

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 430**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2009 E 09710097 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2249864**

54 Título: **Estrategias para prevenir y/o tratar las respuestas inmunitarias a los alofactores solubles**

30 Prioridad:

14.02.2008 EP 08447010

12.03.2008 US 35800 P

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

27.09.2016

73 Titular/es:

**LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW
(50.0%)**

Herestraat 49, bus 913

3000 Leuven, BE y

KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (50.0%)

72 Inventor/es:

SAINT-REMY, JEAN-MARIE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 584 430 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

Estrategias para prevenir y/o tratar las respuestas inmunitarias a los alofactores solubles

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos inmunogénicos y a su uso en la prevención y/o supresión de las respuestas inmunitarias a los alofactores solubles (terapéuticos) tales como los usados en terapia sustitutiva.

Antecedentes de la invención

Un número creciente de polipéptidos o proteínas y factores se utilizan para administración en el contexto de un gran número de enfermedades. Estos incluyen

- 10 - terapia sustitutiva para los defectos de coagulación o defectos fibrinolíticos, incluyendo el factor VIII, factor IX y estafilocinasa,
- hormonas tales como la hormona del crecimiento o la insulina,
- citocinas y factores de crecimiento, tales como interferón-alfa, interferón-gamma, GM-CSF y G-CSF,
- 15 - anticuerpos para la modulación de respuestas inmunitarias, incluyendo anticuerpos anti-IgE en enfermedades alérgicas, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 en el rechazo de trasplantes y en una variedad de enfermedades autoinmunitarias, anticuerpos anti-CD20 en linfomas no Hodgkin,
- eritropoyetina en insuficiencia renal.

20 En muchos casos, la administración de dichos polipéptidos o proteínas o factores provoca la producción de una respuesta inmunitaria específica. Los anticuerpos producidos frente a estos polipéptidos y proteínas o factores dan como resultado la neutralización del efecto terapéutico, un aumento en la tasa de aclaramiento y diversos modos de reacciones de hipersensibilidad, incluyendo la enfermedad del suero, reacciones anafilácticas y erupciones cutáneas.

25 Los anticuerpos provocados frente al agente terapéutico son producidos por los linfocitos B específicos, que se convierten en células efectivas formadoras de anticuerpos por la maduración y diferenciación, lo que requiere tanto la presencia del antígeno (es decir, el agente terapéutico) como la ayuda proporcionada por las células T específicas. Por lo tanto, el polipéptido o proteína es captado por células especializadas en la presentación de antígenos al sistema inmunitario, llamadas células presentadoras de antígeno (APC). Dichas APC están localizadas en sitios en los que se administra el polipéptido o proteína; el bazo en el caso de administración intravenosa, la piel para la administración subcutánea y los nódulos linfáticos regionales para la administración muscular.

30 En términos generales, las APC se separan en dos categorías, a saber, APC profesionales y APC no profesionales. Así, las células dendríticas y las células B (o linfocitos B) se consideran como APC profesionales debido a su capacidad para capturar un antígeno. Las células dendríticas capturan antígenos mediante la captación no específica seguida por el procesamiento activo y la presentación en la superficie celular de los péptidos derivados del antígeno en combinación con determinantes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos B capturan antígenos por medio de su receptor de superficie específico (receptor de células B, BCR) seguido por el procesamiento activo y presentación en el contexto de las moléculas de MHC. Las APC no profesionales son principalmente macrófagos con relativamente poca capacidad para presentar el antígeno, compensada de algún modo por su capacidad para acumularse en los sitios de inflamación.

35 Las respuestas inmunitarias primarias son provocadas por la captación del antígeno por las células dendríticas o los macrófagos, mientras que las respuestas secundarias son dependientes principalmente de células B específicas. Esto es debido a la alta capacidad de las células dendríticas para captar el antígeno, en comparación con las células B primitivas que son muy deficientes en esta actividad. Durante una respuesta inmunitaria secundaria, sin embargo, cuando ya se ha obtenido la maduración de BCR, las células B son con mucho las células presentadoras más eficientes.

40 Como se ha indicado antes, la captación de un antígeno va seguida por el procesamiento y presentación por las moléculas de MHC. Las MHC se dividen en dos categorías, clase I y clase II, codificadas por diferentes locus genéticos. En el hombre, tres locus codifican los antígenos de clase I, llamados A, B y C, y tres locus codifican los antígenos de clase II, llamados DP, DQ y DR.

45 La función de los antígenos de MHC es presentar péptidos a las células T. Se considera clásicamente que los antígenos clase I presentan péptidos principalmente derivados de antígenos celulares endógenos, mientras que los antígenos clase II presentan péptidos generados por el procesamiento de antígenos desde el exterior. Han sido descritas distintas rutas de procesamiento y presentación en la superficie celular para la presentación de antígenos clase I en comparación con la presentación de antígenos clase II.

La producción de anticuerpos específicos requiere la presentación de péptidos en los determinantes de MHC clase II, lo que permite el reconocimiento por y la activación de las células T del subconjunto CD4+. Después de reconocimiento y activación, dichas células T CD4+ producen una serie de citocinas, que proporcionan ayuda a las células B para la maduración completa en células formadoras de anticuerpos.

- 5 El documento de Cao O *et al.* (2004) propone, intentando evitar la respuesta inmunitaria contra un aloantígeno soluble, identificar el epítipo de dicho aloantígeno e inyectarlo "a través de vías específicas, tales como administración oral o nasal (...), lo que induce la anergia de las células T, la delección y activación de las células Th3 reguladoras, que suprimen la respuesta de las células T a través de la secreción de la citocina TGF-beta". Otros documentos sugieren la mutagénesis del epítipo del aloantígeno.
- 10 Cualquier método que pudiera abortar las respuestas inmunitarias a alofactores terapéuticos solubles, tanto en el contexto de las respuestas primarias (que implican principalmente a las células dendríticas) como en el de las respuestas continuas (que implican principalmente a las células B), podría constituir una importante mejora en los tipos de tratamiento tales como los mencionados antes.

Sumario de la invención

- 15 La invención en su sentido más amplio, es como se define en las reivindicaciones independientes.

La presente invención se refiere a péptidos inmunogénicos, como se detalla en las reivindicaciones, para su uso en la prevención o supresión, en un sujeto que espera recibir, que está recibiendo o que ha recibido un aloantígeno soluble, de las respuestas inmunitarias a dicho aloantígeno soluble.

- 20 La presente invención se refiere en un aspecto al menos a un péptido inmunogénico aislado como se detalla en las reivindicaciones, para uso en la prevención o supresión, en un sujeto que espera recibir, que está recibiendo o que ha recibido dicho aloantígeno soluble, de las respuestas inmunitarias a dicho aloantígeno soluble.

- 25 En un aspecto adicional, la descripción se refiere al uso de al menos un péptido inmunogénico aislado como se detalla en las reivindicaciones, para la fabricación de un medicamento para la prevención o supresión, en un sujeto que va a recibir, que está recibiendo o que ha recibido dicho aloantígeno soluble, de la activación de las células T CD4+ efectoras por dicho aloantígeno soluble.

En un aspecto adicional, la descripción cubre también el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado como se detalla en las reivindicaciones, para la fabricación de un medicamento para la inducción, en un sujeto que va a recibir, que está recibiendo o que ha recibido dicho aloantígeno soluble, de las células T CD4+ reguladoras que son citotóxicas para las células que presentan dicho aloantígeno soluble.

- 30 En cualquiera de lo anterior, dicho aloantígeno soluble puede ser una proteína aplicada en terapia sustitutiva, o un factor de coagulación o fibrinolítico, o una hormona, o una citocina o un factor de crecimiento, o un anticuerpo utilizado para fines terapéuticos.

- 35 En cualquiera de lo anterior, el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C en el péptido inmunogénico es inmediatamente adyacente al epítipo de célula T, o está separado del epítipo de célula T por un conector de 7 aminoácidos como máximo.

- 40 En otras realizaciones del péptido inmunogénico para el uso que se detalla en las reivindicaciones, el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C no aparece de forma natural dentro de una región de 11 aminoácidos N- o C-terminalmente adyacente al aloantígeno soluble del cual se deriva el péptido. En realizaciones particulares del péptido inmunogénico para el uso que se indica en las reivindicaciones, el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C está posicionado en el N-terminal del epítipo de célula T. En otras realizaciones particulares del péptido inmunogénico para el uso que se indica en las reivindicaciones, al menos una X en dicho motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es Gly, Ala, Ser o Thr; adicionalmente o alternativamente, al menos una X es His o Pro. En realizaciones particulares del péptido inmunogénico para el uso que se detalla en las reivindicaciones, al menos un C en dicho motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C está metilado.

- 45 En realizaciones particulares del péptido inmunogénico para el uso que se detalla en las reivindicaciones, el péptido inmunogénico comprende además una secuencia de direccionamiento endosómico. Cualquiera de los péptidos inmunogénicos anteriores, puede ser producido por síntesis química o por expresión recombinante.

- 50 Un aspecto adicional de la invención se refiere a métodos *in vitro* para obtener una población de células T CD4+ reguladoras específicas de aloantígeno soluble, que son citotóxicas frente a las células que presentan un epítipo de célula T restringido al MHC de clase II de dicho aloantígeno soluble, comprendiendo dichos métodos las etapas de:

- proporcionar células de sangre periférica;
- poner en contacto dichas células con un péptido inmunogénico que comprende (i) un epítipo de célula T restringido al MHC clase II de un aloantígeno soluble y (ii) un motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, en

donde dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o está separado de dicho epítipo de célula T por un conector de siete aminoácidos como máximo;

- expandir dichas células en la presencia de IL-2, con la condición de que el aloantígeno soluble no es insulina.

5 Las poblaciones de células T CD4+ reguladoras específicas de aloantígeno soluble, que son citotóxicas frente a las células que presentan un epítipo de célula T restringido al MHC clase II de dicho aloantígeno soluble, y que se pueden obtener por los métodos anteriores, con la condición de que el aloantígeno soluble no es insulina, son también parte de la invención, así como dichas células para uso en la prevención o supresión de las respuestas inmunitarias a dicho aloantígeno soluble, en un sujeto que espera recibir, que está recibiendo o que ha recibido dicho aloantígeno.

10 Un aspecto adicional de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados, con una longitud entre 12 y 50 aminoácidos, que comprenden un epítipo de célula T restringido al MHC clase II procedente de un aloantígeno soluble e, inmediatamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o separado de dicho epítipo de célula T por un conector de siete aminoácidos como máximo, un motivo redox C-(X)2-[CST] como se detalla en las reivindicaciones. Más particularmente, la invención proporciona péptidos inmunogénicos de epítipos de aloantígeno soluble, en donde la secuencia natural del aloantígeno soluble no comprende el C-(X)2-C dentro de 11 aminoácidos N- o C-terminalmente adyacente al epítipo.

20 Otro aspecto más de la invención se refiere a al menos un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítipo de célula T restringido al MHC clase II del receptor de células B de una célula B de memoria específica del aloantígeno y (ii) un motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, en donde dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o está separado de dicho epítipo de célula T por un conector de siete aminoácidos como máximo, para uso en la eliminación de células B específicas de aloantígeno en un sujeto que ha recibido dicho aloantígeno.

Leyendas de las figuras

25 Figura 1. Las barras de esta figura ilustran la viabilidad de las células B esplénicas murinas incubadas en diferentes condiciones y evaluadas por análisis Facs de la unión de anexina V y 7-AAD (dos marcadores de apoptosis).

- B: población control de células B primitivas;
- B (cc-pep) + T (cc-pep): células B esplénicas murinas incubadas con epítipo de célula T de anticuerpo anti-FVIII modificado y con células T expandidas con epítipo de célula T modificado (modificación como en "B (cc-pep)");
- 30 - B (wt-pep) + T (cc-pep): células B esplénicas murinas incubadas con epítipo de célula T de anticuerpo anti-FVIII de tipo natural y con células T expandidas con el correspondiente epítipo de célula T modificado.

Véase el ejemplo 1 para detalles de los epítipos de las células T.

Figura 2. Apoptosis de células T efectoras específicas de alofactor por células T CD4+ citolíticas inducidas por un epítipo de célula T derivado de dicho alofactor y modificado por la unión de un motivo de tiorreductasa. El alofactor utilizado fue el factor VIII. Véase el ejemplo 5 para más detalles.

35 Descripción detallada de la invención

Definiciones

40 El término "péptido" cuando se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de entre 2 y 200 aminoácidos, conectada por enlaces peptídicos, pero que en una realización particular, puede comprender estructuras de no aminoácidos (como por ejemplo un compuesto orgánico conector). Los péptidos según la invención pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de los mismos, o pueden contener aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza incorporados por síntesis química de péptidos o por modificación química o enzimática.

45 El término "epítipo" cuando se usa en la presente memoria, se refiere a una o varias porciones (que pueden definir un epítipo conformacional) de una proteína o factor que son específicamente reconocidas y unidas por un anticuerpo o una de sus porciones (Fab', Fab2', etc.) o por un receptor presentado en la superficie celular de un linfocito celular B o T, y que es capaz, por dicha unión, de inducir una respuesta inmunitaria.

50 El término "antígeno" cuando se usa en la presente memoria, se refiere a una estructura de una macromolécula que comprende uno o más haptenos (que generan una respuesta inmunitaria solo cuando están unidos a un portador) y/o que comprende uno o más epítipos de célula T. Típicamente, dicha macromolécula es una proteína o péptido (con o sin polisacáridos) o está constituida por una composición proteica y comprende uno o más epítipos; dicha macromolécula se puede denominar alternativamente en la presente memoria "proteína antigénica" o "péptido antigénico".

El término “alofactor” se refiere a una proteína, péptido o factor (esto es, cualquier molécula) que presenta polimorfismo cuando se compara entre 2 individuos de la misma especie, y que induce una respuesta inmunitaria (alorreactiva) en el sujeto que recibe el alofactor. En la presente memoria descriptiva, “alofactor” significa “aloantígeno”.

- 5 El término “alorreactividad” se refiere a una respuesta inmunitaria en un sujeto que recibe un alofactor, estando dicha respuesta inmunitaria dirigida en principio contra las diferencias alélicas entre el alofactor administrado y la propia versión del factor por parte del receptor. La alorreactividad se aplica a los anticuerpos y a las células T.

10 El término “epítipo de célula T” o “epítipo de célula-T” en el contexto de la presente invención, se refiere a un epítipo de célula T dominante, subdominante o inferior, es decir, una parte de una proteína o factor antigénico que es específicamente reconocida y unida por un receptor en la superficie celular de un linfocito T. El que un epítipo sea dominante, subdominante o inferior depende de la reacción inmunitaria generada contra el epítipo. La dominancia depende de la frecuencia con la que dichos epítipos son reconocidos por las células T y son capaces de activarlas, entre todos los posibles epítipos de célula T de una proteína. En particular, un epítipo de célula T es un epítipo unido por las moléculas de MHC clase I o de MHC clase II.

15 El término “MHC” se refiere al “antígeno mayor de histocompatibilidad”. En los seres humanos, los genes de MHC son conocidos como genes de HLA (“antígeno leucocitario humano”). Aunque no se sigue ninguna convención de manera regular, parte de la bibliografía utiliza HLA para referirse a las moléculas de proteína de HLA, y MHC para referirse a los genes que codifican las proteínas del HLA. Como tales, los términos “MHC” y “HLA” son equivalentes cuando se usan en la presente memoria. El sistema HLA en el hombre tiene su equivalente en el ratón, esto es, el sistema H2. Los genes de HLA estudiados más a fondo son los nueve genes del MHC llamados clásicos: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, y HLA-DRB1. En los seres humanos, el MHC se divide en tres regiones: Clase I, II, y III. Los genes A, B, y C pertenecen al MHC clase I, mientras que los seis genes D pertenecen a la clase II. Las moléculas de MHC clase I están constituidas por una sola cadena polimórfica que contiene 3 dominios (alfa 1, 2 y 3), que se asocia con la microglobulina beta 2 en la superficie celular. Las moléculas de clase II están constituidas por 2 cadenas polimórficas, que contienen cada una de ellas 2 cadenas (alfa 1 y 2, y beta 1 y 2).

20 Las moléculas de MHC clase I se expresan virtualmente sobre todas las células nucleadas. Los fragmentos de péptido presentados en el contexto de las moléculas de MHC clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8+ (linfocitos T citotóxicos o CTL). Los linfocitos T CD8+ maduran frecuentemente a efectores citotóxicos que pueden lisar las células que llevan el antígeno estimulante. Las moléculas de MHC clase II se expresan principalmente sobre linfocitos activados y células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T CD4+ (linfocitos T auxiliares o HTL) se activan con el reconocimiento de un único fragmento peptídico presentado por una molécula de MHC clase II, que normalmente se encuentra sobre una célula presentadora de antígeno tal como un macrófago o una célula dendrítica. Los linfocitos T CD4+ proliferan y segregan citocinas que o bien mantienen una respuesta mediada por anticuerpos a través de la producción de IL-4 e IL-10 o bien mantienen una respuesta mediada por células a través de la producción de IL-2 e IFN-gamma.

30 Los HLA funcionales se caracterizan por un surco de unión profundo al que se unen péptidos potencialmente antigénicos tanto endógenos como extraños. El surco se caracteriza además por una forma y por unas propiedades fisicoquímicas bien definidas. Los sitios de unión del HLA clase I son cerrados, porque los extremos terminales del péptido están inmovilizados en los extremos del surco. También están implicados en una red de enlaces de hidrógeno con residuos conservados de HLA. A la vista de estas restricciones, la longitud de los péptidos unidos se limita a 8-10 residuos. Sin embargo, se ha demostrado que péptidos de hasta 12 residuos de aminoácidos, también son capaces de unirse a HLA clase I. La superposición de las estructuras de diferentes complejos de HLA confirmó un modo general de unión en donde los péptidos adoptan una conformación extendida, relativamente lineal.

40 A diferencia de los sitios de unión de HLA clase I, los sitios de clase II, están abiertos por ambos extremos. Esto permite que los péptidos se extiendan desde la región de unión real, “colgando” de este modo por ambos extremos. Los HLA clase II pueden por lo tanto unir ligandos peptídicos de longitud variable, que varía de 9 a más de 25 residuos de aminoácidos. De forma similar al HLA de clase I, la afinidad de un ligando de clase II se determina por un componente “constante” y un componente “variable”. La parte constante es otra vez el resultado de una red de enlaces de hidrógeno formada entre residuos conservados en el surco de HLA clase II y la cadena principal de un péptido unido. Sin embargo, este patrón de enlace de hidrógeno no se limita a los residuos N- y C-terminales del péptido, sino que se distribuye por toda la cadena. Lo último es importante porque limita la conformación de los péptidos que forman complejos a un modo de unión estrictamente lineal. Esto es común para todos los alotipos de clase II. El segundo componente que determina la afinidad de unión de un péptido es variable debido a ciertas posiciones de polimorfismo dentro de los sitios de unión de clase II. Diferentes alotipos forman diferentes bolsillos complementarios dentro del surco, explicando de este modo la selección de péptidos dependiente del subtipo, o especificidad. Es importante destacar que las restricciones sobre los residuos de aminoácidos mantenidos dentro de los bolsillos de la clase II son en general “más suaves” que para la clase I. Hay mucha más reactividad cruzada de péptidos entre diferentes alotipos de HLA de clase II. La secuencia de los +/- 9 aminoácidos de un epítipo de células T del MHC de clase II que encaja en el surco de la molécula de MHC II se numera normalmente como P1 a P9. Los

aminoácidos adicionales del N-terminal del epítipo se numeran como P-1, P-2 y así sucesivamente, los aminoácidos del C-terminal del epítipo se numeran como P+1, P+2 y así sucesivamente.

5 El término “compuesto orgánico que tiene una actividad reductora” cuando se usa en la presente memoria se refiere a compuestos, más en particular secuencias de aminoácidos, capaces de reducir enlaces disulfuro en las proteínas. Un término usado alternativamente para dicha secuencia de aminoácidos es “motivo redox”.

10 El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad del péptido de la invención o su derivado, que produce el efecto terapéutico o preventivo deseado en un paciente. Por ejemplo, con referencia a una enfermedad o trastorno, es la cantidad que reduce hasta cierto punto uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, y más particularmente que vuelve a la normalidad, ya sea parcial o completamente, los parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o causantes de la enfermedad o trastorno. Según una realización particular de la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo, que llevará a una mejora o restablecimiento de la situación fisiológica normal. Por ejemplo, cuando se usa para tratar terapéuticamente a un mamífero afectado por un trastorno inmunitario, es la cantidad diaria de péptido/kg de peso corporal de dicho mamífero. Alternativamente, cuando la administración es a través de terapia génica, la cantidad de ADN desnudo o de vectores virales se ajusta para garantizar la producción local de la dosis relevante del péptido de la invención, derivado u homólogo del mismo.

20 El término “natural” cuando se usa en esta memoria refiriéndose a una secuencia n, se refiere al hecho de que la secuencia (de aminoácidos o nucleótidos) es idéntica a una secuencia de origen natural o es idéntica a parte de dicha secuencia de origen natural. A diferencia de esto, el término “artificial” se refiere a una secuencia que como tal no está presente en la naturaleza. A menos que se especifique otra cosa, los términos natural y artificial refiriéndose a una secuencia, se refieren exclusivamente, por lo tanto, a una secuencia particular de aminoácidos (o de nucleótidos) (p. ej. la secuencia del péptido inmunogénico, una secuencia comprendida dentro del péptido inmunogénico, una secuencia epitópica) y no se refieren a la naturaleza del péptido inmunogénico como tal.

25 Opcionalmente, una secuencia artificial se obtiene a partir de una secuencia natural mediante modificaciones limitadas tales como el cambio de uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de origen natural o por la adición de aminoácidos al N- o C-terminal de una secuencia de origen natural. Los aminoácidos se denominan en esta memoria con su nombre completo, su abreviatura de tres letras o su abreviatura de una letra.

30 Los motivos de las secuencias de aminoácidos se escriben en esta memoria según el formato de Prosite (Hulo et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34 (Database issue D227-D230). El símbolo X se utiliza para una posición en la que se acepta cualquier aminoácido. Las alternativas se indican listando los aminoácidos aceptables para una posición dada, entre corchetes (“[]”). Por ejemplo: [CST] representa un aminoácido seleccionado de Cys, Ser o Thr. Los aminoácidos que se excluyen como alternativas se indican listándolos entre llaves (“{ }”). Por ejemplo {AM} representa cualquier aminoácido excepto Ala y Met. Los diferentes elementos en un motivo se separan entre sí por un guion -. La repetición de un elemento idéntico dentro de un motivo se puede indicar poniendo detrás de ese elemento un valor numérico o un intervalo numérico entre paréntesis. Por ejemplo: X(2) corresponde a X-X, X(2,4) corresponde a X-X o X-X-X o X-X-X-X, A(3) corresponde a A-A-A.

40 El término “homólogo” cuando se usa en esta memoria con referencia a los epítipos utilizados en el contexto de la invención, se refiere a moléculas que tienen al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el epítipo de origen natural, manteniendo de este modo la capacidad del epítipo de unirse a un anticuerpo o receptor de la superficie celular de una célula B y/o T. Las realizaciones particulares de los homólogos de un epítipo corresponden al epítipo natural modificado a lo sumo en tres, más particularmente a lo sumo en dos, y lo más particularmente en un aminoácido.

45 El término “derivado” cuando se usa en esta memoria con referencia a los péptidos de la invención, se refiere a moléculas que contienen al menos la porción activa del péptido (esto es, capaz de provocar la actividad citolítica de las células T CD4+) y además de eso comprende una porción complementaria que puede tener diferentes fines tales como estabilizar los péptidos o alterar las propiedades farmacodinámicas o farmacocinéticas del péptido.

50 El término “identidad de secuencia” de dos secuencias, cuando se usa en esta memoria, se refiere al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos de la más corta de las secuencias, cuando se alinean las dos secuencias. En realizaciones particulares, dicha identidad de secuencia es de 70 % a 80 %, de 81 % a 85 %, de 96 % a 90 %, de 91 % a 95 %, de 95 % a 100 %, o 100%.

55 Los términos “polinucleótido (o ácido nucleico) codificante de péptido” y “polinucleótido (o ácido nucleico) que codifica un péptido” cuando se usan en esta memoria, se refieren a una secuencia de nucleótidos, que, cuando se expresa en un entorno apropiado, da como resultado la generación de la secuencia del péptido relevante o de un derivado u homólogo del mismo. Dichos polinucleótidos o ácidos nucleicos incluyen las secuencias normales codificantes del péptido, así como derivados y fragmentos de estos ácidos nucleicos capaces de expresar un péptido con la actividad requerida. Según una realización, el ácido nucleico que codifica los péptidos según la invención o fragmentos de los mismos, es una secuencia codificante del péptido o de un fragmento del mismo que se origina de un mamífero o que corresponde a un mamífero, más particularmente un fragmento peptídico humano.

La presente invención encuentra su origen en la observación de que las células T CD4+ aisladas de ratones primitivos, inmunizados con un anticuerpo humano, y posteriormente estimulados con epítipo de célula T modificado derivado de dicho anticuerpo, fueron capaces de llevar las células B primitivas que presentan dicho epítipo de célula T (natural o modificado) a la apoptosis. La modificación del epítipo de célula T que existía allí fue que se extendió
 5 mediante un motivo capaz de catalizar el arrastre del puente disulfuro en proteínas, esto es, una secuencia que contiene actividad de tiorreductasa (de aquí en adelante denominado simplemente motivo redox).

Por lo tanto, la presente invención proporciona péptidos para uso en la prevención y/o supresión de las respuestas inmunitarias contra las proteínas derivadas de alofactores solubles como los utilizados p. ej. en terapia sustitutiva, como se detalla en las reivindicaciones. En particular, la descripción proporciona modos para prevenir el desarrollo
 10 de y/o suprimir la respuesta de las células T CD4+ efectoras (denominadas, alternativamente, células T espectadoras). En cambio, se inducen células T CD4+ reguladoras que son capaces de inducir específicamente la apoptosis de las APC (tales como las células B) que presentan epítopos de célula T procesados a partir de alofactores solubles, evitando de este modo la formación de anticuerpos específicos.

Los compuestos utilizados para conseguir lo anterior, son péptidos inmunogénicos que abarcan la secuencia de un epítipo de célula T derivado de alofactores solubles (p. ej. por procesamiento) y presentados en el contexto de los determinantes del MHC de clase II unido a un motivo redox tal como C-/X)2-C, como se detalla en las reivindicaciones. El epítipo de célula T modificado de este modo altera el patrón de activación y la función de las células T CD4+, ya sea *de novo* a partir de células T intactas en un contexto de prevención, o ya sea modificando las propiedades de las células T de memoria, dando ambos como resultado una fuerte capacidad para inducir la
 15 apoptosis de las APC. De este modo, se evitan y/o se suprimen las respuestas de los anticuerpos y de las células frente a los alofactores solubles. Más específicamente, la eliminación de una APC (células dendríticas o macrófagos, o células B, en el contexto de las respuestas inmunitarias primarias y secundarias, respectivamente) que presenta péptidos unidos al MHC de clase II procesados de alofactores solubles, da como resultado la inducción de la tolerancia a dichos alofactores solubles. Por lo tanto, un importante efecto secundario p. ej. de la terapia sustitutiva,
 20 se elimina utilizando los compuestos descritos anteriormente.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a al menos un péptido inmunogénico aislado según la invención para uso en la prevención o supresión, en un sujeto que espera recibir, que está recibiendo o que ha recibido un alofactor soluble, de la respuesta inmunitaria a dicho alofactor soluble, como se detalla en las reivindicaciones. Más particularmente, la invención se refiere a al menos un péptido inmunogénico aislado, como se detalla en las
 30 reivindicaciones, para uso en la prevención o supresión, en un sujeto que espera recibir, que está recibiendo o que ha recibido dicho alofactor soluble, de las respuestas inmunitarias a dicho alofactor soluble. Por lo tanto, dicho péptido inmunogénico o el medicamento que lo comprende, se puede utilizar para el tratamiento previo o profiláctico o inmunización de un sujeto que recibirá (y por consiguiente se espera que reciba) (o que está recibiendo) dicho alofactor soluble (terapéutico) con el fin de suprimir, evitar, reducir parcial o totalmente, o eliminar (parcial o
 35 totalmente) la respuesta o respuestas inmunitarias inducidas por el alofactor soluble administrado posteriormente. Del mismo modo, dicho péptido inmunogénico o el medicamento que lo comprende, se puede usar para el tratamiento terapéutico o inmunización de un sujeto que ha recibido (o está recibiendo) dicho alofactor soluble (terapéutico) con el fin de suprimir, evitar, reducir parcial o totalmente, o eliminar (parcial o totalmente) la respuesta o respuestas inmunitarias en curso inducidas por la administración de dicho alofactor soluble.

En un aspecto adicional, la descripción se refiere al uso de al menos un péptido inmunogénico aislado, como se detalla en las reivindicaciones, para la fabricación de un medicamento para prevenir, en un sujeto, que va a recibir,
 40 que está recibiendo o que ha recibido dicho alofactor soluble, la activación de las células T CD4+ efectoras por dicho alofactor soluble.

En un aspecto adicional, la descripción cubre también el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado, como se detalla en las reivindicaciones, para la fabricación de un medicamento para la inducción, en un sujeto que va a recibir, que está recibiendo o que ha recibido dicho alofactor soluble, de las células T CD4+ reguladoras que son
 45 citotóxicas para las células que presentan dicho alofactor soluble.

En los aspectos anteriores de la invención, el péptido inmunogénico o el medicamento que lo comprende, puede ser para uso como tratamiento previo o profiláctico o para inmunización de un sujeto que recibirá (o está recibiendo) dicho alofactor soluble (terapéutico) con el fin de suprimir, evitar, reducir parcial o totalmente, o eliminar (parcial o
 50 totalmente) una activación normalmente esperada en el receptor de las células T CD4+ efectoras frente al alofactor soluble siguiendo o de forma posterior a la administración real de dicho alofactor soluble. Del mismo modo, los uno o más péptidos inmunogénicos o los medicamentos que los comprenden, pueden ser para uso como tratamiento terapéutico o inmunización de un sujeto que ha recibido (o está recibiendo) dicho alofactor soluble (terapéutico) con el fin de suprimir, reducir parcial o totalmente, o eliminar (parcial o totalmente) la activación en el receptor de las células T CD4+ efectoras y/o células T CD8+ frente al alofactor soluble de forma simultánea con o después de la administración real de dicho alofactor soluble. Alternativamente, o de forma simultánea con cualquiera de lo anterior,
 55 el péptido inmunogénico o el medicamento que lo comprende, puede ser para uso como tratamiento previo o profiláctico o inmunización de un sujeto que recibirá (o está recibiendo) dicho alofactor soluble (terapéutico) con el fin de inducir una activación normalmente inesperada en el receptor de las células T CD4+ reguladoras específicas del alofactor soluble, capaces de destruir las células que presentan uno o más antígenos de alofactor soluble siguiendo
 60

o de forma posterior a la administración real de dicho alofactor soluble. Del mismo modo, dicho péptido inmunogénico o el medicamento que lo comprende, puede ser para uso como tratamiento terapéutico o inmunización de un sujeto que ha recibido (o está recibiendo) dicho alofactor soluble (terapéutico) con el fin de inducir la activación en dicho sujeto de células T CD4+ reguladoras específicas del alofactor soluble capaces de destruir las células que presentan dicho alofactor soluble. Dicha inducción puede tener lugar de forma simultánea con o después de la administración real de dicho alofactor soluble.

En cualquiera de los usos descritos anteriormente en la presente memoria, el sujeto o receptor es un mamífero, en particular un primate (no humano) o un ser humano.

En cualquiera de los usos anteriores, el alofactor soluble puede ser una proteína aplicada en terapia sustitutiva, o un factor de coagulación o fibrinolítico, o una hormona, o una citocina o un factor de crecimiento, o un anticuerpo utilizado para fines terapéuticos. Una lista no limitante de posibles alofactores incluye el factor VIII; factor IX, estafilocinasa, hormona del crecimiento, insulina, citocinas y factores del crecimiento (tales como interferón-alfa, interferón-gamma, GM-CSF y G-CSF), anticuerpos para la modulación de respuestas inmunitarias (incluyendo anticuerpos anti-IgE en enfermedades alérgicas, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 en rechazo de trasplantes y una variedad de enfermedades autoinmunitarias. anticuerpos anti-CD20 en linfomas no Hodgkin) y eritropoyetina en la insuficiencia renal.

Las células T reguladoras citotóxicas generadas por los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden suprimir las respuestas inmunitarias incluso contra los alofactores solubles (terapéuticos) complejos. Un requisito mínimo para que dichas células se activen es que reconozcan un péptido cognado presentado por determinantes del MHC de clase II, llevando a la apoptosis de las células presentadoras de antígeno, suprimiendo de este modo las respuestas de las células T (células T tanto CD4+ como CD8+) contra todos los epítomos de célula T presentados por la APC. Un mecanismo adicional por el cual las células T reguladoras citotóxicas pueden suprimir la respuesta inmunitaria global frente a los antígenos complejos es suprimiendo la activación de las células T espectadoras.

Se prevé que hay situaciones en las que más de un antígeno de alofactor soluble contribuye a una respuesta inmunitaria frente a un alofactor soluble. En tales circunstancias, la misma APC puede no presentar todos los antígenos de alofactores solubles relevantes, ya que algunos de dichos antígenos pueden ser captados por las APC potencialmente diferentes. Se puede prever por tanto que la combinación de dos o más péptidos inmunogénicos se puede utilizar para la prevención y supresión de las respuestas inmunitarias frente a dicho alofactor soluble.

En un aspecto adicional de la invención dicho péptido inmunogénico es reemplazado por células T CD4+ reguladoras sensibilizadas con dicho péptido inmunogénico, como se detalla en las reivindicaciones. En un aspecto adicional más, se prevén métodos tales como los descritos anteriormente en donde el péptido inmunogénico es reemplazado por una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido inmunogénico (p. ej. en la forma de DNA desnudo o un vector viral que se administra a un individuo en lugar del péptido inmunogénico). En adición, se puede usar una combinación de múltiples péptidos inmunogénicos, esto es, más de 1 (p. ej. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) en cualquiera de lo anterior. Estos aspectos de la invención, así como la modificación posterior del péptido inmunogénico se describen en detalle más adelante.

La presente invención se basa en el hallazgo de que un péptido inmunogénico que comprende un epítomo de célula T derivado de un alofactor soluble (terapéutico) y una secuencia peptídica, que tiene actividad reductora, es capaz de generar una población de células T CD4+ reguladoras, que tienen un efecto citotóxico sobre las células presentadoras de antígeno. Se basa adicionalmente en el hallazgo de que dicho péptido inmunogénico es capaz de prevenir la activación de las células T CD8+ específicas del alofactor soluble y/o de las células T CD4+ efectoras.

Por consiguiente, la invención se refiere a péptidos inmunogénicos, que comprenden al menos un epítomo de célula T de un alofactor soluble (terapéutico) con un potencial para desencadenar una reacción inmunitaria, acoplado a un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora, tal como un motivo de secuencia de tiorreductasa como se describe en las realizaciones. El epítomo de célula T y el compuesto orgánico están separados por una secuencia conectora de siete aminoácidos como máximo. En otras realizaciones opcionales el péptido inmunogénico comprende adicionalmente una secuencia de direccionamiento endosómico (p. ej. secuencia de direccionamiento endosómico tardío) y/o secuencias "flanqueantes" adicionales.

Los péptidos inmunogénicos de la invención se pueden representar esquemáticamente como A-L-B o B-L-A, en donde A representa un epítomo de célula T de un antígeno (propio o no propio) con un potencial para desencadenar una reacción inmunitaria, L representa un conector y B representa un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora.

La actividad reductora de un compuesto orgánico se puede valorar por su capacidad para reducir un grupo sulfhidrilo tal como en el ensayo de solubilidad de la insulina conocido en la técnica, en donde la solubilidad de la insulina es alterada después de la reducción, o con una insulina marcada con fluorescencia. El compuesto orgánico reductor se puede acoplar en el lado amino-terminal del epítomo de célula T o en el carboxi-terminal del epítomo de célula T.

En general, el compuesto orgánico con actividad reductora es una secuencia peptídica. Los fragmentos peptídicos con actividad reductora se encuentran en las tiorreductasas que son pequeñas enzimas reductoras de disulfuro que

incluyen glutarredoxinas, nucleorredoxinas, tiorredoxinas y otras oxidorreductasas de tiol/disulfuro. Estas ejercen actividad reductora de los enlaces disulfuro sobre proteínas (tales como enzimas) a través de cisteínas con actividad redox dentro de secuencias consenso de dominio activo conservado: C- X(2)-C, C-X(2)-S, C-X(2)-T, S-X(2)-C, T-X(2)-C (Fomenko et al. (23) Biochemistry 42, 11214-11225), en las que X representa cualquier aminoácido. Dichos dominios se encuentran también en proteínas más grandes tales como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y la fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos.

Por consiguiente, en realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos según la presente invención comprenden como motivo redox el motivo de la secuencia de tiorreductasa [C]-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-[C], como se detalla en las reivindicaciones. En la presente solicitud dicho tetrapéptido será denominado "el motivo". En realizaciones particulares, los péptidos de la invención contienen el motivo de secuencia [C]-X(2)-[CS] o [CS]-X(2)-[C], como se detalla en las reivindicaciones. En realizaciones más particulares los péptidos contienen el motivo de secuencia C-X(2)-S, S-X(2)-C o C-X(2)-C, como se detalla en las reivindicaciones.

Como se explica con detalle más adelante, los péptidos inmunogénicos de la presente invención se pueden preparar por síntesis química, lo que permite la incorporación de aminoácidos no naturales. Por consiguiente, en el motivo de los compuestos reductores según realizaciones particulares de la presente invención, C representa o cisteína u otros aminoácidos con un grupo tiol tales como mercaptovalina, homocisteína u otros aminoácidos naturales o no naturales con una función tiol. Con el fin de tener actividad reductora, las cisteínas presentes en el motivo no deberían presentarse como parte de un puente disulfuro de cisteína. Sin embargo, el motivo puede comprender cisteínas modificadas tal como cisteína metilada, que se convierte *in vivo* en cisteína con grupos tiol libres.

Cada uno de los aminoácidos X en el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C de realizaciones particulares de los péptidos inmunogénicos de la invención, puede ser cualquier aminoácido natural, incluyendo S, C o T o puede ser un aminoácido no natural. En realizaciones particulares X es un aminoácido con una cadena lateral pequeña tal como Gly, Ala, Ser o Thr. En realizaciones particulares adicionales, X no es un aminoácido con una cadena lateral voluminosa tal como Tyr. En otras realizaciones particulares al menos una X en el motivo [CST]-X(2)-[CST] es His o Pro.

En los péptidos inmunogénicos para uso en los métodos de la presente invención que comprenden el motivo (redox) descrito anteriormente, el motivo se localiza de tal manera que, cuando el epítipo encaja en el surco del MHC, el motivo se mantiene fuera del surco de unión al MHC. El motivo está localizado o inmediatamente adyacente a la secuencia epitópica dentro del péptido, o está separado del epítipo de célula T por un conector de 7 aminoácidos o menos. De forma más particular, el conector comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. Alternativamente, un conector puede comprender 6 aminoácidos. Los aminoácidos típicos usados en conectores son serina y treonina. Ejemplos de péptidos con conectores de acuerdo con la presente invención son CXXC-G-epítipo (SEC ID NO: 6), CXXC-GG-epítipo (SEC ID NO: 7), CXXC-SSS-epítipo (SEC ID NO: 8), CXXC-SGSG-epítipo (SEC ID NO: 9) y similares.

En aquellas realizaciones particulares de los péptidos de la invención en las que la secuencia del motivo es adyacente a la secuencia epitópica esto se indica como posición P-4 a P-1 o P+1 a P+4 comparada con la secuencia epitópica. Además de un conector peptídico se pueden usar otros compuestos orgánicos como conectores para conectar entre sí las partes del péptido inmunogénico.

Los péptidos inmunogénicos para uso en los métodos y aplicaciones de la presente invención pueden comprender además secuencias adicionales cortas de aminoácidos en el N-terminal o C-terminal de la secuencia (artificial) que comprende el epítipo de célula T y el compuesto reductor (motivo). Dicha secuencia de aminoácidos se denomina de forma general en la presente memoria "secuencia flanqueante". Una secuencia flanqueante puede estar localizada de forma N-terminal y/o C-terminal respecto del motivo redox y/o del epítipo de célula T en el péptido inmunogénico. Cuando el péptido inmunogénico comprende una secuencia de direccionamiento endosómico, una secuencia flanqueante puede estar presente entre el epítipo y una secuencia de direccionamiento endosómico y/o entre el compuesto reductor (por ejemplo, el motivo) y una secuencia de direccionamiento endosómico. Más particularmente una secuencia flanqueante es una secuencia de hasta 10 aminoácidos, o de entre 1 y 7 aminoácidos, tal como una secuencia de 2 aminoácidos.

En realizaciones particulares de la invención, el motivo redox en el péptido inmunogénico está localizado de forma N-terminal respecto al epítipo.

En realizaciones particulares adicionales, cuando el motivo redox presente en el péptido inmunogénico contiene una cisteína, esta cisteína está presente en el motivo en la posición más lejana desde el epítipo, por tanto, el motivo se encuentra como C- X(2)-[ST] o C-X(2)-S de forma N-terminal del epítipo o se encuentra como [ST]-X(2)-C o S-X(2)-C de forma carboxi-terminal del epítipo.

En ciertas realizaciones de la presente invención, se proporcionan péptidos inmunogénicos que comprenden una secuencia epitópica y una secuencia del motivo. En realizaciones particulares adicionales, el motivo se encuentra varias veces (1, 2, 3, 4 o incluso más veces) en el péptido, por ejemplo, como repeticiones del motivo que pueden estar espaciadas una de otra por uno o más aminoácidos (por ejemplo, CXXC X CXXC X CXXC; SEC ID NO: 10), como repeticiones que son adyacentes entre sí (CXXC CXXC CXXC; SEC ID NO: 11) o como repeticiones que se

solapan entre sí CXXCXXCXXC (SEC ID NO: 12) o CXCCXCCXCC (SEC ID NO: 13)). De manera alternativa, se proporcionan uno o más motivos tanto en el N-terminal como en el C-terminal de la secuencia del epítipo de la célula T. Otras variaciones previstas para los péptidos inmunogénicos de la presente invención incluyen péptidos que contienen repeticiones de una secuencia de epítipo de célula T o múltiples epítipos de célula T diferentes en donde cada epítipo está precedido y/o seguido por el motivo (por ejemplo, repeticiones de "motivo-epítipo" o repeticiones de "motivo-epítipo-motivo"). En la presente memoria los motivos pueden tener todos la misma secuencia, pero esto no es obligatorio. Se señala que las secuencias repetitivas de péptidos que comprenden un epítipo que comprende en sí mismo el motivo darán también como resultado una secuencia que comprende tanto el 'epítipo' como un 'motivo'. En tales péptidos, el motivo dentro de una secuencia epitópica funciona como un motivo fuera de una segunda secuencia epitópica. Sin embargo, en realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la presente invención comprenden solamente un epítipo de célula T.

Como se ha descrito anteriormente, los péptidos inmunogénicos para uso en métodos según la invención comprenden, además de un compuesto reductor/motivo, un epítipo de célula T derivado de un alofactor soluble. Un epítipo de célula T en una secuencia proteica se puede identificar mediante ensayos funcionales y/o mediante uno o más ensayos de predicción *in silico*. Los aminoácidos en una secuencia de epítipo de célula T se numeran según su posición en el surco de unión de las proteínas del MHC. En realizaciones particulares, el epítipo de célula T presente dentro de los péptidos de la invención consiste en entre 8 y 25 aminoácidos, aun más particularmente en entre 8 y 16 aminoácidos, y aún lo más particularmente consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos. En una realización más particular, el epítipo de célula T consiste en una secuencia de 9 aminoácidos. El epítipo de célula T es un epítipo, que se presenta a las células T mediante las moléculas de MHC de clase II. En realizaciones particulares de la presente invención, la secuencia del epítipo de célula T es una secuencia epitópica que encaja en la hendidura de una proteína del MHC II, más particularmente un nonapéptido que encaja en la hendidura del MHC II. El epítipo de célula T de los péptidos inmunogénicos de la invención puede corresponder a una secuencia epitópica natural de una proteína o puede ser una versión modificada de la misma, con la condición de que el epítipo de célula T modificado conserve su capacidad de unirse dentro de la hendidura del MHC, de modo similar a la secuencia del epítipo de célula T natural. El epítipo de célula T modificado puede tener la misma afinidad de unión para la proteína de MHC que el epítipo natural, pero también puede tener una afinidad disminuida. En realizaciones particulares la afinidad de unión del péptido modificado no es inferior a 10 veces menos que el péptido original, más particularmente no inferior a 5 veces menos. Es un hallazgo de la presente invención que los péptidos de la presente invención tienen un efecto estabilizante sobre los complejos de proteínas. Por consiguiente, el efecto estabilizante del complejo péptido-MHC compensa la disminución de afinidad del epítipo modificado por la molécula de MHC.

En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos para uso en los métodos de la invención comprenden además una secuencia de aminoácidos (u otro compuesto orgánico) que facilita la captación del péptido en los endosomas (tardíos) para el procesamiento y presentación dentro de los determinantes del MHC clase II. El direccionamiento endosómico tardío está mediado por señales presentes en la cola citoplasmática de proteínas y corresponde a motivos peptídicos bien identificados tales como el motivo [DE]XXXL[L] (SEC ID NO:14) basado en dileucina o el motivo DXLL (SEC ID NO:15) (por ejemplo, DXLL; SEC ID NO:16); el motivo YXXØ basado en tirosina o el denominado motivo de racimo ácido. El símbolo Ø representa residuos de aminoácidos con una cadena lateral hidrófoba voluminosa tal como Phe, Tyr y Trp. Las secuencias de direccionamiento endosómico tardío permiten el procesamiento y la presentación eficiente del epítipo de células T derivado de antígeno por las moléculas del MHC clase II. Dichas secuencias de direccionamiento endosómico están contenidas, por ejemplo, dentro de la proteína gp75 (Vijayasaradhi et al. (1995) J Cell Biol 130, 807-820), la proteína CD3 gamma humana, la HLA-BM β (Copier et al. (1996) J. Immunol. 157, 1017-1027), la cola citoplasmática del receptor de DEC205 (Mahnke et al. (2000) J Cell Biol 151, 673-683). Otros ejemplos de péptidos que funcionan como señales de clasificación para el endosoma están descritos en la revisión de Bonifacio and Traub (2003) Annu. Rev. Biochem. 72, 395-447. Alternativamente, la secuencia puede ser la de un epítipo de célula T subdominante o menor procedente de una proteína, que facilita la captación en endosomas tardíos sin superar la respuesta de células T frente al epítipo de células T derivado del alofactor soluble.

Los péptidos inmunogénicos para uso en los métodos de la invención se pueden generar por acoplamiento de un motivo reductor como se describe en la presente memoria, en el N-terminal o C-terminal con respecto a un epítipo de células T del alofactor soluble (terapéutico) (bien directamente adyacente al mismo o separado por un conector). Además, la secuencia del epítipo de célula T del péptido inmunogénico y/o el motivo redox se pueden modificar y/o se pueden introducir (o modificar) una o más secuencias flanqueantes y/o una secuencia de direccionamiento, en comparación con la secuencia del epítipo de célula T de origen natural. Por consiguiente, la secuencia resultante del péptido inmunogénico diferirá en la mayoría de los casos de la secuencia de la proteína del alofactor soluble de interés. En estos casos, los péptidos inmunogénicos de la invención son péptidos con una secuencia 'artificial', de origen no natural.

Los péptidos inmunogénicos para uso en el contexto de la invención, pueden variar sustancialmente en longitud, por ejemplo, de aproximadamente 12-13 aminoácidos (un epítipo de célula T de 8-9 aminoácidos y el motivo redox de 4 aminoácidos) hasta 50 o más aminoácidos, como se detalla en las reivindicaciones. Por ejemplo, un péptido inmunogénico según la invención puede comprender una secuencia de direccionamiento endosómico de 40 aminoácidos, una secuencia flanqueante de aproximadamente 2 aminoácidos, un motivo como se describe en la

presente memoria de 4 aminoácidos, un conector de 4 aminoácidos y un péptido epitópico de célula T de 9 aminoácidos. En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención consisten en entre 12 aminoácidos y 20 hasta 25, 30, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos. En una realización más particular, los péptidos consisten en entre 10 y 20 aminoácidos. Más particularmente, el compuesto reductor es un motivo redox como se describe en la presente memoria, y la longitud del péptido inmunogénico que comprende el epítipo y el motivo opcionalmente conectado por un conector es de 19 aminoácidos o menos, por ejemplo 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos.

Como se ha detallado antes, los péptidos inmunogénicos para uso en el contexto de la presente invención comprenden un motivo reductor como se describe aquí conectado a una secuencia de epítipo de célula T. Según una realización particular, los epítipos de células T se derivan de alofactores solubles que no comprenden dentro de su secuencia natural nativa, una secuencia de aminoácidos con propiedades redox dentro de una secuencia de 11 aminoácidos adyacente en el N o C terminal al epítipo de célula T de interés. Más particularmente, la invención abarca la generación de péptidos inmunogénicos a partir de alofactores solubles que no comprenden una secuencia seleccionada de C-X(2)-S, S-X(2)-C, C-X(2)-C, S-X(2)-S, C-X(2)-T, T-X(2)-C dentro de una secuencia de 11 aminoácidos adyacente en el N o C terminal a la secuencia del epítipo, como se detalla en las reivindicaciones. En realizaciones particulares adicionales, la presente invención proporciona péptidos inmunogénicos de alofactores solubles que no comprenden las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente con propiedades redox dentro de su secuencia, como se detalla en las reivindicaciones.

En realizaciones particulares adicionales, los péptidos inmunogénicos de la invención son péptidos que comprenden epítipos de células T, en donde los epítipos de células T no comprenden una secuencia de aminoácidos con propiedades redox dentro de su secuencia natural, como se detalla en las reivindicaciones. Sin embargo, en realizaciones alternativas, un epítipo de células T que se une a la hendidura del MHC puede comprender un motivo redox tal como se describe en la presente memoria dentro de su secuencia epitópica; los péptidos inmunogénicos según la invención que comprenden dicho epítipo de célula T deben comprender además otro motivo redox acoplado (adyacente o separado por un conector) en el N o C terminal con respecto al epítipo de tal manera que el motivo unido puede asegurar la actividad reductora (al contrario del motivo presente en el epítipo, que se oculta dentro de la hendidura).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para generar péptidos inmunogénicos de la presente invención descritos en esta memoria. Tales métodos incluyen la identificación de epítipos de células T en un alofactor soluble de interés; en la técnica se conocen modos para la identificación *in vitro* e *in silico* de epítipos de células T y a partir de ahora se desarrollan algunos aspectos. Los péptidos inmunogénicos generados se pueden evaluar opcionalmente en cuanto a la capacidad para inducir células T CD4+ reguladoras específicas de alofactores solubles que son citotóxicas para las células que presentan (partes de) el alofactor soluble de interés.

Los péptidos inmunogénicos según la invención se generan partiendo del epítipo o epítipos de células T del alofactor o alofactores solubles de interés. En particular, el epítipo de célula T utilizado puede ser un epítipo de célula T dominante. La identificación y selección de un epítipo de célula T de un alofactor soluble, para su uso en el contexto de la presente invención, se realiza por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias peptídicas aisladas de un alofactor soluble se ensayan, por ejemplo, mediante técnicas de biología celular de células T, para determinar si las secuencias peptídicas provocan una respuesta de células T. Aquellas secuencias peptídicas que se encuentra que provocan una respuesta de células T se definen como poseedoras de actividad estimulante de células T. La actividad estimulante de células T humanas se puede ensayar además cultivando células T obtenidas de un individuo sensibilizado frente a un alofactor soluble con un péptido/epítipo derivado del alofactor soluble y determinando si la proliferación de células T se produce o no en respuesta al péptido/epítipo que se mide, por ejemplo, mediante la captación celular de timidina tritiada. Los índices de estimulación para respuestas por células T a péptidos/epítipos se pueden calcular como el CPM máximo en respuesta a un péptido/epítipo dividido por el CPM control. Un índice de estimulación (S.I.) de células T igual o mayor a dos veces el nivel de fondo se considera "positivo." Los resultados positivos se utilizan para calcular el índice de estimulación medio para cada péptido/epítipo para el grupo de péptidos/epítipos ensayados. Los epítipos de células T no naturales (o modificados) se pueden ensayar además opcionalmente en cuanto a su afinidad de unión a moléculas de MHC clase II. La unión de epítipos de células T no naturales (o modificados) con moléculas de MHC clase II se puede realizar de diferentes maneras. Por ejemplo, las moléculas del HLA clase II solubles se obtienen por lisis de células homocigóticas para una molécula de clase II determinada. La última se purifica por cromatografía de afinidad. Las moléculas de clase II solubles se incuban con un péptido de referencia marcado con biotina producido de acuerdo con su fuerte actividad de unión para esa molécula de clase II. Los péptidos a evaluar para la unión con la clase II se incuban entonces a diferentes concentraciones y se calcula su capacidad para desplazar al péptido de referencia de su unión con la clase II por la adición de neutravidina. Los métodos se pueden encontrar, por ejemplo, en Texier et al., (2000) J. Immunology 164, 3177-3184). Los péptidos inmunogénicos de la invención tienen un índice medio de estimulación de células T mayor que o igual a 2,0. Un péptido inmunogénico que tiene un índice de estimulación de células T mayor que o igual a 2,0 se considera útil como agente profiláctico o terapéutico. Más particularmente, los péptidos inmunogénicos según la invención tienen un índice medio de estimulación de células T de al menos 2,5, al menos 3,5, al menos 4,0, o incluso al menos 5,0. Además, dichos péptidos tienen normalmente un índice de positividad (P.I.) de al menos aproximadamente 100, al menos 150, al menos aproximadamente 200 o al menos aproximadamente 250. El índice de positividad de un

péptido se determina multiplicando el índice medio de estimulación de células T por el porcentaje de individuos, en una población de individuos sensible a un alofactor soluble (por ejemplo, al menos 9 individuos, al menos 16 individuos, o al menos 29 o 30, o incluso más), que tienen células T que responden al péptido (correspondiendo por tanto al SI multiplicado por la naturaleza promiscua del péptido/epítipo). Por tanto, el índice de positividad representa tanto la fuerza de una respuesta de células T contra un péptido (S.I.) como la frecuencia de una respuesta de células T contra un péptido en una población de individuos sensibles a un alofactor soluble. Para determinar los epítipos de células T óptimos, por ejemplo, mediante técnicas de cartografía fina, un péptido que tiene actividad estimulante de células T y por tanto que comprende al menos un epítipo de células T, como se determina mediante técnicas de biología de células T, se modifica por adición o delección de restos de aminoácidos en el N o C terminales del péptido y se ensaya para determinar un cambio en la reactividad de las células T contra el péptido modificado. Si se encuentra que dos o más péptidos que comparten un área de solapamiento en la secuencia proteica nativa tienen actividad estimulante de las células T humanas, como se determina mediante técnicas de biología celular de células T, se pueden producir péptidos adicionales que comprenden el total o una parte de dichos péptidos y estos péptidos adicionales se pueden ensayar por un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, se seleccionan los péptidos y se producen de manera recombinante o sintética. Los epítipos o péptidos de células T se seleccionan basándose en diversos factores, incluyendo la fuerza de la respuesta de células T contra el péptido/epítipo (por ejemplo, índice de estimulación) y la frecuencia de la respuesta de las células T contra el péptido en una población de individuos.

Los antígenos candidatos se pueden cribar mediante uno más algoritmos *in vitro* para identificar una secuencia de epítipo de células T dentro de una proteína antigénica. Algoritmos adecuados están descritos, por ejemplo, en Zhang et al. (2005) *Nucleic Acids Res* 33, W180-W183 (PREDBALB); Salomon & Flower (2006) *BMC Bioinformatics* 7, 501 (MHCBN); Schuler et al. (2007) *Methods Mol Biol.* 409, 75-93 (SYFPEITHI); Dönnes & Kohlbacher (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, W194-W197 (SVMPIC); Kolaskar & Tongaonkar (1990) *FEBS Lett.* 276,172-174 y Guan et al. (2003) *Appl Bioinformatics* 2, 63-66 (MPICPred). Más particularmente, dichos algoritmos permiten realizar la predicción dentro de una proteína antigénica de una o más secuencias nonapeptídicas que encajarán en el surco de una molécula de MHC II.

Los péptidos inmunogénicos para uso en el contexto de la invención se pueden producir por expresión recombinante, por ejemplo, en células bacterianas (por ejemplo, *Escherichia coli*), células de levadura (por ejemplo, especies de *Pichia*, especies de *Hansenula*, especies de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*), células de insectos (por ejemplo, de *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*), células de plantas o células de mamífero (por ejemplo, células CHO, COS). La construcción de los vectores de expresión adecuados por lo tanto necesarios (incluyendo información adicional, tal como secuencias promotoras y de terminación) implica entre tanto técnicas estándar de ADN recombinante. Los péptidos inmunogénicos de la invención producidos de manera recombinante pueden ser derivados de una proteína precursora más grande, por ejemplo, mediante escisión enzimática de sitios de escisión enzimática insertados adyacentes a los terminales N y/o C del péptido inmunogénico, seguido de purificación adecuada.

En vista de la longitud limitada de los péptidos inmunogénicos para uso en el contexto de la invención, estos se pueden preparar mediante síntesis peptídica química, en la que los péptidos se preparan acoplando entre sí los diferentes aminoácidos. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión, por ejemplo, de D-aminoácidos, aminoácidos con cadenas laterales de origen no natural o aminoácidos naturales con cadenas laterales modificadas tal como cisteína metilada. Los métodos químicos de síntesis peptídica están bien descritos y se pueden hacer pedidos de péptidos de compañías tales como Applied Biosystems y otras compañías. La síntesis peptídica se puede realizar como síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) o por el contrario como síntesis peptídica en fase de solución. Los métodos de SPPS mejor conocidos son la química en fase sólida de t-Boc y Fmoc que es ampliamente conocida por los expertos en la técnica. Además, los péptidos se pueden ligar entre sí para formar péptidos más largos utilizando una estrategia de ligamiento (acoplamiento quimioselectivo de dos fragmentos peptídicos no protegidos) como se describe originalmente por Kent (Schnolzer & Kent (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.* 40, 180-193) y se revisa, por ejemplo, en Tam et al. (2001) *Biopolymers* 60, 194-205. Esto proporciona un enorme potencial para conseguir la síntesis de proteínas que está más allá del alcance de la SPPS. Muchas proteínas con un tamaño de 100-300 residuos han sido sintetizadas satisfactoriamente por este método. Los péptidos sintéticos han continuado desempeñando un papel crucial en constante aumento en los campos de investigación de bioquímica, farmacología, neurobiología, enzimología y biología molecular debido a los enormes avances en la SPPS.

Las propiedades físicas y químicas de un péptido inmunogénico de interés (por ejemplo, solubilidad, estabilidad) se examinan para determinar si el péptido es o podría ser adecuado para su uso en composiciones terapéuticas. Normalmente este se optimiza ajustando la secuencia del péptido. Opcionalmente, el péptido puede ser modificado después de la síntesis (modificaciones químicas, por ejemplo, adición/delección de grupos funcionales) utilizando métodos conocidos en la técnica.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para generar células T citotóxicas específicas de alofactores solubles (células Tregs o células T CD4+ reguladoras) *in vitro* (*ex vivo*). En particular dichas células T son citotóxicas frente a cualquier célula que presente un antígeno de alofactor soluble y se pueden obtener como una población de células. La invención se extiende a dichas (poblaciones de) Tregs citotóxicas específicas de

alofactores solubles que se pueden obtener por los métodos descritos en la presente memoria, como se detallan en las reivindicaciones.

En realizaciones particulares, se proporcionan métodos que comprenden el aislamiento de células de sangre periférica, la estimulación de la población de células *in vitro* poniendo en contacto un péptido inmunogénico según la invención con las células de sangre periférica aisladas, y la expansión de la población de células estimulada, más particularmente en presencia de IL-2, como se detalla en las reivindicaciones. Los métodos según la invención tienen la ventaja de que se producen mayores cantidades de Tregs y de que se pueden generar Tregs que son específicas para el alofactor soluble (utilizando un péptido que comprende un epítipo específico del antígeno). Alternativamente, las células T citotóxicas específicas de alofactores solubles se pueden obtener por incubación en presencia de las APC que presentan un péptido inmunogénico específico de alofactor soluble según la invención después de la transducción o transfección de las APC con una construcción genética capaz de dirigir la expresión de dicho péptido inmunogénico. De hecho, dichas APC se pueden administrar ellas mismas a un sujeto que necesite desencadenar *in vivo* en dicho sujeto la inducción del subconjunto beneficioso de células T CD4+ citotóxicas.

En un aspecto alternativo, las Tregs se pueden generar *in vivo*, es decir, mediante la administración a un sujeto de un péptido inmunogénico proporcionado en la presente memoria y recogida de las Tregs generadas *in vivo*.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a las células T reguladoras específicas de alofactores solubles que se pueden obtener por los métodos anteriores para uso en la prevención o supresión, en un sujeto que espera recibir, que está recibiendo o que ha recibido un alofactor soluble, de la respuesta inmunitaria a dicho alofactor soluble. Para cualquiera de los usos descritos anteriormente de los péptidos inmunogénicos de la invención, dichos péptidos pueden ser reemplazados por dichas Tregs específicas del alofactor soluble. Se contempla tanto el uso de células alogénicas como de células autógenas. Cualquier método que comprenda la administración de dichas Tregs específicas del alofactor soluble a un sujeto que lo necesite (es decir, para prevenir o suprimir la respuesta o respuestas inmunitarias frente a un alofactor soluble) es conocido también como terapia celular adoptiva. Dicha terapia es de particular interés en el caso del tratamiento de reacciones inmunitarias agudas específicas de alofactores solubles y reincidencias de dichas reacciones. Las Tregs son cruciales en la inmunorregulación y tienen un gran potencial terapéutico. La eficacia de la inmunoterapia basada en Tregs depende de la especificidad Ag de las células T reguladoras. Además, el uso de una Treg específica de Ag en lugar de Treg policlonal expandida reduce el número total de Treg necesario para terapia.

Todavía un aspecto más de la presente descripción se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican los péptidos inmunogénicos descritos para uso en el contexto de la presente invención y a métodos para su uso, por ejemplo, para la expresión recombinante o en terapia génica. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico son capaces de expresar los péptidos inmunogénicos de la invención. Los péptidos inmunogénicos de la invención, de hecho, se pueden administrar a un sujeto que lo necesite utilizando cualquier método de terapia génica adecuado. En cualquier uso o método de la descripción para el tratamiento y/o supresión de la respuesta o respuestas inmunitarias frente a un alofactor soluble, la inmunización con un péptido inmunogénico de la invención se puede combinar con la transferencia de células adoptivas de (una población de) Tregs específicas para dicho péptido inmunogénico y/o con terapia génica. Cuando se combinan, dicha inmunización, la transferencia de células adoptivas y la terapia génica se pueden utilizar simultáneamente, o secuencialmente, en cualquier combinación posible.

En la terapia génica, las moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican los péptidos inmunogénicos se pueden utilizar como ADN desnudo o en liposomas u otros sistemas lipídicos para la administración a las células diana. Otros métodos para la transferencia directa de ADN plasmídico a las células son bien conocidos por los expertos en la técnica para uso en terapia génica humana e implican el direccionamiento del ADN a los receptores sobre células mediante la formación de complejos del ADN plasmídico con las proteínas. En su forma más sencilla, la transferencia génica se puede realizar inyectando simplemente cantidades muy pequeñas de ADN en el núcleo de una célula, a través de un procedimiento de microinyección. Una vez que se han introducido los genes recombinantes en una célula, ellos pueden ser reconocidos por los mecanismos normales de las células para la transcripción y traducción, y se expresará un producto génico. También se han intentado otros métodos para introducir ADN en mayor número de células. Estos métodos incluyen: transfección, en donde el ADN se precipita con fosfato de calcio y se introduce en las células por pinocitosis; electroporación, en donde las células se exponen a impulsos de alto voltaje para introducir orificios en la membrana; lipofección/fusión de liposomas, en donde el ADN se empaqueta en vesículas lipófilas que se fusionan con una célula diana; y bombardeo de partículas utilizando ADN unido a proyectiles pequeños. Otro método para introducir el ADN en las células es acoplar el ADN a proteínas químicamente modificadas. Las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar los endosomas y de potenciar la captación de ADN en las células. La mezcla de adenovirus con soluciones que contienen complejos de ADN, o la unión de ADN a la polilisina unida covalentemente a adenovirus utilizando agentes reticulantes de proteínas, mejora sustancialmente la captación y la expresión del gen recombinante. Los vectores de virus adenoasociados se pueden utilizar también para la administración de genes a las células vasculares. Como se usa en la presente memoria, "transferencia génica" significa el proceso de introducir una molécula de ácido nucleico exógeno en una célula, lo que se realiza normalmente para permitir la expresión de un producto particular codificado por el gen. Dicho producto puede incluir una proteína, polipéptido, ADN o ARN antisentido, o ARN enzimáticamente activo. La transferencia génica se puede realizar en células cultivadas o por administración directa en los mamíferos.

En otra realización, se proporciona un vector que comprende una secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico según la invención. En realizaciones particulares, el vector se genera de tal manera que la secuencia de la molécula de ácido nucleico se expresa solamente en un tejido específico. Los métodos para conseguir la expresión génica específica de tejido son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, colocando la secuencia que codifica un péptido inmunogénico de la invención bajo el control de un promotor, que dirige la expresión del péptido específicamente en uno o más tejidos u órganos. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, vaccinia virus, adenovirus, virus adenoasociados, herpes virus, virus de ARN o papilomavirus bovino, se pueden utilizar para la administración de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, ADNc) que codifican péptidos, homólogos o derivados de los mismos según la invención en los tejidos o en la población de células diana. Se pueden utilizar métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores virales recombinantes que contienen dichas secuencias codificantes. Alternativamente, en terapia génica se pueden utilizar células modificadas genéticamente que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico según la invención.

Cuando la administración de uno o más péptidos según la invención se asegura a través de la transferencia génica (es decir la administración de un ácido nucleico que asegura la expresión de péptidos según la invención *in vivo* después de la administración), la dosificación apropiada del ácido nucleico se puede determinar basándose en la cantidad de péptido expresado como resultado del ácido nucleico introducido.

Un aspecto adicional de la invención contempla medicamentos que son normalmente, pero no necesariamente, una formulación (farmacéutica) que comprende como ingrediente activo al menos uno de los péptidos inmunogénicos de la invención, una (población de) Tregs específica para dicho péptido inmunogénico o un vector génico terapéutico capaz de expresar dicho péptido inmunogénico. Aparte del ingrediente o ingredientes activos, dicha formulación comprenderá al menos uno de un diluyente, vehículo o adyuvante (farmacéuticamente aceptable). Normalmente, los compuestos farmacéuticamente aceptables (tales como diluyentes, vehículos y adyuvantes) se pueden encontrar, por ejemplo, en un manual de Farmacopea (por ejemplo, Farmacopea de Estados Unidos, Farmacopea Europea o Farmacopea Internacional). El medicamento o composición farmacéutica de la invención normalmente comprende una cantidad (profilácticamente o terapéuticamente) eficaz del ingrediente o ingredientes activos, en donde la eficacia es en relación con la afección o trastorno a prevenir o tratar. En particular, las composiciones farmacéuticas de la invención son vacunas para aplicación profiláctica o terapéutica.

Puede ser necesario que el medicamento o composición farmacéutica de la invención sea administrado a un sujeto que lo necesite como parte de un régimen profiláctico o terapéutico que comprende administraciones múltiples de dicho medicamento o composición. Dichas administraciones múltiples normalmente tienen lugar secuencialmente y el intervalo de tiempo entre dos administraciones puede variar y se ajustará a la naturaleza del ingrediente activo y a la naturaleza de la afección a prevenir o tratar. La cantidad de ingrediente activo administrada a un sujeto que lo necesite en una única administración también puede variar y dependerá de factores tales como el estado físico del sujeto (por ejemplo, peso, edad), el estado de la afección a prevenir o tratar, y la experiencia del médico o enfermero que le trata.

El término "diluyentes" se refiere, por ejemplo, a soluciones salinas fisiológicas. El término "adyuvante" normalmente se refiere a un agente farmacológico o inmunológico que modifica (preferiblemente aumenta) el efecto de otros agentes (por ejemplo, fármacos, vacunas) al mismo tiempo que tiene pocos, si los hubiera, efectos directos cuando se administran por sí mismos. Como un ejemplo de adyuvante, se da el hidróxido de aluminio (alumbre), en el que un péptido inmunogénico de la invención puede ser adsorbido. Además, se conocen en la técnica muchos otros adyuvantes y se pueden utilizar con la condición de que faciliten la presentación del péptido en la presentación del MHC de clase II y la activación de células T. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa cualquier material o sustancia con la que se formula el ingrediente activo con el fin de facilitar su aplicación o diseminación en el sitio a tratar, por ejemplo, disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición, y/o para facilitar su almacenamiento, transporte o manipulación sin alterar su eficacia. Estos incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol) agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares. Se pueden incluir ingredientes adicionales para controlar la duración de la acción del ingrediente activo en la composición. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que haya sido comprimido para formar un líquido, es decir, las composiciones de esta invención se pueden utilizar adecuadamente como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos, pulverizaciones, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, gránulos o polvos. Los vehículos farmacéuticos adecuados para su uso en dichas composiciones farmacéuticas y sus formulaciones, son bien conocidos por los expertos en la técnica y no hay ninguna restricción particular para su selección dentro de la presente invención. Ellos pueden incluir también aditivos tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, gomas, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares, siempre que los mismos sean conformes con la práctica farmacéutica, es decir, vehículos y aditivos que no creen un daño permanente a los mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar de cualquier manera conocida, por ejemplo, mezclando, recubriendo y/o moliendo de manera homogénea los ingredientes activos, en un procedimiento de una sola etapa o de múltiples etapas, con el material vehículo seleccionado y, cuando sea apropiado, con el resto de aditivos tales como agentes tensioactivos. También se pueden preparar por micronización, por ejemplo, con el fin

de obtenerlas en forma de microesferas normalmente con un diámetro de aproximadamente 1 a 10 μm , especialmente para la fabricación de microcápsulas para liberación controlada o sostenida de los ingredientes activos.

5 Los péptidos inmunogénicos, homólogos o derivados de los mismos según la invención (y sus sales o composiciones farmacéuticas fisiológicamente aceptables incluidas todas en el término "ingredientes activos") pueden ser administrados por cualquier vía apropiada para la afección a prevenir o tratar y apropiada para los compuestos, en este caso las proteínas inmunogénicas a administrar. Las vías posibles incluyen las vías regional, sistémica, oral (forma sólida o inhalación), rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, Intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural). La vía de administración preferida puede variar, por ejemplo, con la condición del receptor o con la afección a prevenir o tratar.

10 Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada uno de ellos, una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida tipo aceite en agua o una emulsión líquida tipo agua en aceite. El ingrediente activo se puede presentar también como un bolo, un electuario o una pasta. Un comprimido se puede fabricar por comprensión o por moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos producidos por compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden ser recubiertos o ranurados y se pueden formular para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo que contienen.

15 Un aspecto adicional de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados, con una longitud entre 12 y 50 aminoácidos, que comprenden un epítipo de célula T restringido al MHC de clase II de un aloantígeno soluble y, inmediatamente adyacente a dicho epítipo de célula T o separado de dicho epítipo de célula T por un conector de 7 aminoácidos como máximo, un motivo redox C-(X)₂-C, como se detalla en las reivindicaciones. En realizaciones particulares, se proporcionan péptidos inmunogénicos que se derivan de alofactores solubles que no comprenden en su secuencia natural un epítipo ni un motivo redox dentro de los 11 aminoácidos adyacentes N-terminalmente o C-terminalmente a dicho epítipo. En realizaciones particulares, el alofactor es un agente terapéutico de sustitución.

20 Una estrategia alternativa para tratar las respuestas de aloinmunización a los factores solubles, consiste en el direccionamiento de las células B de memoria que segregan anticuerpos para dicho factor soluble. Esto es debido a la propiedad de las células B de memoria de expresar el BCR (receptor de células B) de superficie que contiene las cadenas variables de un anticuerpo idéntico al que ellas segregan después de la activación (las células B de memoria producen un anticuerpo solamente después de ver el antígeno y de ser activadas por las correspondientes células T CD4⁺ dirigidas hacia los epítipos derivados del antígeno o del idiotipo BCR). Un idiotipo está constituido por el conjunto de determinantes antigénicos transportados por la parte variable de los anticuerpos. Por lo tanto, dicho BCR y el anticuerpo segregado comparten determinantes idiotípicos. Durante la captación de polipéptidos o proteínas por las células B, partes del BCR son procesadas junto con el antígeno y son presentadas por los determinantes del MHC clase II. Por lo tanto, las células B de memoria también presentan epítipos de células T CD4⁺ derivados de sus propios BCR. Las células T CD4⁺ dirigidas hacia tales epítipos derivados de BCR pueden activar las correspondientes células B. Como los epítipos de células T modificados por la unión de un motivo redox a los mismos inducen que las células T CD4⁺ adquieran la propiedad de inducir la apoptosis en las APC que presentan dicho epítipo de células T (natural o modificado), los epítipos de células T de BCR de células B de memoria modificados mediante la unión de un motivo redox a los mismos son capaces de inducir las células T CD4⁺ que pueden llevar a dichas células B de memoria a la apoptosis. Así, las células B de memoria frente a los alofactores solubles pueden ser eliminadas utilizando un epítipo de célula T de BCR de célula B de memoria específico del alofactor modificado por la unión de un motivo redox al mismo. Este enfoque es de especial interés para situaciones en las que la respuesta frente al alofactor soluble es oligoclonal lo que ocurre a menudo. Esta estrategia alternativa puede ser también combinada obviamente con la estrategia descrita anteriormente que se basa en utilizar epítipos de células T derivados de los propios alofactores. Además, esta estrategia alternativa se podría emplear también en un contexto preventivo en situaciones en donde las células B de memoria están presentes sin que sean detectables anticuerpos solubles. En tales casos, la anterior estrategia orientada al idiotipo sería preventiva en la medida en que la eliminación de las células B de memoria evitaría la producción de anticuerpos cuando hay un antígeno presente. En casos particulares la estrategia anterior que implica epítipos de células T de BCR o sus idiotipos se puede extender a las células B primitivas. De hecho, en los casos en que haya anticuerpos (y por lo tanto BCR) en la configuración de la línea germinal, especialmente con exactamente la misma secuencia al nivel de las partes variables que las células B primitivas producidas por el reordenamiento aleatorio de genes en la médula ósea. La inmunización con un epítipo de célula T modificado derivado de un idiotipo (para inducir células T CD4⁺ reguladoras citotóxicas específicas para el epítipo de célula T del idiotipo) podría prevenir la

selección de dichas células B. Son ejemplos de anticuerpos relevantes en la configuración de la línea germinal, los anticuerpos que se unen al dominio C2 del factor VIII, inhibiendo de este modo la función del FVIII.

5 Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere al menos a un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítipo de célula T restringido al MHC de clase II del receptor de células B de una célula B de memoria específica del aloantígeno, y (ii) un motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, en donde dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o está separado de dicho epítipo de célula T por un conector de siete aminoácidos como máximo, para uso en la eliminación de las células B específicas del aloantígeno en un sujeto que ha recibido dicho aloantígeno.

10 La descripción se refiere así mismo al uso de al menos un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítipo de célula T derivado de un idiotipo de anticuerpo anti-alofactor y (ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, para la fabricación de un medicamento para prevenir la activación de las células T CD4+ efectoras capaces de activar las células B específicas del alofactor en un sujeto que ha recibido dicho alofactor.

15 La descripción se refiere además al uso de al menos un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítipo de célula T derivado de un idiotipo de anticuerpo anti-alofactor y (ii) un motivo [CST]-(X)2-[CST], más particularmente un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, para la fabricación de un medicamento para inducir en un receptor las células T CD4+ reguladoras que son citotóxicas para las células B específicas del alofactor en un sujeto que ha recibido dicho alofactor.

En cualquiera de estos aspectos, las células B son células B de memoria o células B primitivas.

20 La presente invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos, que se proporcionan sin ninguna intención limitante.

Ejemplos

Ejemplo 1 Inducción a la apoptosis de las células B del bazo de ratones primitivos que presentan un péptido en determinantes del MHC de clase II

25 Se determinó si las células B primitivas que presentan un epítipo de células T restringido a clase II derivado de un idiotipo BCR podrían ser eliminadas por el reconocimiento y la activación de las células T provocadas para un anticuerpo específico anti-factor VIII que lleva el mismo idiotipo. Por lo tanto, se inmunizaron ratones C57Bl/6 3 veces en un intervalo de dos semanas con fragmentos Fab de anticuerpo BO2C11, un anticuerpo monoclonal humano para el dominio C2 del factor VIII (Jacquemin et al. (1998) *Blood* 92, 496-501). Diez días después de la última inmunización, se sacrificaron los ratones y se prepararon las células T CD4+ a partir de su bazo mediante selección con perlas magnéticas.

30 Se expandieron entonces las células T CD4+ *in vitro* mediante la presentación de, o puesta en contacto con un péptido identificado utilizando los algoritmos referenciados anteriormente como portador de un epítipo de célula T. Este epítipo de célula T se deriva de la región determinante de complementariedad (CDR) 3 de la región VH del anticuerpo BO2C11. Este epítipo tiene la secuencia: YCAVPDDPDA (SEQ ID NO: 1).

35 En experimentos paralelos, se estimularon las células T CD4+ con una versión modificada del epítipo de célula T, consistiendo la modificación en la adición de una secuencia de consenso con actividad de tiorreductasa ("motivo redox"). El epítipo modificado tiene la secuencia: CHGCYCAVPDPDA (SEQ ID NO: 2; la secuencia del motivo redox está subrayada).

40 Las células B primitivas se cargaron por incubación con un péptido de la SEQ ID NO: 1 o de la SEQ ID NO: 2 y se lavaron. Cada uno de estos dos cultivos de células B se mezcló entonces con células T estimuladas o con el péptido de la SEQ ID NO: 1 o con el péptido de la SEQ ID NO: 2. Una población de control de las células B sin tratar se cultivó en paralelo para evaluar la pérdida espontánea de células B.

45 Las células T se expandieron con el péptido de la SEQ ID NO: 1, a saber, el epítipo de célula T en cada conformación natural no mostró ninguna o sólo una pequeña influencia sobre la supervivencia de las células B de control durante un periodo de incubación de 18 h (no se muestran los datos). Por el contrario, las células B cargadas con el péptido de la SEQ ID NO: 1 o con el péptido de la SEQ ID NO: 2 fueron inducidas a la apoptosis (véase la Figura 1) por las células T expandidas con el péptido de la SEQ ID NO: 2.

50 Por lo tanto, se puede llegar a la conclusión de que la adición de un motivo redox al epítipo de células T (epítipo natural de la SEQ ID NO: 1 al epítipo modificado de la SEQ ID NO: 2) fue suficiente para alterar las propiedades de las células T CD4+ suscitadas para el idiotipo de anticuerpos de tal manera que inducen la apoptosis de las células B diana. Además, las células T CD4+ con actividad citotóxica podrían ser activadas por el reconocimiento del epítipo de célula T natural (péptido de la secuencia 1).

Una evaluación fenotípica de las células T citotóxicas inducidas en el presente experimento indicó que compartían marcadores de células T reguladoras, tales como la alta expresión de CD25 en reposo, con altos CTLA-4 y GITR.

Sin embargo, no se detectó el Foxp3, represor de la transcripción. Los factores implicados en la inducción de la apoptosis se expresaron fácilmente, incluyendo Fas y FasL, y granzimas.

Ejemplo 2. Inducción a la apoptosis de las células B humanas específicas para el factor VIII por las células T CD4+ específicas para un epítipo de factor VIII presentado en moléculas de MHC clase II

5 Se obtuvieron líneas de células B linfoblastoides humanas de la sangre periférica de un paciente afectado por una forma leve de hemofilia, y que producen anticuerpos neutralizantes de la función del factor VIII. Una línea específica de células, LE2E9 (denominada en lo sucesivo como 2E9) produjo un anticuerpo para el extremo carboxi terminal del factor VIII de dominio C1 (Jacquemin et al. (2000), *Blood* 95,156-163). Se demostró que la línea celular 2E9 presenta péptidos derivados del factor VIII dentro del contexto de la molécula de MHC clase II, lo que dio como resultado la activación específica de las células T CD4+. Tales células T CD4+ fueron clonadas a partir de la sangre periférica del mismo paciente. Se realizó la cartografía del péptido reconocido por dichos clones de células T y tiene la secuencia: IIARY-IRLHPHTHSIRST (SEQ ID NO: 3), que corresponde a los aminoácidos 2144 a 2161 del dominio C1 y en la que I en la posición 2149 corresponde al primer residuo de anclaje de MHC (P1).

10 Este péptido se modifica reemplazando los aminoácidos 2144 a 2148 por una secuencia CGHC GG, que codifica una secuencia de consenso con actividad de tiorreductasa ("motivo redox"). El péptido modificado tiene la secuencia: CGHC GGIRLHPHTHSIR (SEQ ID NO: 4; en la que el motivo redox está subrayado).

15 Un clon específico de células T (Jacquemin et al. (2003), *Blood* 101, 1351-1358) se cultiva en APC (células dendríticas) que presentan el péptido de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 4. Después de un período de reposo, se añaden células a cultivos de la línea de células B 2E9 cargados durante un período de 4 horas con el péptido de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 4 y después se lavan.

20 Se compara el efecto de los clones de células T expandidos con el epítipo natural de la SEQ ID NO: 3 o el péptido modificado de la SEQ ID NO: 4 sobre la inducción de la apoptosis de las células linfoblastoides 2E9 que presentan o el epítipo natural de la SEQ ID NO: 3 o su homólogo modificado de la SEC ID NO: 4.

25 Ejemplo 3. Inducción a la apoptosis de células dendríticas humanas específicas para el factor VIII por células T CD4+ específicas para un epítipo del factor VIII

30 Para determinar si se podría evitar una respuesta inmunitaria primaria al factor VIII utilizando epítopos modificados extendidos con un motivo redox, se llevó a cabo un experimento similar al descrito en el ejemplo 2 utilizando células dendríticas en lugar de una línea de células B. Así, las células dendríticas humanas se preparan a partir de monocitos de sangre periférica mediante el cultivo de estos en presencia de GM-CSF e IL-4. Se obtiene entonces la maduración completa mediante la adición de TNF-alfa, de acuerdo con métodos publicados.

35 Las células dendríticas se cargan por incubación con péptidos de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 4 que comprenden un epítipo de célula T de FVIII (véase el ejemplo 2). Después de lavado, las células dendríticas se incuban con el clon de células T específico de factor VIII. pre-activado con el péptido de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 4.

Estos experimentos demuestran la capacidad de los epítopos de células T modificados por la adición de un motivo redox, de evitar una respuesta primaria a un aloantígeno por la inducción de la apoptosis de las APC que presentan un epítipo de células T específico.

Ejemplo 4 Supresión de una respuesta inmunitaria secundaria a un aloantígeno mediante la generación de células T reguladoras citotóxicas para el factor VIII o para los idiotipos derivados de BCR

40 Para determinar si las células T reguladoras citotóxicas pueden suprimir o no una respuesta inmunitaria secundaria, nos aprovechamos de una cepa de ratón transgénico que expresa un receptor de células B (BCR) para el factor VIII humano. Se aíslan las células B transgénicas del bazo de dichos ratones mediante selección con perlas magnéticas.

45 Las células B transgénicas aisladas se incuban con el factor VIII y se lavan. Después se co-cultivan las células con células T policlonales obtenidas del bazo de un ratón inmunizado con el factor VIII humano. Tales esplenocitos contienen células T CD4+ específicas para el factor VIII humano, que se purifican por selección con perlas magnéticas. Las células T se cultivan entonces con células B transgénicas que presentan factor VIII y finalmente se clonan mediante dilución limitante. Los clones que reconocen el péptido de SEQ ID NO: 3 se expanden.

50 Los clones de células T de ratón para el factor VIII son activados por incubación con las APC que presentan el péptido de la SEQ ID NO: 3 (epítipo de factor VIII de célula T natural) o el péptido de la SEQ ID NO: 4 (epítipo de factor VIII modificado). Después de un período de descanso de 10 días, cada uno de estos clones de células T pre-activadas se incuban durante 18 h con las células B transgénicas que presentan el factor VIII. Se evalúa el efecto de las células T activadas de manera diferente sobre las células B transgénicas.

Como las células B transgénicas expresan también epítomos de células T derivados de BCR, se utiliza el mismo sistema para determinar si una respuesta inmunitaria continua contra un aloantígeno dado puede ser suprimida mediante la generación de células T reguladoras citotóxicas para los determinantes idiotípicos.

5 Como los BCR transgénicos se derivan del anticuerpo anti-factor VIII humano BO2C11, la línea de células B transgénicas presenta los mismos determinantes idiotípicos que los descritos en el ejemplo 1 y por lo tanto se pueden utilizar los clones de células T usados en el ejemplo 1.

10 Las células B transgénicas se incuban con factor VIII y se lavan. Después, las células son co-cultivadas con los clones de células T del ejemplo 1 pre-activadas con el péptido de la SEQ ID NO: 1 (determinante idiotípico natural) o con el péptido de la SEQ ID NO: 2 (determinante idiotípico modificado). Se evaluó el efecto de las diferentes células T activadas sobre las células B transgénicas.

Ejemplo 5. Inducción a la apoptosis de células T CD4+ efectoras específicas del factor VIII mediante supresión de las espectadoras inducida por las células T CD4+ citolíticas específicas del factor VIII generadas *in vivo*

15 Se obtuvieron células T CD4+ efectoras policlonales del bazo de los ratones KO de factor VIII inmunizados con 2 U.I. de FVIII recombinante humano (CD4 (F8-)) y se purificaron utilizando perlas magnéticas anti-CD4. Después se marcaron las células con CFSE.

20 La inducción de la apoptosis como se mide por las células marcadas con CFSE, se midió después por la anexina V y tinción con 7-AAD después de la incubación de dichas células con APC (células B de bazo) cargadas con 5 µg/ml de FVIII humano y péptido 1 µM de la SEQ ID NO: 5 (CGHC~~CG~~GFTNMFATWSPSK, que corresponde a la secuencia de 2196-2207 aminoácidos del dominio C2 del factor VIII humano, modificada por adición de un motivo tiorreductasa (subrayado) separado por 2 glicinas del epítomo de células T del Factor VIII). La apoptosis se midió después de 72 h de cultivo a 37 °C.

25 Cuando las células CD4(F8-) marcadas con CFSE se co-cultivaron con células T CD4+ obtenidas de ratones inmunizados con un péptido sintético de la SEQ ID NO: 5 (células T CD4+ citolíticas), se indujo una apoptosis significativa. La figura 2 muestra que dos preparaciones independientes de las células T CD4+ citolíticas produjeron el 6,6 % y el 8,4 % de la apoptosis, respectivamente ("CD4(F8+) conjunto 1" y "CD4(F8+) conjunto 2" en la Figura 2). Cuando las células CD4(F8-) marcadas con CFSE fueron co-cultivadas en presencia de doble número de células CD4(F8-) no marcadas, no se indujo la apoptosis (leyenda "CD4(F8-)" en la Figura 2). La mortalidad de la línea base se restó de los porcentajes de muerte celular. Estos resultados indican que las respuestas inmunitarias a alofactores solubles que dependen de las células T CD4+ efectoras pueden ser eliminadas por las células T CD4 + citolíticas generadas utilizando un epítomo de células T derivado de un alofactor modificado según la invención.

30

Listado de secuencias

<110> Life Sciences Research Partners VZW Saint-Remy, Jean-Marie

5 <120> Estrategias para prevenir y/o tratar las respuestas inmunitarias a los alofactores solubles

<130> T5212-PCT (043)

<150> EP 08447010.3

10 <151> 14-02-2008

<150> US 61/035.800

<151> 12-03-2008

15 <160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Epítoto de células T de CDR3 de anticuerpo B02C11 anti-factor VIII

<400> 1

Tyr Cys Ala Val Pro Asp Asp Pro Asp Ala

1 5 10

30 <210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Epítoto modificado de células T de CDR3 de anticuerpo B02C11 anti-factor VIII

<220>

40 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(4)

<223> resto tiorreductasa

<400> 2

45 Cys His Gly Cys Tyr Cys Ala Val Pro Asp Pro Asp Ala

1 5 10

<210> 3

<211> 18

50 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> aminoácidos 2144-2161 de factor humano VIII

55 <400> 3

Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg

1 5 10 15

Ser Thr

60 <210> 4

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> epítopo modificado de células T de factor humano VIII

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 10 <222> (1) .. (4)
 <223> resto tiorreductasa

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (5)..(6)
 <223> ligante Gly-Gly

<400> 4

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

20 Arg

<210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> epítopo de células T de factor human VIII modificado

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1) .. (4)
 <223> resto tiorreductasa

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (5)..(6)
 <223> ligante Gly-Gly

40 <400> 5

Cys Gly His Cys Gly Gly Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro
 1 5 10 15

Ser Lys

<210> 6
 45 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> secuencia general del péptido de la invención

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (2)..(3)
 55 <223> Xaa en posiciones 2 y 3 denota cualquier aminoácido

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (6)..(6)
 <223> Xaa denota la secuencia de cualquier epítipo de células T

 <400> 6
 5 Cys Xaa Xaa Cys Gly Xaa
 1 5

 <210> 7
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia general del péptido de la invención
 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa en posiciones 2 y 3 denota cualquier aminoácido
 20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa denota secuencia de cualquier epítipo de células T
 25
 <400> 7

 Cys Xaa Xaa Cys Gly Gly Xaa
 1 5
 30 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> secuencia general del péptido de la invención

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 40 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa en posiciones 2 y 3 denota cualquier aminoácido

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 45 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa denota la secuencia de cualquier epítipo de células T

 <400> 8

 Cys Xaa Xaa Cys Ser Ser Ser Xaa
 1 5
 50

 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia general del péptido de la invención

 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa en posiciones 2 y 3 denota cualquier aminoácido

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (9)..(9)
 5 <223> Xaa denota secuencia de cualquier epítopo de células T

 <400> 9

 Cys Xaa Xaa Cys Ser Gly Ser Gly Xaa
 1 5
 10
 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> repetición de resto tiorreductasa

 <220>
 20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(14)
 <223> Xaa en posiciones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, y 13 denota cualquier aminoácido

 <400> 10
 25
 Cys Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa Xaa Cys
 1 5 10

 <210> 11
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> repetición de resto tiorreductasa
 35
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(12)
 <223> Xaa en posiciones 2, 3, 6, 7, 10, y 11 denota cualquier aminoácido
 40
 <400> 11

 Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys
 1 5 10
 45
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> repetición de resto tiorreductasa

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 55 <222> (1)..(10)
 <223> Xaa en posiciones 2, 3, 5, 6, 8, y 9 denota cualquier aminoácido

 <400> 12

 Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys
 1 5 10
 60

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> repetición de resto tiorreductasa
 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(10)
 <223> Xaa en posiciones 2, 5, y 8 denota cualquier aminoácido
 <400> 13
 15 Cys Xaa Cys Cys Xaa Cys Cys Xaa Cys Cys
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> señal diana endosoma tardío
 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa denota aspartato (D o Asp) o glutamato (E o Glu)
 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (2)..(4)
 <223> Xaa en posiciones 2, 3 y 4 denota cualquier aminoácido
 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa denota leucina (L o Leu) o isoleucina (I o Ile)
 40 <400> 14
 Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
 1 5
 45 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> señal diana endosoma tardío
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 55 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa en posiciones 2 y 3 denota cualquier aminoácido
 <400> 15
 Asp Xaa Xaa Leu Leu
 60 1 5
 <210> 16
 <211> 6

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> señal diana endosoma tardío

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (2)..(5)
10 <223> Xaa en posiciones 2, 3 y 4 denota cualquier aminoácido

<400> 16

Asp Xaa Xaa Xaa Leu Leu
1 5
15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítipo de célula T restringido al MHC clase II de un aloantígeno soluble y (ii) un motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C, en donde dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o está separado de dicho epítipo de célula T por un conector de siete aminoácidos como máximo, para uso en la prevención o supresión, en un sujeto que espera recibir, que está recibiendo o que ha recibido dicho aloantígeno soluble, de las respuestas inmunitarias a dicho aloantígeno soluble.
2. El péptido según la reivindicación 1, para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho aloantígeno soluble es para uso en terapia sustitutiva.
- 10 3. El péptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho aloantígeno soluble se selecciona del grupo que consiste en un factor de coagulación o fibrinolítico, una hormona, una citocina o un factor de crecimiento y un anticuerpo utilizado para fines terapéuticos.
4. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C no aparece de forma natural dentro de una región de 11 aminoácidos N- o C-terminalmente adyacente a dicho epítipo de célula T en dicho aloantígeno soluble.
- 15 5. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C está posicionado N-terminalmente de dicho epítipo de célula T.
- 20 6. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para el uso según la reivindicación 1, en donde al menos una X en dicho motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C es Gly, Ala, Ser o Thr; o en donde al menos una X en dicho motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C es His o Pro, o en donde al menos un C en dicho motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C está metilado.
7. Un método *in vitro* para obtener células T CD4⁺ reguladoras específicas de aloantígeno soluble, que son citotóxicas frente a las células que presentan un epítipo de célula T restringido a MHC clase II de dicho aloantígeno soluble, comprendiendo el método las etapas de:
- proporcionar células de sangre periférica;
- 25 - poner en contacto dichas células con un péptido inmunogénico que comprende (i) un epítipo de célula T restringido a MHC clase II de un aloantígeno soluble y (ii) un motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C, en donde dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o está separado de dicho epítipo de célula T por un conector de 7 aminoácidos como máximo; y
- expandir dichas células en la presencia de IL-2,
- 30 con la condición de que el aloantígeno soluble no es insulina.
8. Las células T CD4⁺ reguladoras específicas de aloantígeno soluble, que son citotóxicas frente a las células que presentan un epítipo de célula T restringido a MHC clase II de dicho aloantígeno soluble, obtenibles por el método según la reivindicación 7, con la condición de que el aloantígeno soluble no es insulina.
- 35 9. Las células T CD4⁺ reguladoras específicas de aloantígeno soluble, que son citotóxicas frente a las células que presentan un epítipo de célula T restringido a MHC clase II de dicho aloantígeno soluble, para uso en la prevención o supresión, en un sujeto que espera recibir, que está recibiendo o que ha recibido dicho aloantígeno soluble, de las respuestas inmunitarias a dicho aloantígeno soluble, en donde dichas células T CD4⁺ se pueden obtener por un método que comprende las etapas de:
- proporcionar células de sangre periférica;
- 40 - poner en contacto dichas células *in vitro* con un péptido inmunogénico que comprende (i) un epítipo de célula T restringido a MHC clase II de un aloantígeno soluble y (ii) un motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C, en donde dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o está separado de dicho epítipo de célula T por un conector de 7 aminoácidos como máximo; y
- expandir dichas células en la presencia de IL-2.
- 45 10. Un péptido inmunogénico aislado, con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende un epítipo de célula T restringido a MHC clase II procedente de un aloantígeno soluble e, inmediatamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o separado de dicho epítipo de célula T por un conector de 7 aminoácidos como máximo, un motivo redox C-(X)₂-[CST], con la condición de que el aloantígeno soluble no es insulina.
- 50 11. Un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítipo de célula T restringido a MHC clase II del receptor de células B de una célula B de memoria específica para el aloantígeno y (ii) un motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C, en donde dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o está separado

de dicho epítipo de célula T por un conector de 7 aminoácidos como máximo, para uso en la eliminación de células B específicas de aloantígeno en un sujeto que ha recibido dicho aloantígeno.

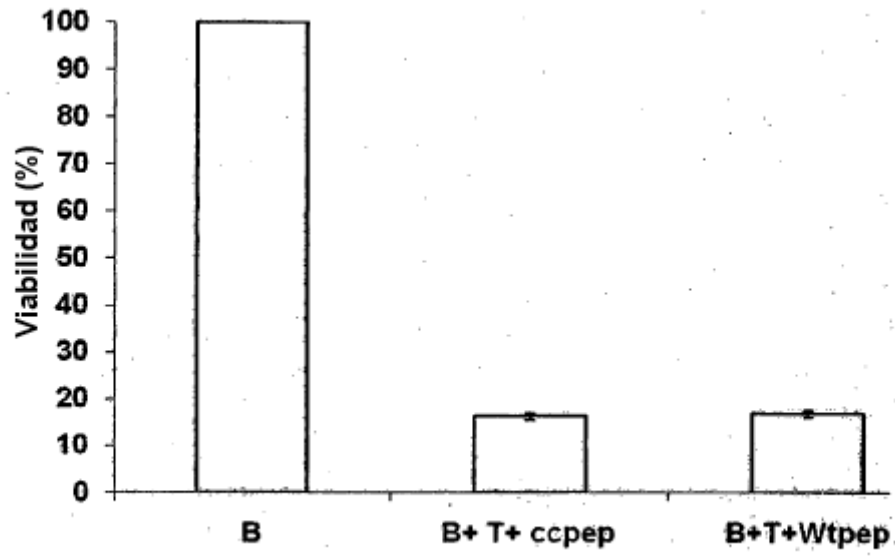


Figura 1

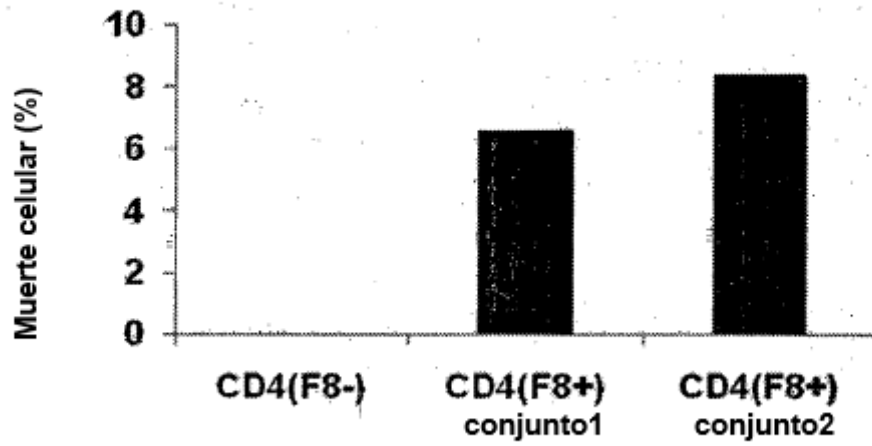


Figura 2