

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 432**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2007 PCT/EP2007/007165**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2008 WO08017517**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2007 E 07801643 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2059256**

54 Título: **Péptidos inmunógenos y su uso en trastornos inmunitarios**

30 Prioridad:

11.08.2006 GB 0615966

25.05.2007 GB 0710081

13.06.2007 GB 0711403

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

15.02.2017

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 2 601 432 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos inmunógenos y su uso en trastornos inmunitarios

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos inmunógenos y a su uso en terapias para suprimir alergias y trastornos autoinmunitarios.

Antecedentes de la invención

10 El sistema inmunitario de los mamíferos es una red compleja que sirve para proteger a un sujeto de factores externos e internos que lo ponen en peligro. Sin embargo, en algunas circunstancias, este mecanismo de protección complejo mantiene o el mismo se convierte en la causa de trastornos, la mayoría con implicaciones crónicas, dentro del sujeto. Existen muchos trastornos inmunitarios, siendo dos importantes las enfermedades alérgicas y los trastornos autoinmunitarios. Las enfermedades alérgicas, descritas convencionalmente como enfermedades mediadas de tipo 1 o enfermedades mediadas por IgE, han visto casi duplicar su prevalencia a lo largo de los últimos 20 años. Las manifestaciones clínicas de las enfermedades alérgicas incluyen asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y reacciones anafilácticas a picaduras de insectos o fármacos. La carga económica relacionada con el cuidado de pacientes alérgicos está aumentando continuamente a lo largo de los años. Como un ejemplo, el coste asociado con la prescripción de tratamiento alérgico en EE.UU. se prevé que alcance alrededor de 10 mil millones de dólares americanos en 2006. Actualmente no hay terapia curativa para dichas enfermedades, que se mantienen bajo control por expulsión del alérgeno cuando es posible, y/o terapia sintomática usando broncodilatadores, antihistaminas, corticosteroides e inmunomoduladores tales como ciclosporina. La desensibilización al alérgeno, que consiste en la administración regular de alérgenos a los que es sensible el paciente, ha mostrado ser eficaz en la rinitis alérgica, pero sigue siendo polémico en el asma y la dermatitis atópica. Algunos síntomas clínicos, tales como los relacionados con los alérgenos de alimentos, no se pueden tratar por desensibilización.

25 La autoinmunidad es el fallo del organismo para reconocer sus propias partes constituyentes (hasta el nivel submolecular) como "propias", lo que produce una respuesta inmunitaria contra sus propias células y tejidos. Cualquier enfermedad que produce dicha respuesta inmunitaria aberrante se denomina enfermedad autoinmunitaria. Son ejemplos destacados el lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sjögren y la artritis reumatoide (RA). Las enfermedades autoinmunitarias se clasifican ampliamente en dos categorías, en concreto enfermedades sistémicas y enfermedades específicas de órgano. La etiología precisa de las enfermedades autoinmunitarias sistémicas no está definida. En cambio, las enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano están relacionadas con una respuesta inmunitaria específica que incluye linfocitos B y T, que se dirigen al órgano y de esta forma induce y mantiene un estado crónico de inflamación local. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano incluyen la diabetes de tipo 1, miastenia grave, tiroiditis, esclerosis múltiple, enfermedad celiaca, enfermedades inflamatorias del intestino, aterosclerosis, adrenalitis, síndromes poliendocrinos, gastritis, anemia perniciosa, enfermedades oculares tales como uveítis, y enfermedades del oído interno tales como cocleítis.

40 Las reacciones autoinmunitarias están, por lo tanto, dirigidas a las propias células o tejidos, más en particular a "autoantígenos", es decir antígenos (o proteínas) que están presentes de forma natural en el organismo del mamífero. En este mecanismo, los autoantígenos son reconocidos por linfocitos B y/o T que activan el sistema inmunitario para atacar al tejido que comprende el autoantígeno. Está bien reconocido que la supresión del sistema inmunitario es beneficiosa y en algunos casos puede conducir a la recuperación parcial o completa de la función del órgano en algunos casos. Sin embargo, este tipo de terapia no es eficaz para la enfermedad autoinmunitaria específica de órgano y hasta la fecha la supresión inmunitaria no se puede lograr de una forma específica del antígeno. La terapia actual usa la supresión inmunitaria no específica obtenida por el uso de corticosteroides y agentes inmunosupresores, que presentan todos efectos secundarios importantes relacionados con la falta de especificidad, limitando así su uso y su eficacia general.

45 Es interesante que por razones que no se entienden del todo, la incidencia de las enfermedades autoinmunitarias se ha duplicado a lo largo de los últimos 20 años, muy en paralelo con el aumento observado de enfermedades alérgicas. De nuevo, el coste relacionado con el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias ha aumentado enormemente en los últimos años, añadiendo una razón más a la necesidad de una nueva forma de terapia.

50 En la técnica anterior, se han usado epítomos de linfocitos T de alérgenos para fines de desensibilización. Los péptidos derivados de alérgenos que contienen uno o unos pocos epítomos de linfocitos T se usan en experimentos con animales y en seres humanos en un intento de inhibir la activación de linfocitos T específicos e inducir un estado de falta de respuesta, tal como se describe en la solicitud de patente WO93/08279. Una aplicación humana de este concepto es la administración de un péptido derivado de la secuencia de epítomos de linfocitos T presentes en el alérgeno Fel d 1, por inyecciones subcutáneas en individuos sensibles a los gatos (Wallner & Geffer (1994) *Allergy* 49, 302-308). Un procedimiento complementario alternativo de este concepto también se ha usado en experimentos con animales. Los péptidos usados se modificaron de forma que mantuvieran su capacidad para

unirse a determinantes de MHC de clase II en linfocitos B específicos, pero estos péptidos pierden su capacidad de activar los correspondientes linfocitos T (O'Hehir et al. (1991) *Int. Immunol.* 3, 819-826).

5 El cribado del alérgeno Der p 2 del ácaro del polvo doméstico con un conjunto de péptidos que se solapan de esta proteína, muestra que un péptido específico p21-35 comprende un epítipo de linfocito T que se comporta como epítipo universal y podría ser un candidato adecuado para la inducción de anergia de linfocitos T (Wu et al. (2003) *J. Immunol.* 169, 1430-2435, WO0170263).

10 En una publicación relacionada, se ha mostrado que un péptido que comprende un epítipo de MHC de clase II y una secuencia CHGS del mismo tiene un efecto específico de epítipo en la apoptosis mediada por CD4+ CD25+ de linfocitos B presentadores de antígeno (Janssens et al. (2003) *J. Immunol.* 171, 4604-4612). Sin embargo, los autores no mencionaban que esta secuencia CxxS tiene una actividad reductora. Sin embargo, la identificación de este péptido requiere un cribado exhaustivo del alérgeno y no hay indicación de que para todas y cada una de las proteínas antígenas, se pueda identificar dicho péptido con un efecto inductor de apoptosis.

El documento US2003152581 describe el mismo péptido p21-35 de Wu et al. fusionado a un epítipo de linfocito T similar a Th1 de toxoide tetánico.

15 El documento WO9308279 describe conjuntos de péptidos que se solapan de alérgenos de ácaros y el ensayo de secuencias de epítopos de estos fragmentos de péptidos. Algunos de los péptidos contienen una secuencia CGSC cerca de un epítipo de MHC de clase II. La presencia e importancia de dicha secuencia no se describe en esta publicación.

Compendio de la invención

20 La presente invención se refiere a nuevos péptidos inmunógenos con actividad citotóxica. Los péptidos de la invención comprenden (i) al menos un epítipo de linfocito T de un antígeno (propio o no propio) con potencial para producir una reacción inmunitaria, acoplado, opcionalmente a través de un conector a (ii) un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora, tal como una secuencia de tiorreductasa, y que además comprende opcionalmente (iii) una secuencia de aminoácidos que dirige al endosoma.

25 En un aspecto, la presente invención proporciona péptidos inmunógenos aislados derivados de una proteína antígenica que comprende una secuencia artificial que comprende un epítipo de linfocito T de la proteína antígenica y el motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C, cuyo motivo tiene actividad reductora, dando como resultado una respuesta específica de linfocitos T cuando se ponen en contacto con este péptido.

30 En realizaciones particulares, se proporcionan péptidos inmunógenos aislados derivados de una proteína antígenica que comprenden una secuencia artificial que comprende un epítipo de linfocito T de la proteína antígeno y el motivo C-X(2)-C, de modo que el motivo está situado adyacente al epítipo, o separado del epítipo dentro de la secuencia artificial por un conector de como máximo 7 aminoácidos. En realizaciones particulares adicionales, el péptido inmunógeno derivado de una proteína antígenica comprende una secuencia artificial que comprende un epítipo de linfocitos T de la proteína antígenica y un patrón C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C, de modo que el motivo está situado adyacente al epítipo, o separado del epítipo por un conector de como máximo 7 aminoácidos dentro de la secuencia artificial y de modo que el motivo no se encuentra de forma natural dentro de una región de 11 aminoácidos N terminales o C terminales del epítipo de linfocito T en la proteína de la que deriva el epítipo. Realizaciones particulares adicionales proporcionan péptidos inmunógenos aislados derivados de una proteína antígenica que comprenden una secuencia artificial que comprende un epítipo de linfocito T de la proteína antígeno y el motivo C-X(2)-[ST] o [ST]-X(2)-C, de modo que el motivo está situado adyacente al epítipo, o separado del epítipo por un conector de como máximo 7 aminoácidos dentro de la secuencia artificial, y de modo que en los péptidos donde el motivo es C-X(2)-S o S-X(2)-C, el epítipo de linfocito T no comprende la secuencia EPCIIHRGKP [SEQ ID. NO: 1] del péptido p21-35 de Der p 2. Realizaciones particulares adicionales corresponden a péptidos inmunógenos como se han descrito antes, en donde para los péptidos en donde el motivo es C-X(2)-S o S-X(2)-C, la proteína antígenica no es Der p 2.

Realizaciones particulares adicionales de la invención se refieren a péptidos inmunógenos tales como los descritos en lo que antecede, que además comprenden, unido a la secuencia artificial una secuencia que dirige al endosoma tardío.

50 Realizaciones particulares adicionales de la invención se refieren a péptidos inmunógenos tales como los descritos en lo que antecede, que comprende el motivo situado N terminal del epítipo.

Realizaciones particulares adicionales de la invención se refieren a péptidos inmunógenos tales como los descritos en lo que antecede, en donde la secuencia artificial tiene una longitud de entre 12 y 19 aminoácidos.

55 En realizaciones particulares de la invención, se proporcionan péptidos inmunógenos tales como los descritos en lo que antecede, en donde X en el motivo no es Tyr, u otro aminoácido voluminoso tal como Trp o Phe. Adicional o alternativamente, en realizaciones particulares, al menos uno de X en el motivo es Gly, Ala, Ser o Thr. Adicional o alternativamente en realizaciones particulares, al menos uno de X en el motivo es H o P.

En realizaciones particulares de la invención, se proporcionan péptidos inmunógenos tales como los descritos en lo que antecede, en donde la cisteína en el correspondiente motivo está metilada. En el caso del motivo C-X(2)-C una o ambas cisteínas en el motivo pueden estar metiladas.

5 Los péptidos inmunógenos de la presente invención se prevé que sean útiles en la generación de un efecto inmunosupresor, de modo que el efecto inmunosupresor dirigido determinará la naturaleza de la proteína antígena de la que deriva el epítipo. En realizaciones particulares de los péptidos inmunógenos descritos en lo que antecede, la proteína antígena es un autoantígeno, más en particular un autoantígeno seleccionado del grupo que consiste en tiroglobulina, peroxidasa tiroidea, receptor de TSH, insulina (proinsulina), ácido glutámico descarboxilasa (GAD), tirosina fosfatasa IA-2, proteína oligodendrocítica de la mielina, proteína de choque térmico HSP65.

10 En realizaciones particulares adicionales de los péptidos inmunógenos descritos en lo que antecede, la proteína antígena es un alérgeno, más en particular un alérgeno seleccionado del grupo que consiste en alérgeno Bet v1 de *Betula*, betalactoglobulina bovina y Der p1.

15 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso terapéutico y profiláctico de péptidos inmunógenos descritos en lo que antecede. Por consiguiente, la presente invención proporciona péptidos tales como los descritos antes, para usar como un medicamento, y composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los péptidos descritos antes, que comprenden opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de los péptidos descritos en lo que antecede en el tratamiento y prevención de trastornos autoinmunitarios. Como se ha indicado antes, se describe que los péptidos tienen tanto efecto terapéutico como profiláctico permitiendo de esta forma una reducción en la aparición, una reducción en la aparición y/o gravedad de recaída y/o la prevención y/o tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias. Por lo tanto, la presente invención proporciona los péptidos inmunógenos descritos en lo que antecede, para usar en el tratamiento y prevención de un trastorno autoinmunitario. Realizaciones específicas de trastornos autoinmunitarios contemplados en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a esclerosis múltiple, diabetes dependiente de insulina espontánea y tiroiditis autoinmune.

25 Un aspecto adicional más de la presente invención se refiere al uso de los péptidos descritos en lo que antecede en el tratamiento y prevención de afecciones alérgicas. Como se ha indicado antes, se describe que los péptidos tienen tanto efecto terapéutico como profiláctico permitiendo así la aparición y/o gravedad de la afección alérgica y/o la prevención de la afección alérgica y/o una reducción de los síntomas de la afección alérgica. Más en particular, la presente invención proporciona péptidos, como se describe en la presente memoria, para usar en el tratamiento y prevención de una afección alérgica seleccionada del grupo que consiste en alergia a ácaros del polvo, alergia a la leche y alergia al polen de abedul.

30 Un aspecto adicional más de la presente invención proporciona métodos para preparar un péptido de una proteína antígena capaz de producir actividad de linfocitos T CD4+ citotóxicos, comprendiendo dicho método las etapas de (a) proporcionar una secuencia de péptido que consiste en un epítipo de linfocito T de la proteína antígena, y conectada a esta secuencia de péptido, una secuencia que comprende el motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C, de modo que el motivo y el epítipo están adyacentes entre sí o separados por un conector de como máximo 7 aminoácidos. En realizaciones particulares, el motivo es el motivo C-X(2)-C. En realizaciones particulares de métodos de acuerdo con este aspecto de la invención, el epítipo de linfocito T es un epítipo de una proteína antígena que no comprende de forma natural el motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C dentro de una región de 11 aminoácidos N terminales o C terminales del epítipo de linfocito T, y el epítipo de linfocito T está unido al motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C. En otras realizaciones particulares más de los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención, donde el epítipo de linfocito T comprende la secuencia EPCIIHRGKP [SEQ ID. NO: 1] del péptido p21-35 de Der p 2, el motivo no es C-X(2)-S o S-X(2)-C. En realizaciones particulares adicionales, la proteína antígena no es Der p 2.

45 En realizaciones particulares, los métodos de la presente invención comprenden además modificar la secuencia del péptido así obtenido, modificando los aminoácidos en el epítipo, asegurándose así que en el péptido modificado la secuencia del epítipo está modificada de modo que se mantiene la capacidad para encajar en la hendidura de MHCII. Dichas modificaciones incluyen sustituciones de aminoácidos, pero también incluyen cambios en la cadena de aminoácidos tales como modificaciones que se encuentran en modificaciones postraduccionales de aminoácidos o incluso cadenas laterales de aminoácidos no naturales que no se encuentran de forma no natural.

50 Otro aspecto más de la invención se refiere a métodos para preparar un péptido inmunógeno aislado de una proteína antígena capaz de producir actividad de linfocitos T CD4+ citotóxicos, cuyos métodos comprenden las etapas de identificar dentro de la proteína antígena, una secuencia que comprende un epítipo de linfocito T flanqueado, en la proteína antígena, por el motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C dentro de una región de 11 aminoácidos N terminales o C terminales de dicho epítipo de linfocito T, y generar un péptido que comprende esta secuencia como un péptido aislado de entre 12 y 19 aminoácidos. No se ha demostrado previamente que de esta forma se puedan generar péptidos con propiedades inmunógenas particulares. En realizaciones particulares, la proteína antígena no es Der p 2.

De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden además modificar la secuencia de dicho péptido modificando los aminoácidos en el motivo y/o modificando el número de aminoácidos entre el motivo y el epítipo y/o modificando la secuencia de epítipo, asegurándose así que en dicho péptido modificado:

- 5 - se mantiene la capacidad del epítipo de linfocito T para encajar en la hendidura de MHCII,
- se conserva el motivo y
- dicho motivo y dicho epítipo permanecen adyacentes entre sí o separados por un conector de como máximo 7 aminoácidos.

10 De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden además la etapa de unir una secuencia que dirige al endosoma tardío al péptido obtenido como se ha descrito antes.

15 Un aspecto adicional más de la invención se refiere a métodos de identificación de una población de Treg citotóxicos. En realizaciones particulares, se proporcionan métodos que comprenden determinar que las células expresan CD4, no expresan IL-10 o TGF-beta, y expresan Krox-20 y producen granzimas (en particular granzimas B y C) y ligando Fas.

En realizaciones particulares adicionales, los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden determinar una o más de las siguientes características, cuando se comparan con Treg no citotóxicos: :

- 20 a) una mayor expresión de marcadores de superficie incluyendo CD103, CTLA-4, FasL e ICOS tras activación,
b) una expresión alta de CD25, expresión de CD4, ICOS, CTLA-4, GITR y expresión baja o sin expresión de CD127 (IL7-R),
c) la expresión del factor de transcripción T-bet y/o egr-2 (Krox-20) pero no del represor de transcripción Foxp3,
d) una producción alta de IFN-gamma y no de, o solo cantidades en trazas de IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 o TGF-beta.
e) una mayor expresión de marcadores que incluyen FasL y granzimas B y C tras activación.

25 En realizaciones particulares adicionales, los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden determinar que estas células no responden a la activación por reconocimiento de TCR.

Un aspecto más de la invención, proporciona métodos in vitro para obtener una población de linfocitos T reguladores específicos de antígeno con propiedades citotóxicas. En una realización particular, los métodos de acuerdo con este aspecto comprende las etapas de:

- 30 - proporcionar células de sangre periférica,
- poner en contacto dichas células con un péptido inmunógeno como se ha descrito antes y
- aumentar dichas células en presencia de IL-2.

En una realización particular adicional, estos métodos in vitro comprenden administrar un péptido inmunógeno de acuerdo con la presente invención a un sujeto, y aislar de dicho sujeto linfocitos T reguladores específicos de antígeno con propiedades citotóxicas.

35 Un aspecto adicional más de la presente invención se refiere a poblaciones in vitro de linfocitos T reguladores con propiedades citotóxicas, que se pueden obtener (y/o identificar) por los métodos de la presente invención descritos antes.

Un aspecto adicional más de la presente invención, proporciona el uso de la población de linfocitos T reguladores descritos en lo que antecede en el tratamiento y prevención de una afección alérgica o un trastorno autoinmunitario.

40 Se describen en el presente documento métodos in vitro que comprenden las etapas de:

- proporcionar células de sangre periférica del sujeto que se va a tratar,
- poner en contacto las células con un péptido inmunógeno como se describe en la presente memoria,
- aumentar las células, y
- administrar las células aumentadas al sujeto que se va a tratar.

Más en particular, en métodos proporcionados en la presente memoria se usa un péptido inmunógeno del cual se obtiene el epítipo de linfocito T de una proteína antígena implicada en el proceso patológico que se va a tratar. Más en particular, el antígeno es un antígeno dominante.

- 5 Se describen en la presente memoria métodos para tratar o prevenir una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende las etapas de administrar uno o más péptidos inmunógenos como se describen en la presente memoria, a dicho sujeto. Además se describen métodos para tratar o reducir los síntomas de una afección alérgica en un sujeto, que comprenden las etapas de administrar uno o más de los péptidos inmunógenos como se describen en la presente memoria a dicho sujeto. Más en particular, en métodos proporcionados en la presente memoria se usan péptidos inmunógenos de los cuales se obtiene el epítipo de linfocito T de una proteína antígena implicada en el proceso patológico que se va a tratar. Más en particular, el antígeno es un antígeno dominante.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la capacidad de p21-35 de Der p 2 para reducir los puentes disulfuro en el ensayo de reducción de insulina (ensayo turbodimétrico) (línea de trazos: control; línea negra con triángulos: péptido B4; línea negra con cuadrados: Trx (tioredoxina).

- 15 La figura 2 muestra el aumento de absorción de p21-35 por células presentadoras de antígeno (ensayado por apoptosis de linfocitos B wehi diana) por adición de un epítipo de linfocito T subdominante (línea gris con cuadrados: péptido T-B (p21-35 unido a epítipo T menor (p830-844) de toxina tetánica; línea negra con triángulos: péptido p21-35).

- 20 La figura 3 muestra el efecto de mutar las posiciones 21 a 24 en P21-35 a alanina en la proliferación de clones Treg (incorporación de ³H timidina (panel B) y lisis de células Wehi (panel C) de acuerdo con una realización de la invención. El motivo y los restos que forman la hendidura de unión a MHC de clase II en p21-35 están indicados en el panel A. (neg: sin péptido; a21: mutación Cys21Ala; a22: mutación His22Ala; a23: mutación Gly23Ala, a24 : mutación Ser24Ala).

- 25 La figura 4 muestra el efecto de la preinmunización con T-B en un modelo de ratón in vivo para la alergia, tras inyección de proteína Der p 2 de acuerdo con una realización de la invención. El "modelo de Der p 2" es un grupo de ratones de control, Tbalum es un grupo experimental previamente tratado con el péptido T-B.

Panel A: Cantidad (expresada como cifras totales) de macrófagos, eosinófilos y linfocitos en el grupo de control y experimental.

- 30 Panel B: Cantidad de eosinófilos, linfocitos y células calciformes expresada usando un sistema de puntuación de intensidad de 0 a 6.

Panel C: Hiperreactividad de las vías aéreas en el grupo de control y experimental. La hiperreactividad se mide calculando el área bajo la curva (AUC) de valores PenH obtenidos exponiendo los ratones a concentraciones crecientes de metacolina.

- 35 La figura 5 muestra el efecto de p21-35 en el metabolismo oxidativo de linfocitos Treg cognados, medido por separación celular de células marcadas con Carboxi-H2DCFDA. Panel A: PBS (control negativo); Panel B: péptido p21-35; Panel C; hidróperóxido de terc-butilo (control positivo).

- 40 La figura 6 muestra las propiedades citotóxicas de una línea de Treg (G121) en la línea de linfocitos B WEHI usada como una célula presentadora de antígeno tras la adición del péptido p21-25, indicado como porcentaje de lisis celular (rombos: WEHI + linfocitos T, cuadrados: células WEHI + linfocitos T + péptido p21-35, triángulos linfocitos T + células WEHI precargadas con el péptido p21-35).

La figura 7 muestra la supresión de clones de linfocitos Treg en la activación de linfocitos T específicos para otro epítipo en el mismo antígeno, o específico para otro antígeno por citotoxicidad de acuerdo con una realización de la invención.

Paneles A y B: línea de linfocitos T específicos para Der p1.

- 45 Paneles C y D: línea de linfocitos T específicos para el péptido p71-85 de Der p 2.

Los paneles A y C muestran la proliferación de las líneas celulares antes de incubación con un clon de Treg citotóxico específico para el péptido 21-35.

Los paneles B y D muestran la proliferación de las líneas celulares después de incubación con un clon de Treg citotóxico específico para el péptido 21-35.

- 50 La figura 8 muestra que los linfocitos Treg de la invención tienen un perfil fenotípico característico.

- 5 La figura muestra la producción de citoquinas de 4 clones de Treg específicos del péptido p21-35 derivados de ratones tratados con el péptido p21-35, péptido T-B como en la figura 4 (panel izquierdo). Se analizó en los líquidos sobrenadantes de los cultivos celulares el contenido de citoquinas después de cuatro días de estimulación con células presentadoras de antígenos (esplenocitos irradiados de ratones sin tratamiento previo, 10^5 células) y péptido p21-35 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 μl). Puede verse que los clones de Treg producían principalmente IFN-G y solo cantidades en trazas de TNF-a e IL-10. El panel de la derecha muestra que en el análisis del ARNm de dichos linfocitos Treg, no se detectaron transcritos para el represor de transcripción Foxp3, pero eran altamente expresados transcritos para T-bet, granzima A y granzima B.
- 10 La figura 9 muestra la expresión de diferentes marcadores celulares de cuatro clones de linfocitos T específicos de p21-35 en reposo, usando separación celular activada por fluorescencia (Facs).
- 15 La figura 10 muestra un visión general esquemática de la generación de clones de linfocitos T con propiedades citotóxicas después de estimulación con un péptido de control (señal directora - epítipo de Der p1) y un péptido experimental (señal directora - CFGS - epítipo de Der p 1) de acuerdo con una realización de la invención. "n" es el número total de clones de linfocitos T, "lítico" es el número de estos clones que tienen la capacidad de producir la lisis de células WEHI.
- La figura 11 muestra la producción de linfocitos T reguladores específicos de antígeno usando secuencias de epítipo con restos mutados de acuerdo con una realización de la invención.
- 20 Panel A: Inducción de apoptosis (indicada como expresión de anexina V en células reguladas por CD19+ usando células Wehi precargadas con p21-35 (triángulos), p21-35met (péptido p21-35 con cisteína metilada) (cruces) o mp21-35 (péptido de fusión de un epítipo menor de toxoide tetánico y P21-35) (cuadrados), y cocultivadas durante 24 horas con el clon de Treg citolítico G121. Resultados representativos de al menos 3 experimentos;
- 25 Panel B: Supresión de la proliferación de linfocitos T CD4+ del bazo (medido como incorporación de ^3H timidina) inducida por la proteína Der p 2 entera (negro), p21-35met (péptido p21-35 con cisteína metilada) (blanco) o una mezcla de p830 (péptido p830-844 de toxoide tetánico) y p21-35met (gris). Los histogramas son la media de cpm \pm e.e.m. de 6 ratones ensayados individualmente por triplicado;
- Panel C: Producción de citoquinas por los linfocitos T CD4+ del bazo pretratados con los péptidos indicados en el panel b. Las tres poblaciones de células se estimularon con Der p2 intacto. Los histogramas son para la concentración media \pm e.e.m. de 6 ratones ensayados individualmente.
- 30 Panel D: Procesamiento y presentación de p21-35met, mp21-35 y Der p 2 evaluado usando esplenocitos adherentes como APC y un clon de linfocitos T CD4+ específicos de p21-35 efectores (G221N). Las APC se trataron previamente con los inhibidores indicados. La proliferación de linfocitos T se muestra como un índice de estimulación. Las barras representan los valores del e.e.m. de cultivos por triplicado.
- 35 La figura 12 muestra la caracterización fenotípica de clones Treg citolíticos obtenidos con mp21-35Asn (péptido de fusión de péptido toxoide tetánico y p21-35 mutado (Ile28Asn)) de acuerdo con una realización de la invención. Se ensayó en los clones de Treg en alumbre la expresión de marcadores de superficie y CTLA-4 intracelular.
- Panel A: Expresión de marcadores de superficie (Facs) de un clon de Treg;
- Panel B: Detección intracelular de Foxp3, T-bet, granzima B (Grz-B), perforina y CD127 de superficie usando anticuerpos específicos con marcadores de fluorescencia (negro). La tinción de control con un anticuerpo de isotipo correspondiente también se muestra (blanco).
- 40 Panel C: RT-PCR de transcritos de ARNm de Grz-A y Grz-B detectados 12 días después de la última estimulación en 4 clones citolíticos. Las bandas 1, 3, 4 y 5 muestran los clones de Treg y la banda 2 un clon de linfocito T efector CD4+ específico de p21-25. Se usó beta-actina como control.
- Panel D: Detección por ELISA de citoquinas en 4 clones después de 3 días de estimulación con esplenocitos empobrecidos en linfocitos T irradiados, obtenidos de ratones sin tratamiento previo, y cargados con mp21-35Asn
- 45 La figura 13 muestra la inducción de apoptosis en células presentadoras de antígeno de acuerdo con una realización de la invención.
- Parte A: Panel izquierdo: Incubación (18 horas) de linfocitos B esplénicos precargados con p21-35 con clon de linfocito T R3TB7 (relación 2/1).
- 50 Panel derecho: Incubación (18 horas) de linfocitos B esplénicos precargados con p21-35 con un clon de linfocitos T efectores CD4+ de control. Las áreas blancas con líneas de trazos representan la expresión de caspasa-3 en linfocitos B cultivados sin linfocitos T; las áreas grises con líneas negras muestran la expresión de caspasa 3 en presencia del clon de Treg citolítico (panel izquierdo) o del clon efector CD4+ (panel derecho). Tinción con anticuerpo contra la caspasa 3 escindida. Los datos representan la evaluación de un mínimo de 3 experimentos independientes.

Parte B: Panel izquierdo: Células dendríticas (células dendríticas CD11c+ activadas por LPS)

Panel derecho: Células WEHI

5 Ambos tipos de células se cargan con p21-35 y se cocultivan con Treg R3TB7 (áreas negras) o un clon no citolítico de control de la misma especificidad (G221 N) (áreas blancas). La apoptosis se mide usando un anticuerpo contra la caspasa 3 escindida. El recuento de células se refiere al número de células WEHI que sobreviven después de 18 horas de incubación. Datos representativos de dos experimentos. El % de supresión indicado es el % de supresión de crecimiento de Wehi por R3TB7.

Parte C: Panel izquierdo: Incubación de células WEHI (cargadas con p21-35met e incubadas con Treg R3TB7 (relación 1/1)) con anticuerpo anti-FasL.

10 Panel derecho: Incubación de células WEHI (cargadas con p21-35met e incubadas con Treg R3TB7 (relación 1/1)) con un péptido antagonista de GZ-B (Z-AAD-CMK) (cuadrados negros) o un inhibidor químico de serina proteasas (DCIC: 3,4-dicloroiso-cumarina) (cuadrados blancos).

Parte D: Panel izquierdo: Apoptosis medida por la expresión de anexina V (área gris) de células dendríticas (células CD11c+ cargadas con p21-35 e incubadas en presencia de Treg G121 en una relación 1/1 durante 18 horas)

15 Panel derecho: como en el panel izquierdo, pero las DC y linfocitos Treg están separados por una membrana semipermeable en un sistema de cultivo en transpocillos.

(Área blanca (oculta en el panel D) representa la unión de anexina V en DC sin linfocitos T citotóxicos). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

20 Parte E: Dos poblaciones de células WEHI se marcaron con CFSE 80 nM o 300 nM y se incubaron durante 1 hora con p21-35 o p71-85, respectivamente. Después las células se incubaron con Treg G121 (panel izquierdo) o con linfocitos T efectores CD4+ de control (panel derecho). La unión de anexina V se analizó por citometría de flujo después de una incubación de 18 horas.

Figura 14: Supresión de linfocitos T inespecíficos (*bystander*) por linfocitos T citotóxicos de acuerdo con una realización de la invención.

25 Parte A: Análisis por FACS de células teñidas con CFSE de células el bazo CD4+CD25(-), incubadas con esplenocitos con reducción drástica de linfocitos T usados como APC, anticuerpo anti-CDr 1 pg/ml, p21-35 1 µg/ml, y una línea de linfocitos Treg. Se usó una relación 1/3 de Treg frente a linfocitos T CD4+CD25(-) en placas de cultivo de poliestireno sin recubrir con pocillos con forma de V para optimizar el contacto celular.

Paneles izquierdos: Línea de linfocitos Treg citolíticos G121

30 Paneles medios: Línea de linfocitos Treg citolíticos R3TB7

Paneles izquierdo: Cultivo de células de control en donde los Treg citolíticos se sustituyen por esplenocitos CD4+CD25(-) no marcados (paneles derechos). El número de células, las divisiones celulares y el tamaño celular se evaluaron por FACS después de selección de las células vivas.

Paneles superiores: incubación durante 48 horas

35 Paneles inferiores: incubación durante 72 horas

Parte B: Análisis de la unión de anexina V en linfocitos T CD4+CD25(-) marcados con CFSE después de cocultivo con la línea de linfocitos Treg R3TB7 después de 18 horas (panel medio) y después de 24 horas (panel derecho). El panel izquierdo muestra un cocultivo de control (24 horas) sin Treg citolíticos.

40 Parte C: Experimento con las configuraciones experimentales de los paneles inferiores de la parte A, pero las divisiones de CFSE se evaluaron después de 72 h de cocultivo (excepto para el panel izquierdo), sin EGTA y sin línea de linfocitos Treg citolíticos (panel izquierdo), en presencia de EGTA 2 mM (panel medio) o de EGTA 4 mM (panel derecho). Parte D: Marcate de un clon de células Th2 específicas de Der p 1 con CFSE y cocultivo durante 72 h con esplenocitos empobrecidos en linfocitos T cargados con péptido cognado (aminoácidos 114 a 128 de Der p 1). La selección se hizo en células positivas para CFSE y negativas para yoduro de propidio. El panel izquierdo muestra la proliferación determinada en un desplazamiento de fluorescencia hacia la izquierda en presencia de las mismas células Th2 no marcadas (relación 1/1). El segundo panel desde la izquierda muestra los resultados obtenidos tras la adición de Treg G121 (relación 1/1 con el clon de Th2) más p21-35 (1 µg/ml) al cultivo, en presencia de un anticuerpo de control. Los siguientes 3 paneles (de izquierda a derecha) muestran los efectos obtenidos cuando se añadieron los anticuerpos FasL, GITR o Lag3 desde el principio del cocultivo con el clon citolítico. Cada anticuerpo se usó en concentración de 10 µg/ml. Los porcentajes son para la proporción de células marcadas con CFSE negativas para PI dentro de la población total de células CFSE.

45

50

- 5 Parte E: Incubación de un clon de Th1 marcado con CFSE específico para p71-85 de Der p 2, durante 72 horas con un número igual del mismo clon no marcado (panel izquierdo). La proliferación se muestra como un desplazamiento de la fluorescencia hacia la derecha. Este experimento se repitió pero sin sustituir el clon no marcado por un Treg citolítico en un solo pocillo (panel medio), o en dos pocillos separados por una membrana transpocillo (panel derecho). La relación de células era 1/1. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los histogramas representan células marcadas con CFSE negativas para PI.
- 10 Parte F: Incubación de esplenocitos empobrecidos en linfocitos T con un clon de Th1 específico para p71-85 marcado con CFSE durante 18 horas. El péptido p71-85 se añadió para activar el clon en cada caso excepto para el control (panel izquierdo alejado). A este cultivo, se añadió un clon de células de control con p830-844 con su péptido específico (panel izquierdo), o un clon citolítico (R3TB7) con o sin el péptido p21-35 (paneles derecho alejado y derecho, respectivamente). La relación de células era 1/1. Se muestran gráficas de densidad de puntos. Los resultados se expresan como los valores de FSC medios (valor superior, negro) y porcentajes de células CFSE que forman blastos (valor inferior, gris). La formación de blastos se calculó a partir del tamaño celular en células positivas para CFSE en la separación de linfocitos que viven (establecido en las gráficas de FSC / SSC). La separación de linfocitos en reposo se ajustó respecto a la región que mostraba la mayor densidad de células no estimuladas (panel izquierdo alejado). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos.
- 15 La figura 15 muestra la localización de Treg citolíticos en los pulmones en ratones expuestos a alérgeno y la inducción in vivo de apoptosis por linfocitos B presentadores de antígeno de acuerdo con una realización de la invención.
- 20 A: Linfocitos B esplénicos aislados por perlas magnéticas de ratones BALB/c sin tratamiento previo, se transdujeron con un vector retroviral que codificaba 21-35 y la proteína gp75. El panel izquierdo representa linfocitos B incubados durante 18 horas con un clon de linfocitos T citolíticos (relación 2/1). El panel derecho representa el mismo ensayo pero llevado a cabo con una célula efectora CD4+ de control. Las curvas de trazos representan la tinción anti-caspasa 3 en linfocitos B cultivados sin linfocitos T.
- 25 B: Se administraron 5×10^6 linfocitos B transducidos con p21-35 vía IV a cada ratón (n=6) seguido 5 días más tarde de 5×10^5 Treg citolíticos. Dos semanas más tarde, los ratones se sacrificaron y se prepararon las células de bazo y pulmones por purificación por gradiente de densidad y selección con CD19+ usando perlas magnéticas. La presencia de ARNm que codifica la construcción retroviral usada para generar linfocitos B transgénicos se detectó por PCR. Un grupo de ratones (n=6) recibió los linfocitos B transducidos pero no linfocitos T citolíticos, se trató de la misma forma. Se analizaron 6 ratones de cada grupo y los resultados representativos se muestran en las bandas A para los bazo de 2 ratones, tratados con Treg citolíticos y en la bandas B para 2 ratones del grupo de control.
- 30 C: Se administraron 5×10^5 V β 8.1+ Treg citolíticos, o un V β 8.1+ clon de linfocitos T de control, vía IV a ratones BALB/c sin tratamiento previo, seguido 24 h más tarde de tres instilaciones nasales con 100 microgramos de Der p 2. Dos semanas más tarde, los ratones se sacrificaron y los linfocitos de los pulmones se prepararon por centrifugación por gradiente de densidad. La proporción de células que expresaban V β 8.1 se calculó por FACS dentro de la población de células CD4+. Los resultados se expresan como el % medio \pm e.e.m. de 6 ratones de cada grupo. el % CD4 es el porcentaje de CD4 dentro de la población linfocítica total; % V β 8.1 es el porcentaje de células que expresan V β 8.1 dentro de la población total de células CD4.
- 35 La figura 16 muestra la prevención (a-f) y la supresión (g-l) de asma experimental por lo clones de Treg citolíticos de acuerdo con una realización de la invención. Los paneles A a F muestran datos de ratones tratados con Treg citolíticos específicos para mp21-35Asn (clones T1 y T3) antes de sensibilización IP con Der p 2. (El "clon de linfocito T de control" es específico para el péptido 830-844 de toxoide tetánico, el "modelo Der P 2" se refiere a experimentos en donde no se administran células a las células).
- 40 En los paneles G a L los ratones se trataron con las líneas celulares anteriores después de sensibilización IP con Der p 2
- 45 Los paneles A y H muestran el número de células de BALF total;
- Los paneles B y H muestran los recuentos de células de BALF diferenciales;
- Los paneles C e I muestran citoquinas de BALF medidas por ELISA;
- Los paneles D y J muestran una puntuación semicuantitativa para la infiltración pulmonar por eosinófilos y linfocitos.
- 50 Los paneles E y K muestran el recuento de células calciformes. Los resultados se expresan como la proporción (%) de células calciformes dentro de la población de células epiteliales después de tinción con PAS;
- Los paneles F y L muestran la hiperreactividad de vías aéreas evaluada por inhalación de concentraciones crecientes de metacolina. Los valores de PenH se determinaron usando un pletismógrafo de cuerpo entero. Los resultados se muestran como el "área bajo la curva" (AUC) para valores de PenH. Para comparación, se muestran

los valores de AUC obtenidos en ratones sin tratamiento previo en un experimento independiente (naïve). Este grupo da valores base tanto en ensayos de prevención como de supresión.

Los datos representan resultados de un mínimo de 5 ratones por grupo. Las barras representan la media \pm e.e.m. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ comparado (P valor de una cola) respecto al modelo de Der p 2.

5 La figura 17 muestra la inducción de apoptosis por la línea de linfocitos T CD4 efectores específica para el epítipo de linfocitos T Der p1 (114-128), marcada con CFSE e incubada con APC cargadas con el correspondiente péptido (114-128) (panel superior) de acuerdo con una realización de la invención. El panel inferior muestra la mortalidad base (40%) cuando un número idéntico de células efectoras (no marcadas) sustituye al clon de linfocito T regulador.

10 La figura 18A muestra el recuento de células diferencial en BALF después de instilaciones nasales con 100 μ g de Der p1 (modelo) o NaCl (negativo). Se realizó en los ratones la transferencia adoptiva de linfocitos T citolíticos antes (prevención) o después (supresión) de la primera serie de instilaciones nasales con Der p 1. Las barras representan media \pm EEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado con el grupo negativo.

15 La figura 18B muestra la puntuación de histología después de transferencia adoptiva de linfocitos T citolíticos de acuerdo con una realización de la invención. Se establecieron las puntuaciones para los infiltrados de eosinófilos, linfocitos y plasmocitos usando una escala de 0 a 6 (sin lesión para infiltrado masivo). Los ratones recibieron 2 series de 3 instilaciones nasales con 100 μ g de Der p 1 (modelo) o NaCl (negativo). Se llevó a cabo en los ratones la transferencia adoptiva de linfocitos T citolíticos antes (prevención) o después (supresión) de la primera serie de instilación nasal con Der p 1. Las barras representan media \pm EEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado con el grupo modelo.

20 La figura 19A muestra la producción de TNF-alfa (histogramas en negro) y de IFN-gamma (histogramas en gris) de clones citolíticos estimulados con APC no usando péptido, usando péptido p21-35 de tipo natural (C-x-x-S), o p21-35 mutado Ser24Cys (C-x-x-C) de acuerdo con una realización de la invención.

25 La figura 19B muestra la detección por PCR semicuantitativa de transcritos de granzimas (bandas 1 a 3) y Fas-L (bandas 6 a 8). Un clon citotóxico se estimuló con APC cargadas con p21-35 de tipo natural (bandas 1, 6), p21-25 modificado Ser24Cys (bandas 2, 7) o sin péptido (bandas 3, 8). Las bandas 4 y 5 son marcadores de peso molecular.

30 La figura 20 muestra la apoptosis de linfocitos T efectores marcados con CFSE y cocultivados con células APC de acuerdo con una realización de la invención. Las barras indican linfocitos T efectores no marcados y péptido MOG de tipo natural: T_{efectores} wtMOG; células Tr y péptido MOG no modificado: Tr wtMOG; células Tr y péptido MOG modificado que contiene la secuencia de tiorredoxina: Tr CsMOG). Los linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ se obtuvieron de animales inmunizados con péptido MOG que contenía una secuencia consenso de tiorredoxina (CSMOG). Las células efectoras CD4⁺CD25⁻ se obtuvieron de animales EAE (T_{efectores}).

35 La figura 21 muestra el efecto de la inyección de péptido MOG modificado en el desarrollo de EM en un modelo de ratón. (0: sin enfermedad, 1: cola flácida, 2: cola flácida y pérdida de peso mayor de 10%, 3: parálisis parcial de las extremidades traseras, 4: parálisis completa de las extremidades traseras). Modelo: 3 ratones C57BL/6 recibieron, el día 0, inyección SC de 100 μ g de péptido MOG/400 μ g de *Mycobacterium butyricum* en CFA e inyección ip de 300 ng de *Bordetella pertussis* en NaCl. El día +2, se les dio una segunda inyección de B. pertussis. Transferencia adoptiva: 3 ratones recibieron inyección ip de 500.000 Treg, 24 h antes de la inducción de la enfermedad como en el grupo modelo.

40 La figura 22 muestra la puntuación clínica de los ratones con y sin la prevención por inyección del péptido MOG en un modelo de esclerosis múltiple.

45 La figura 23 muestra la inducción in vitro de apoptosis en células CD4 policlonales marcadas con CFSE de dos esplenocitos de ratones NOD. Estas células se cocultivaron con APC cargadas con péptido GAD65 524-543 [SEQ ID. NO: 34] junto con células CD4 policlonales purificadas de ratones NOD tratados con péptido modificado. La figura muestra la tinción de las células CD4 diana con 7-AAD y anexina V-PE. La tabla representa el porcentaje de células positivas dobles (células muertas).

Descripción detallada

Definiciones

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

- 5 El término "antígeno" como se usa en la presente memoria se refiere a una estructura de una macromolécula, típicamente proteína (con o sin polisacáridos) o hecha de composición proteica que comprende uno o más haptenos y comprende epítomos de linfocitos T. La expresión "proteína antigénica" como se usa en la presente memoria se refiere a una proteína que comprende uno o más epítomos de linfocitos T. Un autoantígeno o proteína autoantígena como se usa en la presente memoria se refiere a una proteína humana o animal presente en el cuerpo, que produce una respuesta inmunitaria dentro del mismo cuerpo humano o animal.
- La expresión "proteína antigénica alimentaria o farmacéutica" se refiere a una proteína antigénica presente de forma natural en un alimento o producto farmacéutico, tal como en una vacuna.
- 10 El término "epítomo" se refiere a una o varias partes (que pueden definir un epítomo conformacional) de una proteína antigénica que es/son reconocidas específicamente y a las que se unen un anticuerpo o una parte del mismo (Fab', Fab2', etc.) o un receptor presentado en la superficie de la célula de un linfocito B o T, y que mediante dicha unión es capaz de inducir una respuesta inmunitaria.
- 15 La expresión "epítomo de linfocito T" en el contexto de la presente invención, se refiere a un epítomo de linfocito T subdominante o menor, es decir, una parte de una proteína antigénica que es reconocida específicamente y a la que se une un receptor en la superficie celular de un linfocito T. El que un epítomo sea dominante, subdominante o menor depende de la reacción inmunitaria producida contra el epítomo. La dominancia depende de la frecuencia con la que dichos epítomos son reconocidos por linfocitos T y son capaces de activarlos, entre todos los posibles epítomos de linfocitos T de una proteína.
- 20 En realizaciones particulares, un epítomo de linfocito T es un epítomo reconocido por moléculas MHC de clase II, que consisten en una secuencia de +/- 9 aminoácidos que encajan en la hendidura de la molécula MHC II. Dentro de una secuencia de péptido que representa un epítomo de linfocito T, los aminoácidos en el epítomo se numeran de P1 a P9, los aminoácidos N terminales del epítomo se numeran P-1, P-2 etc., los aminoácidos C terminales del epítomo se numeran P+1, P+2 etc., como se ilustra en la figura 3A.
- 25 El término "homólogo" como se usa en la presente memoria con referencia a los epítomos usados en el contexto de la invención, se refiere a moléculas que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 50%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% con el epítomo que se encuentra de forma natural, a la vez que mantiene la capacidad del epítomo de unirse a un anticuerpo o receptor de superficie celular de un linfocito B y/o T. Realizaciones particulares de homólogos de un epítomo corresponden al epítomo natural modificado en como máximo 3, más en particular como máximo 2, más en particular en un aminoácido.
- 30 El término "derivado" como se usa en la presente memoria con referencia a los péptidos de la invención, se refiere a moléculas que contienen al menos la parte activa del péptido (es decir, capaz de producir la actividad de linfocitos T CD4+ citolíticos) y, además de esta, comprende una parte complementaria que puede tener diferentes fines tales como estabilizar los péptidos o alterar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del péptido.
- 35 La expresión "identidad de secuencias" de dos secuencias como se usa en la presente memoria se refiere al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos o aminoácidos en 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%, e 86% a 90%, de 91% a 95%, de 96% a 100%, o 100%.
- 40 Las expresiones "polinucleótido (o ácido nucleico) codificante de péptido" y "polinucleótido (o ácido nucleico) que codifica un péptido", como se usan en la presente memoria, se refieren a una secuencia de nucleótidos, que cuando se expresan en un entorno adecuado, producen la generación de la secuencia peptídica relevante o un derivado y homólogo de la misma. Dichos polinucleótidos o ácidos nucleicos incluyen las secuencias normales que codifican los péptidos, así como derivados y fragmentos de los ácidos nucleicos capaces de expresar un péptido con la actividad requerida. De acuerdo con una realización, el ácido nucleico que codifica los péptidos de acuerdo con la invención o fragmento del mismo, es una secuencia que codifica el péptido o fragmento del mismo procedente de un mamífero, o que corresponde a un mamífero, más en particular un fragmento de péptido humano.
- 45 La expresión "compuesto orgánico que tiene una actividad reductora" se refiere, en el contexto de esta invención, a compuestos, más en particular secuencias de aminoácidos, con una actividad de reducción de enlaces disulfuro en proteínas. La expresión "trastornos inmunitarios" o "enfermedades inmunitarias" se refiere a enfermedades en donde una reacción del sistema inmunitario es responsable de o mantiene un mal funcionamiento o situación no fisiológica en un organismo. Están incluidos en los trastornos inmunitarios, entre otros, trastornos alérgicos y enfermedades autoinmunitarias.
- 50 Las expresiones "enfermedades alérgicas" o "trastornos alérgicos" como se usan en la presente memoria, se refieren a enfermedades caracterizadas por reacciones de hipersensibilidad del sistema inmunitario frente a sustancias específicas llamadas alérgenos (tales como polen, picaduras, fármacos o alimentos). La alergia es el conjunto de signos y síntomas observados siempre que un paciente individual atópico encuentra un alérgeno al que ha sido sensibilizado, que puede producir el desarrollo de diferentes enfermedades, en particular enfermedades respiratorias y síntomas tales como asma bronquial. Existen varios tipos de clasificaciones y la mayoría de los trastornos alérgicos tienen diferentes nombres dependiendo de en qué sitio del cuerpo del mamífero ocurre.
- 55

"Hipersensibilidad" es una reacción no deseable (que produce daño, incomodidad y a veces es mortal) producida en un individuo tras la exposición a un antígeno al cual se ha sensibilizado; la "hipersensibilidad inmediata" depende de la producción de anticuerpo IgE, y por lo tanto es equivalente a una alergia.

5 Las expresiones "enfermedad autoinmunitaria" o "trastorno autoinmunitario" se refieren a enfermedades que resultan de una respuesta inmunitaria aberrante de un organismo contra sus propias células o tejidos, debido a un fallo del organismo para reconocer sus propias partes constituyentes (hasta el nivel submolecular) como "propias". El grupo de enfermedades se puede dividir en dos categorías, enfermedades específicas de órgano y sistémicas.

10 Un "alérgeno" se define como una sustancia, normalmente una macromolécula o una composición proteína que produce la producción de anticuerpos IgE en pacientes individuales (atópicos) predispuestos, en particular genéticamente dispuestos. Se presentan definiciones similares en Liebers et al. (1996) *Clin. Exp. Allergy* 26, 494-516.

15 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo, que produce el efecto terapéutico o preventivo deseado en un paciente. Por ejemplo, en referencia a una enfermedad o trastorno, es la cantidad que reduce en alguna medida uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, y más en particular, devuelve a la normalidad, parcial o completamente, los parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o causantes de la enfermedad o trastorno. De acuerdo con una realización particular de la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo, que conducirá a una mejora o restablecimiento de la situación fisiológica normal. Por ejemplo, cuando se usa para tratar terapéuticamente a un mamífero que padece un trastorno inmunitario, es una 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 vectores víricos, se ajusta para asegurar la producción local de la dosis relevante del péptido de la invención, derivado u homólogo del mismo.

25 El término "natural" cuando se refiere a un péptido o una secuencia en la presente memoria, se refiere al hecho de que la secuencia es idéntica a una secuencia que se encuentra de forma natural. En contraste con esto, el término "artificial" se refiere a una secuencia o péptido que como tal, no se encuentra en la naturaleza. Opcionalmente, una secuencia artificial se obtiene de una secuencia natural mediante modificaciones limitadas tales como el cambio de uno o más aminoácidos dentro de la secuencia natural o por adición de aminoácidos N o C terminales de una secuencia natural. Los aminoácidos en la presente memoria se nombran con su nombre completo, su abreviatura de tres letras o su abreviatura de una letra.

30 Los motivos de secuencia de aminoácidos se escriben en la presente memoria en el formato de Prosite. El símbolo X se usa para una posición donde un aminoácido es aceptado. Las alternativas se indican citando los aminoácidos aceptables para una posición dada, entre corchetes ('[]'). Por ejemplo: [CST] representa un aminoácido seleccionado de Cys, Ser o Thr. Los aminoácidos que están excluidos como alternativas se indican citándolos entre llaves ('{ }'). Por ejemplo: {AM} representa cualquier aminoácido excepto Ala y Met. Los diferentes elementos en un motivo están separados unos de otros por un guion -. La repetición de un mismo elemento 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 La presente invención se basa en el descubrimiento de que un péptido que comprende un epítipo de linfocito T y una secuencia peptídica, que tiene actividad reductora, es capaz de generar una población de linfocitos T reguladores que tiene un efecto citotóxico en las células presentadoras de antígeno.

45 Por consiguiente, en su sentido más amplio, la invención se refiere a péptidos que comprenden al menos un epítipo de linfocito T de un antígeno (propio o no propio) con el potencial para producir una reacción inmunitaria, acoplado a un compuesto orgánico que tiene actividad reductora, tal como un motivo de secuencia de tiorreductasa. El epítipo de linfocito T y el compuesto orgánico están opcionalmente separados por una secuencia conectora. En realizaciones opcionales adicionales, el péptido comprende adicionalmente una secuencia que dirige al endosma y/o secuencias "flanqueadoras" adicionales.

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

50 La actividad reductora de un compuesto orgánico se puede ensayar por su capacidad para reducir un grupo sulfhidrilo tal como en el ensayo de solubilidad de insulina descrito en los ejemplos en la presente memoria, en donde se altera la solubilidad de la insulina tras la reducción, o con una insulina marcada de modo fluorescente. El compuesto orgánico reductor se puede acoplar al extremo amino del epítipo de linfocito T o en el extremo carboxi del epítipo de linfocito T.

55 En general, el compuesto orgánico con actividad reductora es una secuencia peptídica. Se encuentran fragmentos peptídicos con actividad reductora en tiorreductasas que son enzimas reductoras de disulfuro pequeñas que incluyen glutarredoxinas, nucleorredoxinas, tiorredoxinas y otras tiol/disulfuro oxidorreductasas (Holmgren (2000) *Antioxid Redox Signal* 2, 811-820; Jacquot et al. (2002) *Biochem Pharm* 64, 1065-1069). Son multifuncionales,

5 ubicuas y se encuentran en muchas procariotas y eucariotas. Ejercen actividad reductora para enlaces disulfuro en proteínas (tales como enzimas) a través de las cisteínas activas rédox dentro de las 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. (2003) *Biochemistry* 42, 11214-11225; Fomenko et al. (2002) *Prot. Science* 11: 2285-2296), en las que X representa cualquier aminoácido. Dichos dominios también se encuentran en proteínas mayores tales como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y fosfolipasa C específica de fosfoinosítido (tabla 1).

Tabla 1: Aparición del motivo CST-X(2)-CST en proteínas reductoras representativas

Organismo	Longitud de la proteína	posición en la proteína de C-X(2)-S	estructura secundaria y descripción	estructura secundaria y descripción	estructura secundaria y descripción
<i>D. pteronyssinus</i>	129	21-25	b-CHGS-espinal		alérgeno Der p 2
<i>E. coli K12</i>	115	30-35	b-CGFS-a		Glutarredoxina
<i>E. coli K12</i>	104	14-18	b-CGTS-a		arsenato reductasa
<i>S. cerevisiae</i>	203	108-112	b-CPYS-a		homólogo de glutarredoxina
<i>S. cerevisiae</i>	231	136-140	b-CSYS-a		homólogo de glutarredoxina
<i>S. cerevisiae</i>	517	62-66	b-CLHS-a		proteína disulfuro isomerasa
<i>H. sapiens</i>	793	72-78	b-CGHS-a		homólogo de tiorredoxina

nº b: cadena beta; A: hélice alfa

10 Por consiguiente, en realizaciones particulares, los péptidos de acuerdo con la presente invención comprenden el motivo de la secuencia de tiorreductasa [CST]-X(2)-[CST] en donde al menos uno de [CST] es Cys; por lo tanto, el motivo es [C]-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-[C]. En la presente solicitud dicho tetrapéptido se denominará "el motivo". En realizaciones particulares, los péptidos de la invención contienen el motivo de secuencia [C]-X(2)-[CS] o [CS]-X(2)-[C]. En realizaciones más particulares, los péptidos contienen el motivo de secuencia C-X(2)-S, S-X(2)-C o C-X(2)-C.

15 Como se explica en detalle más adelante, los péptidos de la presente invención se pueden hacer por síntesis química, que permite la incorporación de aminoácidos no naturales. Por consiguiente, en el motivo de los compuestos reductores de acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, C representa cisteína u otros aminoácidos con un grupo tiol tal 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 deben estar como parte de un puente disulfuro de cisteínas. No obstante, el motivo puede comprender cisteínas modificadas tales como cisteína metilada, que se convierte en cisteína con grupos tiol libres in vivo.

25 El aminoácido X en el motivo [CST]-X(2)-[CST] de realizaciones particulares de los compuestos reductores 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 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 la Tyr. En realizaciones particulares adicionales al menos un X en el motivo [CST]-X(2)-[CST] es His o Pro.

30 En los péptidos de la presente invención que comprenden el motivo descrito antes como el compuesto reductor, el motivo está situado de modo que cuando el epítipo encaja en la hendidura de MHC, el motivo permanece fuera de la hendidura de unión del MHC. El motivo está situado inmediatamente adyacente a la secuencia de epítipo dentro del péptido, o está separado del epítipo de linfocito T por un conector. Más en particular, el conector comprende una secuencia de aminoácidos de 7 aminoácidos o menos. Más en particular, el conector comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. Alternativamente, el conector puede comprender 6, 8 o 10 aminoácidos. En aquellas realizaciones particulares de los péptidos de la invención donde la secuencia del motivo está adyacente a la secuencia del epítipo, esto se indica como la posición P-4 a P-1 o P+1 a P+4 comparado con la secuencia del epítipo.

35 Además del conector peptídico, se pueden usar otros compuestos orgánicos como conectores para unir las partes del péptido entre sí, (p. ej., el motivo de la secuencia de epítipo de linfocito T).

Los péptidos de la presente invención pueden comprender además secuencias de aminoácidos cortas adicionales N o C terminales de la secuencia (artificial) que comprende el epítipo de linfocito T y el compuesto reductor (motivo). Dicha secuencia de aminoácidos en general se denomina en la presente memoria como "secuencia flanqueadora". Una secuencia flanqueadora puede estar situada entre el epítipo y una secuencia que dirige al endosoma y/o entre el compuesto reductor (p. ej., motivo) y una secuencia que dirige al endosoma. En realizaciones adicionales, que no comprenden una secuencia que dirige al endosoma, puede estar presente una secuencia de aminoácidos corta N o C terminal del compuesto reductor y/o secuencia de epítipo en el péptido. Más en particular, una secuencia flanqueadora es una secuencia de entre 1 y 7 aminoácidos, más en particular una secuencia de 2 aminoácidos.

En realizaciones particulares de los péptidos de la invención, el motivo está situado N-terminal desde el epítipo.

- 10 En realizaciones particulares adicionales, donde el motivo presente en el péptido contiene una cisteína, esta cisteína está presente en el motivo en la posición remota desde el epítipo, por lo tanto el motivo aparece como C-X(2)-[ST] o C-X(2)-S N terminal del epítipo, o aparece como [ST]-X(2)-C o S-X(2)-C C terminal del epítipo.

- 15 En algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan péptidos que comprenden una secuencia de epítipo y una secuencia de motivo. En realizaciones particulares adicionales, el motivo aparece varias veces (1, 2, 3, 4 o incluso más veces) en el péptido, por ejemplo, como repeticiones del motivo que pueden estar separadas unas de otras por uno o más aminoácidos (p. ej. CXXC X CXXC X CXXC), como repeticiones que son adyacentes entre sí (CXXC CXXC CXXC) o como repeticiones que se superponen entre sí CXXCXXCXXC o CXCCXCCXCC). Alternativamente, se proporcionan uno o más motivos tanto en el extremo N como el C de la secuencia de epítipo de linfocito T.

- 20 Otras variaciones contempladas para los péptidos de la presente invención incluyen péptidos que contienen repeticiones de una secuencia de epítipo de linfocito T, en donde cada secuencia de epítipo está precedida y/o seguida del motivo (p. ej., 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. Hay que indicar que las secuencias repetitivas de péptidos que comprenden un epítipo que comprende en el mismo el motivo, también dará como resultado una secuencia que comprende tanto el "epítipo" como un "motivo". En dichos péptidos, el motivo dentro de una secuencia de epítipo funciona como un motivo fuera de una segunda secuencia de epítipo.

Sin embargo, en realizaciones particulares, los péptidos de la presente invención comprenden solo un epítipo de linfocito T.

- 30 Por consiguiente, los péptidos de acuerdo con la presente invención comprenden, además de un compuesto reductor, un epítipo de linfocito T derivado de un antígeno, típicamente un alérgeno o un autoantígeno, dependiendo de la aplicación. Como se describe más adelante, un epítipo de linfocito T en una secuencia de proteína se puede identificar por ensayos funcionales y/o uno o más ensayos de predicción in silico. Los aminoácidos en una secuencia de epítipo de linfocito T se numeran de acuerdo con su posición en la hendidura de unión a las proteínas MHC. En realizaciones particulares, el epítipo de linfocito T presente dentro de los péptidos de la invención consiste en entre 8 y 25 aminoácidos, todavía más en particular entre 8 y 16 aminoácidos, todavía lo más en particular consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos. En una realización más particular, el epítipo de linfocito T consiste en una secuencia de 9 aminoácidos. En una realización particular adicional, el epítipo de linfocito T es un epítipo que es presentado a los linfocitos T por moléculas MHC de clase II. En realizaciones particulares de la presente invención, la secuencia del epítipo de linfocito T es una secuencia de epítipo que encaja en la hendidura de una proteína MHC II, más en particular un nonapéptido que encaja en la hendidura de MHC II.

- 45 El epítipo de linfocito T de los péptidos de la presente invención puede corresponder a una secuencia de epítipo natural de una proteína o puede ser una variante modificada de la misma, con la condición de que el epítipo de linfocito T retenga su capacidad para unirse dentro de la hendidura del MHC, similar a la secuencia de epítipo de linfocito T natural. El epítipo de linfocito T modificado puede tener la misma afinidad de unión por la proteína MHC que el epítipo natural, pero también puede tener una menor afinidad. En realizaciones particulares, la afinidad de unión del péptido modificado no es menor que 10 veces menos que la del péptido original, más en particular no menor que 5 veces menos. Es un descubrimiento de la presente invención que los péptidos de la presente invención tienen un efecto estabilizante en complejos de proteínas. Por consiguiente, el efecto estabilizante del complejo de péptido-MHC compensa la menor afinidad del epítipo modificado por la molécula de MHC. Un ejemplo de esto, es la sustitución Ile28Asn del péptido p21-25 de Der p 2, que a pesar de su menor afinidad por la hendidura de MHC II, es capaz de producir la misma respuesta de linfocitos T que el péptido p21-35 de Der p 2 natural.

- 55 En realizaciones particulares, la secuencia que comprende el epítipo de linfocito T y el compuesto reductor dentro del péptido está además unido a una secuencia de aminoácidos (u otro compuesto orgánico) que facilita la absorción del péptido en endosomas tardíos para el procesamiento y presentación dentro de los determinantes del MHC II. El direccionamiento a endosomas tardíos es mediado por señales presentes en la cola citoplasmática de proteínas y corresponde a motivos de péptidos bien identificados, tales como el motivo [DE]XXXL[LI] o DXXLL basados en dileucina (p. ej. DXXXLL), el motivo YXXØ basado en tirosina, o similares, llamados motivo de agrupación ácido. El símbolo Ø representa restos de aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas voluminosas

tales como Phe, Tyr y Trp. Las secuencias que dirigen al endosoma tardío permiten el procesamiento y la presentación eficaz del epítipo de linfocito T derivado de antígeno por las moléculas de MHC de clase II. Dichas secuencias que dirigen al endosoma están contenidas, por ejemplo, dentro de la proteína gp75 (Vijayasradhi et al. (1995) *J Cell Biol* 130, 807-820), la proteína CD3 gamma humana, HLA-BM β (Copier et al. (1996) *J. Immunol.* 157, 1017-1027), la cola citoplasmática del receptor DEC205, (Mahnke et al. (2000) *J Cell Biol* 151, 673-683). Se describen otros ejemplos de péptidos que funcionan como señales clasificadoras al endosoma en la revisión de Bonifacio y Traub (2003) *Annu. Rev. Biochem.* 72, 395-447. Alternativamente, la secuencia puede ser la de un epítipo de linfocito T subdominante o menor de una proteína, que facilita la absorción en el endosoma tardío sin superar la respuesta de linfocitos T hacia el antígeno, es decir, alérgeno o epítipo de linfocito T derivado de autoantígeno.

La secuencia que dirige al endosoma tardío puede estar situada en el extremo amino o en el extremo carboxi del alérgeno o péptido derivado de autoantígeno para la absorción eficaz y procesamiento, y también puede estar acoplada por una secuencia flanqueadora, tal como una secuencia de péptido de hasta 10 aminoácidos. Cuando se usa el epítipo de linfocito T menor para el propósito de dirigir, este último típicamente está situado en el extremo amino terminal del alérgeno o péptido derivado de autoantígeno.

Por consiguiente, la presente invención contempla péptidos de proteínas antígenas y su uso para producir reacciones inmunitarias específicas. Los péptidos de la presente invención pueden corresponder a fragmentos de proteínas que comprenden, dentro de su secuencia, las características de la presente invención, es decir un compuesto reductor y un epítipo de linfocito T separado por como máximo 10, preferiblemente 7 aminoácidos o menos. Alternativamente, y para la mayoría de las proteínas antígenas, los péptidos de la invención se generan por acoplamiento de un compuesto reductor, más en particular un motivo reductor como se describe en la presente memoria, N terminal o C terminal respecto a un epítipo de linfocito T de la proteína antígeno (directamente adyacente a la misma o con un conector de como máximo 10, más en particular como máximo 7 aminoácidos) para así obtener las propiedades que caracterizan la invención. Además, la secuencia de epítipo de linfocito T de la proteína y/o el motivo se pueden modificar y/o se pueden introducir (o modificar) una o más secuencias flanqueadoras y/o una secuencia directora, comparado con la secuencia que se encuentra de forma natural. Por lo tanto, dependiendo de si se pueden encontrar o no las características de la presente invención dentro de la secuencia de la proteína antígeno de interés, los péptidos de la presente invención pueden comprender una secuencia que es "artificial" o "natural".

Los péptidos de la presente invención pueden variar sustancialmente de longitud. En realizaciones particulares, cuando el compuesto reductor corresponde al motivo como se describe en la presente memoria, la longitud de los péptidos varía de 12-13 aminoácidos, es decir, consisten en un epítipo de 8-9 aminoácidos y adyacente al mismo el motivo como se describe en la presente memoria de 4 aminoácidos, hasta 50 o más aminoácidos. Por ejemplo, un péptido de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia que dirige al endosoma de 40 aminoácidos, una secuencia flanqueadora de aproximadamente 2 aminoácidos, un motivo como se describe en la presente memoria de 4 aminoácidos, un conector de 4 aminoácidos y un péptido de epítipo de linfocito T de 9 aminoácidos.

Por consiguiente, en realizaciones particulares, los péptidos completos consisten en entre 12 aminoácidos y 20 hasta 25, 30, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos. En una realización más particular, los péptidos consisten entre 10 y 20 aminoácidos. Más en particular, cuando el compuesto reductor es un motivo como se describe en la presente memoria, la longitud de la secuencia (artificial o natural) que comprende el epítipo y el motivo opcionalmente conectados por un conector (denominado en la presente memoria una secuencia de "epítipo-motivo"), dentro de la secuencia que dirige al endosoma, es crítica. Más en particular, el "epítipo-motivo" tiene una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos, de forma óptima 18 aminoácidos o menos. Dichos péptidos de 12 o 13 a 18 aminoácidos pueden estar acoplados opcionalmente a una señal que dirige al endosoma cuyo tamaño no es crítico.

Como se ha detallado antes, en realizaciones particulares, los péptidos de la presente invención comprenden un motivo reductor como se describe en la presente memoria conectado a una secuencia de epítipo de linfocito T. De acuerdo con una realización particular, los péptidos son péptidos de proteínas que no comprenden dentro de su secuencia natural nativa una secuencia de aminoácidos con propiedades rédox en la cercanía (es decir, dentro de una secuencia de 11 aminoácidos N o C terminales) del epítipo de interés, más específicamente que no comprende en su secuencia natural nativa una secuencia consenso de tioredoxina, glutarredoxina o tioreductasas u homólogos de las mismas, en la cercanía del epítipo de interés. Más en particular, la invención abarca generar péptidos inmunógenos a partir de proteínas antígenas 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, o cualesquiera otras secuencias consenso que son típicas de secuencias consenso de tioredoxina, glutarredoxina o tioreductasas, en la cercanía del epítipo de interés, es decir dentro de una secuencia de 11 aminoácidos N o C terminal de la secuencia del epítipo. En realizaciones particulares adicionales, la presente invención proporciona péptidos inmunógenos de proteínas antígenas que no comprenden las secuencias de aminoácidos descritas antes con propiedades rédox dentro de su secuencia. En realizaciones particulares adicionales, la proteína antígeno no comprende de forma natural la secuencia C-H-G-S dentro de una secuencia de 11 aminoácidos N o C terminales de la secuencia de epítipo. Más en particular, la presente invención reivindica péptidos distintos de los péptidos que comprenden el epítipo EPCIIHRGKP [SEQ ID. NO: 1] del péptido p21-35 de Der p 2 (CHGSEPCIIHRGKPF [SEQ ID. NO: 2]) y el motivo C-H-G-S [SEQ ID. NO: 3], en particular aquellos péptidos donde este motivo está situado N terminal de la secuencia de epítipo, puesto que

dichos péptidos corresponden a péptidos generados en la técnica anterior y usados para inducir una respuesta inmunitaria en el contexto de la cartografía de epítomos de Der p 2 (Wu et al. 2002, *J. Immunol.* 169, 2430-2435).

5 En realizaciones particulares adicionales, los péptidos de la invención son péptidos que comprenden epítomos de linfocitos T que no comprenden una secuencia de aminoácidos con propiedades rédox dentro de su secuencia natural.

10 Sin embargo, en realizaciones alternativas, el epítomo de linfocito T puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos que asegure la unión del epítomo a la hendidura de MHC. Cuando un epítomo de interés de una proteína antígena comprende un motivo tal como se describe en la presente memoria dentro de su secuencia de epítomo, los péptidos inmunógenos de acuerdo con la presente invención comprenden la secuencia de un motivo como se describe en la presente memoria y/o de otra secuencia reductora acoplada N o C terminal a la secuencia de epítomo de modo que (al contrario que el motivo presente dentro del epítomo, que es enterrado dentro de la hendidura) el motivo unido puede asegurar la actividad reductora.

15 En realizaciones particulares, los péptidos de la presente invención no son naturales sino péptidos artificiales que contienen, además de un epítomo de linfocito T, un motivo como se describe en la presente memoria, de modo que el motivo está opcionalmente separado del epítomo de linfocito T por un conector que consiste en hasta 7, más en particular hasta 4 aminoácidos.

20 En una realización particular, se proporcionan péptidos de acuerdo con la invención de la proteína Der p 2, que comprenden un motivo como se describe en la presente memoria y un epítomo de Der p 2. Más en particular, se proporcionan péptidos que comprenden una o más copias del epítomo nonapéptido EPCIIHRGKP [SEQ ID. NO: 1] de Der p 2 cada una unida a un motivo reductor que consiste en el motivo C-X2-C. Alternativamente se proporcionan péptidos de la proteína de Der p 2 que comprenden un epítomo de linfocito T distinto de una secuencia que comprende EPCIIHRGKP [SEQ ID. NO: 1] unido a un motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C. Los péptidos de la invención comprenden opcionalmente una secuencia que dirige al endosoma. Más en particular, se proporcionan péptidos inmunógenos de Der p 2 que comprenden el motivo G-X2-C.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a procedimientos de generación de péptidos inmunógenos de la presente invención descritos en la presente memoria.

30 En una primera realización de procedimientos de acuerdo con la presente invención, se prepara un péptido de una proteína antígena capaz de producir actividad de linfocitos T CD4+ citolíticos, proporcionando un péptido que consiste en un epítomo de linfocito T de dicha proteína antígena, y conectar a dicho epítomo un compuesto reductor. Más en particular, los métodos de acuerdo con la invención abarcan la unión de dicho epítomo de linfocito T a una secuencia de aminoácidos que corresponde al motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C, de modo que dicho motivo y dicho epítomo están adyacentes entre sí o separados por un conector de como máximo 7 aminoácidos, más en particular como máximo 4 aminoácidos. Más en particular, el motivo corresponde a C-X2-C.

35 En realizaciones particulares de los métodos de la invención, el epítomo de linfocito T de la proteína antígena se selecciona de modo que la proteína antígena no comprende, en su secuencia natural, una secuencia que corresponde a la secuencia combinada del epítomo y un motivo de acuerdo con la presente invención dentro de una región de 11 aminoácidos N o C terminales de dicho epítomo. En realizaciones particulares adicionales, cuando el epítomo comprende la secuencia EPCIIHRGKP [SEQ ID. NO: 1] del péptido p21-35 de Der p 2, el motivo corresponde a [CT]-X2-C o C-X2-[CT], más en particular a C-X2-C. Los métodos de la presente invención generan péptidos inmunógenos que inducen una respuesta inmunitaria que no es generada, o no en esta medida, por los epítomos de linfocitos T generados de forma natural de la proteína antígena. El efecto se asegura por la combinación específica del epítomo de linfocito T y el compuesto reductor, más en particular del epítomo de linfocito T y el motivo reductor.

40 Por consiguiente, los métodos descritos antes son particularmente adecuados para la generación de péptidos inmunógenos a partir de alérgenos o autoantígenos de proteínas que no tienen un motivo tal como el que se describe en la presente memoria en su secuencia o en donde un motivo como se describe en la presente memoria está presente completa o parcialmente dentro de una secuencia de epítomo de interés o en donde un motivo está presente fuera, pero alejado (es decir, más de 4, 7, 10 aminoácidos) de una secuencia de epítomo de interés.

45 En realizaciones particulares de los métodos descritos antes, se proporcionan una o más etapas adicionales de modo que se introduce un conector entre el epítomo de linfocito T y el compuesto reductor y/o se añaden secuencias adicionales (tales como una secuencia directora) y/o una o más secuencias flanqueadoras y/o se introducen modificaciones en la secuencia de epítomo del péptido.

50 En realizaciones adicionales de métodos de acuerdo con la invención de obtención de un péptido capaz de producir actividad de linfocito CD4+ citolítico de una proteína antígena, se proporcionan métodos que aseguran la identificación de un péptido inmunógeno adecuado dentro de una proteína antígena. En estas realizaciones, los métodos de la presente invención abarcan determinar si la proteína antígena comprende, dentro de su secuencia natural, un epítomo de linfocito T de modo que la proteína comprende además dentro de una región de 11, más en particular dentro de una región de 8 aminoácidos N o C terminales del epítomo de linfocito T, un motivo reductor

- como se describe en la presente memoria. Por consiguiente, estas realizaciones comprenden la identificación dentro de la proteína antígeno de una secuencia adecuada para usar como un péptido inmunógeno y la producción de un péptido que corresponde con la secuencia identificada. Más en particular, los péptidos aislados generados de esta forma comprenden una longitud de entre 12 y 19 aminoácidos. Se describen más adelante métodos de producción de péptidos. Cuando están presentes sitios de escisión enzimáticos adecuados en la proteína, se contempla además que los péptidos de la presente invención también se pueden generar por escisión enzimática de la proteína original.
- En realizaciones particulares de los diferentes métodos descritos antes, se proporcionan una o más etapas de modo que se añaden secuencias adicionales a los péptidos obtenidos, tales como una secuencia directora y/o una o más secuencias flanqueadoras y/o se introducen modificaciones en el epítipo, conector y/o motivo reductor del péptido. Estas modificaciones pueden además potenciar las propiedades inmunógenas del péptido o pueden mejorar otras características de los péptidos tales como la facilidad de síntesis, solubilidad etc.
- Los métodos descritos antes permitirán la generación de un péptido inmunógeno de acuerdo con la presente invención, solo para la selección de proteínas antígenas que comprenden de forma natural, en la cercanía de un epítipo de interés, un motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C. En realizaciones particulares, el epítipo de linfocito T no comprende la secuencia EPCIIHRGKP [SEQ ID. NO: 1] del péptido p21-35 de Der p 2. En realizaciones particulares, la proteína antígeno puede comprender de forma natural un motivo C-X(2)-[ST] o [STI-X(2)-C dentro de como máximo 11 aminoácidos que flanquean el epítipo de interés, y los métodos de la invención generan un péptido aislado que comprende dicho motivo y dicha secuencia de epítipo y modifican dicho motivo a C-X(2)-C de modo que aumentan más las propiedades inmunógenas descritas en la presente memoria.
- La identificación de un epítipo de linfocito T adecuado de una proteína antígeno se puede usar en la generación de péptidos como se describe en los métodos anteriores y se detalla más adelante.
- Se ha mostrado que tras la administración (es decir, inyección) a un mamífero de un péptido de acuerdo con la invención (o una composición que comprende dicho péptido), el péptido produce la activación de linfocitos T que reconocen el antígeno (es decir, el alérgeno o autoantígeno) derivado del epítipo de linfocito T y proporciona una señal adicional al linfocito T a través de la reducción del receptor de superficie. Esta activación supraóptima da como resultado linfocitos T que adquieren propiedades citotóxicas para la célula que presenta el epítipo de linfocito T, así como propiedades supresoras en linfocitos T inespecíficos. De esta forma, los péptidos o composiciones que comprenden los péptidos descritos en la presente invención, que contienen un epítipo de linfocito T derivado de antígeno y, fuera del epítipo, un compuesto reductor, se pueden usar para la inmunización directa de mamíferos, incluyendo seres humanos.
- Un aspecto de la invención proporciona, por lo tanto, péptidos de la invención o derivados de los mismos, para usar como un medicamento. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos terapéuticos que comprenden administrar uno o más péptidos de acuerdo con la presente invención, a un paciente que lo necesite.
- La presente invención ofrece métodos mediante los cuales se pueden producir linfocitos T específicos de alérgeno/antígeno provistos de propiedades citotóxicas, por inmunización con péptidos pequeños. Se ha encontrado que péptidos que contienen (i) una secuencia que codifica un epítipo de linfocito T de un antígeno (es decir, alérgeno, autoantígeno), y (ii) una secuencia consenso con propiedades redox, y además opcionalmente comprende también una secuencia que facilita la absorción del péptido en los endosomas tardíos para la presentación eficaz por MHC de clase II, produce linfocitos T supresores.
- Las propiedades inmunógenas de los péptidos de la presente invención son de particular interés en el tratamiento y prevención de reacciones inmunitarias. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de péptidos descritos en la presente memoria como un medicamento, más en particular para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un trastorno inmunitario en un mamífero, más en particular un ser humano.
- Se describe en la presente memoria un método de tratamiento o prevención de un trastorno inmunitario de un mamífero que necesite dicho tratamiento o prevención, usando los péptidos de la invención, homólogos o derivados de los mismos, comprendiendo los métodos las etapas de administrar a dicho mamífero que padece o está en riesgo de tener un trastorno inmunitario, una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos de la invención, homólogos o derivados de los mismos, para así reducir los síntomas del trastorno inmunitario. Está contemplado el tratamiento tanto de seres humanos como de mamíferos, tales como, pero no limitado a mascotas y caballos.
- Los trastornos inmunitarios a citados antes, se seleccionan en una realización particular de enfermedades alérgicas y enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades alérgicas son enfermedades. Las manifestaciones clínicas de las enfermedades alérgicas incluyen asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y reacciones anafilácticas a picaduras de insectos o fármacos. Las enfermedades alérgicas son causadas por reacciones de hipersensibilidad del sistema inmunitario a sustancias específicas llamadas alérgenos (tales como polen, picaduras, fármacos o alimentos). La forma más grave de un trastorno alérgico es el choque anafiláctico, que es una urgencia médica. Los alérgenos incluyen alérgenos de transmisión aérea, tales como los de ácaros del polvo

domésticos, mascotas y pólenes. Los alérgenos también incluyen alérgenos ingeridos responsables de la hipersensibilidad a alimentos, que incluyen frutas, verduras y leche.

Los péptidos de acuerdo con la invención se generan a partir de las proteínas antígenas o alérgenos que se sabe o se cree que son el factor causante de la enfermedad. Los alérgenos que se pueden usar para la selección de epítopos de linfocitos T típicamente son alérgenos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- 5
- alérgenos alimentarios presentes en los cacahuetes, pescado, p. ej. bacalao, clara de huevo, crustáceos, p. ej., gambas, leche, p. ej., leche de vaca, trigo, cereales, frutos de la familia Rosácea (manzana, ciruela, fresa), verduras de las familias liliáceas, crucíferas, solanáceas y umbelíferas, frutos secos, sésamo, cacahuete, soja y otros alérgenos de la familia de las leguminosas, especias, melón, aguacate, mango, higo, plátano,
- 10
- alérgenos de ácaros del polvo doméstico obtenidos de *Dermatophagoides spp* o *D. pteronyssinus*, *D. farinae* y *D. microceras*, *Euroglyphus maynei* o *Blomia sp.*,
 - alérgenos de insectos presentes en cucaracha o himenópteros,
 - alérgenos del polen, en especial polen de árbol, césped y maleza,
 - alérgenos de animales, en especial, perros, gatos, caballos y roedores,
- 15
- alérgenos de hongos, en especial de *Aspergillus*, *Alternaria* o *Cladosporium*, y
 - alérgenos ocupacionales presentes en productos tales como el látex, amilasa, etc.

El epítipo de linfocito T que corresponde a una proteína antígeno (o inmunógeno) para usar en el contexto de la presente invención, típicamente es un epítipo de linfocito T universal o promiscuo (es decir, un epítipo de linfocito T capaz de unirse a la mayoría de las moléculas de MHC de clase II), más en particular presente sobre un alérgeno de transmisión aérea o un alérgeno de transmisión alimentaria. En realizaciones particulares, dicho alérgeno se selecciona del grupo que consiste en alérgenos de rinosinusitis, alérgenos de asma bronquial alérgico y alérgenos de dermatitis atópica.

20

Los alérgenos también pueden ser alérgenos principales presentes en mohos o diferentes fármacos tales como hormonas, antibióticos, enzimas, etc. (Véase también la definición en *Clin. Exp. Allergy* 26, 494-516 (1996) y en *Molecular Biology of Allergy and Immunology*, Ed. R. Bush (1996)). También se conocen en la técnica otros alérgenos relacionados con enfermedades alérgicas específicas y se pueden encontrar en internet, p. ej., en www.allergome.org.

25

Las enfermedades autoinmunitarias se clasifican ampliamente en dos categorías, enfermedades específicas de órgano y sistémicas. La etiología precisa de las enfermedades autoinmunitarias sistémicas no está definida. En cambio, las enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano están relacionadas con una respuesta inmunitaria específica que incluye linfocitos B y T, que se dirigen al órgano y de esta forma induce y mantiene un estado crónico de inflamación local. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias específicas incluyen diabetes de tipo 1, miastenia grave, tiroiditis y esclerosis múltiple. En cada una de estas afecciones, se ha identificado uno o un número pequeño de autoantígenos, incluyendo la insulina, el receptor muscular de acetilcolina, peroxidasa tiroidea, y proteína básica mayor, respectivamente. Está bien aceptado que la supresión de esta respuesta inmunitaria específica de órgano es beneficiosa y conduce a la recuperación parcial o completa de la función del órgano. Sin embargo, no hay terapia que suprima dicha respuesta inmunitaria de una forma específica del antígeno. La terapia actual más bien usa la supresión inmunitaria no específica obtenida por el uso de corticosteroides y agentes inmunosupresores, que presentan todos efectos secundarios importantes relacionados con la ausencia de especificidad, limitando así su uso y su eficacia general. La tabla 2 muestra una lista no limitante de ejemplos de autoantígenos conocidos que están relacionados con trastornos autoinmunitarios específicos de órgano y que están contemplados dentro del contexto de la presente invención.

30

35

40

Tabla 2. Autoantígenos representativos y enfermedades relacionadas con los mismos

Enfermedad	Antígeno
enfermedades tiroideas	tiroglobulina
	peroxidasa tiroidea
	receptor de TSH
diabetes de tipo 1	insulina (proinsulina)
	ácido glutámico descarboxilasa (GAD)
	tirosina fosfatasa IA-2
	proteína de choque térmico HSP65
	proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP)
adrenalitis	21-OH hidroxilasa
síndromes poliendocrinos	17-alfa-hidroxilasa
	histidina descarboxilasa
	triptófano hidroxilasa
	tirosina hidroxilasa
gastritis y anemia perniciosa	H+/K+ ATPasa factor intrínseco
esclerosis múltiple	glucoproteína oligodendrocitaria de la mielina (MOG)
	proteína básica de la mielina (MBP)
	proteína proteolipídica (PLP)
miastenia grave	receptor de acetilcolina
enfermedades oculares	proteína de unión a retinol (RBP)
enfermedades del oído interno	colágeno de tipo II y tipo IX
enfermedad celiaca	transglutaminasa tisular
enfermedades inflamatorias del intestino	proteína histona H1 pANCA
aterosclerosis	proteína de choque térmico HSP60

5 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan péptidos inmunógenos que comprende un epítipo de linfocito T de un antígeno (propio o no propio) con potencial para producir una reacción inmunitaria, tal como un alérgeno o un autoantígeno, tales como los descritos en la tabla 2. En una realización particular, el epítipo de linfocito T es un epítipo de linfocito T dominante.

10 Los métodos de tratamiento y prevención que se describen en el presente documento comprenden la administración de un péptido inmunógeno como se describe en la presente memoria, en donde el péptido comprende epítipo de linfocito T de una proteína antigénica que tiene una función en la enfermedad que se va a tratar (por ejemplo, tales como las descritas en la tabla 2 anterior). En realizaciones particulares adicionales, el epítipo usado es un epítipo dominante.

La identificación y selección de un epítipo de linfocito T de dichas proteínas antigénicas, más en particular de alérgenos o autoantígenos, para usar en el contexto de la presente invención es conocido para el experto en la técnica.

15 Para identificar un epítipo adecuado para usar en el contexto de la presente invención, se ensayan secuencias de péptidos aisladas de una proteína antigénica, por ejemplo, por técnicas biológicas de linfocitos T, para determinar si la secuencia de péptido produce una respuesta de linfocitos T. Las secuencias de péptidos que se encuentra que producen respuesta de linfocitos T, son definidas como que tienen actividad de estimulación de linfocitos T.

La actividad de estimulación de linfocitos T humanos se puede ensayar además cultivando linfocitos T obtenidos de un individuo sensible, p. ej., a un alérgeno de ácaro (es decir, un individuo que tiene una respuesta inmunitaria mediada por IgE a un alérgeno de ácaro) con un péptido/epítipo derivado del alérgeno y determinando si se produce proliferación de linfocitos T en respuesta al péptido/epítipo medido, p. ej., por captación celular de timidina tritiada. Los índices de estimulación para respuestas por linfocitos T a péptidos/epítipos se puede calcular como las CMP máximas en respuesta a un péptido/epítipo dividido entre las CPM del control. Un índice de estimulación (S.I.) de linfocitos T igual o mayor que dos veces el nivel base se considera "positivo". Los resultados positivos se usan para calcular el índice de estimulación medio para cada péptido/epítipo para el grupo de péptidos/epítipos ensayado.

Se puede ensayar además opcionalmente la afinidad de unión de los epítipos de linfocitos T no naturales (o modificados) a moléculas de MHC de clase II. Esto se puede realizar de diferentes formas. Por ejemplo, se obtienen moléculas de HLA de clase II solubles por lisis de células homocigóticas para una molécula de clase II dada. Esta última se purifica por cromatografía de afinidad. Las moléculas de clase II se incuban con biotina-molécula de clase II. Los péptidos en los que se va a evaluar la unión de clase II después se incuban en diferentes concentraciones y se calcula su capacidad para desplazar el péptido de referencia de su unión de clase II por adición de neutravínida. Los métodos se pueden encontrar, por ejemplo, en Texier et al., (2000), *J. Immunology* 164, 3177-3184.)

De acuerdo con la presente invención, las propiedades inmunógenas de los epítipos de linfocitos T aumentan uniéndolo a un compuesto reductor. En particular, los péptidos de la presente invención que comprenden al menos un epítipo de linfocito T y el compuesto reductor, como se describe en la presente memoria, tienen un índice de estimulación de linfocitos T medio mayor o igual a 2,0. Un péptido que tiene un índice de estimulación de linfocitos T mayor o igual que 2,0, se considera útil como un agente terapéutico. Más en particular, los péptidos de la invención tienen un índice de estimulación de linfocitos T de al menos 2,5, al menos 3,5, al menos 4,0, o incluso al menos 5,0. Además, los péptidos típicamente tienen 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 para un péptido se determina multiplicando el índice de estimulación de linfocitos T medio por el porcentaje de individuos, en una población de individuos sensibles al ácaro del polvo doméstico (p.ej., al menos 9 individuos, al menos 16 individuos o al menos 29 o 30, o incluso más), que tienen linfocitos T que responden al péptido (por lo tanto que corresponde al SI multiplicado por la naturaleza promiscua del péptido/epítipo. Por lo tanto, el índice de positividad representa tanto la fuerza de una respuesta de linfocitos T a un péptido (S.I.) como la frecuencia de una respuesta de linfocitos T a un péptido de una población de individuos sensibles al ácaro del polvo doméstico.

Con el fin de determinar los epítipos de linfocitos T óptimos, por ejemplo, mediante técnicas de cartografía fina, un péptido que tiene actividad de estimulación de linfocitos T y por lo tanto comprende al menos un epítipo de linfocito T determinado por técnicas biológicas de linfocitos T, se modifica por adición o eliminación de restos de aminoácidos en el extremo amino o carboxi del péptido, y se ensaya para determinar un cambio en la reactividad de los linfocitos T al péptido modificado. Si se encuentra que dos o más péptidos que comparten una zona de solapamiento en la secuencia de proteína original tienen actividad de estimulación de linfocitos T, determinado por técnicas biológicas de linfocitos T, se pueden producir péptidos adicionales que comprenden todo o una parte de dichos péptidos y estos péptidos adicionales se pueden ensayar por un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, se seleccionan péptidos y se producen de forma recombinante o sintética. Los epítipos de linfocitos T o péptidos se seleccionan basándose en diferentes factores, que incluyen la fuerza de la respuesta de los linfocitos T al péptido/epítipo (p. ej., índice de estimulación) y la frecuencia de la respuesta de linfocitos T al péptido en una población de individuos.

Adicional y/o alternativamente, se pueden usar uno o más algoritmos para identificar una secuencia de epítipo de linfocito T dentro de una proteína antigénica. Los algoritmos adecuados incluyen, pero no se limitan a los encontrados en los siguientes sitios en la red:

45 - <http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc/>;

- <http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc/>;

- <http://www.imtech.res.in/raghava/mhcbln/>;

- <http://www.syfpeithi.de/home.htm>;

- <http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC>;

50 - <http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>;

- <http://www.jenner.ac.uk/MHCPred/>.

Más en particular, dichos algoritmos permiten predecir dentro de una proteína antigénica una o más secuencias de nonapéptidos que encajarán en la hendidura de una molécula MHC II.

Los péptidos de la presente invención se pueden generar usando técnicas de ADN recombinante, en bacterias, levaduras, células de insectos, células de plantas o células de mamíferos. En vista de la longitud limitada de los

péptidos, se pueden preparar por síntesis química de péptidos, en donde se preparan péptidos por acoplamiento de diferentes aminoácidos entre sí. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión, p. ej., de D-aminoácidos, aminoácidos con cadenas laterales que no se encuentran de forma natural o aminoácidos naturales con cadenas laterales modificadas tales como cisteína metilada.

- 5 Los métodos de síntesis química de péptidos están bien descritos y se pueden encargar péptidos en empresas tales como Applied Biosystems y otras empresas.

La síntesis de péptidos se puede llevar a cabo por síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) o al contrario por síntesis de péptidos en fase de solución. Los métodos de SPPS mejor conocidos son la química en fase sólida de t-Boc y Fmoc:

- 10 Durante la síntesis de péptidos se usan varios grupos protectores. Por ejemplo, los grupos funcionales hidroxilo y carboxilo se protegen con el grupo t-butilo, la lisina y triptófano se protegen con el grupo t-Boc, y las asparaginas, glutamina, cisteína e histidina se protegen con el grupo tritilo, y la arginina se protege con el grupo pbf. En realizaciones particulares, dichos grupos protectores se pueden dejar en el péptido después de la síntesis.

- 15 Los péptidos se pueden unir unos con otros para formar péptidos más largos usando una estrategia de ligado (acoplamiento quimioselectivo de dos fragmentos de péptidos no protegidos) como describe originalmente Kent (Schnolzer & Kent (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.* 40, 180-193) y revisado, por ejemplo, en Tam et al. (2001) *Biopolymers* 60, 194-205, que proporciona el enorme potencial de conseguir síntesis de proteínas que están más allá del alcance de la SPPS. Se han sintetizado con éxito muchas proteínas con el tamaño de 100-200 restos por este método. Los péptidos sintéticos continúan teniendo una función crucial incluso creciente en los campos de investigación de bioquímica, farmacología, neurobiología, enzimología y biología molecular, debido a los enormes avances en la SPPS.

- 25 Alternativamente, los péptidos se pueden sintetizar usando moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos de esta invención, en un vector de expresión adecuado, que incluye las secuencias de nucleótidos codificantes. Dichas moléculas de ADN se pueden preparar fácilmente usando un sintetizador de ADN automático y la relación bien conocida de codón-aminoácido del código genético. Dicha molécula de ADN también se puede obtener como ADN genómico o como ADNc usando sondas de oligonucleótidos y metodologías de hibridación convencionales. Dichas moléculas de ADN se pueden incorporar en vectores de expresión, incluyendo plásmidos, que están adaptados para la expresión del ADN y producción del polipéptido en un hospedante adecuado tal como una bacteria, p.ej. *Escherichia coli*, célula de levadura, célula animal o célula vegetal.

- 30 Las propiedades físicas y químicas de un péptido de interés (p. ej., solubilidad, estabilidad) se examinan para determinar si el péptido es/sería adecuado para usar en composiciones terapéuticas. Típicamente, esto se optimiza ajustando la secuencia del péptido. Opcionalmente, el péptido se puede modificar después de síntesis (modificaciones químicas, p. ej., añadiendo/eliminando grupos funcionales) usando técnicas conocidas en la materia.

- 35 Los epítomos de linfocitos T por sí mismos se cree que producen sucesos tempranos a nivel del linfocito T auxiliar por unión a una molécula de HLA adecuada en la superficie de una célula presentadora de antígeno y estimulación de la subpoblación de linfocitos T relevantes. Estos sucesos conducen a la proliferación de linfocitos T, secreción de linfoquinas, reacciones inflamatorias locales, el reclutamiento de células inmunitarias adicionales en el sitio, y la activación de la cascada de linfocitos B que conduce a la producción de anticuerpos. Un isotipo de estos anticuerpos, IgE, es muy importante en el desarrollo de síntomas alérgicos y en su producción influye pronto la cascada de sucesos, a nivel de linfocito T auxiliar, por la naturaleza de las linfoquinas secretadas. Un epítomo de linfocito T es el elemento básico o unidad más pequeña de reconocimiento por un receptor de linfocitos T donde el epítomo comprende restos de aminoácidos esenciales para el reconocimiento del receptor, que son contiguos en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

- 45 Sin embargo, tras la administración de los péptidos de acuerdo con la invención (que comprenden un epítomo de linfocito T acoplado a una secuencia rédox) o composiciones de los mismos, se cree que ocurren los siguientes sucesos:

- activación de linfocitos T específicos de antígeno (es decir, alérgeno o autoantígeno) que resulta de la interacción cognada con el péptido derivado de antígeno (es decir, alérgeno o autoantígeno) presentado por moléculas de MHC de clase II;
- 50 - la secuencia consenso de reductasa reduce las proteínas de superficie de linfocitos T, tales como la molécula CD4 (y también CD3), cuyo segundo dominio contiene un puente disulfuro restringido. Esto transduce una señal a los linfocitos T. Entre una serie de consecuencias relacionadas con la ruta oxidativa mayor, sucesos importantes son el mayor flujo de calcio y la traslocación del factor de transcripción NF-κB al núcleo. Esto último da como resultado la mayor transcripción de IFN-gamma y granzimas, lo que permite que las células adquieran propiedades citotóxicas;
- 55 - la citotoxicidad afecta a células presentadoras del péptido por un mecanismo, que implica secreción de granzima B e interacciones Fas-FasL. La destrucción de las células diana presentadoras de antígeno previene la activación de

otros linfocitos T específicos para epítopos situados en el mismo antígeno, o en un antígeno no relacionado que sería procesado por la misma células presentadora de antígeno;

- una consecuencia adicional de la activación de linfocitos T es suprimir la activación de linfocitos T inespecíficos por un mecanismo dependiente del contacto célula-célula. En dicho caso, los linfocitos T activados por un antígeno presentado por una célula presentadora de antígeno diferente también son suprimidos con la condición de que los linfocitos T citotóxicos y los inactivos estén cerca.

El mecanismo de acción postulado antes es respaldado con datos experimentales (véase a continuación). Algunos experimentos también han sugerido, además, la implicación de la ruta de la perforina y/o la activación de la indolamina oxidasa en células diana, que produce un mayor catabolismo del triptófano, un aminoácido esencial para la supervivencia celular, así como para la producción de micropartículas por Treg activados.

Experimentos en modelos in vivo descritos más adelante, han demostrado que la administración (es decir, inyección) de un péptido de acuerdo con la invención o una composición del mismo, puede prevenir o suprimir la respuesta inmunitaria específica de antígeno. Como un ejemplo, en un modelo de ratón de asma debido a la sensibilización a un alérgeno. Der p 2, la preinmunización con un péptido de acuerdo con la invención descrito antes, previene la infiltración de células inflamatorias pulmonares, que es una característica distintiva del asma. La hiperreactividad de las vías aéreas no específica, medida por inhalación de dosis crecientes de metacolina, es esencialmente prevenida por el mismo protocolo experimental. La migración de células en el líquido broncoalveolar también se previene completamente (véase el ejemplo 4). Además, la transferencia adoptiva de clones de linfocitos T (derivados de animales inmunizados con la composición) previene y suprime completamente tanto la infiltración de células inflamatorias como la hiperreactividad de las vías aéreas en los receptores. Dichos clones de linfocitos T que son producidos por la administración de otros péptidos de acuerdo con la invención, presentan una serie de características fenotípicas, que los hacen distintos de los Treg identificados habitualmente, sea Treg naturales o Treg adoptivos. Por lo tanto, los Treg citotóxicos muestran mayor expresión de los marcadores de superficie incluyendo CD103, CTLA-4, FasL y ICOS (tras activación). Son altos en CD25 incluso en reposo y bajos en CD127 (IL7-R). La expresión del factor de transcripción incluye T-bet pero no el represor de transcripción Foxp3, considerado una característica distintiva de los Treg naturales. A parte de la alta producción de IFN-gamma, dichos clones no segregan o solo cantidades en trazas de IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 o TGF-beta. Las características anteriores no son exclusivas, pero proporcionan como una ilustración, el hecho de que dichos Treg citotóxicos son distinguibles de otros Treg.

Por consiguiente, en un aspecto adicional más, la presente invención proporciona métodos para generar Treg citotóxicos específicos de antígeno in vitro, independientemente de los mismos, métodos para discriminar Treg citotóxicos de otros Treg basándose en los datos de expresión característicos descritos antes.

Se describen en la presente memoria métodos para la producción de los Treg específicos de antígeno de la invención. Una realización particular se refiere al método para producir o aislar dichos Treg por inmunización de animales (incluyendo seres humanos) con los péptidos de la invención, como se describe en la presente memoria, y después aislar los Treg de dichos animales inmunizados. Se describen procedimientos más detallados en la sección de ejemplos de la presente memoria y son parte de la invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a métodos in vitro para la producción de Treg específicos de antígeno de la invención. Los Treg son cruciales en la inmunorregulación y tienen un gran potencial terapéutico. La eficacia de la inmunoterapia basada en Treg depende críticamente de la especificidad del Ag de los linfocitos T reguladores. Además, el uso de Treg específicos de Ag en oposición a lo Treg expandidos policlonales reduce el número total de Treg necesarios para la terapia. La generación de linfocitos T reguladores in vitro usando métodos conocidos en la técnica tiene una serie de desventajas importantes. El porcentaje de Treg dentro de una muestra de células periféricas aisladas es aproximadamente 5% y el cultivo de linfocitos Treg es difícil, de modo que la cantidad de Treg está siempre limitada. Además, los Treg generados de esta forma no son específicos y por lo tanto no son capaces de suprimir una respuesta inmunitaria específica, sino que tienen solo un efecto inmunosupresor general cuando se administran a un paciente. Por consiguiente, se han desarrollado estrategias para el desarrollo de procedimientos de selección que permiten la selección y expresión de Treg específicos de Ag, muy potentes. Sin embargo, el número de linfocitos Treg específicos de antígeno obtenido de esta forma, sigue siendo limitado.

La presente invención proporciona métodos para generar linfocitos T reguladores específicos de antígeno que tiene actividad citotóxica.

En una realización, se proporcionan métodos que comprenden el aislamiento de células de sangre periférica, la estimulación de la población de células in vitro por un péptido inmunógeno de acuerdo con la invención y la expansión de la población de células estimulada, más en particular en presencia de IL-2. Los métodos de acuerdo con la invención tiene la ventaja de que se producen mayor número de Treg y que se pueden generar Treg que son específicos para la proteína antigénica (usando un péptido que comprende un epítipo específico de antígeno).

Los linfocitos T reguladores específicos de antígeno que se pueden obtener por los métodos de la presente invención tienen un interés particular para la administración a mamíferos en inmunoterapia, en la prevención de

reacciones alérgicas y el tratamiento de recaídas en enfermedades autoinmunitarias. Está contemplado tanto el uso de células alogénicas como autogénicas.

5 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona poblaciones de Treg citotóxicos caracterizados como se describe en lo sucesivo. Más en particular, las poblaciones de Treg de la presente invención se obtienen por los métodos descritos en la presente memoria.

10 Por consiguiente, la presente invención proporciona Treg específicos de antígeno con propiedades citotóxicas de acuerdo con la invención, para usar como un medicamento, más en particular para usar en terapia celular adoptiva, más en particular para el tratamiento de reacciones alérgicas agudas y recaídas de enfermedades autoinmunitarias tales como la esclerosis múltiple. La presente invención se refiere además al uso de dichos Treg aislados o poblaciones de linfocitos Treg generadas como se describe en la presente memoria, más en particular poblaciones de linfocitos Treg específicos de antígeno como se describe en la presente memoria, para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de trastornos inmunitarios.

15 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona métodos para discriminar linfocitos Treg citotóxicos de otros linfocitos Treg basándose en las características de expresión de las células. Más en particular, los métodos de acuerdo con la invención comprenden determinar si la población de linfocitos Treg demuestra una o más de las siguientes características comparados con una población de linfocitos Treg no citotóxicos:

- una mayor expresión de marcadores de superficie incluyendo CD103, CTLA-4, FasL e ICOS tras activación,
- expresión alta de CD25,
- expresión de CD4, ICOS, CTLA-4, GITR y expresión baja o no expresión de CD127 (IL7-R),
- 20 - expresión del factor de transcripción T-bet y egr-2 (Krox-20) pero no del represor de transcripción Foxp3,
- una producción alta de IFN-gamma y no de, o solo cantidades en trazas de IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 o TGF-beta.

25 Más en particular, los métodos de la presente invención comprenden determinar que las células expresan CD4, que no expresan IL-10 o TGF-beta, que expresan Krox-20 y producen granzimas y ligando Fas. Más en particular, estas células se seleccionan además funcionalmente como células que no responden a la activación por el reconocimiento de TCR. En realizaciones particulares adicionales, los métodos abarcan determinar todas las características descritas antes.

30 En años recientes se ha progresado mucho en la caracterización de linfocitos T reguladores (Treg) tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Más en particular, se ha descrito el potencial de uso de los Treg para la terapia de algunas enfermedades. La presente invención aborda el desarrollo de un subconjunto recién definido de Treg adoptivos específicos de antígenos que difieren de los Treg previos descritos, por el método usado para la inducción *in vitro* y por propiedades específicas. Los Treg pertenecen a dos categorías amplias, es decir, Treg naturales y Treg inducidos (o adoptivos). Los Treg naturales se describieron por primera vez en el ratón en 1995, y se definieron como un subconjunto de linfocitos T CD4+ activamente seleccionados en el timo. Dichas células se caracterizan por la expresión de una serie de marcadores de superficie, que incluyen CD25 en células en reposo, GITR, CTLA-4 y LAG-3. Más recientemente, los Treg naturales se han definido además por la falta de expresión de CD127 (IL-7R). El represor de transcripción Foxp3 tiene una función determinante en la selección de Treg naturales. Las mutaciones de Foxp3 dan como resultado la ausencia de Treg naturales, con una desregulación inmunitaria ligada al cromosoma X con manifestaciones de poliendocrinopatía, enteropatía, atópicas e infecciones letales. Dichos Treg naturales suprimen diferentes procesos inflamatorios incluyendo síndromes gastrointestinales. A nivel molecular, Foxp3 se combina con el factor de transcripción NFAT en competición con AP1, y de esta forma regula la transcripción de una serie de citoquinas. El mecanismo de acción de los Treg naturales está bajo un intenso escrutinio. *In vitro*, dichas células producen IL-10 y TGF-beta. *In vivo*, sin embargo, la neutralización de IL-10 y/o TGF-b no superan la supresión, indicando que hay otros mecanismos en juego. *In vitro*, los Treg naturales suprimen la respuesta adaptativa de una forma dependiente del contacto de células. Es interesante que los Treg naturales expresan proteasas granzimas tales como granzima-A (GZ-A) y granzima-B (GZ-B). Aunque todavía es polémico, un mecanismo adicional o alternativo de acción para los Treg naturales parece que se basa en su capacidad para producir la lisis de células diana por exocitosis de granzimas. Los Treg deficientes en GZ-B pierden en parte su capacidad para suprimir la respuesta inmunitaria. Los Treg adaptativos constituyen una familia heterogénea de linfocitos T que tienen en común que son específicos de antígeno, ejercen una actividad supresora en los linfocitos T inespecíficos y son inducidos en la periferia. Las células Th3 son producidas principalmente por la administración oral de antígeno y se encuentran en lo ganglios linfáticos mesentéricos. Dichas células ejercen su actividad supresora produciendo niveles altos de TGF-beta con cantidades variables de IL-4 e IL-10. Las células Tr1 producen altas concentraciones de IL-10 y cantidades variables de TGF-beta. Estas son inducidas *in vitro* por exposición a linfocitos T CD4+ vírgenes a altas concentraciones de IL-10 o activación combinada por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD46. La relación precisa entre las células Th3 y Tr1 no está establecida, en ausencia de marcadores fenotípicos específicos. No solo parece existir un solapamiento entre estos dos Treg adaptativos, sino que es probable que en los próximos años se definan subconjuntos adicionales. Los Treg adaptativos no expresan el factor represor Foxp3. Aparte de la producción de citoquinas supresoras tales como IL-10 y/o TGF-beta, se ha descrito que los linfocitos T

- 5 CD4+CD25(-) pueden ser inducidos para expresar granzimas, principalmente GZ-B, por la estimulación por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD46. No está claro si estos Treg inducidos in vitro, no específicos, ejercen actividad citotóxica debido a la secreción de granzima. Los péptidos de la invención, tras la administración a un animal vivo, típicamente un ser humano, producen linfocitos T específicos que ejercen una actividad supresora en los linfocitos T inespecíficos. Los péptidos aparentemente activan el metabolismo oxidativo de los linfocitos T después de interacción cognada y reducen el puente disulfuro restringido del segundo dominio extracelular de la molécula CD4.
- 10 Este mecanismo también implica y los resultados experimentales muestran que los péptidos de la invención, aunque comprenden un epítipo de linfocito T específico de un determinado antígeno, se pueden usar para la prevención o tratamiento de trastornos producidos por una reacción inmunitaria contra otros epítipos de linfocitos T del mismo antígeno, o en determinadas circunstancias incluso para el tratamiento de trastornos producidos por una reacción inmunitaria contra otros epítipos de linfocitos T de otros antígenos diferentes si fueran presentados por el mismo mecanismo por moléculas de MHC de clase II en la cercanía de linfocitos T activados por péptidos de la invención.
- 15 Un aspecto particular adicional de la presente invención se refiere, por lo tanto, a un tipo de célula, que son linfocitos T, más en particular Treg o linfocitos T supresores, caracterizados porque expresan IL-10 o TGF-beta (mientras que otros linfocitos T adaptativos producen IL-10 y/o TGF-beta), expresan Krox-20 y producen granzimas y ligando Fas. Más en particular, estas células se seleccionan además funcionalmente como células que no responden a la activación por el reconocimiento de TCR. Más en particular, se proporcionan en la presente memoria, poblaciones de tipos de linfocitos Treg que tienen las características descritas en el presente documento, de modo que la respuesta anérgica es específica de antígeno.
- 20 En realizaciones particulares adicionales, los linfocitos Treg de la invención se caracterizan porque tienen:
- expresión de CD25, CD4, ICOS, CTLA-4, GITR, y no expresión de CD127 (IL7-R), expresión del factor de transcripción T-bet y egr-2 (Krox-20) pero no de Foxp3,
 - una mayor expresión de marcadores que incluyen FasL y granzimas (B y C) tras activación.
 - una producción alta de IFN-gamma.
- 25 En una realización particular adicional, la invención proporciona un tipo de célula, que son linfocitos T, más en particular Treg o linfocitos T supresores, caracterizados porque tienen:
- expresión de CD25, CD4, ICOS, CTLA-4, GITR, y no expresión de CD127 (IL7-R), expresión del factor de transcripción T-bet y egr-2 (Krox-20) pero no de Foxp3,
 - una mayor expresión de marcadores que incluyen FasL y granzimas (B y C) tras activación.
- 30 - una producción alta de IFN-gamma.
- Más en particular, los linfocitos o poblaciones de Treg de la invención se caracterizan porque tienen:
- una mayor expresión de marcadores de superficie incluyendo CD103, CTLA-4, FasL e ICOS tras activación,
 - expresión alta de CD25, mientras que otros linfocitos T adaptativos son negativos para CD25, expresión de CD4, ICOS, CTLA-4, GITR y expresión baja, o sin expresión de CD127 (IL7-R),
- 35 - expresión del factor de transcripción T-bet e egr-2 (Krox-20) pero no del represor de transcripción Foxp3, mientras que otros linfocitos T adaptativos son positivos para Foxp3,
- una producción alta de IFN-gamma y no de, o solo cantidades en trazas de IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 o TGF-beta.
 - una mayor expresión de marcadores que incluyen FasL y granzimas (B y C) tras activación.
- 40 Más en particular, la presente invención proporciona poblaciones de células aisladas del tipo celular que tiene las características descritas antes, que, además son específicas de antígeno, es decir, capaces de suprimir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Por consiguiente, la presente invención proporciona linfocitos Treg específicos de antígeno aislados, caracterizados como se ha descrito antes. Más en particular, la presente invención proporciona linfocitos Treg específicos de antígeno distintos de los producidos por Der p 2.
- 45 Los péptidos, de acuerdo con la invención, también se pueden usar en métodos de terapia génica bien conocidos en la técnica, y la terminología usada en la presente memoria que explica el uso de péptidos de acuerdo con la invención, también incluye el uso de ácidos nucleicos que codifican o expresan péptidos inmunógenos de acuerdo con la invención.
- Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención, se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican péptidos de la presente invención y métodos para su uso.

Están contemplados diferentes métodos para conseguir, mediante terapia génica, niveles de péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención, en un mamífero in vivo, dentro del contexto de la presente invención.

5 Se pueden usar moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican secuencias de proteínas como ADN desnudo o en liposomas u otros sistemas lipídicos para el suministro a células diana. Otros métodos para la transferencia directa de ADN plasmídico en células son bien conocidos para los expertos en la técnica, para usar en terapia génica, e implican dirigir el ADN a receptores en células mediante complejo del ADN plasmídico con proteínas. En su forma más simple, la transferencia de genes se puede llevar a cabo inyectando simplemente cantidades pequeñas de ADN en el núcleo de la célula, por un procedimiento de microinyección. Una vez que los genes recombinantes se han introducido en una célula, pueden ser reconocidos por los mecanismos normales de células para la transcripción y traducción, y se expresará un producto génico. También se han intentado otros métodos para introducir ADN en mayores números de células. Estos métodos incluyen: transfección, en donde el ADN precipita con fosfato cálcico y es absorbido por las células por pinocitosis; electroporación, en donde las células son expuestas a pulsos de gran voltaje para introducir agujeros 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 con partículas usando ADN unido a proyectiles pequeños. Otro método para introducir ADN en las células es acoplar el ADN a proteínas químicamente modificadas. Las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar endosomas y potenciar la absorción de ADN en las células. La mezcla de adenovirus con soluciones que contienen complejos de ADN, o la unión de ADN a polilisina unida covalentemente a adenovirus usando agentes de reticulación de proteínas, mejora sustancialmente la absorción y expresión del gen recombinante. Los vectores de virus adenoasociados también se pueden usar para el suministro génico en células vasculares. Como se usa en la presente memoria, la "transferencia de genes" significa el procedimiento de introducción de una molécula de ácido nucleico extraña en una célula, que normalmente se lleva a cabo para permitir la expresión de un producto particular codificado por el gen. Dicho producto puede incluir una proteína, polipéptido, ADN de sentido contrario o ARN, o ARN enzimáticamente activo. La transferencia de genes se puede realizar en células cultivadas o por administración directa a mamíferos.

En otra realización, se proporciona un vector que comprende una secuencia de molécula de ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la invención. En realizaciones particulares, el vector se genera de modo que la secuencia de molécula de ácido nucleico es expresada solo en un tejido específico. Los métodos para conseguir la expresión génica específica de tejido son bien conocidos en la técnica. De acuerdo con una realización, esto se logra poniendo la secuencia que codifica un péptido de acuerdo con la invención, bajo el control de un promotor que dirige la expresión en uno o más tejidos particulares.

Se pueden usar vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, adenovirus, virus adenoasociados, virus el herpes, virus de ARN o virus del papiloma bovino, para el suministro de secuencias de nucleótidos (p. ej., ADNc) que codifican péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención, en los tejidos o población celular seleccionados. Se pueden usar métodos que son bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores recombinantes que contienen dichas secuencias codificantes.

Por consiguiente, la presente invención describe el uso de un ácido nucleico que es capaz de expresar los péptidos de la invención, in vivo, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades alérgicas y autoinmunitaria. De acuerdo con una realización, el ácido nucleico capaz de expresar un péptido de acuerdo con la invención in vivo, es una secuencia que codifica dicho péptido, que está operativamente unida a un promotor. Dicha secuencia se puede administrar directa o indirectamente. Por ejemplo, un vector de expresión que contiene la secuencia codificante para un péptido de acuerdo con la invención, se puede insertar en células, después de lo cual dichas células se cultivan in vitro y después se inyectan o infunden al paciente. Alternativamente, el ácido nucleico capaz de expresar un péptido de acuerdo con la invención in vivo, es una secuencia que modifica la expresión endógena de las células. El método de terapia génica puede implicar el uso de un vector de adenovirus que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica los péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención, o una molécula de ácido nucleico desnuda que codifica un péptido de acuerdo con la invención. Alternativamente, se pueden inyectar células modificadas genéticamente que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la invención.

Cuando la administración de uno o más péptido de acuerdo con la invención se asegura por transferencia génica (es decir, la administración de un ácido nucleico que asegura la expresión de los péptidos de acuerdo con la invención in vivo, tras administración), la dosis adecuada del ácido nucleico se puede determinar basándose en la cantidad de péptido expresado como resultado del ácido nucleico, tal como, p. ej., determinando la concentración de péptido en la sangre después de administración. Por lo tanto, en una realización particular, los péptidos de la invención se administran mediante el uso de polinucleótidos que codifican dichos péptidos, sea en un vector de expresión o no, y por lo tanto, la presente invención también se refiere a métodos de terapia génica. Otra realización particular se refiere al uso de métodos para inducir un exceso de expresión local del péptido de la invención, para el tratamiento o prevención de trastornos inmunitarios.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más péptidos de acuerdo con la presente invención, comprendiendo además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se ha detallado antes, la presente invención también se refiere a las composiciones para usar como un medicamento o a los métodos para el tratamiento de un mamífero de un trastorno inmunitario, usando dicha composición, y al uso de dichas composiciones para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de trastornos inmunitarios.

5 La composición farmacéutica podría ser, por ejemplo, una vacuna adecuada para tratar o prevenir trastornos inmunitarios, en especial alergia de transmisión aérea y transmisión alimentaria, así como enfermedades de origen alérgico. Como un ejemplo descrito además en la presente memoria de una composición farmacéutica, un péptido de acuerdo con la invención se adsorbe sobre un adyuvante adecuado para la administración a mamíferos, tales como hidróxido de aluminio (alumbre). Típicamente, se inyectan 50 µg del péptido adsorbido sobre alumbre por vía subcutánea en 3 ocasiones en un intervalo de 2 semanas. Será evidente para los expertos en la técnica que son posibles otras vías de administración, que incluyen la vía oral, intranasal o intramuscular. Además, el número de inyecciones y la cantidad inyectada pueden variar dependiendo de las afecciones que se van a tratar. Además, se pueden usar otros adyuvantes distintos del alumbre, con la condición de que faciliten la presentación del péptido en la presentación de MHC de clase II y la activación de linfocitos T. Por lo tanto, aunque los ingredientes activos se pueden administrar solos, típicamente se presentan como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, tanto para uso veterinario como para uso humano, de la presente invención, comprenden al menos un ingrediente activo, como se ha descrito antes, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Una realización particular de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, que comprende como un ingrediente activo, uno o más péptidos de acuerdo con la invención, mezclados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención debe comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo, como se ha indicado en lo que antecede con respecto al método de tratamiento o prevención. Opcionalmente, la composición comprende además otros ingredientes terapéuticos. Otros ingredientes terapéuticos adecuados, así como su dosis habitual dependiendo de la clase a la que pertenezcan, son bien conocidos para los expertos en la técnica y se pueden seleccionar de otros fármacos conocidos usados para tratar trastornos inmunitarios.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente memoria, 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 que se va a tratar, por ejemplo, disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición, y/o facilitar su almacenamiento, transporte o manipulación sin deteriorar su eficacia. Incluyen todos y cada uno de los medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro sódico) y similares. Se pueden incluir ingredientes adicionales con el fin de controlar la duración de la acción del ingrediente activo anticuerpo monoclonal en la composición. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que se ha comprimido para formar un líquido, es decir, las composiciones de esta invención se pueden usar de forma adecuada como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos espolvoreables, pulverizadores, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, gránulos o polvos. Dichos vehículos farmacéuticos aceptables para usar en dichas composiciones farmacéuticas y su formulación, son bien conocidos para los expertos en la técnica, y no hay restricción particular para su selección dentro de la presente invención. También pueden incluir aditivos tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, adherentes, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro sódico) y similares, con la condición de que estos sean coherentes con la práctica farmacéutica, es decir, vehículos y aditivos que no creen daño permanente a mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar de cualquier forma conocida, por ejemplo, mediante mezcla homogénea, recubrimiento y/o molienda de los ingredientes activos, en un procedimiento en una etapa o en múltiples etapas, con el material vehículo seleccionado y, cuando sea adecuado, otros aditivos tales como agentes tensioactivos. También se pueden preparar por micronización, por ejemplo, con vistas a obtenerlos en forma de microesferas que normalmente tienen un diámetro de aproximadamente 1 a 10 µm, en concreto para la fabricación de microcápsulas para la liberación controlada o sostenida de los ingredientes activos.

Los agentes tensioactivos adecuados, también conocidos como emulgente o emulsionante, para usar en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, son materiales no iónicos, catiónicos y/o aniónicos que tienen buenas propiedades de emulsión, dispersión y/o humectantes. Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen tanto jabones solubles en agua como agentes tensioactivos sintéticos solubles en agua. Los jabones adecuados son sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, sales de amonio no sustituidas o sustituidas de ácidos grasos superiores (C₁₀-C₂₂), p.ej. las sales de sodio o potasio de ácido oleico o esteárico, o de mezclas de ácidos grasos naturales que se pueden obtener de aceite de coco o aceite de sebo. Los tensioactivos sintéticos incluyen sales de sodio o calcio de ácidos poliacrílicos; sulfonatos y sulfatos grasos; derivados de bencimidazol sulfonato y alquilarilsulfonatos. Los sulfonatos y sulfatos grasos están normalmente en forma de sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, sales de amonio no sustituidas o sales de amonio sustituidas con un radical alquilo o acilo que tiene de 8 a 22 átomos de carbono, p. ej., la sal de sodio o calcio del ácido lignosulfónico o ácido dodecilsulfónico, o una mezcla de sulfatos de alcoholes grasos obtenidos de ácidos grasos naturales, sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de ésteres de ácido sulfúrico o sulfónico (tales como laurilsulfato sódico) y ácidos sulfónicos de alcohol grasos/aductos de óxido de etileno. Los derivados de bencimidazol sulfonato adecuados típicamente contienen de 8 a 22 átomos de carbono. Los ejemplos de alquilarilsulfonatos son las sales de sodio, calcio o

alcanolamina de ácido dodecilsulfónico o dibutilnaftalenosulfónico o un producto de condensación de ácido naftalenosulfónico/formaldehído. También son adecuados los correspondientes fosfatos, p. ej., sales de éster de ácido fosfónico y un aducto de p-nonilfenol con óxido de etileno y/o propileno, o fosfolípidos. Los fosfolípidos adecuados para este fin son los fosfolípidos naturales (procedentes de células animales o vegetales) o sintéticos del tipo cefalina o lecitina, tales como p.ej. fosfatidil-etanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, lisolecitina, cardiolipina, dioctanilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y sus mezclas.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen derivados polietoxilados y polipropoxilados de alquilfenoles, alcoholes grasos, ácidos grasos, aminas o amidas alifáticas que contienen al menos 12 átomos de carbono en la molécula, alquilarensulfonatos y dialquilsulfosuccinatos, tales como derivados del éter poliglicólico de alcoholes alifáticos y cicloalifáticos, ácidos grasos saturados e insaturados y alquilfenoles, dichos derivados típicamente contienen de 3 a 10 grupos éter glicólico y de 8 a 20 átomos de carbono en el resto hidrocarbonado (alifático) y de 6 a 18 átomos de carbono en el resto alquilo del alquilfenol. Tensioactivos no iónicos adecuados adicionales son aductos solubles en agua de poli(óxido de etileno) con polipropilenglicol, etilendiaminopolipropilenglicol que contiene de 1 a 10 átomos de carbono en la cadena de alquilo, con aductos que contienen de 20 a 250 grupos de éter etilenglicol y/o de 10 a 100 grupos de éter propilenglicol. Dichos compuestos normalmente contienen de 1 a 5 unidades de etilenglicol por unidad de propilenglicol. Ejemplos representativos de tensioactivos no iónicos son nonilfenol-polietoxietanol, ésteres poliglicólicos de aceite de ricino, aductos de poli(óxido de propileno)/poli(óxido de etileno), tributilfenoxipolietoxietanol, polietilenglicol y octilfenoxipolietoxietanol. Los ésteres de ácidos grasos de polietilensorbitán (tales como trioletato de sorbitán polioxietilénico), glicerol, sorbitán, sacarosa y pentaeritritol, también son tensioactivos no iónicos adecuados. Los tensioactivos catiónicos adecuados incluyen sales de amonio cuaternario, en particular haluros, que tienen 4 radicales hidrocarbonados opcionalmente sustituidos con halógeno, fenilo, fenilo sustituido o hidroxilo; por ejemplo, sales de amonio cuaternario que contienen como N-sustituyente al menos un radical alquilo C8-C22 (p. ej., cetilo, laurilo, palmitilo, miristilo, oleilo y similares) y, como sustituyente adicionales, radicales alquilo inferior no sustituido o halogenado, bencilo y/o hidroxialquilo inferior.

Se puede encontrar una descripción más detallada de agentes tensioactivos adecuados para este fin, por ejemplo, en "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual" (MC Publishing Corp., Ridgewood, New Jersey, 1981), "Tensid-Taschenbucw", 2ª ed. (Hanser Verlag, Vienna, 1981) y "Encyclopaedia of Surfactants, (Chemical Publishing Co., New York, 1981). Los péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención (y sus sales fisiológicamente aceptables o composiciones farmacéuticas todos incluidos en la expresión "ingredientes activos") se pueden administrar por cualquier vía adecuada para la afección que se va a tratar y adecuada para los compuestos, aquí las proteínas y fragmentos que se van a administrar. Las posibles vías incluyen vía 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 afección del receptor o con las enfermedades que se van a tratar. Como se describe en la presente memoria, el o los vehículos son "aceptables" de forma óptima en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para su receptor. Las formulaciones incluyen las adecuadas para la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural). Las formulaciones se pueden presentar de forma conveniente en forma farmacéutica y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan por asociación uniforme e íntima del ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; en forma de polvo o gránulos; en forma de solución o una suspensión en un líquido acuoso o líquido no acuoso; o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también se puede preparar en forma de un bolo, electuario o pasta. Un comprimido puede estar hecho por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos por compresión se pueden preparar por compresión en una máquina adecuada del 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. Se pueden hacer comprimidos moldeados por moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos se pueden opcionalmente recubrir o ranurar y se pueden formular para proporcionar liberación lenta o controlada del ingrediente activo de los mismos.

Para tratamientos locales, por ejemplo, en la piel, tal como de la articulación, las formulaciones se aplican opcionalmente como una pomada o crema tópica que contiene el o los ingredientes activos en una cantidad de, por ejemplo, 0,075 a 20% en p/p (que incluye el o los ingredientes activos en un intervalo entre 0,1% y 20% en incrementos de 0,1% en p/p tal como 0,6% en p/p, 0,7% en p/p, etc.), en particular de 0,2 a 15% en p/p y más en particular de 0,5 a 10% en p/p. Cuando se formula en una pomada, los ingredientes activos se pueden usar con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Alternativamente, los ingredientes activos se pueden formular en una crema con una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos 30% en p/p de un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos

hidroxilo tal como propilenglicol, butano, 1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir de forma conveniente un compuesto que potencia la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras zonas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados. La fase aceitosa de las emulsiones de esta invención puede estar constituida de ingredientes conocidos en una forma conocida. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante (conocido también como un emulgente), comprende de forma conveniente una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como con un aceite. Opcionalmente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como un estabilizante, típicamente incluyendo ambos un aceite y una grasa. Juntos, el o los emulsionantes con o sin el o los estabilizantes componente la llamada cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa componente la llamada basa de pomada emulsionante que forma la fase dispersada en aceite de las formulaciones en crema.

La elección de los aceites y grasas adecuados para la formulación se basa en lograr las propiedades cosméticas deseadas, puesto que es probable que la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de los aceites que se van a usar en formulaciones farmacéuticas sea muy baja. Por lo tanto, la crema podría ser opcionalmente un producto no graso, que no mancha y lavable con consistencia adecuada para evitar la pérdida de los tubos u otros recipientes. Se pueden usar ésteres de alquilo mono o dibásico de cadena lineal o ramificada tales como diisoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol y ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, y en particular estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP. Estos se pueden usar solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Alternativamente, se pueden usar lípidos de alto punto de fusión, tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en el ojo también incluyen colirios en donde el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, en especial un disolvente acuoso para el ingrediente activo. El ingrediente activo está presente opcionalmente en dichas formulaciones en una concentración de 0,5 a 20%, ventajosamente de 0,5 a 10% en particular aproximadamente 1,5% en p/p. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el ingrediente activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado. Las formulaciones para administración rectal pueden estar presentes como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato. Las formulaciones adecuadas para administración nasal en donde el vehículo es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partículas, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros (que incluye tamaños de partículas en el intervalo entre 20 y 500 micrómetros en incrementos de 5 micrómetros tal como 30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.), que se administra de una forma en la que se toma una aspiración, es decir, mediante inhalación rápida a través de la fosa nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en donde el vehículo es un líquido, para administración, por ejemplo, como un pulverizador nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas o aceitosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para la administración por aerosol se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales y se pueden suministrar con otros agentes terapéuticos. Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverizador que contienen además del ingrediente activo vehículos tales como los que se sabe en la técnica que son adecuados. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos, que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitarias o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en condiciones liofilizadas que requieren solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo previamente descrito.

Las formas farmacéuticas unitarias son las que contienen una dosis diaria o una subdosis diaria unitaria, como se ha descrito antes en la presente memoria, o una fracción adecuada de la misma, de un ingrediente activo. Debe entenderse que además de los ingredientes mencionados antes en particular, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica, teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo las adecuadas para administración oral pueden incluir agentes de sabor. Los péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención se pueden usar para proporcionar formulaciones farmacéuticas de liberación controlada que contienen como ingrediente activo uno o más compuestos de la invención ("formulaciones de liberación controlada") en las que la liberación del ingrediente activo se puede controlar y regular para permitir la administración menos frecuente o para mejorar el perfil farmacocinético o de toxicidad de un compuesto dado de la invención. Las formulaciones de liberación controlada adaptadas para la administración oral, en las que las unidades discretas comprenden uno o más compuestos de la invención, se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales. Se pueden incluir ingredientes adicionales con el fin de controlar la duración de la acción del ingrediente activo en la composición. Las composiciones de liberación controlada pueden, por lo tanto, conseguirse mediante la selección adecuada de vehículos polímeros tales como por ejemplo poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa,

sulfato de protamina y similares. La velocidad de liberación del fármaco y la duración de la acción se pueden controlar incorporando el ingrediente activo en partículas, p. ej., microcápsulas, de una sustancia polimérica tal como hidrogeles, poli(ácido láctico), hidroximetilcelulosa, poli(metacrilato de metilo) y otros polímeros descritos antes. Dichos métodos incluyen sistemas de suministro de fármacos coloidales tales como liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas, etc. Dependiendo de la vía de administración, la composición farmacéutica puede requerir recubrimientos protectores. Las formas farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de las mismas. Los vehículos típicos para este fin incluyen, por lo tanto, tampones acuosos biocompatibles, etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares, y mezclas de los mismos. En vista del hecho de que cuando los ingredientes activos se usan en combinación, no proporcionan necesariamente su efecto terapéutico conjunto directamente al mismo tiempo en el mamífero que se va a tratar, la composición correspondiente también puede estar en forma de un kit o envase médico que contiene los dos ingredientes en repositorios o compartimentos separados pero adyacentes. En este último contexto, cada ingrediente activo se puede formular, por lo tanto, de una forma adecuada para una vía de administración diferente de la del otro ingrediente, p. ej., uno de ellos puede estar en forma de una formulación oral o parenteral mientras que el otro está en forma de una ampolla para inyección intravenosa o un aerosol.

La parte experimental de la presente invención muestra un subconjunto de linfocitos T específicos de antígeno, inducidos in vivo y fáciles de expandir, con propiedades reguladoras. Esto último incluye: (1) inducción de apoptosis de APC después de la activación cognada dependiente de MHC de clase II, que afecta tanto a células dendríticas como linfocitos B, y demostrado in vitro e in vivo, y; (2) supresión de linfocitos T inespecíficos por un mecanismo dependiente de contacto en ausencia de IL-10 y/o TGF- β . La presente invención describe además métodos para distinguir Treg citolíticos inducidos tanto de Treg naturales como adaptativos. Basado en la caracterización de 15 clones, el fenotipo de superficie se define como CD25^{hi}, CTLA-4^{hi}, GITR⁺ y ICOS⁺, pero CD127(-). Dichos clones expresan niveles bajos de CD62L y CD103 pero no CCR7. La producción de citoquinas estaba limitada a IFN- γ , sin TGF- β o IL-10. Todos los clones eran Foxp3(-) pero fuertemente positivos para T-bet y Egr-2, junto con niveles altos de transcrito para granzima B. Los Treg naturales se definen por la expresión de Foxp3 y ausencia de CD127, producen niveles altos de IL-10, al menos in vitro, y son específicos para autoantígenos. Entre los numerosos linfocitos T adaptativos descritos hasta ahora, la mayoría comparten la producción de IL-10 (y TGF- β en algunos casos como en las células Th3) y son negativos para Foxp3 y CD25. Es central para los Treg citolíticos la fuerte expresión de T-bet. T-bet es inducido por IFN- γ por una vía dependiente de STAT1 y ejerce diferentes actividades, incluyendo la supresión de la transcripción de IL-2, inducción de transcripción de granzima y es un factor de maduración para la diferenciación de Th1.

No se encontró transcrito para IL-2 en los clones de linfocitos T de la presente invención y, es interesante que la IL-2 endógena no restablece la transcripción de IL-2, incluso después de repetidos ciclos de estimulación in vitro. Esto sugiere que los Treg citolíticos han sufrido un alteración epigenética, que mantendría su actividad reguladora tanto in vitro como in vivo. Aunque T-bet es necesario para la maduración del subconjunto de Th1, su expresión no cualifica necesariamente a las células como perteneciente a dicho linaje. La inducción de granzima B por T-bet se ha observado con linfocitos T citolíticos CD8⁺. Los Treg descritos aquí son anérgicos en el sentido de que no eran capaces de proliferar y/o producir IL-2 tras reticulación de su receptor de antígeno. Es interesante, que este estado anérgico podría superarse por la adición de IL-2. Se observó una expresión alta del factor de transcripción Egr-2 (Krox-20), que regula por aumento los inhibidores del ciclo celular p21^{cip1} y p27^{kip}. Se sabe que la IL-2 puede anular la supresión mediada por Egr-2, posiblemente por activación de NF- κ B. Este último regula por aumento la transcripción de granzimas, lo cual puede tener un efecto sinérgico con T-bet para la producción de granzimas. Debe tenerse presente que las propiedades reguladoras no se pierden cuando las células son estimuladas por la adición de IL-2. En una realización particular, esta es una propiedad de los Treg citolíticos presentes, un subconjunto de células aparentemente estable que ejerce su actividad reguladora tras activación dependiente de IL-2. La inducción de apoptosis es el mecanismo en la base de la actividad reguladora. Esto se demostró tanto a nivel de las APC como de linfocitos T inespecíficos, mostrando la activación de caspasa 3 y/o unión de anexina. Se mostró que las dos rutas principales que conducen a la apoptosis eran activadas en los Treg citolíticos. Tanto la producción de GrB como de perforina se indujeron por activación de Treg, con mayor transcripción de GrB pero no de granzima A. GrB a diferencia de GrA, induce la apoptosis por al menos dos mecanismos, en concreto la activación directa e indirecta de pro-caspasa 3, esta última por la liberación de citocromo C por mitocondrias y activación de caspasa 9. Los inhibidores específicos de GrB mostraron reducción significativa de la inducción de apoptosis y solo en concentraciones cercanas a la citotoxicidad celular. Es dudoso si es necesaria la perforina para dicha actividad, puesto que EFTA no bloquea la apoptosis en ningún grado significativo. La segunda ruta por la cual se puede inducir apoptosis es la ruta Fas-FasL. Es interesante que FasL está presente en la exocitosis de gránulos junto con granzimas, y se ancla a la membrana tras la activación celular, que constituye la ruta principal para la expresión de FasL en linfocitos T. FasL señala a través de Fas conduciendo a la activación de la caspasa 8, con activación corriente abajo de la caspasa 3 y caspasa 9 por la liberación mitocondrial de citocromo C, mediante sinergia con GrB. La inhibición parcial de la apoptosis se obtuvo usando un anticuerpo específico de FasL. La participación relativa de las rutas de GrB y FasL está dirigida por la extensión de la expresión de FasL. Por lo tanto, las células Wehi que tienen una expresión constitutiva alta de Fas son lisadas fácilmente por los Treg, comparado, por ejemplo, con las células dendríticas. No está totalmente establecido si la acción combinada de GrB y FasL da cuenta de toda la actividad citolítica, puesto que experimentos preliminares han mostrado que la combinación de los dos inhibidores

no anula la apoptosis celular dirigida. Se sabe que las granzimas son secretadas por los Treg. Por lo tanto, la granzima B está implicada en el mecanismo por el cual los Treg naturales controlan las respuestas inmunitarias, tanto en seres humanos como en los ratones. Los ratones que no expresan GrB pueden tener un defecto en la regulación. Sin embargo, es difícil establecer en qué medida los Treg inducidos usan las granzimas para ejercer su actividad reguladora. Una publicación muestra que la proporción de Treg de tipo Tr1 activados por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD46 expresan GrB. Una dificultad que todavía hay que resolver con las granzimas es la falta de inhibidores específicos y eficaces. Los inhibidores químicos o peptídicos, tales como los usados en la presente invención (ejemplo 11), requieren altas concentraciones para ser activos. El uso de la ruta Fas-FasL no se ha descrito antes en Treg adaptativos, y muy pocos datos indican que los Treg CD4+CD25+ naturales podrían usar también Fas-L como mecanismo. Hay que destacar que se observa inducción de apoptosis en células dendríticas y linfocitos B, sugiriendo que tanto las respuestas inmunitarias primarias y secundarias pueden ser reguladas. Además, los Treg que reconocen un solo epítipo de linfocito T incluso de antígenos complejos, tienen la capacidad de suprimir la respuesta a la proteína entera eliminando la célula presentadora de antígeno. Esto está bien ilustrado por los datos in vivo, en los que la respuesta hacia el alérgeno completo, Der p 2, es suprimida después de la transferencia adoptiva de un solo clon de Treg. Este efecto está reforzado por la supresión de linfocitos T inespecíficos, incluso cuando estos últimos son activados por la interacción con una APC diferente, siempre que sea posible el contacto celular entre Treg y linfocitos T efectoras. Es interesante que los Treg pueden regular los linfocitos T efectoras en diferentes estadios de maduración, Th0, Th1 o Th2. Es importante que los Treg citolíticos inducen la apoptosis en células diana y no necrosis. Las APC apoptóticas pueden tener una función en la supresión. De hecho se ha demostrado que las células apoptóticas recogidas por células presentadoras de antígenos inducen tolerancia, mientras que las células necróticas inducen más bien inflamación. *In vivo*, la supresión casi completa de la inflamación en los pulmones debería considerarse verdaderamente como un símbolo de la apoptosis de células diana en lugar de necrosis. Un aspecto de la presente invención es la demostración de que la apoptosis de linfocitos B ocurre también in vivo. Por lo tanto, los ratones sometidos a transferencia adoptiva de linfocitos B que expresan p21-35 seguido de Treg citolíticos de la especificidad correspondiente, muestran la desaparición completa de linfocitos B, detectados en el bazo. No es probable que los linfocitos B transgénicos hubieran migrado a otros sitios. No se encontraron pruebas de dichas células en pulmones o en el hígado. Las propiedades funcionales de las células transgénicas p21-35 son idénticas a las de los linfocitos B incubados con el péptido en un ensayo de carga convencional. Se muestra aquí que los linfocitos B transgénicos son inducidos a la apoptosis in vitro por cocultivo con Treg citolíticos, indicando una buena prueba de la importancia in vivo de la citólisis de APC. Se prestó particular atención a la posible implicación de IL-10. Los Treg naturales, así como la mayoría si no todos los subconjuntos de Treg adaptativos, producen IL-10 (Levings et al. (2002) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129, 263-276. Uno de estos subtipos era inducido después de exposición respiratoria a alérgeno y expresaba Foxp3, GATA3, y no producía IFN- γ (Akbari et al. (2002) *Nature medicine* 8, 1024-1032). Se indujo otro tipo durante las condiciones de polarización fuerte de Th1 (*Listeria monocytogenes* como adyuvante), expresaba Foxp3, T-bet, y producía IFN- γ (Stock et al. (2004) *Nat. Immunol.* 5, 1149-1156). Ambos subconjuntos podían inhibir la hiperreactividad de las vías aéreas y la inflamación por un mecanismo dependiente de IL-10. No había pruebas de la producción de IL-10 por los Treg citolíticos negativos para Foxp3 ni activación de STAT3 o SP1. La observación de que la inducción de la apoptosis requería contacto directo de células como se muestra en los experimentos en transpocillos, y la supresión conocida de la transcripción de IL-10 por el IFN- γ , siendo este último producido en altos niveles por todas los Treg citolíticos, se consideró una prueba contra la implicación significativa de la IL-10 en la actividad de los Treg citolíticos. Hay que destacar que un adyuvante medio como el alumbre era todo lo que se requería. Es interesante que la inmunización con el péptido mp21-35 péptido hecho en CFA/IFA era incluso más eficaz en la supresión de la inflamación e hiperreactividad de las vías aéreas, pero esto era en detrimento de la acumulación de un gran número de linfocitos Th1 en los pulmones. Además, esto muestra que la inmunización en CFA no consiguió producir Treg citolíticos. La metilación de la cisteína aumentaba la presentación de MHC de clase II, pero esto es atribuible a la mayor estabilidad del péptido y mayor captación por las APC. Es interesante que no era posible inducir Treg citolíticos contra el segundo epítipo de linfocito T mayor de Der p 2, p71-85. La sustitución de la isoleucina 28 por la asparagina reducía la afinidad de unión a las moléculas MHC de clase II, que se mostró que no era perjudicial para la producción de Treg citolíticos. Se ha descrito que péptidos alterados que llevan epítopos de linfocitos T o bien aumentan la afinidad de unión y/o reconocimiento de TCR, o bien inducen tolerancia, un resultado a veces difícil de predecir. En el caso presente, tanto los Treg citolíticos como efectoras reconocían el mismo epítipo, y podían expandirse in vitro con p21-25 en su secuencia natural o mutada.

Un aspecto interesante del presente estudio era la demostración de que los Treg citolíticos migraban hacia los pulmones tras la exposición de las vías aéreas al alérgeno Der p 2, y esto en ausencia de sensibilización con alérgeno periférico. Las quimioquinas implicadas en atraer los linfocitos T al pulmón no están identificadas de forma precisa. Los Treg citolíticos descritos aquí expresan CD103 pero no CCR7, lo que les conferiría la capacidad para migrar a tejidos inflamados. Otras quimioquinas como CCR5 y CCR3 no se detectaron. Sin embargo, el sistema modelo usado aquí, en el que los ratones sometidos a transferencia adaptativa de Treg citolíticos se someten a 2 series de 3 instilaciones nasales a intervalos de una semana, no produce inflamación significativa en los pulmones, como se muestra en los ratones de control sometidos solo a la inhalación de alérgeno. En un modelo experimental de asma, que incluye sensibilización periférica e inhalación de alérgeno, se mostró que los Treg tienen capacidad de prevenir y suprimir tanto la infiltración inflamatoria como la hiperreactividad de las vías aéreas, que son características distintivas del asma bronquial. Se usó una forma recombinante exenta de LPS de un alérgeno principal, Der p 2, que está implicada en una gran proporción de pacientes que padecen asma alérgico. En estudios

paralelos, se determinó que el péptido p21-35 activaba linfocitos T efectores CD4⁺ de pacientes sensibilizados con Der p 2. Un clon de linfocito T específico de p21-35 derivado de dicho paciente, muestra propiedades comparables con las de los Treg citolíticos de ratón, lo que sugiere que los Treg citolíticos son generados como parte de una respuesta inmunitaria normal a un alérgeno tal como Der p 2.

5 Estas observaciones respaldan la utilidad de los Treg citolíticos de acuerdo con la invención, para tratar el asma alérgico en clínica. Los Treg citolíticos son activados y expandidos fácilmente por la presentación de epítipo restringida a MHC de clase II, y no producen citoquinas supresoras, lo que proporciona la especificidad requerida para uso clínico. Además, dichos Treg se obtienen tras inmunización usando adyuvante convencional, en concreto alumbre, sin requerirse material derivado de bacterias tal como micobacteria o CFA. Lo más esperanzador es la observación de que la hiperreactividad de las vías aéreas frente a un estimulante no específico, en concreto la metacolina, era reducida significativamente incluso después de sensibilización con alérgeno. Esto era inesperado, puesto que la inflamación e hiperreactividad de las vías aéreas no están necesariamente conectadas. De hecho, en el modelo de asma de Der p 2, los dos fenómenos están disociados entre sí.

10 La presente invención ahora se ilustrará mediante los siguientes ejemplos que se proporcionan sin intención limitante.

Ejemplos

Ejemplo 1: P21-35 contiene una secuencia consenso de tiorredoxina/glutarredoxina

La tabla 1 muestra la homología de secuencia de aminoácidos entre un fragmento de p21-35 y motivos rédox C-X(2)-S en proteínas de diferentes organismos.

20 La figura 1 muestra la capacidad de p21-35 para reducir los puentes disulfuro en el ensayo de reducción de insulina (ensayo turbidimétrico). En la presente memoria, se incubó una solución de insulina (1 mg/ml) que contenía DL-Ditiotreitol con una proteína o péptido reductor o control durante 20 minutos a 25°C. Después se midió el aumento de densidad óptica a 650 nm (eje Y) debido a la precipitación de la insulina reducida a pH 7, en diferentes tiempos de medición (eje X). Se usó un tetrámero recombinante de p21-35 (B4) [SEQ ID. NO: 4] con tiorredoxina recombinante como control positivo.

Ejemplo 2: La captación de p21-35 por las células presentadoras de antígeno aumenta por la adición de un epítipo de linfocitos T subdominante (figura 2).

30 La inducción de apoptosis de células WEHI B se usó como una medida de la captación y presentación de antígeno. Se mezclaron linfocitos B WEHI (2x10⁴) con un clon de Treg específico del péptido p21-35 (relación 1/1) y concentraciones decrecientes del péptido p21-35 (eje X), o el mismo péptido unido al epítipo T menor de la toxina tetánica (p830-844; T-B). Después de 18 horas, las células se marcaron con anticuerpos anti-CD19-PE (un marcador de células WEHI) y anexina V-FITC, un marcador de apoptosis. Las muestras después se analizaron por citometría de flujo. Los resultados son representativos para la proporción de células WEHI positivas para la anexina V. Se observó un aumento de 100 veces de la capacidad de inducir apoptosis cuando el péptido p21-25 se unió a un epítipo de linfocito T menor, como se indica en la figura 2.

Ejemplo 3: Los restos de aminoácidos implicados en la secuencia consenso de tipo tiorredoxina son decisivos para la expresión de propiedades reguladoras.

40 El panel A de la figura 3 muestra la situación del motivo de la secuencia de tipo tiorredoxina dentro del péptido p21-35. La secuencia de CHGS [SEQ ID. NO: 3] está adyacente a la hendidura de unión de MHC de clase II. La sustitución por alanina del resto 21C o resto S24 del motivo de tipo tiorredoxina C-X(2)-S no deteriora el reconocimiento del epítipo de linfocito T medido por la proliferación (incorporación de ³H-timidina) de un clon de Treg, se indica en el panel B de la figura 3. La proliferación se llevó a cabo usando 5x10⁴ células WEHI incubadas durante 1 h a 37°C con un péptido 6 µM. Después las células se lavaron y cocultivaron durante 4 días con 5x10⁴ linfocitos T. Se añadió ³H-timidina 24 h antes del final del cultivo. La radiactividad se contó en las células adsorbidas sobre filtros de fibra de vidrio. La sustitución de los restos 21 y 24 anula la capacidad del clon de Treg para la lisis de las células presentadoras de antígeno en un ensayo de inducción de apoptosis (véase el panel C de la figura 3) llevado a cabo como se describe en el ejemplo 2.

Ejemplo 4: Generación de Treg con propiedades fisiológicas tras inyección de T-Bb en ratones.

50 La capacidad del péptido T-B para prevenir el asma inducido por Der p 2 se evaluó como sigue. Un grupo de 8 ratones BALB/c (indicados como Tbalum en la figura 4) recibieron 3 inyecciones en la almohadilla de la pata (20 µg por inyección) llevado a cabo a intervalos de 2 semanas con el péptido T-B adsorbido sobre alumbre. Dos semanas después de la última inyección, todos los ratones recibieron inyecciones IP de rDer p 2 de longitud completa adsorbido sobre alumbre (40 µg por inyección) en 3 ocasiones con un intervalo de 2 semanas, seguido de instilaciones nasales de rDer p 2 en solución salina (100 µg de rDer p 2 en 50 µl de PBS por instilación). Los resultados se evaluaron por comparación con un grupo de ratones tratado con rDer p 2 (indicado como "modelo Der p 2" en la figura 4) pero que no recibieron inyecciones de péptido. La figura indica que la preinmunización con el

péptido reduce significativamente los recuentos de células en el BAL evaluado en aparatos Cytospin (figura 4 panel A), puntuaciones de histología de pulmones (figura 4, panel B) e hiperreactividad de las vías aéreas (figura 4 panel C) evaluado por la reactividad a concentraciones crecientes de metacolina.

Ejemplo 5: Efecto de P21-35 en el metabolismo oxidativo de linfocitos Treg cognado

5 Se incubó un clon de Treg (10^5 células) específico para p21-35 durante 90 minutos en PBS (figura 5, panel A), péptido p21-35 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 200 μl de PBS; figura 5, panel B) o hidroperóxido de terc-butilo (100 μM en PBS; figura 5, panel C), que es un inductor de especies de oxígeno reactivas (ROS). Después las células se marcaron durante 30 minutos con carboxi-H2DCFDA (12 μM), un marcador fluorogénico para ROS en células vivas, y después se
10 analizaron por citometría de flujo. La figura muestra que el péptido p21-35 estimula el metabolismo oxidativo de linfocitos Treg cognados e induce la duplicación de la intensidad de fluorescencia debido al aumento de ROS.

Ejemplo 6: Los clones de linfocitos TREG presentan propiedades citotóxicas en células presentadoras de antígeno.

Se ensayaron las propiedades citotóxicas de una línea Treg (G121) en la línea de linfocitos B WEHI como una célula presentadora de antígeno. La figura 6 muestra el % de células lisadas a lo largo de un periodo de tiempo de 14 h en presencia de la línea celular citotóxica sola (WEHI (10^4 células) + linfocito T (10^4 células)), la línea de linfocitos T con adición del péptido p21-35 (WEHI + linfocito T + p21), o células WEHI precargadas con el péptido p21-35 (WEHIp21 + linfocito T). La lisis de las células WEHI se midió usando el ensayo JAM (un ensayo cuantitativo de fragmentación del ADN): 10^4 células WEHI se preincubaron con ^3H -timidina (4,5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 1 ml) durante 10 h a 37°C y después se lavaron antes de cocultivo con la línea de Treg. La liberación de ^3H -timidina en los líquidos sobrenadantes se tomó como una medida de la lisis de células WEHI. Los datos muestran que es necesaria la presencia del péptido para activar la línea de linfocitos T.
15
20

Ejemplo 7: Los clones de linfocitos TREG suprimen la activación de linfocitos T específicos para otro epítipo en el mismo antígeno, o específicos para otro antígeno por citotoxicidad (figura 7).

Líneas de linfocitos T (TCL; 10^5 células) específicas para Der p 1, un alérgeno no relacionado con Der p 2 o específico para un epítipo de linfocito T mayor alternativo (p71-85) situado en Der p 2 se marcaron con CFSE (que es un marcador para proteínas citoplasmáticas, que hace posible la evaluación del número de divisiones celulares, basado en la intensidad de tinción, que se reduce a 50% cada vez que la célula se divide) (12,5 nanoM) (figura 7). La proliferación de dichos TCL específicos para Der p 1 marcados con CFSE (Panel A y B) o TCL p71-85 (panel C y D) se midió antes (panel A y C) o después (panel B y D) de incubación con el clon de Treg citotóxico (relación 1/1). Se precargaron células presentadoras de antígeno tanto con el alérgeno específico (Der p 1 o Der p 2; 0,5 ml que contenían 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en cada caso) como con el péptido 21-35 (0,5 ml que contenían 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Después de 72 horas de incubación, las células se recogieron, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron en un citómetro de flujo. Los histogramas y porcentajes en las partes B y D de la figura representan la proporción de células positivas para CFSE vivas residuales (las células vivas se discriminaron siendo negativas para el yoduro de propidio). La figura muestra que el clon de Treg citotóxico específico para el péptido 21-35 disminuye fuertemente la proliferación de cada uno de los 2 linfocitos T inespecíficos (divisiones CFSE). La mayoría de las células teñidas con CFSE se volvieron positivas para el marcador de apoptosis yoduro de propidio, indicando que los linfocitos T inespecíficos morían en el ensayo.
25
30
35

Ejemplo 8: Determinación del perfil fenotípico de los linfocitos Treg.

La figura 8 muestra la producción de citoquinas de 4 clones de Treg específicos para p21-35 obtenidos de ratones tratados con la composición de péptido T-B como en el ejemplo 4 (panel izquierdo). Se analizó en los líquidos sobrenadantes de los cultivos celulares el contenido de citoquinas después de cuatro días de estimulación con células presentadoras de antígenos (esplenocitos irradiados de ratones sin tratamiento previo, 10^5 células) y péptido p21-35 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 μl). Los clones de Treg producían principalmente IFN- γ (IFN-G) y solo cantidades en trazas de TNF-a (TNF-a) e IL-10. El panel derecho muestra el análisis de ARNm de dichos linfocitos Treg. No se detectaron transcritos para el represor de la transcripción Foxp3, pero T-bet, granzima A y granzima B muestran niveles de transcripción altos.
40
45

La figura 9 muestra los niveles de expresión de diferentes genes en un clon de linfocitos T específico para el péptido 21-35 en reposo por separación de células activada por fluorescencia (Facs). En la tabla 4, se proporciona la intensidad de fluorescencia media de 4 clones diferentes (T1 a T4) (2×10^5 células). Se observaron niveles altos de CD25, ICOS, GITR, CD103 y CTLA-4 intracelular. CD28 no era expresado o era muy poco expresado. CD62-L y CD45RB eran expresados con niveles bajos. Todos los anticuerpos eran de Becton-Dickinson (NJ, EE.UU.).
50

Tabla 4: Fluorescencia media de clones de Treg marcados con anticuerpo fluorescente

	CD28	CD62L	CD103	CD45RB	ICOS	GITR	CTLA-4
T1	5	36	21	6	251	127	98
T2	12	27	25	10	245	150	110
T3	4	39	27	6	263	110	92
T4	4	36	14	7	253	129	87

Ejemplo 9: Los linfocitos Treg con propiedades citotóxicas son producidos por inmunización con un péptido hecho de un epítipo de linfocito T dominante del alérgeno Der p 1 unido a una secuencia consenso de glutarredoxina (figura 10).

Se sintetizó un epítipo de linfocito T dominante del alérgeno Der p 1 reconocido por SNYCQIYPPNANKIR p114-128 de ratones BALB/c [SEQ ID. NO: 5] en línea con la secuencia CGFS (secuencia del motivo [SEQ ID. NO: 6]), que lleva una secuencia consenso de tipo glutarredoxina de E. coli k12. Esta última se añadió al extremo amino terminal del epítipo de linfocito T (considerando s114 como P1).

El péptido completo tiene la secuencia CGFSSNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID. NO: 7]. La secuencia que contiene el epítipo de linfocito T de Der p 1 sin la secuencia consenso de tipo glutarredoxina [SEQ ID. NO: 5] se usó como control.

Ambos péptidos se unieron mediante una secuencia conectora SGGSGGSGG [SEQ ID. NO: 8] en el extremo amino terminal de la secuencia al extremo amino terminal de la secuencia IITIAWAALLLVAAIFGVASCLIRSRSTKNEANQPLLTD [SEQ ID. NO: 9], que corresponde al dominio transmembrana y la cola citosólica truncada de la proteína gp75, con el fin de dirigir el epítipo de linfocito T al endosoma tardío (el motivo basado en dileucina está subrayado).

La secuencia completa del péptido que comprende la secuencia directora, conector, motivo y secuencia de epítipo es:

CGFS SNYCQIYPPNANKIR SGGSGGSGG

IITIAVVAALLLVAAIFGVASCLIRSRSTKNEANQPLLTD [SEQ ID. NO: 10],

mientras que el péptido de control sin la secuencia CGFS [SEQ ID. NO: 6] tiene la secuencia:

SNYCQIYPPNANKIR SGGSGGSGG

IITIAVVAALLLVAAIFGVASCLIRSRSTKNEANQPLLTD [SEQ ID. NO: 11]

Se inmunizaron grupos de ratones BALB/c por vía subcutánea (20 µg) con el péptido experimental [SEQ ID. NO: 10] o el péptido de control [SEQ ID. NO: 11] adsorbido sobre hidróxido de aluminio. Se realizaron tres inyecciones en intervalos de 2 semanas. Diez días después de la inmunización, los ratones se sacrificaron y se prepararon los linfocitos T CD4+ a partir de los bazo usando perlas magnéticas. Los linfocitos T CD4+ (2x10⁶ células) después se estimularon con el epítipo de linfocito T de Der p 1 (20 µg) presentado por células de bazo adherentes que servían como células presentadoras de antígeno.

Diez días después de la estimulación, se calculó el número de líneas de linfocitos T obtenidas en cada grupo, por análisis de dilución limitante. Para cada línea celular se evaluó su capacidad de producir la lisis de células WEHI, una línea de linfocitos B seleccionada por su eficacia en la presentación de antígenos por determinantes MHC de clase II, como se describe en el ejemplo 6. Solo las células obtenidas de animales inmunizados con el péptido que contiene la secuencia consenso de glutarredoxina han adquirido la capacidad de producir la lisis de células WEHI, y la lisis se produce solo en presencia del epítipo de linfocito T de Der p 1 cognado.

(La figura 10 muestra que los clones de linfocitos T con propiedades Treg solo podían obtenerse de ratones que habían recibido la construcción hecha con el epítipo de Der p 1 conectado al motivo redox de tipo glutarredoxina y gp75, pero no de ratones que habían recibido el péptido de control. Todos los clones de linfocitos T obtenidos después de tratamiento con la construcción y reestimulados in vitro, eran citotóxicos.

Ejemplo 10: Uso de un epítipo de linfocito T dominante de proteína MOG en un modelo in vivo de esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple se puede inducir en modelos experimentales por inmunización con el péptido de la glucoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG) VGWYRSPFSRVVHLYR [SEQ ID. NO: 12], que corresponde a

los restos de aminoácidos 37-52 de la proteína MOG. Este péptido contiene un epítipo de linfocito T dominante. La posición P1, es decir, el primer aminoácido anclado en la hendidura de MHC de clase II es Y40 (la secuencia P1-P9 está subrayada). Los 3 aminoácidos del extremo amino terminal del péptido se sustituyen por la secuencia CGPS [SEQ ID. NO: 13], que corresponde a la secuencia de tioredoxina humana, restos 21 a 24), dando como resultado el péptido CGPSYRSPFSRVVHLYR [SEQ ID. NO: 14]. El péptido experimental [SEQ ID. NO: 14] y el péptido de control [SEQ ID. NO: 12] se unen mediante una secuencia conectora SGGSGGSGG [SEQ ID. NO: 8] en el extremo amino terminal de la secuencia VSVSAVTLGLGLIIFSLGVIS WRRAGHSSYTPLPGSNYSEGWHIS [SEQ ID. NO: 15], que corresponde al dominio transmembrana y la cola citosólica truncada de la proteína HLA-DM β , con el fin de dirigir el epítipo de linfocito T al endosoma tardío (el motivo del péptido basado en tirosina está subrayado).

10 Las secuencias de los péptidos dirigidos son:

VSVSAVTLGLGLIIFSLGVISWRRAGHSSYTPLPGSNYSEGWHIS

SGGSGGSGG CGPS YRSPFSRVVHLYR [SEQ ID. NO: 16] and

VSVSAVTLGLGLIIFSLGVISWRRAGHSSYTPLPGSNYSEGWHIS

SGGSGGSGG YRSPFSRVVHLYR [SEQ ID. NO: 17]

15 Se lleva a cabo la transferencia adoptiva en un grupo de ratones C57BL/6 de un clon de linfocitos T efectores específicos de MOG CD4+ siguiendo un protocolo que se entiende que induce un síndrome de tipo esclerosis múltiple. Esto implica la administración del péptido MOG en adyuvante completo de Freund y 2 inyecciones de toxina Pertussis. Este protocolo produce una expansión del clon de linfocitos T efectores, que da como resultado el desarrollo de señales compatibles con la esclerosis múltiple, en el plazo de 12 días después de la administración del péptido MOG.

20 En un segundo grupo de ratones C57BL/6 se lleva a cabo la transferencia adoptiva primero con un clon de linfocitos T reguladores específicos de MOG (obtenido usando los péptidos [SEQ ID. NO: 16 y 17] descritos antes), seguido después de 1 día del protocolo entero de inducción de enfermedad.

Se observa que la puntuación clínica desarrollada por ratones previamente tratados con un clon de linfocitos T citolíticos se reduce significativamente comparado con los ratones que recibían solo el clon de linfocitos T efectores.

Métodos y materiales

25 Ratones. Los ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad se obtuvieron de instalaciones del laboratorio. Los estudios in vivo fueron aprobados por el comité ético de la University of Leuven.

30 Reactivos. Los péptidos obtenidos del alérgeno del grupo 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 2) Der p 1 y el toxoide tetánico, fueron sintetizados (pureza, >85%). Las secuencias son: p21-35, CHGSEPCIIHRGKPF [SEQ ID. NO: 2]; p114-128 (aminoácidos 114-128 de Der p 1), SNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID. NO: 5]; p830 (aminoácidos 830-844 del toxoide tetánico), QYIKANSKFIGITEL [SEQ ID. NO: 18]; mp21-35 QYIKANSKFIGITELGGCHGSEPCIIHRGKPF [SEQ ID. NO: 19]; mp21-35Asn QYIKANSKFIGITELGGCHGSEPCNIHRGKPF [SEQ ID. NO: 20]. Der p 2 de longitud completa recombinante se produjo en *Pichia pastoris*.

35 Sensibilización con alérgeno. Los animales se sensibilizaron el día 1, 14 y 28 por una inyección i.p. de 40 μ g de alérgeno recombinante absorbido sobre 6 mg de AL(OH)₃. El día 43, 44, y 45, los ratones se expusieron a 100 μ g de alérgeno en 50 μ l de solución salina por instilación intranasal, seguido de una primera medición de la función pulmonar por pletismógrafo de cuerpo entero. Se llevaron a cabo una segunda serie de instilaciones nasales el día 50, 51 y 52 seguido de evaluación de la función pulmonar por pletismógrafo de cuerpo entero.

40 Purificación celular. Los linfocitos T CD4 esplénicos se obtuvieron después de inmunización con el péptido. Después de purificación por gradiente de densidad con Ficoll (Nycomed Pharma), se enriquecieron por selección negativa usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4 (Miltenyi Biotec) y columnas de separación de LS. Las células dendríticas esplénicas se seleccionaron positivamente usando microperlas de CD11c (Miltenyi Biotec) en columnas de separación de LS. Se estimularon con 5 μ g/ml de LPS (Sigma) durante 5 horas, después se lavaron y se mantuvieron durante 18 horas en un incubador de CO₂; se recuperaron células vivas eliminando las células muertas y apoptóticas con microperlas de anexina V en columnas de LS y MidiMacs (todo de Miltenyi Biotec).

45 Los linfocitos V se prepararon a partir de células del bazo de ratones BALB/c sin tratamiento previo, por selección positiva usando microperlas CD19 (Miltenyi Biotec). Como células presentadoras de antígeno, los esplenocitos se empobrecieron de linfocitos T mediante microperlas de CD90 (Miltenyi Biotec) en columnas de empobrecimiento de LD. En algunos ensayos, las células adherentes esplénicas se prepararon incubando los esplenocitos durante 2 h a 37°C en medio de cultivo. Las células no adherentes se separaron y el resto de las células se recuperaron para los ensayos.

50

Los linfocitos pulmonares se prepararon por digestión con colagenasa (Sigma) y centrifugación con Percoll (Pharmacia) como se ha descrito previamente (Abraham et al. (1990) *J. Immunol.* 144, 2117-2122).

5 Cultivo celular. Se cultivaron células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B en medio RPMI 1640 que contenía FCS al 5%, 2-ME 50 μ M, Gentamicina 200 μ g/ml (Invitrogen). Las células Wehi 231 se adquirieron en la colección europea de cultivos celulares (ECACC).

El clon de linfocitos T efectores G221 N es específico para el péptido p21-35. G121, R3TB7, T1 y T3 identifican clones de linfocitos T citotóxicos ensayados en este estudio (en el ejemplo 11).

10 Ensayos de procesamiento de péptidos. G221N, un clon de linfocitos T efectores específicos para el péptido p21-35 se ensayó en un ensayo de proliferación donde se usaron células adherentes esplénicas como APC. Se trataron previamente o con leupeptina 0,2 μ M, cloroquina 0,1 mM, colchicina 60 μ M o se dejaron sin tratar, durante 30 min. Después de 3 lavados con PBS, las APC se cargaron durante 1 hora con el péptido p21-35, mp21-35 o Der p 2 a 37 °C. Después se lavaron dos veces con medio de cultivo y se añadieron al clon G221 N (10^5 cada uno) durante 72 h. Para bloquear la endocitosis, las APC también se trataron con NaN₃/desoxiglucosa (2 mg/ml, 50 mM, respectivamente) durante todo el tiempo de incubación con los péptido seguido de 3 lavados con PBS frío. La proliferación se ensayó por la adición de 1 μ Ci/pocillo de [³H]timidina (ICN) durante las últimas 18 h. Las células se recogieron y se contaron los isótopos incorporados (cpm). Los datos se expresaron como el índice de estimulación calculado dividiendo las cpm obtenidas para linfocitos T G221N estimulados con APC cargadas con péptido entre el valor obtenido con las APC sin cargar.

20 Obtención de clones de linfocitos T reguladores. Se inmunizaron ratones BALB/c mediante 3 inyecciones en la almohadilla de la pata de 20 μ g/ml de péptido mp21-35Asn en alumbre, en intervalos de 2 semanas. Diez días después de la última inyección los linfocitos T CD4⁺ de bazo se estimularon con esplenocitos empobrecidos en linfocitos T de ratones sin tratamiento previo, en presencia del péptido mp21-35Asn. Después de 10 días, las células se volvieron a estimular en las mismas condiciones con 10 U/ml de IL-2 de ratón (Roche). Después de la quinta estimulación, los linfocitos T se subclonaron en presencia de 10 U/ml de IL-2 por dilución limitante. Las posteriores estimulaciones específicas se llevaron a cabo en presencia de 20 U/ml de IL-2 de ratón. La línea de linfocitos T G121 se obtuvo como se ha descrito previamente (Janssens et al. (2003) *J. Immunol.* 171, 4604-4612).

25 Análisis por FACS. Se usó un FACSCalibur (Becton Dickinson) para la citometría de flujo analítica y los datos se analizaron con el programa CellQuest. Diez días después de la última estimulación, los linfocitos T se tiñeron con anticuerpos contra CD25, CD28, CD62-L, CD103, CD45RB, ICOS, CTLA-4, y CD11c, (Pharmingen), GITR, Foxp3, granzima-B, T-bet(4B10), perforina, CD127, y Vb8.1 TCR, (eBioscience).

30 Ensayos de supresión inespecífica. Los clones de linfocitos T cooperadores y CD4⁺CD25⁻ objetivo se marcaron con CFSE 125 nM (Molecular Probes) durante 15 minutos en PBS a 37 °C. La reacción se detuvo lavando las células con PBS que contenía FBS al 30%. Estas células (3×10^5) se cocultivaron con 10^5 clones de linfocitos T CD4⁺ citotóxicos y esplenocitos empobrecidos en linfocitos T con 1 μ g/ml de anticuerpo anti-CD3 (eBioscience). Para la supresión de los clones de T cooperadores, se cocultivaron 10^5 células con el mismo número de células citotóxicas y esplenocitos empobrecidos en linfocitos T. Después de 48 h o 72 horas, las células se recogieron y se analizaron por citometría de flujo.

Para algunos cultivos se usaron anticuerpos de bloqueo contra FAS-L, GITR, LAG-3 con 10 μ g/ml (eBioscience). Se llevaron a cabo ensayos de transpocillos en placas de 24 pocillos (Becton Dickinson).

40 Detección de apoptosis. Se usaron anexina V-FITC o -PE para detectar la muerte celular en linfocitos B, células dendríticas y linfocitos T (kit de detección con anexina V, BD Biosciences). En algunos experimentos, la apoptosis se midió por detección intracelular de caspasa-3 activada con anticuerpos marcados con FITC o PE (Pharmingen) o por marcaje nuclear con una solución de tinción de yoduro de propidio (PI) (Pharmingen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 Para la inhibición de la actividad de GZ-B, se añadieron Z-AAD-CMK (Calbiochem) o 3,4-dicloroisocumarina (DCIC) (SIGMA) en las concentraciones indicadas durante todo el periodo de cocultivo. .

50 Detección de citoquinas. Se volvieron a estimular un millón de linfocitos Treg con 3 millones de esplenocitos empobrecidos en linfocitos T irradiados, durante 72 horas. Se evaluó en los líquidos sobrenadantes la presencia de diferentes citoquinas. IL-10 e IL-13 se evaluaron usando el kit de Elisa OptEIA mouse Elisa kit (BD Biosciences). TGF- β y IL-13 se evaluaron con los kits de ensayo de anti-TGF- β 1 de ratón de DuoSet o anti-IL-13 de ratón de DuoSet, respectivamente (R&D Systems). La producción de IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ y TNF- α se analizaron por citometría de flujo usando el kit Th1/Th2 Cytokine CBA kit (BD Biosciences).

Para la estimulación de células CD4⁺ policlonales, se estimularon 10^6 células con 5×10^5 esplenocitos empobrecidos en linfocitos T irradiados (de ratones sin tratamiento previo) y 10 μ g/ml de Der p 2 durante 72 h.

55 Proliferación de células CD4⁺ policlonales. Se estimularon 10^5 células CD4⁺ esplénicas de ratones tratados con péptido, con 10^5 esplenocitos empobrecidos en linfocitos T y 10 μ g/ml de mp21-35, 5 μ g/ml de péptido p830 o 10

µg/ml de Der p 2. La incorporación de (³H)-timidina se ensayó como se ha descrito antes. Los resultados se muestran como el recuento de isótopos medio (cpm) ± e.e.m. de 6 ratones individuales ensayados por triplicado.

Hiperreactividad de las vías aéreas. La hiperreactividad de las vías aéreas (AHR) se midió en ratones sin restricción usando un pletismógrafo de cuerpo entero (EMKA) de acuerdo con métodos publicados (Hamelmann et al. (1997) *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 156, 766-775). La pausa potenciada máxima (PenH) se usó como un parámetro para la broncoconstricción. Los animales se expusieron durante 1 minuto a dosis crecientes de metacolina aerolizada (de 10 a 100 mg/ml), seguido de 3 minutos de reposo durante los cuales se evaluaron los parámetros de respiración. Los valores de PenH se expresaron como la media de las mediciones llevadas a cabo cada 30 segundos a lo largo de un periodo de 3 minutos después de cada exposición a la metacolina. La distensibilidad pulmonar se midió con el sistema FlexiVent (Scireq).

Recolección del fluido de lavado broncoalveolar (BALF). Tres días después de la estimulación con metacolina, los ratones se sacrificaron, se aisló la tráquea y se insertó una cánula. El BALF se recogió lavando con 1 ml de solución salina que contenía BSA al 5% (usado para la detección de citoquinas) y después seguido de 2x1 ml de solución salina. Se estableció el recuento de células, se prepararon los Cytospin por centrifugación a 1400 rpm durante 6 min y se tiñeron (método de Diff-Quik). Se contaron 100 células en 3 campos diferentes para la identificación celular.

Histología pulmonar. Los pulmones se fijaron con formaldehído al 4%, se deshidrataron y se insertaron en parafina para la formación de secciones (portaobjetos de 7 µm de grosor) y se tiñeron con hematoxilina/eosina. Los eosinófilos se detectaron por tinción de May-Grünwald Giemsa. Se identificaron células calciformes en la mucosa de las vías aéreas por la reacción de ácido peryódico-Schiff (PAS). Se contaron las células positivas para PAS y se expresó como porcentaje de células epiteliales totales. Para cada ratón, se examinaron 5 campos de cada sección pulmonar, de los bronquios centrales así como de bronquios pequeños. La densidad de infiltración de eosinófilos y linfocitos se clasificó como sigue: ausente: 0; ligera pero no sistémico: 1; ligera: 2; de ligera a media: 3; media: 4; de media a alta: 5; alta: 6.

Todos los portaobjetos fueron examinados por dos personas, que incluía el patólogo que no conocía los grupos a los que pertenecían los ratones.

Para el análisis de linfocitos T transferidos, los pulmones se fijaron con paraformaldehído, se crioprotegieron con sacarosa al 20% durante la noche y se congelaron instantáneamente en medio OCT. Se cortaron secciones con el criostato (9 µm), se fijaron en acetona y se montaron en reactivo antidecolorante (ProLong Gold; Invitrogen) y se analizaron con microscopio confocal. El análisis se llevó a cabo en un Zeiss Axioplan2 conectado a una cámara de vídeo de 3CCD (DXC-930P, Sony), y el programa KS300 (Zeiss).

Expresión dirigida del péptido en linfocitos B. El vector onco-retrovírico pMND-SN se obtuvo de Dr. D. Kohn, USC. Se hizo una construcción de fusión que contenía p21-35 (aminoácidos 21 a 35 de Der p 2) y el extremo carboxi terminal de gp75 (aminoácidos 488 a 539) conectados con un conector, Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly [SEQ ID. NO: 8], por PCR y se clonó en el vector pMND. El vector resultante pMND-p21gp75 se usó junto con vectores que codifican proteínas víricas para la transfección transitoria de células 293T y las células productoras oncovirales se obtuvieron como se ha descrito previamente (Janssens W. et al., *Human gene therapy* 14, 263-276 (2003)). Linfocitos B esplénicos previamente activados durante 24 h con LPS bacteriano 50 µg/ml se cocultivaron con el líquido sobrenadante que contenía el vector vírico en presencia de polibreno (6 µg/ml) y LPS (50 µg/ml). Después los linfocitos B se lavaron exhaustivamente antes de la transferencia adoptiva a ratones BALB/c sin tratamiento previo.

Análisis del ARNm. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (Janssens W. et al. (2003), *Human gene therapy* 14, 263-276. Para los linfocitos T, se analizaron 10⁶ células el día 12 después de reestimulación. Las secuencias de los cebadores eran: *granzima A*, (directo) 5' ctctggtccccggggccatc 3' [SEQ ID. NO: 21] y (inverso) 5' tatgtagtgagccccaagaa 3' [SEQ ID. NO: 22]; *para granzima B*, (directo) 5' ctccacgtgctttcacaaa 3' [SEQ ID. NO: 23] y (inverso) 5' ggaaaatagtagagaggca 3' [SEQ ID. NO: 24]; *para β-actina*, (directo) 5' cattgtgatggactccggagacgg 3' [SEQ ID. NO: 25] y (inverso) 5' catctcctgctcgaagtctagagc 3' [SEQ ID. NO: 26]. La temperatura de reasociación era 55 °C durante 27 ciclos.

Detección de linfocitos B transducidos in vivo. Los ratones que recibieron linfocitos B transducidos con pMND-p21gp75 seguido de transferencia de clon de linfocito T, se sacrificaron y los linfocitos B esplénicos se purificaron con microperlas de CD19 (Miltenyi Biotec). Se realizó la transcripción inversa de 5 µg de ARN total para la preparación de ADNc. Se llevó a cabo la PCR en el ADNc usando cebadores específicos del vector retrovírico, (directo) 5' cccttatccagccctcactc 3' [SEQ ID. NO: 27] y (inverso) 5' cctggggactttccacacc 3' [SEQ ID. NO: 28]. La temperatura de reasociación era 56 °C durante 28 ciclos.

Análisis estadístico. Se usaron ensayos no paramétricos para evaluar diferencias entre medias (prueba U de Mann-Whitney). Para evaluar la hiperreactividad de las vías aéreas, se calculó el área bajo la curva y las diferencias se evaluaron con la prueba U de Mann-Whitney.

Ejemplo 11: Los linfocitos T reguladores CD4+CD25+ inducidos in vivo previenen y suprimen el asma experimental. Producción de linfocitos T reguladores específicos de antígeno in vivo.

Un primer clon de linfocitos CD4+CD25+ citolíticos (G121) se obtuvo de ratones inmunizados con el péptido sintético p21-35, que abarca un epítipo de linfocito T mayor del alérgeno Der p 2. La frecuencia de dichos linfocitos T citolíticos era extremadamente baja comparada con la de las células efectoras CD4+ de la misma especificidad. Los intentos de obtener linfocitos T con las mismas propiedades usando adyuvantes alternativos tales como alumbre no tuvieron éxito.

Esto podía deberse a la presentación ineficaz del péptido debido, por ejemplo, a la rápida degradación y/o ineficaz captación por el endosoma tardío. Se ensayó la capacidad in vitro de diferentes formas de péptido para inducir la apoptosis de una línea de linfocitos B (células Wehi) usada como célula presentadora de antígeno (APC) por el clon de linfocitos T reguladores G121. La metilación de las dos cisteínas puede potenciar la estabilidad del péptido (p21-35met). Alternativamente, el acoplamiento de p21-35 con un péptido que lleva una secuencia conocida de epítipo de linfocito T subdominante podría aumentar la captación por endosomas tardíos. En ratones BALB/c, la secuencia que abarca los restos de aminoácidos 830 a 844 del toxoide tetánico representa un epítipo menor (QYIKANSKFIGITEL, [SEQ ID. NO: 18]). Por lo tanto, se produjo un péptido sintético que cubría los aminoácidos 830-844 de toxoide tetánico, unido por dos glicinas a p21-35 (QYIKANSKFIGITELGGCHGSEPCNIHRGKPF, [SEQ ID. NO: 20]), y por razones de estabilidad también se metilaron dos cisteínas (péptido modificado, mp21-35). mp21-35 era 100 veces más eficaz en la inducción de la apoptosis de células Wehi en presencia de Treg G121, comparado con p21-35 (figura 11a). La metilación de dos restos de cisteína de p21-35 (p21-35met) también aumentaba la presentación de MHC de clase II, y este péptido estabilizado era tan eficaz como mp21-35. Un péptido de control hecho invirtiendo el orden de los dos componentes de mp21-35 era ineficaz en la inducción de apoptosis de células WEHI.

La forma metilada de p21-35 (p21-35met) o la variante acoplada (mp21-35) se ensayaron respecto a la eficacia de producción in vivo de linfocitos T citolíticos. Se inmunizaron ratones BALB/c con Der p 2 en alumbre. La reestimulación in vitro de linfocitos T CD4+ daba como resultado la proliferación robusta cuando se usó Der p 2 para la estimulación, pero poca respuesta a la presentación de p21-35 (figura 11b: grupo de control de solución salina). Posteriormente, se ensayó la capacidad de mp21-35 para prevenir la proliferación de linfocitos T CD4+ por preinmunización de ratones BALB/c con mp21-35 o una mezcla de p830-844 y p21-35met, en concreto los dos componentes peptídicos de mp21-35. A esto le siguió la administración IP de Der p 2 en alumbre, como antes. Se observó una reducción significativa de proliferación inducida por Der p 2 solo cuando se usó mp21-35 para la preinmunización (figura 11b). La producción de citoquinas hecha por las células del bazo CD4+ estimuladas con Der p 2 era idéntica en el grupo de control y en el grupo preinmunizado con los dos componentes peptídicos separados (figura 11c), mostrando una respuesta de tipo Th2. En el grupo pretratado con mp21-35, la producción de citoquinas se redujo a concentraciones indetectables.

Hay que destacar que la estimulación de esplenocitos CD4+ in vitro obtenidos de ratones pretratados con mp21-35 o la mezcla de péptidos, no produjo proliferación de p830-844 (Figura 11b), ni producción de citoquinas, indicando que el péptido derivado del toxoide tetánico no interfería con la generación de Treg.

mp21-35 tenía que ser procesado para la presentación eficaz, como se muestra evaluando la activación de un linfocito T efector de p21-35 (G221N) en presencia de diferentes inhibidores (figura 11d). Esto muestra que p21-35met, mp21-35 y Der p 2 requerían la internalización en las células presentadoras de antígeno (inhibida por NaN3/desoxiglucosa), fusión con y acidificación de los endosomas tardíos (inhibido por colchicina y cloroquina respectivamente). No se requería el procesamiento de péptido para p21-35met, como se muestra por la ausencia de inhibición por adición de leupeptina, un inhibidor de serina/cisteína proteasa, que refleja la capacidad de las moléculas MHC de clase II para acomodar las secuencias de hasta 15 aminoácidos.

Considerados juntos, estos datos indican que mp21-35 era procesado de forma eficaz in vivo, a diferencia de una mezcla de sus dos componentes, y que la preinmunización con mp21-35 prevenía la activación de linfocitos T específicos de alérgeno. Basado en descubrimiento que muestran que la regulación se puede lograr más fácilmente con análogos de epítopos de linfocitos T, se determinó la capacidad de varios mutantes de aminoácidos individuales de p21-35 para producir linfocitos T CD4+ después de inmunización IP en alumbre. En particular, un péptido mutante con una mutación Ile28Asn, una posición que se sabe que corresponde al resto de anclaje de MHC de clase II P4, mostró capacidad solo ligeramente reducida para inducir la proliferación de linfocitos T. Por lo tanto, se usó la forma mutada de mp21-35 (mp21-35Asn) en el resto de los experimentos en este ejemplo.

Obtención y caracterización fenotípica de clones de Treg

Se obtuvieron clones de linfocitos T clones para el análisis fenotípico del bazo de ratones a los que se inyectó mp21-35Asn en alumbre, mp21-35Asn en CFA/IFA (adyuvante de Freund completo o incompleto), Der p 2 o solución salina como control. Se obtuvieron un total de 17 clones, cuya expansión dependía completamente de la adición de IL-2. Estos clones se mantuvieron en reposo durante 10 días antes de evaluar la expresión de CD25. Después se cribaron los clones positivos por su capacidad para inducir la apoptosis de células Wehi cargadas con p21-35 usando la unión a anexina V como resultado de lectura. Todos los clones de linfocitos T CD4+CD25+ (8/8) obtenidos de ratones inmunizados con mp21-35Asn en alumbre, se mostró que eran citolíticos, mientras que no se obtuvieron dichos clones con mp21-35Asn en CFA/IFA (0/5) o de ratones inmunizados con Der p 2 (0/4). Es interesante que se

obtuvo un pequeño número de linfocitos T efectores CD4+ de ratones no inmunizados (véase a continuación), pero ninguno era citolítico.

Se caracterizó el fenotipo de los Treg citolíticos. Se obtuvieron resultados similares para un total de 15 clones, obtenidos de inmunizaciones separadas. Los resultados representativos de Facs para los marcadores de superficie se muestran en la figura 12a (un clon representativo) y en la tabla 5 (4 clones), indicando niveles de expresión homogéneos.

Tabla 5 Presencia de marcadores de superficie en 4 clones citolíticos obtenidos con el péptido mp21-35Asn (expresado como MFI)

	CD28	CD26L	CD103	CD45RB	ICOS	GITR	CTLA-4
T1	5	36	21	6	251	127	96
T2	12	27	25	10	245	150	110
T3	4	39	27	6	263	110	92
T4	4	36	14	7	253	129	87

10 Todos los clones expresaban niveles altos de CTLA-4, GITR e ICOS, con expresión significativa, aunque baja de CD62L y CD103, y expresión apenas detectable del receptor de quimioquina CCR7. T-bet era expresado uniformemente, pero no Foxp3, mientras que CD127 era solo débil (figura 12b). Además, los clones de Treg expresan niveles altos de granzima B y perforina. Los experimentos de RT-PCR muestran niveles detectables de ARNm de granzima A, pero un nivel mucho menor de granzima B (figura 12c). El patrón de secreción de citoquinas mostraba casi exclusivamente IFN-gamma, pero nada o muy poca IL-10 y no TGF-β (figura 12d). No se detectó TGF-β unido a superficie.

20 Todos los Treg citolíticos eran anérgicos ya que no respondían a la activación por antígeno en ausencia de IL-2 añadida. Esta última invertía la anergia sin restablecer la transcripción de IL-2 y sin pérdida de propiedades reguladoras, como se muestra después de ciclos de reestimulación. Esto sugiere una alteración epigenética, posiblemente relacionada con la hiperexpresión de T-bet. Además, estos clones expresaban niveles altos de egr-2, que se sabe que activa la transcripción de reguladores negativos del ciclo celular. Estas células expresaban niveles altos de CD44, pero mostraban expresión baja de CD45RB (y CD62L como se ha mencionado antes), identificándolas como células de memoria. La ausencia de producción de citoquinas supresoras sugiere que su mecanismo de acción requiere el contacto de célula-célula. La expresión de granzimas y perforina clasifica dichos clones entre los linfocitos T con un potencial citolítico. Finalmente, se determinó el uso de Vβ de los Treg citolíticos, que indica una predominancia de Vβ8.1, con algunos clones pertenecientes a la familia Vβ7. Se secuenció la cadena beta de una serie de clones, mostrando las diferencias significativas en CD3, que indica que la respuesta hacia el péptido p21-35 era oligoclonal. Por lo tanto, los clones de Treg se evaluaron funcionalmente para determinar tanto el mecanismo de lisis de las células diana como su capacidad para producir la supresión de linfocitos T inespecíficos.

30 Inducción de apoptosis en células presentadoras de antígeno

La lisis de células presentadoras de antígeno se obtuvo tanto con linfocitos B como con células dendríticas. Linfocitos B esplénicos de ratones BALB/c sin tratamiento previo, precargados con p21-35 indujeron al activación de caspasa 3 solo cuando se incubaron con el clon de linfocito T citolítico R3TB7 (es decir, otro clon de linfocito T con actividad citolítica, obtenido de una forma similar) (figura 13a: panel izquierdo), pero no cuando se añadió un linfocito T específico de p21-35 CD4+ de control (figura 13a, panel derecho). Se repitieron los mismos experimentos usando anexina V como un marcador de apoptosis, proporcionando los mismos resultados. Se llevaron a cabo experimentos con células dendríticas CD11c+ cargadas con p21-35 (figura 13b: panel izquierdo) o células WEHI (figura 13b: panel derecho). Tras incubación con R3TB7 prácticamente todas las células dendríticas (DC) o células Wehi fueron inducidas a la apoptosis, medido por la activación de la caspasa 3. Se llevaron a cabo los mismos experimentos con anexina V y mostraron resultados idénticos.

La apoptosis puede ser inducida por la ruta Fas-FasL o por secreción de gránulos citotóxicos que contienen granzimas. Se hicieron intentos de inhibir cada una de estas rutas. La adición de concentraciones crecientes de un anticuerpo contra FasL, o de inhibidores de granzima B a un cultivo celular que contenía células WeHi cargadas con p21-35 y un clon de linfocito T citolítico, aumentó el número de células WEHI que sobrevivían de una forma dependiente de la dosis (figura 13c). En una serie de experimentos se mostró que el anticuerpo anti-FasL restablecía hasta 80% de la supervivencia de las células WEHI. Se obtuvo solo es restablecimiento parcial de la supervivencia con inhibidores de granzima B y solo cuando se usaron dosis altas, cercanas a la citotoxicidad celular, indicando que la granzima B no da cuenta de mucha de la citolisis celular. En experimentos adicionales, se usó EGTA como un inhibidor de la exocitosis de gránulos, que también mostró solo restablecimiento parcial de la supervivencia de células Wehi.

Se evaluó además si la lisis de las células diana requería el contacto entre células. Para este fin, se usaron DC CD11+ cargadas con p21-35 (o mp21-35Asn en experimento paralelos). Cuando las células DC cargadas se incubaron con el clon de linfocito T citolítico G121, se observó lisis en 89% de las células, medido por la expresión de anexina V (figura 13d, panel izquierdo). Cuando se llevaron a cabo los mismos experimentos en un sistema de transpocillos, la lisis de DC se limitó a 15%, indicando que la lisis requería el contacto directo entre células (figura 13d, panel derecho).

Para evaluar mejor que la lisis de APC requería el contacto directo con linfocitos T citolíticos a través de la presentación de MHC de clase II de p21-35, se llevó a cabo un experimento en el que se cargaron dos poblaciones idénticas de células Wehi con p21-35 o con un péptido irrelevante (p71-85). Estas dos poblaciones se podían distinguir por el marcaje diferencial con CFSE. Se puede ver en la figura 13e que, mientras que las células WEHI que presentaban p21-35 eran lisadas completamente, solo eran afectadas el 40% de las células cargadas con p71-85.

De todo junto surge que los clones de linfocitos T citolíticos inducían la apoptosis de DC y linfocitos B por un mecanismo que requería la formación de una inmunosinapsis por la presentación de péptido dependiente de MHC de clase II. Se demuestra la participación significativa de Fas-FasL, pero solo la implicación limitada de granzima B.

Supresión de linfocitos T inespecíficos

Se examinó el mecanismo de supresión de linfocitos T inespecíficos con linfocitos T CD4+CD25(-) policlonales y con diferentes clones de linfocitos T efectores CD4+.

Primero se ensayó la capacidad de Treg para suprimir la proliferación de linfocitos T CD4+CD25(-) después de activación con anti-CD3 en presencia de células presentadoras de antígeno. Los resultados obtenidos para dos clones de linfocitos T citolíticos (G121 y R3TB7). se muestran en la figura 14a. El número de linfocitos T CD4+CD25(-) detectables, así como el número de divisiones observadas disminuyó notablemente en el plazo de 48 h de incubación cuando se añadió uno cualquiera de los dos clones citolíticos (paneles izquierdo superior y medio). El efecto era incluso más pronunciado a las 72 h para el segundo clon de linfocitos T (panel medio inferior). Es interesante que solo los linfocitos T CD4+CD25(-) activados eran lisados, como puede verse del eje vertical que representa la formación de blasto. El experimento de control en el que Treg era sustituido por un número idéntico de linfocitos T CD4+CD25(-) no marcados (panel derechos) eliminaba un posible artefacto relacionado con número variables de células totales en el medio de cultivo.

Después, se analizó la cinética de supresión. En los experimentos mostrados en la figura 14b, puede verse que 48 y 70% de los linfocitos T CD4+CD25(-) marcados con CFSE expresan anexina V después de 18 y 24 h de coincubación con un Treg citolítico (R3TB7), respectivamente, usando el mismo sistema de ensayo que en la figura 14a.

Dicho efecto rápido sugiere la implicación de rutas secretoras similares a las usadas por los linfocitos T CD8+ citotóxicos. Por lo tanto, los experimentos se repitieron para verificar si la inhibición de exocitosis de gránulos por adición de EGTA al cultivo inhibiría la supresión. Básicamente no había inhibición de la supresión de linfocitos T inespecíficos a las 72 h con 2 concentraciones de EGTA (figura 14c).

Después, se evaluó si los clones de linfocitos T de especificidad definida y fenotipos diferentes podrían ser suprimidos por linfocitos T citolíticos cuando eran activados por el reconocimiento cognado de los antígenos correspondientes, en lugar de activación con anti-CD3 no específica. Para este fin, se obtuvieron tres clones de ratones BALB/c, en concreto una célula Th2 específica para un segundo alérgeno no relacionado de la misma fuente (Der p 1), una célula Th1 específica para un segundo epítipo de linfocito T mayor de Der p 2 (aminoácidos 71-85) y un clon Th0 específico para el epítipo de linfocito T subdominante 830-844 de toxoide tetánico. Cada uno de estos 3 clones se usó en todos los sistemas de ensayo descrito aquí, Se muestran los resultados para un solo clon en cada ensayo, pero los resultados se confirmaron en todas las posibles combinaciones de ensayos y clones.

En un primer conjunto de ensayos, se midió la proliferación de un clon de linfocitos T usando células marcadas con CFSE después de presentación del correspondiente antígeno por esplenocitos empobrecidos en linfocitos T. Para eliminar un artefacto debido a la competición por nutrientes en el medio de cultivo, se añadió la misma cantidad del clon Th2 no marcado al clon Th2 marcado con CFSE. Un clon Th2 específico para Der p 1 proliferaba fácilmente, medido a lo largo de un periodo de tiempo de 72 h (figura 14d). En ensayos paralelos, las APC también se cargaron con p21-35 y un clon de linfocitos T citolíticos añadidos en una relación 1/1 al clon Th2 específico de Der p 1. La figura muestra que solo 5% de los clones Th2 sobrevivían después de 72 h de incubación. La figura también mostraba que la adición de anticuerpos específicos para FasL a lo largo del periodo de incubación entero, daba como resultado la inhibición parcial de la supresión (36% de clon Th2 residual). mientras que un anticuerpo anti-GITR o anti-Lag3 no tenía efecto. Se obtuvieron resultados idénticos con un clon Th1 para Der p 2 y con un clon Th0 para toxoide tetánico. Por lo tanto, era factible la supresión de los clones por los linfocitos T citolíticos independientemente de su estado de maduración, con la condición de que se produzca la activación a través de la interacción cognada de MHC de clase II.

- La cuestión de si la interacción con contacto era necesaria entre los linfocitos T citolíticos y los linfocitos T inespecíficos, se examinó en un sistema de cultivo de transpocillos. Los resultados se muestran en la figura 14e. Los esplenocitos empobrecidos en linfocitos T cargados con p21-35 y p71-85 mantenían la proliferación de un clon Th1 específico de p71-85. La adición de un Treg citolítico de p21-35 suprimía la proliferación (panel medio). Cuando se separaban las APC cargadas con péptido en un sistema de cultivo de transpocillo y se añadía la línea de células citolíticas en un compartimento con el clon Th1 específico de 71-85 no se observaba supresión en el segundo compartimento (panel derecho). Por lo tanto, se podía concluir que la supresión no era mediada por factores solubles. Estos experimentos se confirmaron usando el clon de células Th2 para Der p 1.
- Los linfocitos T citolíticos prevenían de forma eficaz la formación de blastos de linfocitos T inespecíficos. El tamaño celular medio de linfocitos T inespecíficos aumentaba solo marginalmente cuando se cultivaba en presencia de Treg citolíticos activados (R3TB7) como se muestra en la figura 14f. Esto estaba acompañado de una mayor proporción de muerte celular, medida con las células inespecíficas marcadas con CFSE. El porcentaje de muerte celular era 26% por células inespecíficas solas, 36% con el clon de control p830-844 usado en lugar del clon citolítico, 34% con el clon citolítico sin activación, y 51% con el clon citolítico en presencia del péptido activante.
- Con el fin de excluir que la supresión inespecífica pudiera ser parcialmente debida a artefactos, debido a la lisis de APC, se llevaron a cabo ensayos adicionales en los que dos poblaciones distintas de APC (células Wehi-231 B), se incubó cada una con p21-35 o con un péptido de lectura (el epítipo de linfocito T derivado de Der p 1 o p830-844 de toxoide tetánico). Las dos APC se cultivaron en el mismo pocillo y tanto un clon de linfocitos T citolíticos como una célula efectora marcada con CFSE. Se observó que el clon de linfocitos T marcados era suprimido. La presentación en APC de p21-35, requerida para activar Treg citolíticos, se sustituyó por una combinación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. En dichas circunstancias la proliferación de las células efectoras activada por reconocimiento cognado también era suprimida. Considerado junto con los experimentos descritos en la figura 14a, esto muestra que los clones de linfocitos T citolíticos suprimían linfocitos T inespecíficos en ausencia de inducción de apoptosis de la APC.
- Treg citolíticos lisan linfocitos B cargados con p21-35 in vivo
- Los Treg citolíticos inducen la apoptosis de APC in vitro. Para determinar si la actividad era relevante en un marco in vivo, se usaron linfocitos B transgénicos que expresaban p21-35 en el contexto de determinantes MHC de clase II. Dichos linfocitos B transgénicos persisten al menos 3 meses en el bazo después de transferencia adoptiva. Primero, se verificó si los Treg citolíticos inducen apoptosis de linfocitos B transgénicos in vitro. 52% de linfocitos B son inducidos a la apoptosis después de 18 h de incubación con un clon de linfocitos T citolíticos (figura 15a). La expresión de la construcción en bazos de ratones de control (bandas B), pero no en bazos de ratones a los que se ha transferido tanto linfocitos B transgénicos como Treg (bandas A) se muestra en la figura 15b. No se detectó construcción vírica en células pulmonares, en ausencia de la exposición a alérgeno. Estos datos indica que los linfocitos T citolíticos mantenían su capacidad de producir la lisis de linfocitos B que presentan el antígeno cognado después de transferencia in vivo.
- Los Treg citolíticos se acumulan en los pulmones después de exposición a alérgeno
- El fenotipo de memoria de los Treg, combinado con la ausencia de CCR7 y niveles bajos de CD103, sugiere que pueden migrar a los pulmones, donde pueden ejercer su actividad supresora.
- Dos líneas de linfocitos T citolíticos diferentes se marcaron con CFSE o SNARF (ambos marcadores para proteínas citoplasmáticas, que emiten a diferentes longitudes de onda) y se usaron en experimentos separados. Se encontró la acumulación de células marcadas con CFSE en áreas pulmonares perivasculares y peribronquiales (no se muestran los datos). Ratones de control que recibían Treg marcados pero no instilaciones de alérgenos no mostraron prácticamente fluorescencia.
- Para establecer si los Treg representan una proporción significativa de linfocitos que se acumulan en los pulmones, y para descartar un posible artefacto relacionado con la toxicidad inherente del marcaje fluorescentes, se llevó a cabo la transferencia adoptiva de Treg a ratones BALB/c. En estos experimentos, se usó el hecho de que las células citolíticas expresaban V β 8.1 y se contó la proporción de células positivas en toda la población CD4+ que se acumulaba en los pulmones después de instilación nasal con alérgeno. En dichas condiciones, se sabe que muy pocos linfocitos están unidos a los pulmones en el modelo de asma de Der p 2. En el grupo de ratones a los que se transfirió el clon de linfocitos T citolíticos, más de 90% de las células CD4+ expresaban V β 8.1, mientras que solo se detectaron 25% y 20% de dichas células en el grupo tratado con la línea celular de control V β 8.1+, y en un grupo de control de ratones que recibieron Der p 2 por inhalación, pero no linfocitos T, respectivamente (figura 15c).
- Por lo tanto, se concluye que Treg citolíticos se acumulan en los pulmones tras la estimulación con alérgeno por instilación nasal.
- Los clones de Treg citolíticos previenen y suprimen el asma experimental
- Los experimentos descritos antes sugerían que los clones de linfocitos T citolíticos podrían ser valiosos para el control de las respuestas inmunitarias específicas in vivo. El requisito de la interacción cognada de MHC de clase II y

la inducción de apoptosis de APC podría proporcionar la oportunidad de suprimir la respuesta entera hacia antígenos individuales. Además, su acumulación en tejidos pulmonares podría favorecer su actividad reguladora en algunas de las características asociadas con el asma.

5 Esto se ensayó mediante la transferencia adoptiva de linfocitos T citolíticos específicos de p21-35 tanto en marcos preventivos como supresores. Se usó el modelo de asma experimental de Der p 2 como se ha descrito antes. Se usaron dos líneas de linfocitos T citolíticos, obtenidas de ratones BALB/c inmunizados con mp21-35Asn.

10 Los resultados de los experimentos de prevención se muestran en la figura 16(a-f). Puede verse que la transferencia de linfocitos T citolíticos antes de la inducción de sensibilización con Der p 2 reducía el número de células recuperadas del BALF a valores observados en animales sin tratamiento previo (no se muestra en la figura 16a), sin prácticamente células salvo macrófagos. La línea de células de control no tenía efecto en la recuperación de células en el BALF comparado con el grupo de control positivo. Los dos clones de células citolíticas producían esencialmente el mismo efecto. La producción de TGF- β en el BALF era indetectable con los dos Treg, mientras que la producción de IL-10 era suprimida con el segundo clon. Se observó una reducción significativa de infiltración de eosinófilos pulmonares e hiperplasia de células calciformes. Además, la hiperreactividad de las vías aéreas medida por inhalación de dosis crecientes de metacolina se redujo prácticamente a niveles observados en ratones sin tratamiento previo (sin trat. previo).

15 Cuando se usaron las mismas dos líneas celulares citolíticas después de la sensibilización con Der p 2, se observó mejora similar de los parámetros biológicos y funcionales (figura 16(g-l)). Una notable excepción era, sin embargo, la hiperplasia de células calciformes. Es interesante que la reactividad de las vías aéreas a la metacolina era comparable a la de los animales sin tratamiento previo. En ensayos adicionales estos últimos resultados se verificaron por mediciones de distensibilidad dinámica, que proporcionaron esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo 12: Inmunización de ratones BALB/c con péptido derivado de Der p 1.

20 Se inmunizaron dos grupos de ratones BALB/c por vía subcutánea o con 20 μ g del péptido con una secuencia de epítipo de linfocito T del alérgeno Der p1 (SNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID. NO: 5]) o con una versión modificada del mismo CGFS SNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID. NO: 7] que tiene en el extremo N la secuencia CGFS [SEQ ID. NO: 6].

Los aminoácidos de Der p 1 que residen en la hendidura son S114 (o N115) a P122 (o P123) (donde están implicados 9 aminoácidos de unión a halotipos de MHC de clase II en la hendidura). Por lo tanto, la secuencia SNYC que está presente en el Der p 1 no está accesible y no puede interactuar con otras proteínas y llevar a cabo su actividad reductora.

30 Después de 3 inyecciones, los ratones se sacrificaron y los linfocitos T CD4⁺ se purificaron de los bazos y se clonaron por dilución limitante. Los clones de linfocitos T obtenidos de ratones inmunizados con el péptido SNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID. NO: 5] producían linfocitos T efectoras CD4⁺ caracterizados por la proliferación y secreción de citoquinas seguido de interacción cognada con presentación por MHC de clase II del péptido. Los ratones inmunizados con el péptido CGFS SNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID. NO: 7] producían clones de linfocitos T con propiedades citolíticas, determinado en un ensayo similar al descrito en el ejemplo 10.

35 Para determinar si los linfocitos T con propiedades citolíticas (como se muestra en el ejemplo 10) tenían la capacidad de inducir apoptosis de linfocitos T efectoras, se prepararon células presentadoras de antígeno (APC) a partir de células esplénicas adherentes. Las APC se incubaron con el alérgeno Der p 1 para la presentación en los determinantes de MHC de clase II.

40 Como se muestra en la figura 17, las células efectoras CD4⁺ proliferaban fácilmente cuando se añadían a APC cargadas con antígeno. La adición de linfocitos T citolíticos inducía la muerte de células efectoras CD4⁺ (7-AAD tinción positiva (FL3-H)). La figura 17 muestra la apoptosis en 73 % de las células efectoras y la anulación fuerte de la proliferación de células efectoras CD4⁺.

45 Ejemplo 13: La transferencia adoptiva de clones de linfocitos T con actividad citolítica previene completamente y suprime el asma producido por la instilación nasal del alérgeno Der p 1.

Ratones BALB/c se sometieron a 2 series de 3 instilaciones nasales diarias separadas por 1 semana, usando 100 μ g del alérgeno Der p 1. El día después de la instilación nasal, los ratones se sacrificaron y se comprobó la presencia de alteraciones características del asma alérgico en el espacio broncoalveolar y pulmón.

50 En dos grupos adicionales de ratones se lleva a cabo la transferencia adoptiva con clones de linfocitos T citolíticos obtenidos como se describe en el ejemplo 11, usando el péptido de Der p 1 con el motivo, sea antes o después de la primera serie de instilaciones nasales.

55 Se llevaron a cabo los recuentos de células diferenciales en el BALF 4 días después de la última serie de instilaciones nasales (6 BALB/c por grupo). Las células se obtuvieron por lavado broncoalveolar de los pulmones y se identificaron en aparatos Cytospin como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos o linfocitos. Los ratones recibieron 2 series de 3 instilaciones nasales con 100 μ g de Der p 1 (modelo) o NaCl (negativo). La figura 18A y B muestra que

cuando se administran linfocitos T citolíticos antes o después de la primera serie de instilaciones nasales, esto da como resultado la abolición de infiltración de eosinófilos en los bronquios. Como puede verse, el número total de células recuperadas en el fluido de lavado está dentro del intervalo de lo obtenido de animales sin tratamiento previo.

- 5 Se ensayó en los fluidos de lavado broncoalveolar la presencia de citoquinas (Tabla 6). Los ratones que recibieron un clon de citoquina mostraron recuperación de citoquinas muy baja, incluyendo la concentración de IL-10 que es significativamente mayor en el modelo.

Tabla 6: Determinación de las citoquinas del BAL de ratones tratados con el péptido de Der p 1 modificado [SEQ ID. NO: 7] (3 días después de la instilación nasal).

	TNF-alfa	IFN-gamma	IL-5	IL-4	IL-2	IL-10	IL-13	TGF-beta
Prevención	0,7	0	0,3	0	0,7	10	0,2	5,8
Supresión	0	0	0,5	0,7	0,8	2	0,3	0
Modelo	0	0	0	0	0	44	4	1
Neg.	6	1	0,5	2	0	0	0	0
Los resultados representan las concentraciones medias obtenidas de 6 BALB/c (pg/ml).								

10

Ejemplo 14: Efecto del aumento de la potencia rédox de péptidos modificados en la capacidad de activar linfocitos T reguladores citolíticos

- 15 Las células presentadoras de antígeno se cargaron con p21-35 en su configuración natural [SEQ ID. NO: 2] o p21-35 en el que la serina en la posición 24 se sustituye por cisteína, CHGCEPCIHRGKPF [SEQ ID. NO: 29]. Esta sustitución crea un resto rédox del tipo C-x-x-C.

20 Se incubaron varios clones de linfocitos T reguladores con actividad citolítica con las APC. La figura 19 muestra que el péptido que lleva la secuencia rédox C-x-x-C induce un grado mayor de activación de linfocitos T, evaluado por la producción de citoquinas, que su homóloga C-x-x-S. También se muestra que la secuencia C-x-x-C induce la transcripción del ARNm tanto para FasL como granzimas, más que sus homólogas C-x-x-S. Las granzimas son dos de los jugadores clave en la inducción de apoptosis de células diana.

Ejemplo 15: Prevención y supresión de alergia por beta-lactoglobulina

- 25 La beta-lactoglobulina bovina (BLG) es un alérgeno principal en la alergia humana a la leche. Se usa un modelo de ratón para determinar si los péptidos modificados podrían alterar la respuesta específica hacia BLG. Se sintetiza el péptido CHGC AQQKIIAEK [SEQ ID. NO: 30] que abarca la secuencia del motivo tiorédox C-H-G-C [SEQ ID. NO: 31] unida a un epítipo de linfocito T of BLG.

Se inmunizan ratones BALB/c mediante 2 inyecciones SC con 20 µg del péptido de secuencia CHGC AQQKIIAEK [SEQ ID. NO: 30] en alumbre. A esto le sigue 15 días más tarde la sensibilización intraperitoneal a BLG (5 µg en alumbre), en 2 ocasiones en un intervalo de catorce días. Alternativamente, la administración del péptido se da 15 días después de la sensibilización IP a BLG.

- 30 La hipersensibilidad a la BLG se verifica en el ratón evaluando la hiperreactividad bronquial después de administración intranasal de BLG. Todos los ratones se someten a administración intranasal de 10 µg de BLG en solución salina 10 días después de las últimas inyecciones. Se incluye un grupo de control en el que la sensibilización intraperitoneal se lleva a cabo sin inmunización con péptido.

35 Los ratones a los que se inyectó el epítipo de péptido modificado antes o después de la sensibilización habían perdido completamente la capacidad de reaccionar frente a la instilación nasal de BLG. Esto se muestra por la falta de eosinófilos en el fluido de lavado broncoalveolar y en ausencia de hiperreactividad tras la estimulación con dosis crecientes de metacolina, comparado con el grupo de control, en el que se observan tanto eosinófilos como hiperreactividad.

Ejemplo 16: Prevención y supresión de esclerosis múltiple

- 40 Se inmunizaron grupos de ratones C57BL/6 por vía subcutánea (20 µg) con el péptido (CHGS YRSPFSRWHLR [SEQ ID. NO: 32], que contiene el motivo de secuencia C-X(2)-S) o péptido control (YRSPFSRWHLR [SEQ ID. NO: 33] adsorbido sobre hidróxido de aluminio. Se realizan tres inyecciones en intervalos de 2 semanas. Diez días después de la última inmunización, los ratones se sacrifican y se preparan los linfocitos T CD4+ (2x10⁶ células) del

bazo usando perlas magnéticas. Después los linfocitos T CD4+ se estimulan in vitro por el epítipo de linfocito T de MOG (20 µg/ml) presentado por células de bazo adherentes (2x10⁶ células).

Después de 4 reestimulaciones, se ensaya una línea de linfocitos T en un ensayo de supresión inespecífica con, como células diana, células CD4+CD25- policlonales obtenidas de animales en los que la EAE (encefalomielitis autoinmunitaria experimental) era efectiva. Solo las células obtenidas de animales inmunizados con el péptido que contenía el motivo de secuencia C-X(2)-S tenían la capacidad de inducir la muerte en células diana, comparado con el control que consistía en CD4+CD25- efectoras de animales de EAE, como se muestra en la figura 20.

Se lleva a cabo transferencia adoptiva en un grupo de ratones C57BL/6 con un clon de linfocitos T reguladores específicos de MOG CD4+ seguido 1 día después de un protocolo previsto para inducir un síndrome de tipo esclerosis múltiple. Esto implica la administración del péptido MOG en adyuvante completo de Freund y 2 inyecciones de toxina Pertussis. Este protocolo produce una expansión del clon de linfocitos T efectores, que da como resultado el desarrollo de señales compatibles con la esclerosis múltiple, en el plazo de 12 días después de la administración del péptido MOG. Se observó que la puntuación clínica desarrollada por ratones previamente tratados con el clon de linfocitos T citolíticos se reducía significativamente comparado con ratones que recibían solo el protocolo completo de inducción de enfermedad (figura 21).

Se observa que la puntuación clínica desarrollada por ratones previamente tratados con el clon de linfocitos T citolíticos se reduce significativamente comparado con ratones que reciben solo el clon de linfocitos T efectores, como se muestra en la figura 21.

Ejemplo 17: Prevención de esclerosis múltiple por inmunización con péptido

En el grupo modelo, 3 ratones C57BL/6 recibieron, el día 0, inyección SC de 100 µg de péptido MOG/400 µg de *Mycobacterium butyricum* en CFA e inyección ip de 300 ng de *Bordetella pertussis* en NaCl. El día +2, se les dio una segunda inyección de B. pertussis.

En el grupo de prevención, 5 ratones C57BL/6 se inmunizan mediante 5 inyecciones con 20 µg de péptido CSMOG (CHGS YRSPFSRWHLR [SEQ ID. NO: 32]), que contiene el motivo de secuencia C-X(2)-S, en IFA en intervalo de 14 días antes de la inducción de la enfermedad como en el grupo modelo. Los experimentos de control se llevan a cabo con el péptido [SEQ ID. NO: 33] que carecía del motivo en su extremo N.

Las puntuaciones se establecieron como 0: sin enfermedad, 1: cola flácida, 2: cola flácida y pérdida de peso mayor de 10%, 3: parálisis parcial de las extremidades traseras.

La figura 22 muestra que el pretratamiento con péptido modificado [SEQ ID. NO: 32] anula completamente el desarrollo del síndrome.

Ejemplo 18: Prevención y supresión de diabetes dependiente de insulina espontánea con péptidos derivados de GAD65.

Los ratones con diabetes no obesos (NOD) constituyen un modelo animal adecuado para la diabetes dependiente de insulina espontánea.

En dichos animales, como en los seres humanos, se observa una respuesta inmunitaria temprana al autoantígeno ácido glutámico descarboxilasa (GAD65) en el momento en el que se puede ver insulinitis, a partir de la cual la respuesta se extiende por expansión intramolecular e intermolecular. La inducción de tolerancia a la GAD por administración de la proteína a neonatos previene la aparición de la diabetes.

La región carboxi terminal de GAD65, y en particular el fragmento 524-543 SRLSK₅₂₈VAPVIKARMMEYGTT [SEQ ID. NO: 34], es reconocido por linfocitos T específicos. Algunos de dichos linfocitos T son patógenos, tales como los que reconocen el fragmento 530-543, mientras que otros no producen la enfermedad, tales como los que reconocen el fragmento 524-538.

Lys528 constituye un resto de anclaje a P1. Para la generación de un péptido de acuerdo con la invención, los restos de serina P-4 y P-1 se sustituyen por una cisteína, lo que da como resultado CRLC KVAPVIKARMM [SEQ ID. NO: 35].

Se producen linfocitos Treg citotóxicos por inmunización con el péptido anterior modificado que comprende el epítipo de linfocito T de la proteína GAD65. Los linfocitos T obtenidos del bazo de ratones NOD de 20 semanas de edad, en el momento en el que la insulinitis está presente así como la diabetes sintomática, se expanden in vitro con el péptido 524-543 con el fin de generar clones de linfocitos T patógenos.

Los ratones NOD se inmunizan con péptido que contiene la secuencia consenso de tiorredoxina en IFA (adyuvantes de Freund incompletos) desde la edad de 2 semanas. Los linfocitos T se expanden in vitro para generar clones con propiedades reguladoras.

- Las células policlonales purificadas de ratones con la secuencia consenso de tiorredoxina inducen la apoptosis en células CD4 policlonales obtenidas de ratones NOD inmunizados con el péptido 524-543 cuando se estimulaban con células presentadoras de antígenos cargadas con el péptido 524-543 (véase la figura 23). La tabla en la figura 23 representa el porcentaje de células doble positivas (células muertas) después de restar los valores de fondo obtenidos sin la población reguladora.
- La transferencia adoptiva de Treg a la edad de 2 semanas en ratones NOD, en concreto antes de la aparición de insulinitis (3 semanas de edad) se muestra que previene completamente la aparición de diabetes.
- Se muestra que la inmunización de ratones NOD con el péptido CRLC KVAPVIKARMM [SEQ ID. NO: 35]. desde las 2 semanas de edad previene completamente la diabetes y lesiones de insulinitis.
- En un marco de supresión, se muestra que la transferencia adoptiva de Treg a diferentes edades entre 6 y 20 semanas, suprime la diabetes e insulinitis en ratones NOD. Se muestra que la inmunización con el péptido CRLC KVAPVIKARMM [SEQ ID. NO: 35] después de la edad a la que la insulinitis ya es destacada (15 semanas de edad) suprime la diabetes y la insulinitis.
- Ejemplo 19: Prevención y supresión de diabetes dependiente de insulina espontánea con péptidos derivados de insulina.
- Se producen Treg con propiedades citolíticas por inmunización de ratones NOD con el epítipo de linfocito T de la insulina unido al motivo C-X(2)-C con y sin un conector de glicina.
- Los péptidos que se sintetizan son:
- EALYVCGERG CGPC [SEQ ID. NO: 36]
- EALYVCGERG G CGPC [SEQ ID. NO: 37]
- EALYVCGERG GG CGPC [SEQ ID. NO: 38]
- EALYVCGERG GGG CGPC [SEQ ID. NO: 39]
- EALYVCGERG GGGG CGPC [SEQ ID. NO: 40]
- Los linfocitos Treg obtenidos con estos péptidos inducen la apoptosis de linfocitos T patógenos específicos de insulina en un sistema in vitro, en el que tanto las células patógenas como reguladoras son activadas por la presentación de insulina. Previenen o suprimen además la aparición de diabetes e insulinitis después de la transferencia adoptiva de Treg antes de (2 semanas de edad) o después (6 semanas de edad) la aparición espontánea de insulinitis, respectivamente.
- Los linfocitos Treg obtenidos con estos péptidos también previenen o suprimen la aparición de diabetes e insulinitis cuando se producen in vivo tras inmunización con péptido de secuencia que contiene la secuencia consenso de tiorredoxina, empezando a la edad de 2 semanas para la prevención o 15 semanas para la supresión, respectivamente.
- Ejemplo 20: Prevención y supresión de tiroiditis autoinmunitaria con péptidos derivados de tiroperoxidasa
- La tiroiditis autoinmune en el hombre está asociada con la producción de anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea. Los anticuerpos y linfocitos T específicos contra TPO producen la destrucción de células tiroideas por una combinación de mecanismos citotóxicos y citolíticos, conduciendo al hipotiroidismo. La inmunización a propósito de ratones C57Bl/6 con TPO produce una enfermedad idéntica a la patología humana y por lo tanto se considera un modelo adecuado para la tiroiditis autoinmunitaria.
- El fragmento 540-559 (QGQLM₅₄₄NEELTERLFVLSNV [SEQ ID. NO: 41] de TPO abarca un epítipo de linfocito T dominante de TPO reconocido por ratones C57Bl/6.
- El uso de diferentes algoritmos identificaba restos Met₅₄₄ como el primer resto de anclaje en determinantes MHC de clase II. Los aminoácidos P-4 a P-1 se sustituyen por la secuencia de isómero D de CGPC [SEQ ID. NO: 42], que genera la secuencia (CGPC)_{D-isómero} MNEELTERL [SEQ ID. NO: 43].
- Se inmunizaron ratones C57Bl/6 con el péptido experimental [SEQ ID. NO: 43] o el péptido de control [SEQ ID. NO: 41] o QGQLM₅₄₄NEELTERL [SEQ ID. NO 48] en CFA/IFA. Diez días después de la inmunización, los ratones se sacrifican y se preparan los linfocitos T del bazo. Los linfocitos T CD4⁺ se expanden in vitro usando células presentadoras de antígeno cargadas con la secuencia 540-559. Los clones de linfocitos T se obtienen por dilución limitante.
- Se ensaya in vitro la capacidad de los clones de linfocitos T con el péptido experimental (CGPC)_{D-isómero} MNEELTERL [SEQ ID. NO: 43] para suprimir la activación de los linfocitos T efectores por inmunización con el

péptido de secuencia 540-559. En la presente memoria, las células presentadoras de antígeno se cargan con el péptido 540-559. La adición del clon de linfocitos T efectores da como resultado la activación y proliferación de dichas células, medido por incorporación de timidina. Cuando se añade un clon de linfocitos T con actividad reguladora al sistema, junto con el clon de efectores, se inhibe completamente la activación y proliferación de estos últimos.

La transferencia adoptiva de linfocitos T reguladores a ratones C57Bl/6 antes de la inmunización con el péptido 540-559 prevenía o suprimía, respectivamente, la inducción de tiroiditis, evaluado por evaluación de la infiltración linfocítica del tiroides.

Ejemplo 21: Prevención y supresión de tiroiditis autoinmunitaria con péptidos derivados de tiroglobulina

Una respuesta inmunitaria contra la tiroglobulina es una característica común de la tiroiditis autoinmunitaria humana. Se ha obtenido la inducción de dicha respuesta en la tiroiditis experimental tras inyección de péptidos que abarcan epítopos de linfocitos T en animales genéticamente predispuestos tales como ratones H2k.

El fragmento de tiroglobulina 2340-2359 (QVA₂₃₄₂ALTWVQTHIRGFGGDPR [SEQ ID. NO: 44]) abarca un epítipo de linfocito T dominante de tiroglobulina reconocido por ratones AKR/J. El uso de diferentes algoritmos identifica restos Ala₂₃₄₂ como el primer resto de anclaje en determinantes MHC de clase II. Los aminoácidos P-4 a P-1 se sustituyeron por la secuencia CGPS [SEQ ID. NO: 13], que genera la secuencia CGPS AALTWVQTH [SEQ ID. NO: 45].

Los ratones AKR/J se inmunizan dos veces con el péptido experimental [SEQ ID. NO: 45] y el péptido de control LDQVAALTWVQTH [SEQ ID. NO: 49] en CFA/IFA. Diez días después de la inmunización, los ratones se sacrifican y se preparan los linfocitos T del bazo. Los linfocitos T CD4⁺ se expanden in vitro usando células presentadoras de antígeno cargadas con el fragmento 2340-2359. Los clones de linfocitos T se obtuvieron por dilución limitante.

Se ensayó in vitro la capacidad de los clones de linfocitos T generados con el péptido CGPS AALTWVQTH [SEQ ID. NO: 45] para suprimir la activación de los linfocitos T efectores por inmunización con el péptido de secuencia 2340-2359. Por lo tanto, las células presentadoras de antígeno se cargaron con el péptido 2340-2359. La adición del clon de linfocitos T efectores daba como resultado la activación y proliferación de dichas células, medido por incorporación de timidina. Cuando se añade un clon de linfocitos T con actividad reguladora al sistema, junto con el clon de efectores, se inhibe completamente la activación y proliferación de estos últimos.

La transferencia adoptiva de linfocitos T reguladores a ratones AKR/j antes de la inmunización con el péptido -23592340 previene o suprime, respectivamente, la inducción de tiroiditis, evaluado por evaluación de la infiltración linfocítica del tiroides.

Ejemplo 22: Prevención y supresión de alergia al polen con péptidos derivados del alérgeno del polen de abedul

La sensibilidad al polen de abedul es una causa común de rinitis y asma. Sin embargo, aproximadamente 60% de los sujetos sensibilizados al polen de abedul desarrollan síntomas tras la ingestión de frutas de la familia de las rosáceas, tales como manzanas, peras, ciruelas y cerezas. La reactividad cruzada entre Bet v 1 (el principal alérgeno del polen de abedul) y dicho alimento se ha demostrado tanto a nivel de anticuerpos IgE específicos como de linfocitos T. En particular, un epítipo de linfocito T situado en el extremo carboxi terminal de la molécula Bet v 1, que se conserva entre varias isoformas, mostraba un grado alto de homología con la secuencia de un alérgeno de la manzana equivalente (Mal d 1). Los linfocitos T efectores que reconocen el fragmento 142-156 de Bet v 1 son fuertemente activados cuando se exponen al epítipo correspondiente de Mal d 1.

El péptido LRAVESYLLAH [SEQ ID. NO: 46] que corresponde a los restos 144-154 de Bet v 1, y que contiene un epítipo de linfocito T, se modifica por adición de la secuencia (CGPC)_{D-isómero} [SEQ ID. NO: 42], en su extremo amino terminal dando como resultado (CGPC)_{D-isómero} LRAVESYLLAH [SEQ ID. NO: 47].

Este péptido se adsorbe sobre hidróxido de aluminio usando 50 µg del péptido por 1 mg de alumbre. Se llevaron a cabo tres inyecciones SC de 50 µg de péptido en intervalos de 2 semanas. Dos semanas después de la última inyección, se extrae sangre de una vena periférica y se purifican los linfocitos T CD4⁺ por separación de células en perlas magnéticas. Los linfocitos T CD4⁺ se añadieron al medio de cultivo en el que células dendríticas histocompatibles, usadas como células presentadoras de antígeno, se incubaron con el antígeno Bet v 1, o con toxoide tetánico como control, durante 2 h a temperatura ambiente. Después las células se lavaron y se añadieron los linfocitos T CD4⁺ al medio de cultivo. Dichos linfocitos T CD4⁺ inducían apoptosis de células dendríticas que presentaban el antígeno Bet v 1, pero no de células dendríticas que presentaban la proteína de toxoide tetánico. La incubación de linfocitos T CD4⁺ con células dendríticas cargadas con el antígeno Mal d 1 dio como resultado la apoptosis de células dendríticas.

Los pacientes que presentaban síntomas alérgicos tras la exposición al polen de abedul junto con una alergia orofaríngea a la ingestión de manzana y tratados con 3 inyecciones SC del péptido CGPC LRAVESYLLAH [SEQ ID. NO: 47] no reaccionaron ni a la exposición al polen ni al contacto con la manzana en la mucosa orofaríngea.

La vacunación con un péptido que contiene un epítipo de linfocito T del alérgeno Bet v 1 del polen de abedul modificado para contener un resto rédox, produce linfocitos T reguladores citolíticos que eliminan los síntomas relacionados con la exposición al polen de abedul y los que resultan de la ingestión de frutas que llevan un epítipo de linfocito T homólogo.

Lista de secuencias

- <110> D. Collen Research Foundation vzw.
Saint-Remy, Jean-Marie
- 5 <120> Péptidos inmunógenos y su uso en trastornos inmunitarios
- <130> K4262-PCT
- 10 <150> GB 0615966.9
<151> 2006-08-11
- <150> GB 0710081.1
<151> 2007-05-25
- 15 <150> GB 0711403.6
<151> 2007-06-13
- <160> 49
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 10
25 <212> PRT
<213> secuencia artificial
- <220>
<223> péptido
- 30 <400> 1
- Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro**
1 5 10
- 35 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial
- 40 <220>
<223> péptido
- <400> 2
- Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe**
1 5 10 15
- <210> 3
<211> 4
<212> PRT
50 <213> secuencia artificial
- <220>
<223> péptido
- 55 <400> 3
- Cys His Gly Ser**
1
- <210> 4
60 <211> 66
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido

<400> 4

5

Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe
 20 25 30

Gly Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro
 35 40 45

Phe Gly Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys
 50 55 60

Pro Phe
 65

<210> 5

<211> 15

10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido

15

<400> 5

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

20

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25

<220>

<223> péptido

<400> 6

Cys Gly Phe Ser

30

1

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

35

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido

40

<400> 7

Cys Gly Phe Ser Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Lys Ile Arg

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> péptido
 <400> 8
 10
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5
 <210> 9
 <211> 41
 15 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 20 <400> 9
Ile Ile Thr Ile Ala Val Val Ala Ala Leu Leu Leu Val Ala Ala Ile
 1 5 10 15
Phe Gly Val Ala Ser Cys Leu Ile Arg Ser Arg Ser Thr Lys Asn Glu
 20 25 30
Ala Asn Gln Pro Leu Leu Thr Asp Ser
 35 40
 25 <210> 10
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> péptido
 <400> 10
Cys Gly Phe Ser Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn
 1 5 10 15
Lys Ile Arg Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ile Ile Thr Ile
 20 25 30
Ala Val Val Ala Ala Leu Leu Leu Val Ala Ala Ile Phe Gly Val Ala
 35 40 45
Ser Cys Leu Ile Arg Ser Arg Ser Thr Lys Asn Glu Ala Asn Gln Pro
 50 55 60
 35 **Leu Leu Thr Asp**
 65
 <210> 11
 <211> 68
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido

5

<400> 11

Cys Gly Phe Ser Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn
1 5 10 15

Lys Ile Arg Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ile Ile Thr Ile
20 25 30

Ala Val Val Ala Ala Leu Leu Leu Val Ala Ala Ile Phe Gly Val Ala
35 40 45

Ser Cys Leu Ile Arg Ser Arg Ser Thr Lys Asn Glu Ala Asn Gln Pro
50 55 60

Leu Leu Thr Asp
65

10

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15

<220>

<223> péptido

<400> 12

20

Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr Arg
1 5 10 15

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

25

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido

30

<400> 13

Cys Gly Pro Ser
1

35

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

40

<220>

<223> péptido

<400> 14

Cys Gly Pro Ser Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
 1 5 10 15

Arg

5 <210> 15
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido

<400> 15

Val Ser Val Ser Ala Val Thr Leu Gly Leu Gly Leu Ile Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Leu Gly Val Ile Ser Trp Arg Arg Ala Gly His Ser Ser Tyr Thr Pro
 20 25 30

Leu Pro Gly Ser Asn Tyr Ser Glu Gly Trp His Ile Ser
 35 40 45

15 <210> 16
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido

<400> 16

Val Ser Val Ser Ala Val Thr Leu Gly Leu Gly Leu Ile Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Leu Gly Val Ile Ser Trp Arg Arg Ala Gly His Ser Ser Tyr Thr Pro
 20 25 30

25 Leu Pro Gly Ser Asn Tyr Ser Glu Gly Trp His Ile Ser Ser Gly Gly
 35 40 45
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Cys Gly Pro Ser Tyr Arg Ser Pro Phe Ser
 50 55 60

Arg Val Val His Leu Tyr Arg
 65 70

30 <210> 17
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> péptido

<400> 17

Val Ser Val Ser Ala Val Thr Leu Gly Leu Gly Leu Ile Ile Phe Ser
1 5 10 15

Leu Gly Val Ile Ser Trp Arg Arg Ala Gly His Ser Ser Tyr Thr Pro
20 25 30

Leu Pro Gly Ser Asn Tyr Ser Glu Gly Trp His Ile Ser Ser Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His
50 55 60

Leu Tyr Arg
65

5 <210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido
<400> 18

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

15 <210> 19
<211> 32
<212> PRT
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido
<400> 19

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

25 Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe
20 25 30

30 <210> 20
<211> 32
<212> PRT
<213> secuencia artificial

35 <220>
<223> péptido
<400> 20

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

Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Asn Ile His Arg Gly Lys Pro Phe
20 25 30

ES 2 601 432 T3

<210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 10 ctctggtccc cgggccatc 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador
 20
 <400> 22
 tatgtagtga gccccaagaa 20
 25 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 23
 35 ctccacgtgc ttccacaaa 20
 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 24
 ggaaaatagt acagagaggc a 21
 50 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 25
 60 cattgtgatg gactccggag acgg 24
 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 65
 <220>

<223> cebador
 <400> 26

5 catctcctgc tcgaagtcta gagc 24
 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador

15 <400> 27
 ccctttatcc agccctcact c 21
 <210> 28
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 28
 cctggggact ttccacacc 20
 30 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> péptido
 <400> 29

40 **Cys His Gly Cys Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe**
1 5 10 15

<210> 30
 <211> 13
 45 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido
 50 <400> 30
Cys His Gly Cys Ala Gln Lys Lys Ile Ile Ala Glu Lys
1 5 10

55 <210> 31
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

60 <220>
 <223> péptido
 <400> 31

Cys His Gly Cys

1

<210> 32
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 32

Cys His Gly Ser Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr

1

5

10

15

Arg
 <210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 33

Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr Arg

1

5

10

<210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 34

Ser Arg Leu Ser Lys Val Ala Pro Val Ile Lys Ala Arg Met Met Glu

1

5

10

15

Tyr Gly Thr Thr

20

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 35

Cys Arg Leu Cys Lys Val Ala Pro Val Ile Lys Ala Arg Met Met

1

5

10

15

<210> 36
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>

<211> 19
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> péptido
 <400> 41

Gln Gly Gln Leu Met Asn Glu Glu Leu Thr Glu Arg Leu Phe Val Leu
 1 5 10 15

10 **Ser Asn Val**

<210> 42
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

20 <400> 42

Cys Gly Pro Cys
 1

25 <210> 43
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 30 <223> péptido

<400> 43

Cys Gly Pro Cys Met Asn Glu Glu Leu Thr Glu Arg Leu
 1 5 10

35 <210> 44
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> péptido

<400> 44

45 **Gln Val Ala Ala Leu Thr Trp Val Gln Thr His Ile Arg Gly Phe Gly**
 1 5 10 15

Gly Asp Pro Arg
 20

<210> 45
 <211> 13
 50 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 45

Cys Gly Pro Ser Ala Ala Leu Thr Trp Val Gln Thr His
1 5 10

5

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10

<220>
 <223> péptido

<400> 46

15

Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His
1 5 10

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20

<220>
 <223> péptido

25

<400> 47

Cys Gly Pro Cys Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His
1 5 10 15

30

<210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35

<400> 48

Gln Gly Gln Leu Met Asn Glu Glu Leu Thr Glu Arg Leu
1 5 10

40

<210> 49
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

45

<220>
 <223> péptido

<400> 49

Leu Asp Gln Val Ala Ala Leu Thr Trp Val Gln Thr His
1 5 10

50

REIVINDICACIONES

1. Un péptido inmunógeno aislado, con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende:
 - un epítipo de linfocito T de un alérgeno o autoantígeno, cuyo epítipo encaja en la hendidura de una proteína MHC II, y
- 5 - un motivo C-X(2)-C, estando dicho motivo adyacente a dicho epítipo o separado de dicho epítipo por como máximo 7 aminoácidos, en donde dicho alérgeno o autoantígeno no comprende un motivo C-X(2)-C dentro de una secuencia de 11 aminoácidos N o C terminales de dicha secuencia de epítipo. .
2. El péptido según la reivindicación 1, en donde el péptido comprende además una secuencia que dirige al endosoma tardío.
- 10 3. El péptido según la reivindicación 1 o 2, en donde el motivo está situado N terminal del epítipo.
4. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido tiene una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos
5. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el epítipo y el motivo están separados por como máximo 4 aminoácidos.
- 15 6. Un péptido inmunógeno aislado con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende:
 - un epítipo de linfocito T de un alérgeno, cuyo epítipo encaja en la hendidura de una proteína MHC II, y
 - un motivo C-X(2)-C, estando dicho motivo adyacente a dicho epítipo, o separado de dicho epítipo por como máximo 7 aminoácidos, para usar en el tratamiento y prevención de una afección alérgica.
- 20 7. El péptido según la reivindicación 6, para usar en el tratamiento y prevención de una afección alérgica, en donde el antígeno alergénico se selecciona del grupo que consiste en alérgenos alimentarios, alérgenos de ácaros del polvo domésticos, alérgenos de insectos, alérgenos de polen, alérgenos de animales, alérgenos de hongos y alérgenos ocupacionales.
8. Un péptido inmunógeno aislado, con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende:
 - un epítipo de linfocito T de un autoantígeno, cuyo epítipo encaja en la hendidura de una proteína MHC II, y
 - un motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C, estando dicho motivo adyacente a dicho epítipo, o separado de dicho epítipo por como máximo 7 aminoácidos, para usar en el tratamiento y prevención de un trastorno autoinmunitario.
9. El péptido según la reivindicación 8, para usar en el tratamiento y prevención de una enfermedad autoinmunitaria, en donde el motivo es C-X(2)-C.
- 30 10. El péptido según la reivindicación 8 o 9, para usar en el tratamiento y prevención de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en enfermedad tiroidea, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple y miastenia grave.
11. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para usar en el tratamiento y prevención de una enfermedad autoinmunitaria, en donde para la enfermedad tiroidea el autoantígeno se selecciona de tiroglobulina, peroxidasa tiroidea y receptor de TSH, en donde para la diabetes de tipo 1 el autoantígeno se selecciona del grupo que consiste en insulina, proinsulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD), tirosina fosfatasa IA-2, proteína de choque térmico HSP65 o proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa 6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP), en donde para la esclerosis múltiple el autoantígeno se selecciona del grupo que consiste en glucoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG), proteína básica de la mielina (MBP) y proteína proteolípídica (PLP) y en donde para la miastenia grave el autoantígeno es el receptor de acetilcolina.
- 35 12. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para usar en el tratamiento y prevención de la diabetes.
13. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para usar en el tratamiento y prevención de la diabetes en donde el autoantígeno implicado en la diabetes es GAD.
- 45 14. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para usar en el tratamiento y prevención de la esclerosis múltiple.
15. El péptido según la reivindicación 10, para usar en el tratamiento y prevención de la esclerosis múltiple, en donde el autoantígeno implicado en la esclerosis múltiple es la glucoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG).

16. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, para usar en el tratamiento o prevención de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, en donde el péptido tiene una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos.
17. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, para usar en el tratamiento o prevención de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, en donde el motivo y el epítipo están separados por como máximo 4 aminoácidos.
18. Un método in vitro para preparar un péptido inmunógeno de entre 12 y 50 aminoácidos, capaz de producir actividad de linfocitos T CD4+ citolíticos, que comprende las etapas de:
- a) identificar en una secuencia de una proteína antigénica la secuencia de un epítipo de linfocito T que encaja en la hendidura de una proteína MHC II,
 - b) producir un péptido que comprende la secuencia de dicho epítipo de linfocito T identificada y que comprende un motivo [CST]-X(2)-C o C-X(2)-[CST], de modo que dicho epítipo de linfocito T y dicho motivo están adyacentes entre sí o separados por como máximo 7 aminoácidos, en el péptido producido,
 - en donde (i) el motivo en el péptido producido es un motivo [CST]-X(2)-C o C-X(2)-[CST] y dicha proteína antigénica no tiene un motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C dentro de una región de 11 aminoácidos N terminales o C terminales de dicho epítipo de linfocito T en dicha proteína antigénica, o
 - en donde (ii) el motivo en el péptido producido es un motivo C-X(2)-C y dicha proteína antigénica no tiene un motivo C-X(2)-C dentro de una región de 11 aminoácidos N terminales o C terminales de dicho epítipo de linfocito T en dicha proteína antigénica.
19. El método según la reivindicación 18, que además comprende la etapa de ensayar la capacidad reductora de dicho péptido producido.
20. El método según la reivindicación 18 o 19, que además comprende la etapa de determinar la capacidad de dicho péptido producido para inducir linfocitos T específicos de antígeno con propiedades citotóxicas.
21. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en donde la proteína antigénica es un alérgeno o autoantígeno.
22. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en donde el punto (i) del motivo en el péptido producido es C-X(2)-C.
23. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en donde el péptido producido tiene una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos.
24. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, que además comprende la etapa de formular el péptido producido en una composición farmacéutica.
25. Un método in vitro para obtener una población de linfocitos T citolíticos específicos de antígeno, comprendiendo el método las etapas de:
- proporcionar células de sangre periférica,
 - poner en contacto dichas células con un péptido inmunógeno con una longitud entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende:
 - un epítipo de linfocito T de una proteína antigénica, cuyo epítipo encaja en la hendidura de una proteína MHC II, y
 - un motivo C-X(2)-[CT] o [CST]-X(2)-C, estando dicho motivo adyacente a dicho epítipo, o separado de dicho epítipo por como máximo 7 aminoácidos, y
 - ampliar dichas células en presencia de IL-2.
26. La población in vitro de linfocitos T citolíticos específicos de antígeno contra células presentadoras de antígeno, producidos por un péptido que comprende un epítipo de linfocito T de una proteína antigénica, cuyo epítipo encaja en la hendidura de una proteína MHC II, y un motivo C-X(2)-[CT] o [CST]-X(2)-C, estando dicho motivo adyacente a dicho epítipo, o separado de dicho epítipo por como máximo 7 aminoácidos, y que se puede obtener por el método de la reivindicación 25, para el tratamiento y/o prevención de una afección alérgica o un trastorno autoinmunitario.

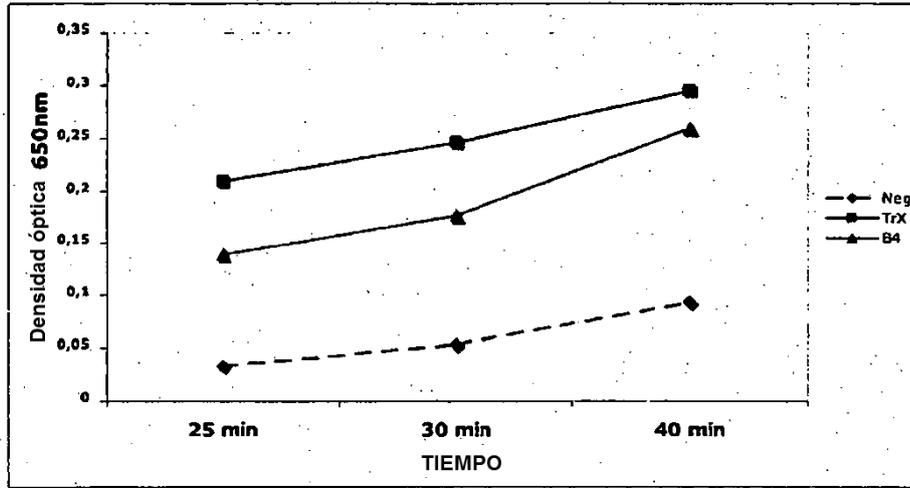


Figura 1

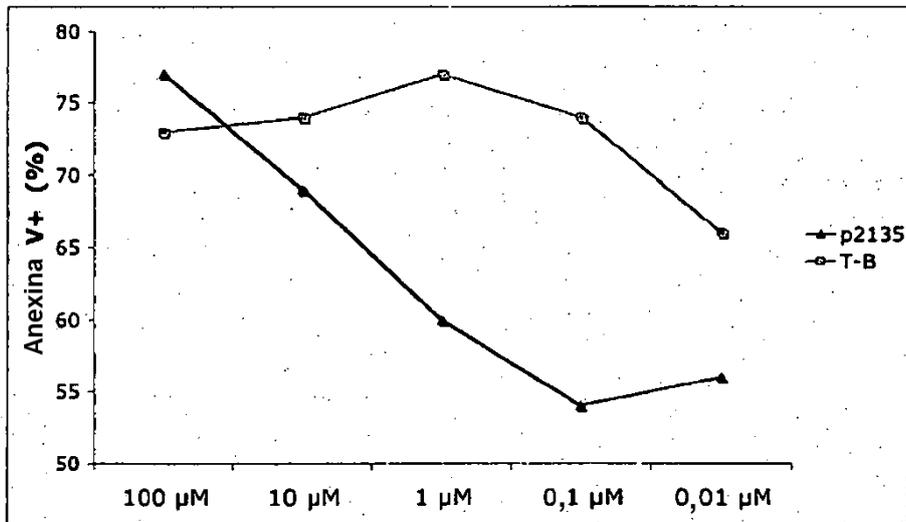


Figura 2

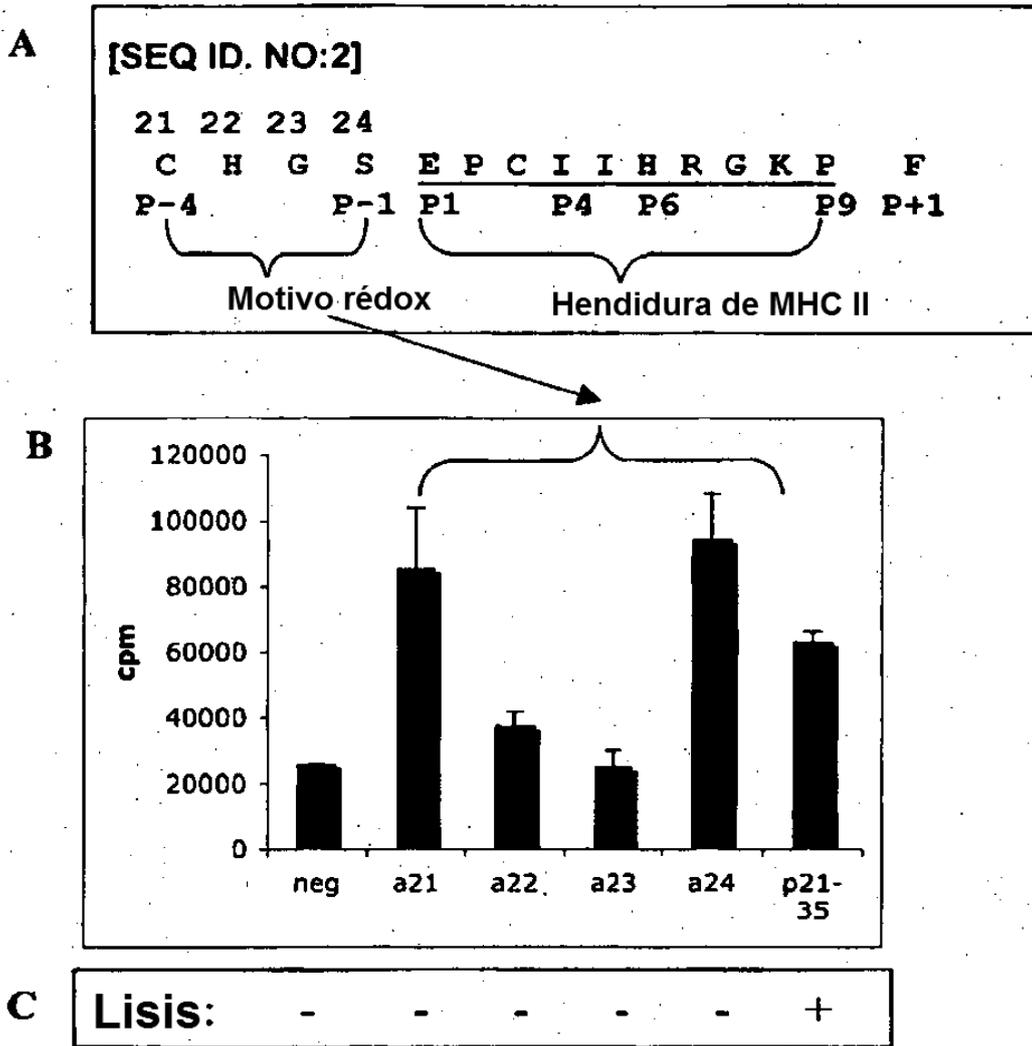


Figura 3

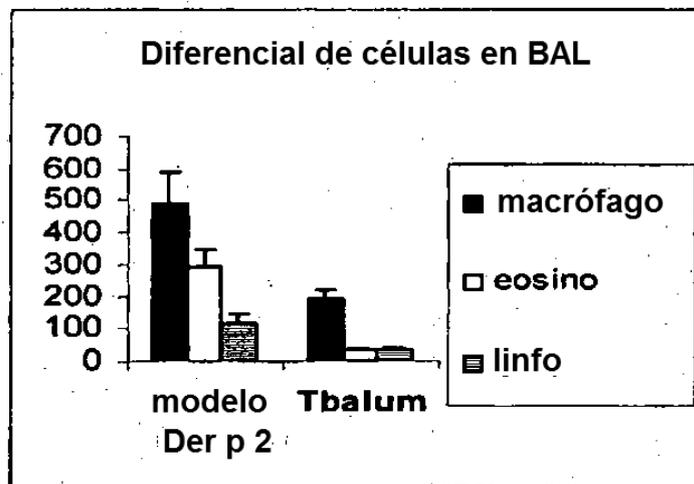
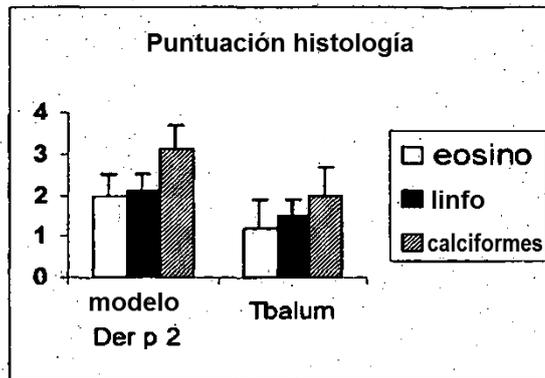
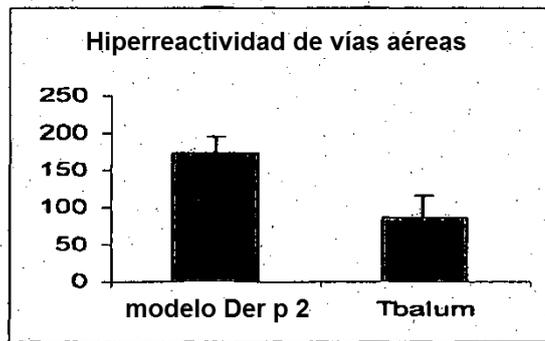


Figura 4A



B



C

Figura 4 (continuación)

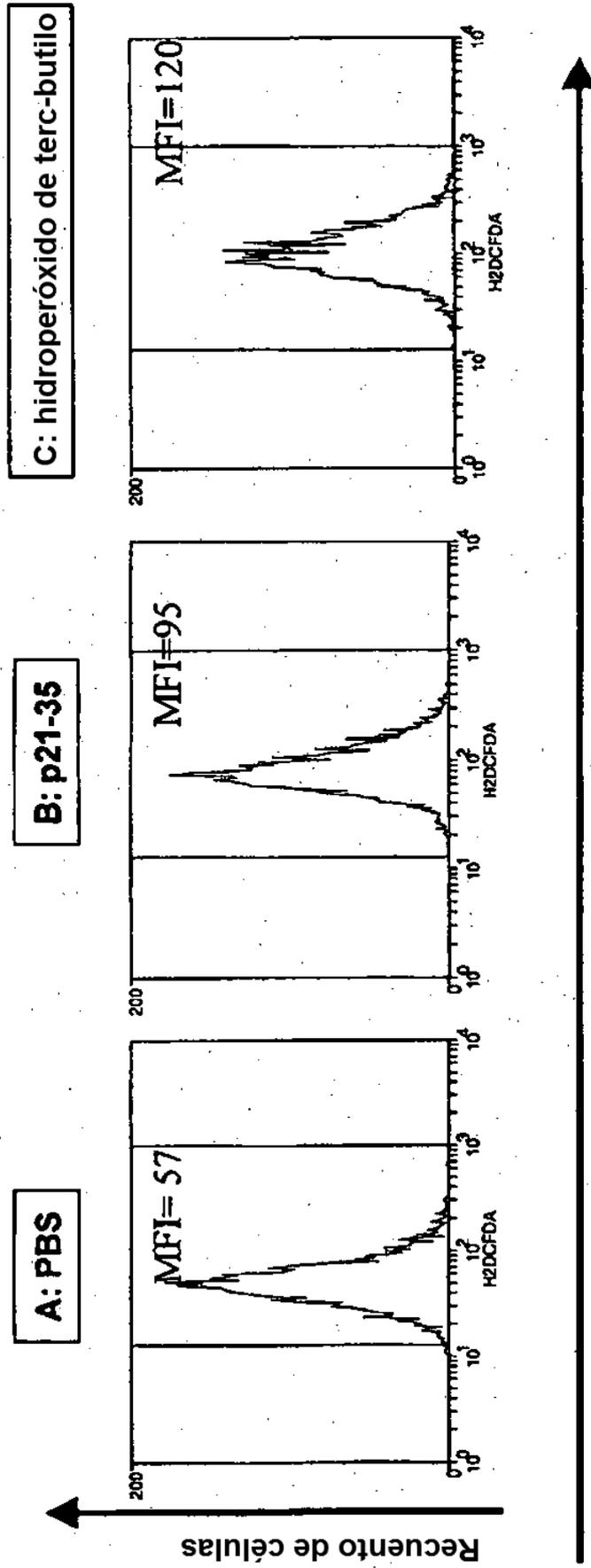


Figura 5

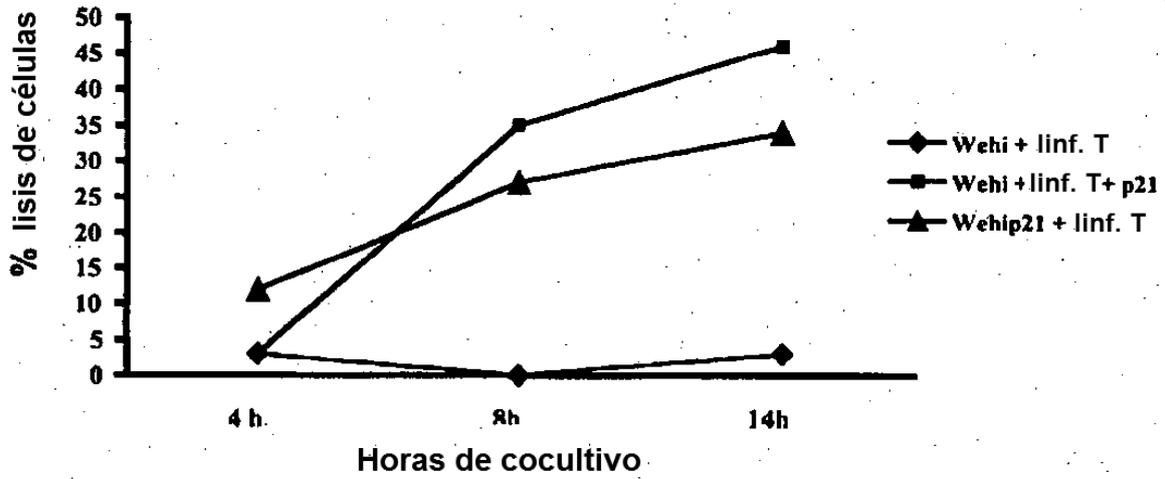


Figura 6

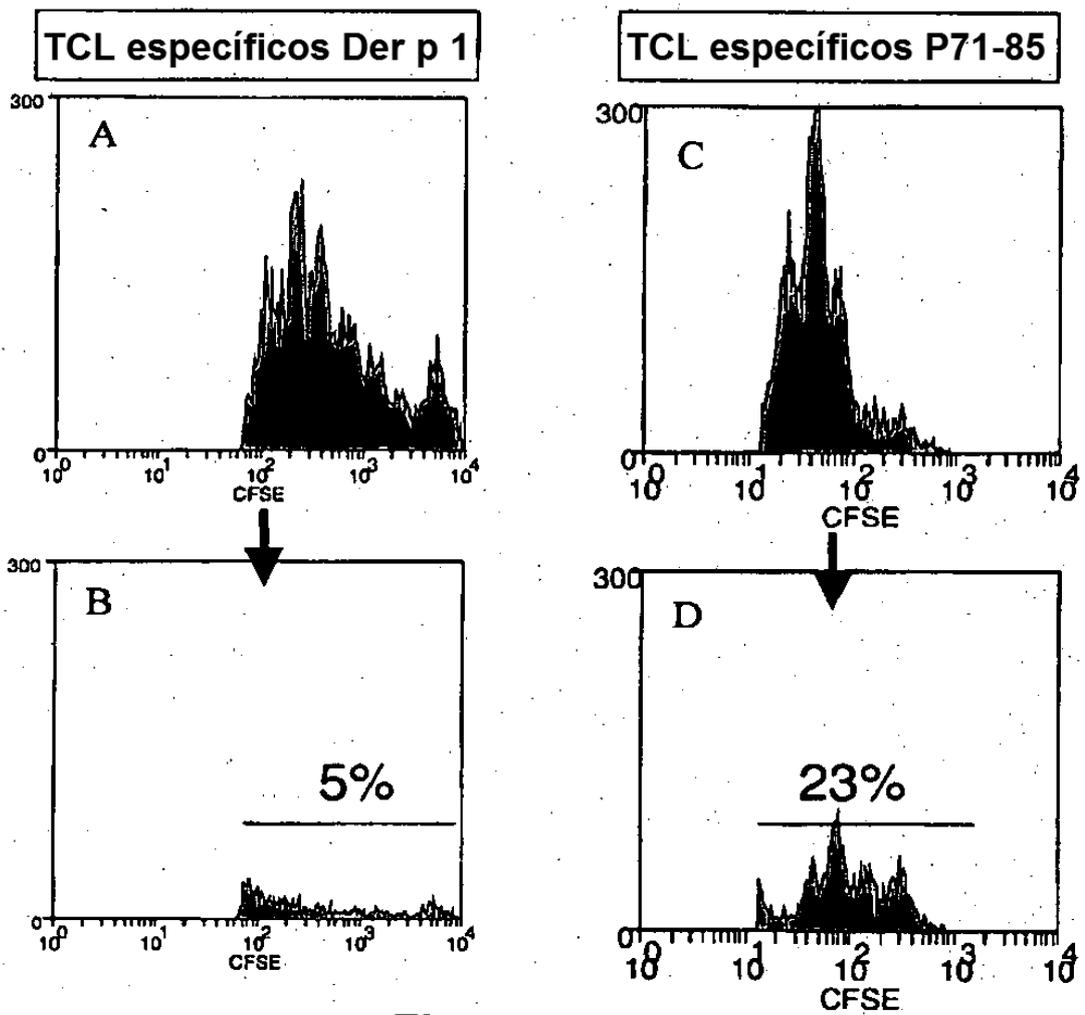


Figura 7

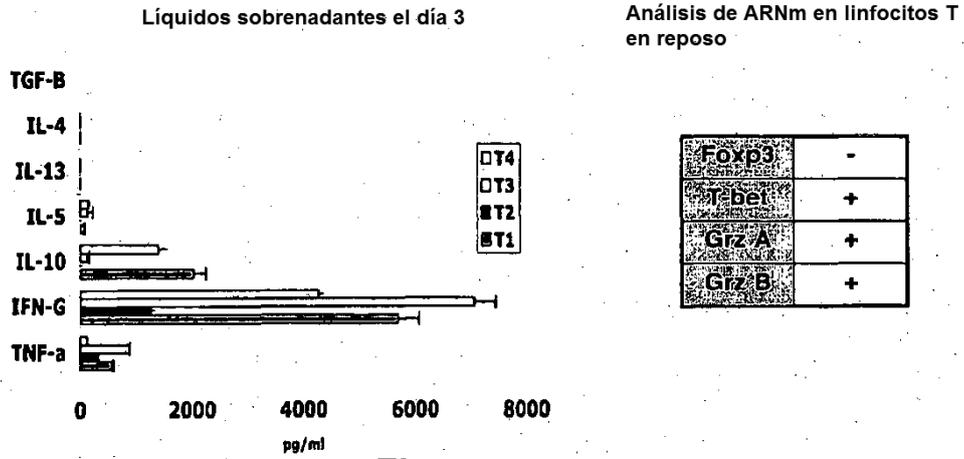


Figura 8

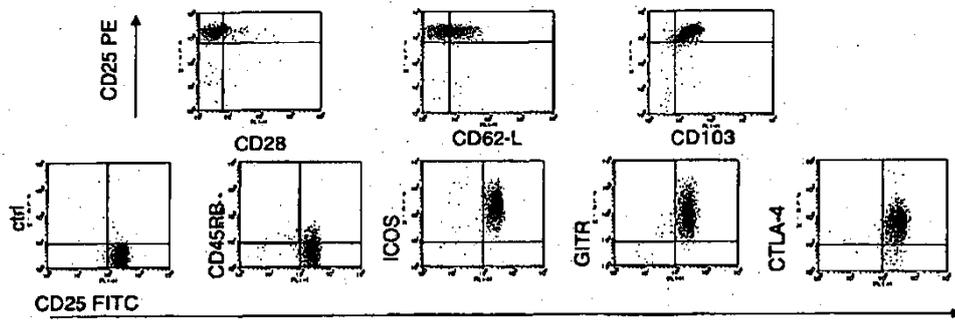


Figura 9

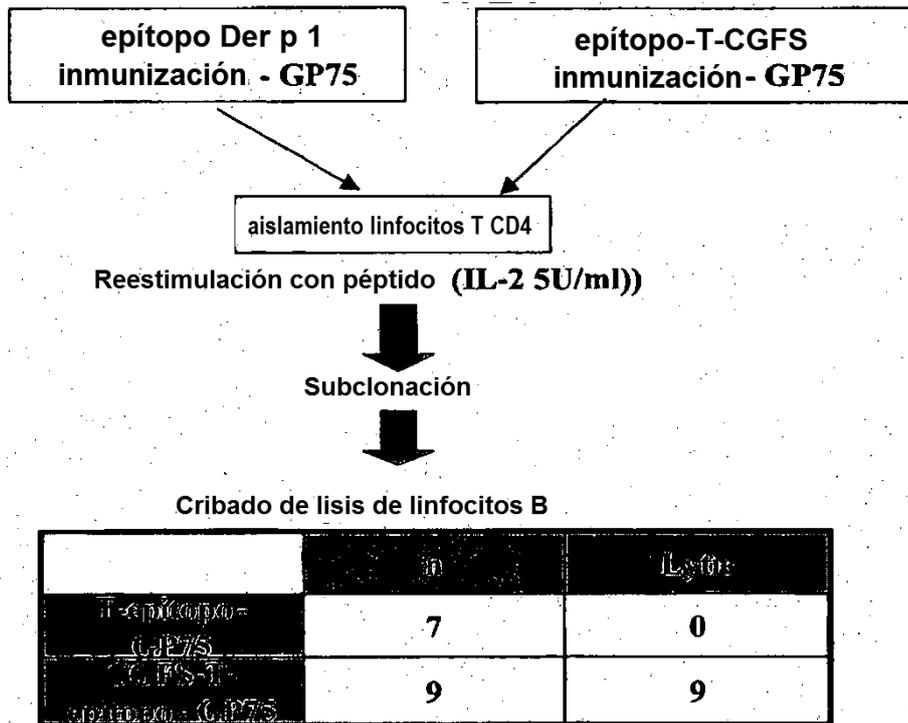


Figura 10

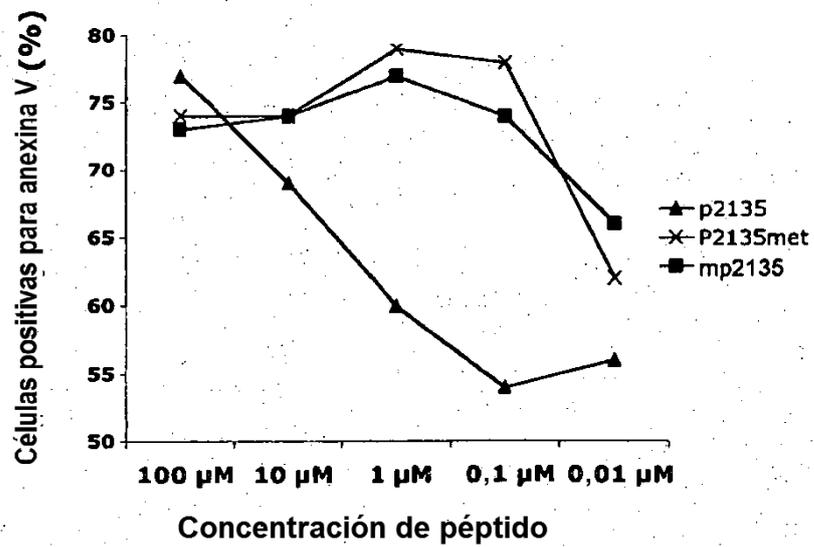


Figura 11A

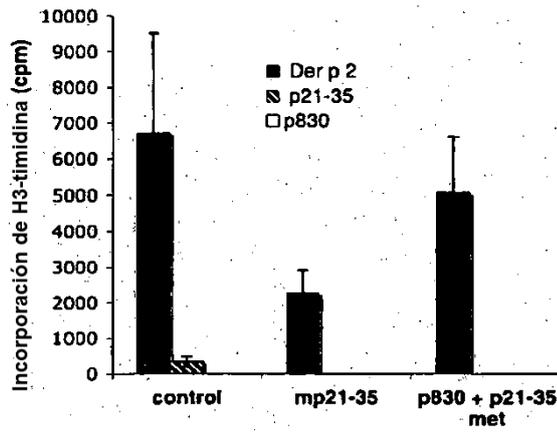


Figura 11B

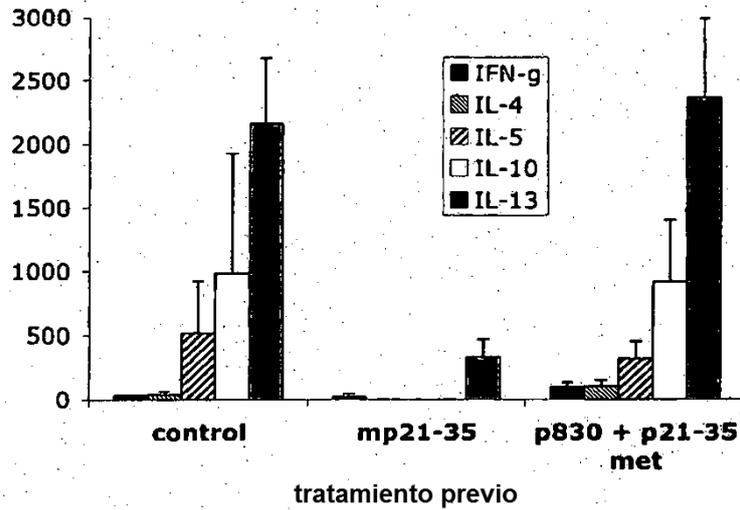


Figura 11C

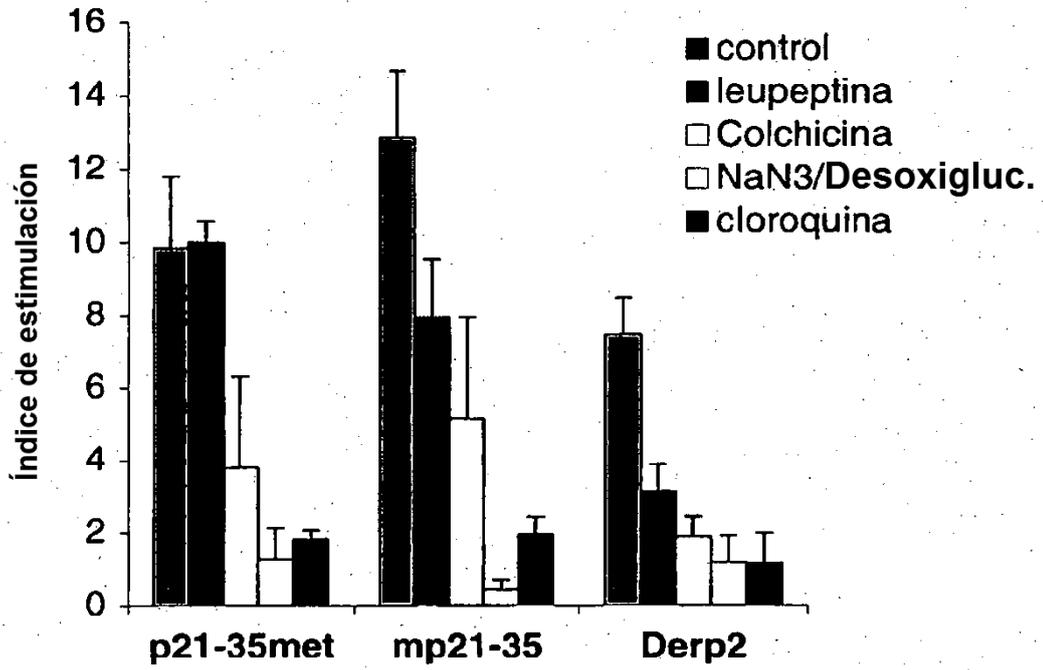


Figura 11D

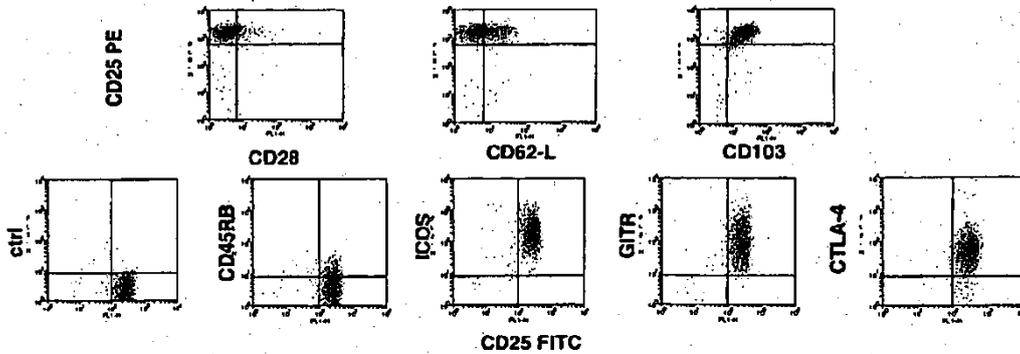


Figura 12A

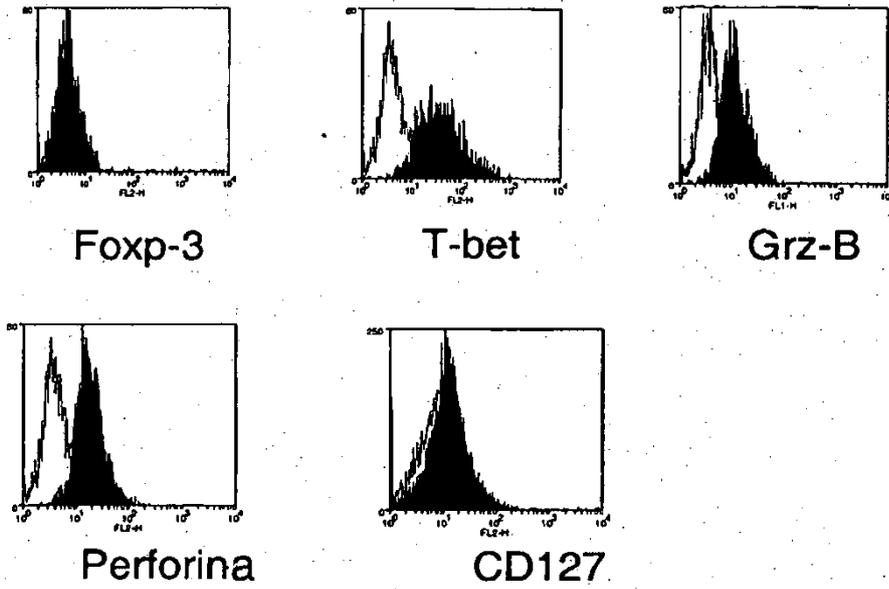


Figura 12B

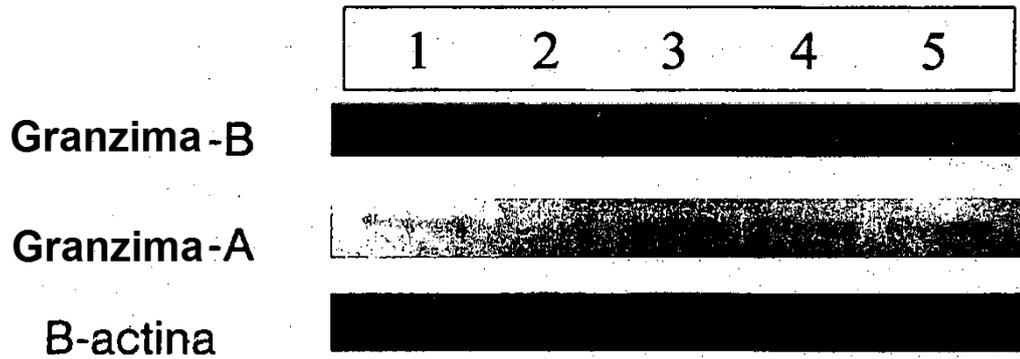


Figura 12C

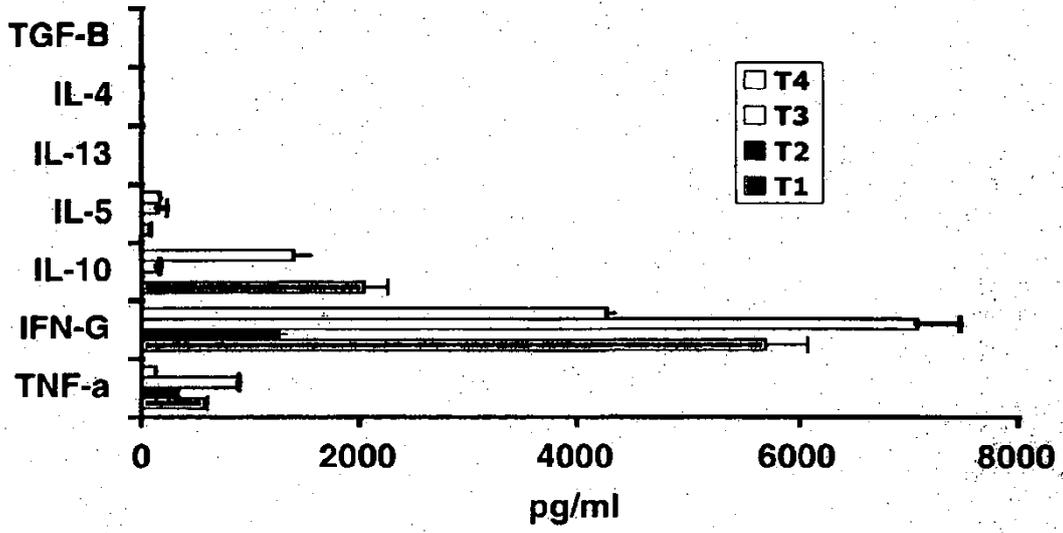


Figura 12D

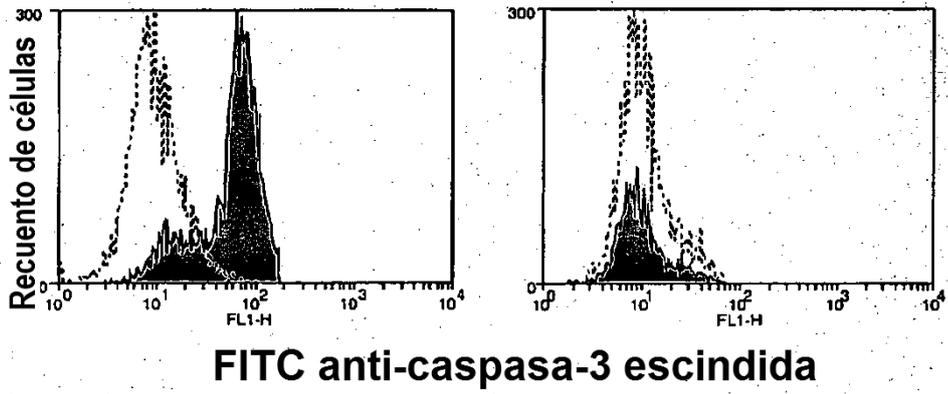


Figura 13A

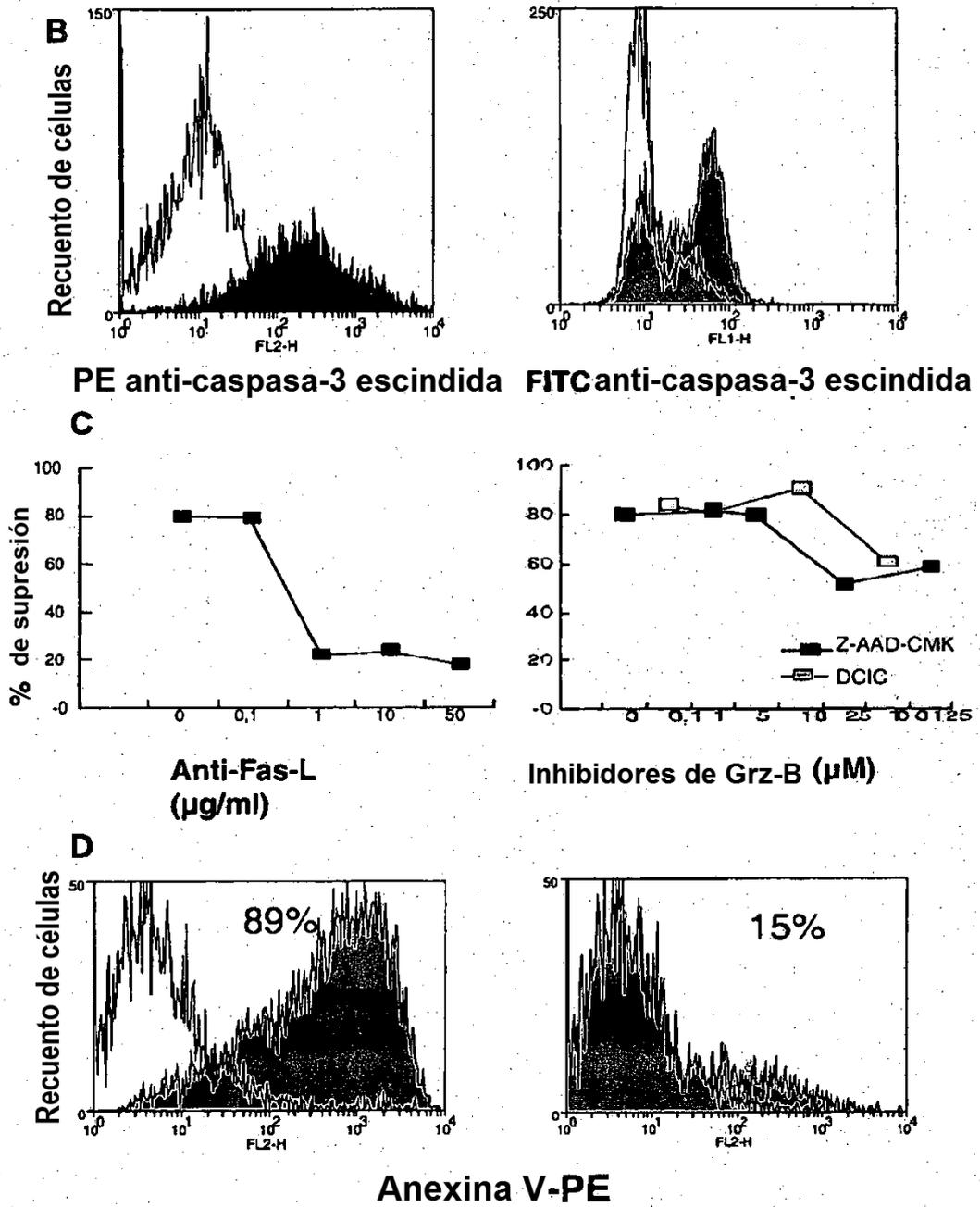


Figura 13 (continuación)

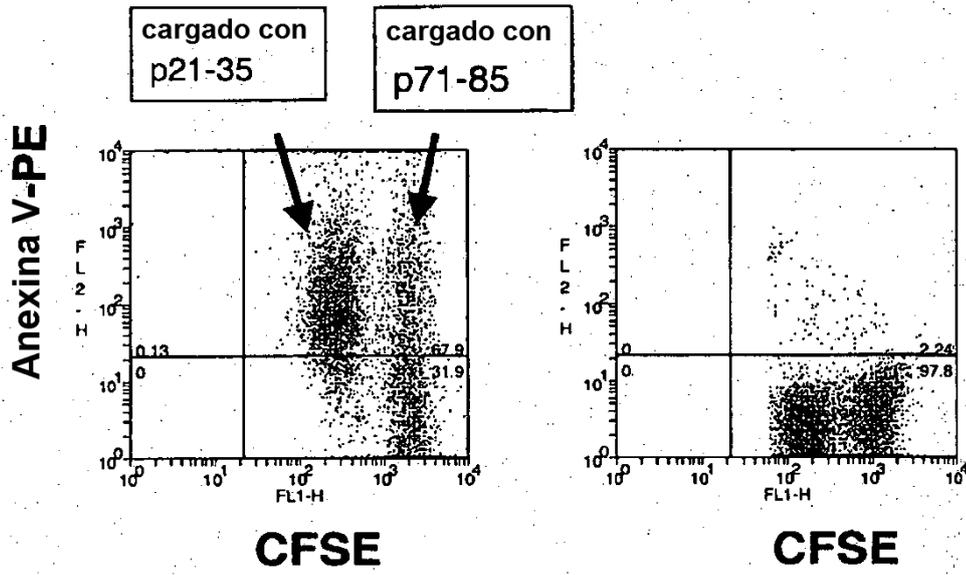


Figura 13 E

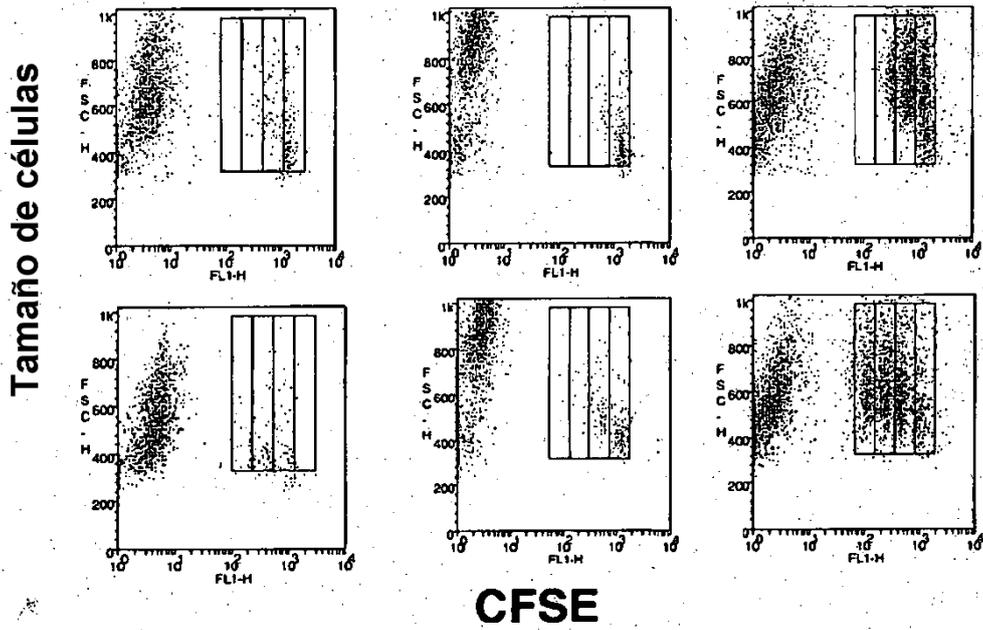
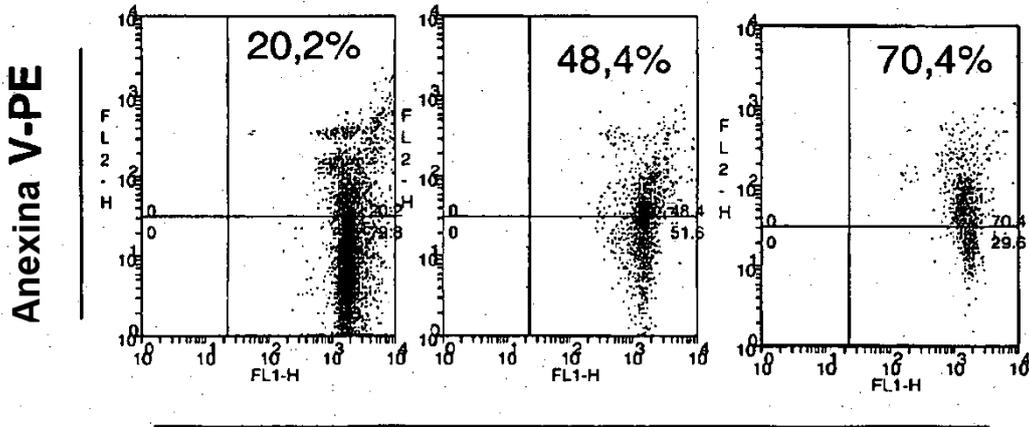
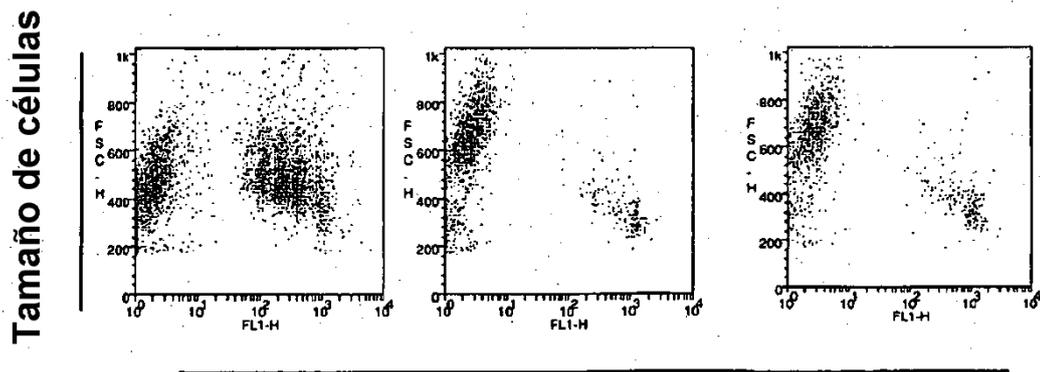


Figura 14 A



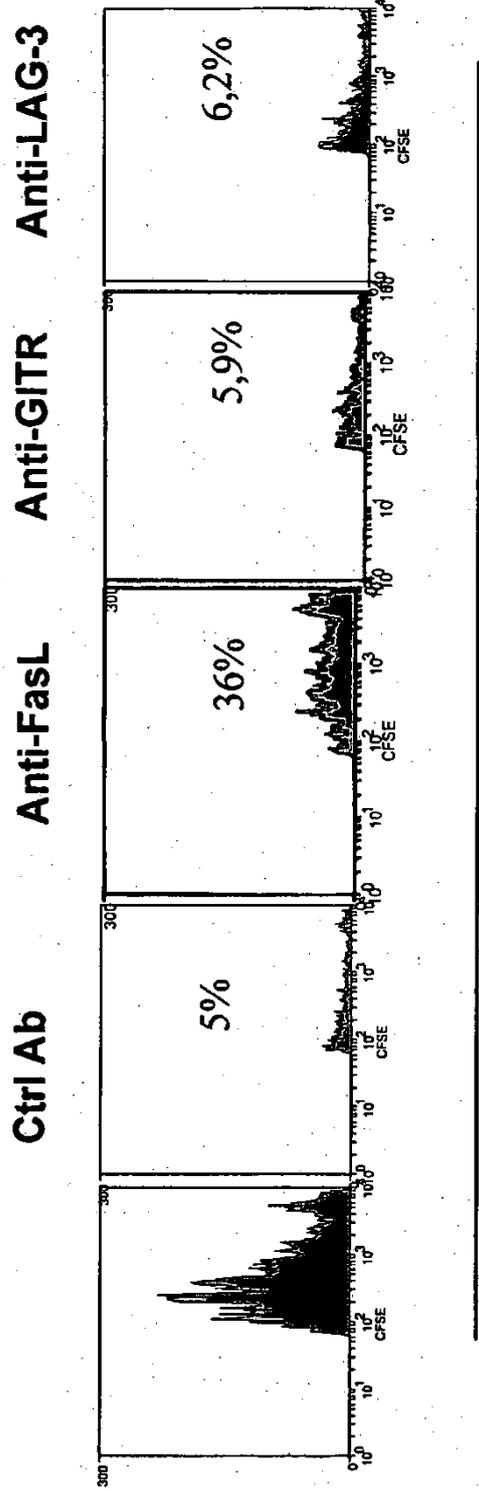
CFSE

Figura 14B



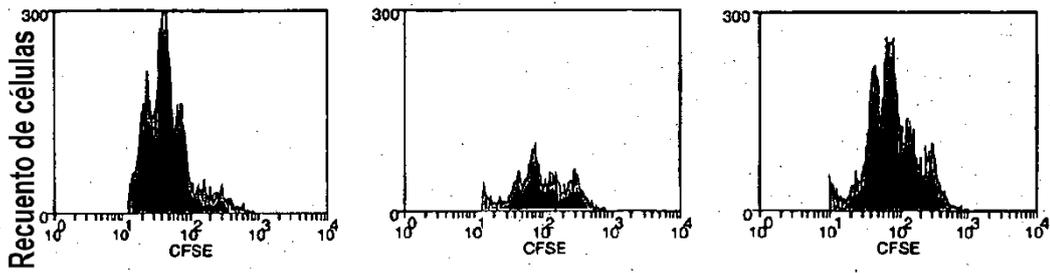
CFSE

Figura 14C



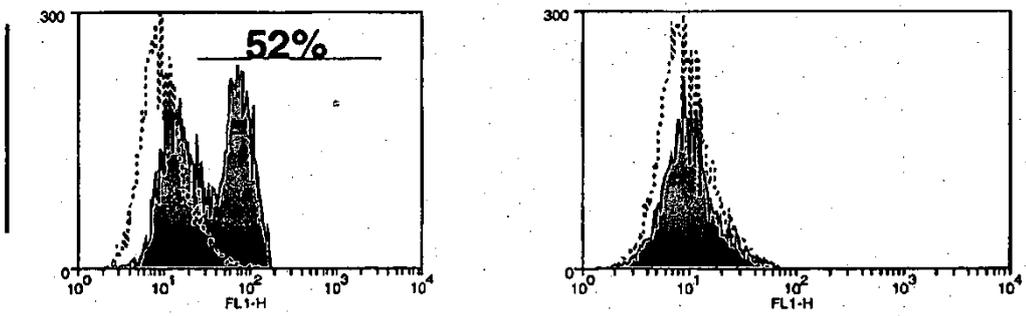
CFSE

Figura 14D



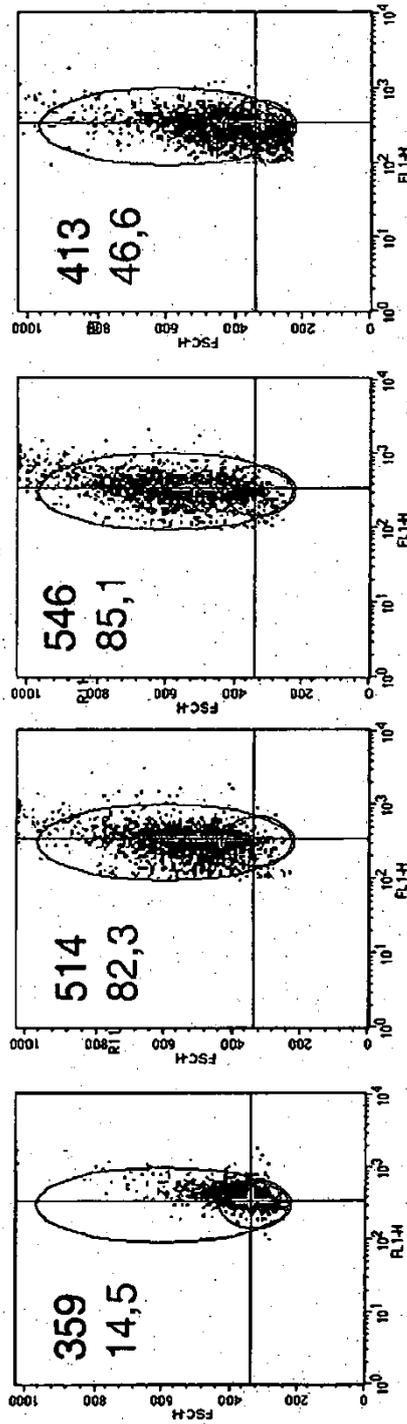
CFSE

Figura 14E



FITC anti-caspasa-3 escindida

Figura 15A



Diana sola
Clon con p830-844
Con clon citolítico (no p21-35)
Con clon citolítico y p21-35

Figura 14F

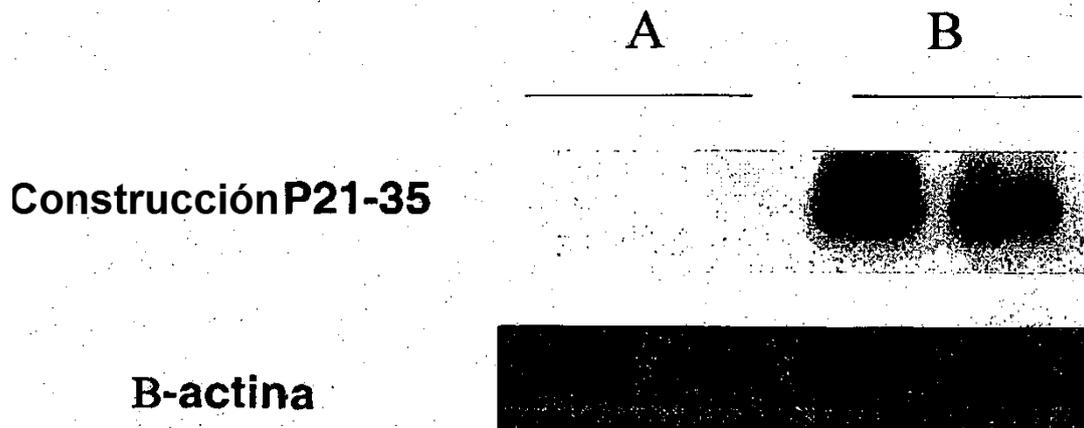


Figura 15 B

Células CD4 pulmonares	Treg	Control T	Sin linf. T
% CD4	91,9 +/- 0,815	27,4 +/- 1,503	25,3 +/- 1,428
% Vβ8.1+ (in CD4)	92,5 +/- 1,087	26,5 +/- 1,544	19,2 +/- 1,138

Figura 15 C

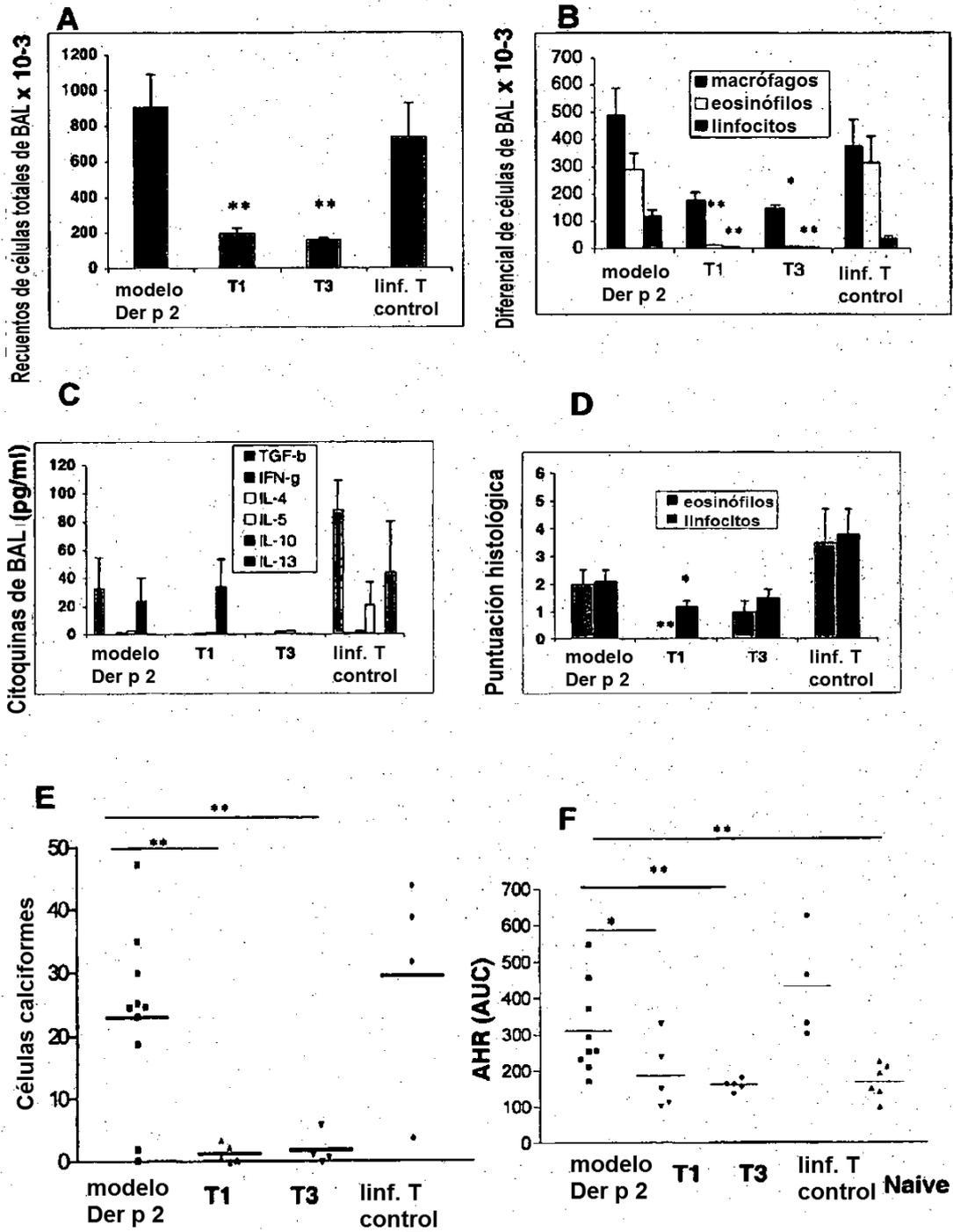


Figura 16

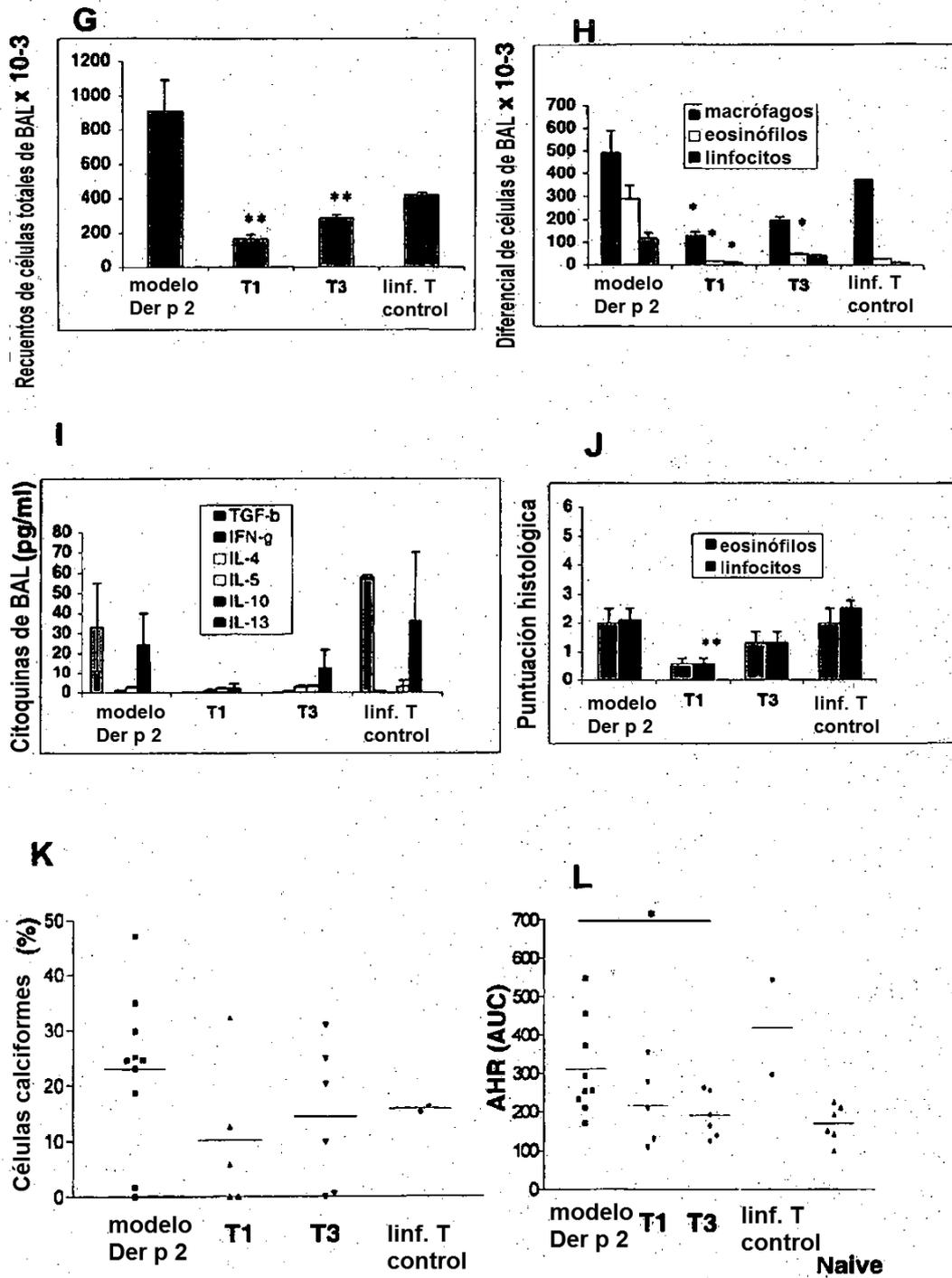


Figura 16 (continuación)

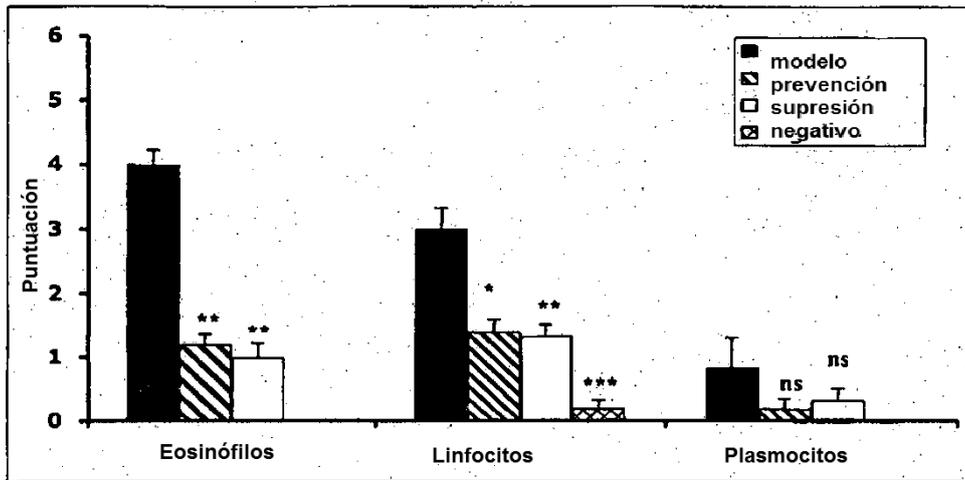
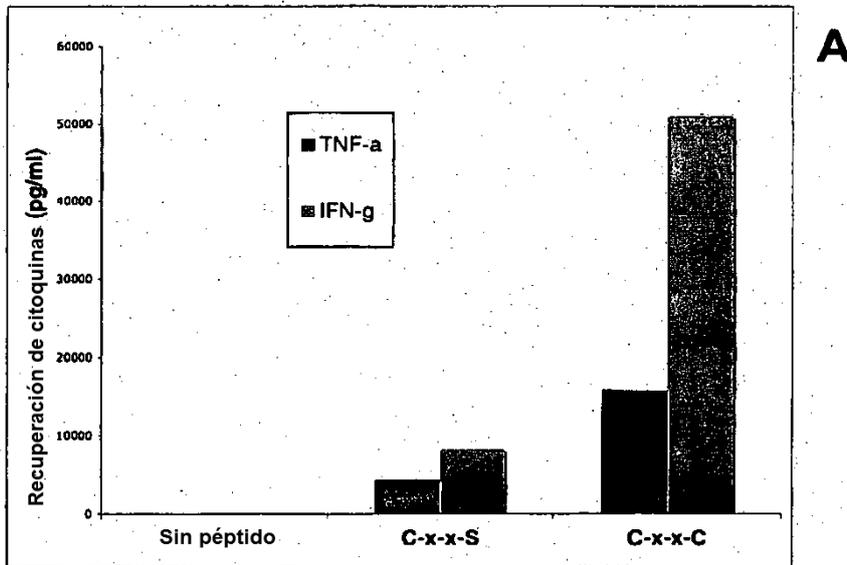


Figura 18 B



A



B

Figura 19

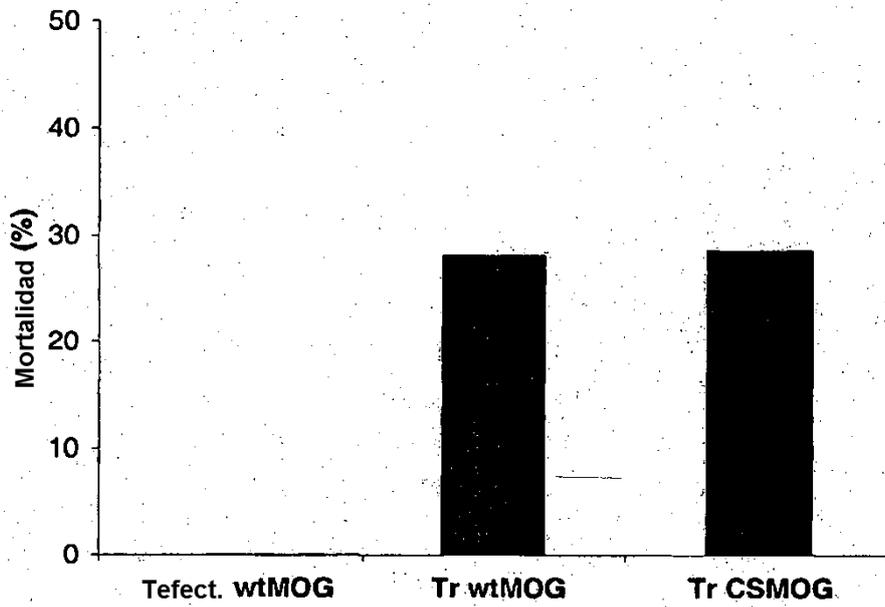


Figura 20

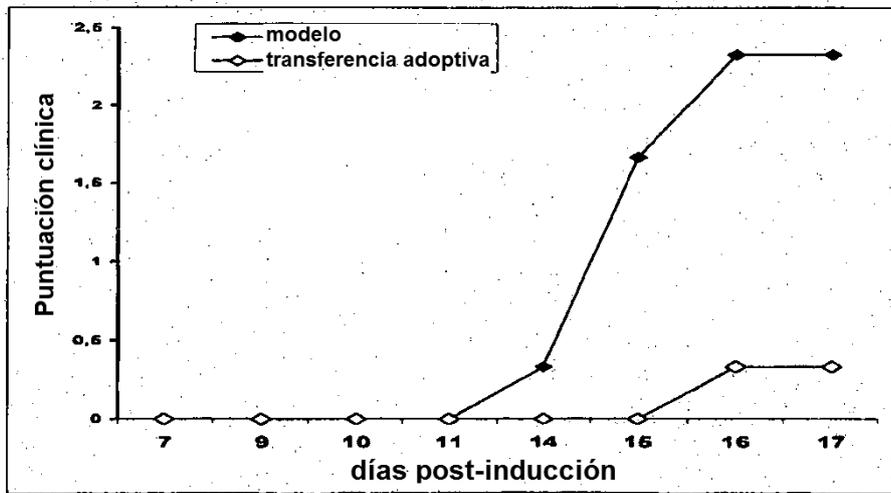


Figura 21

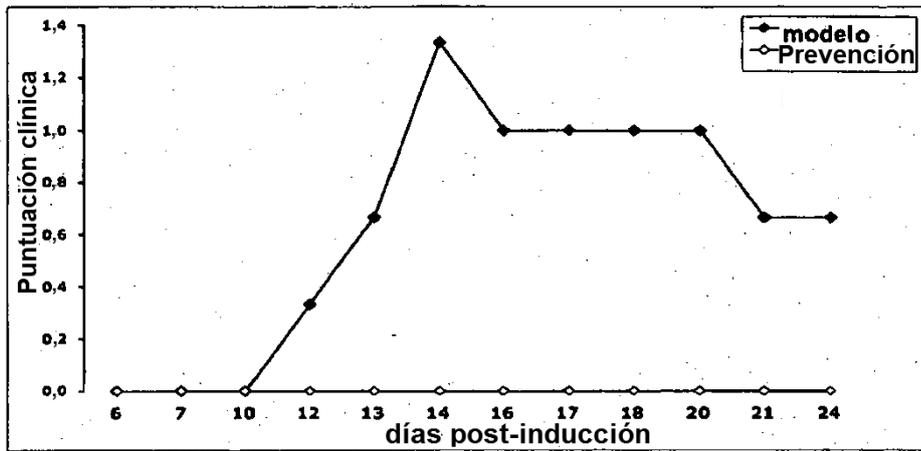
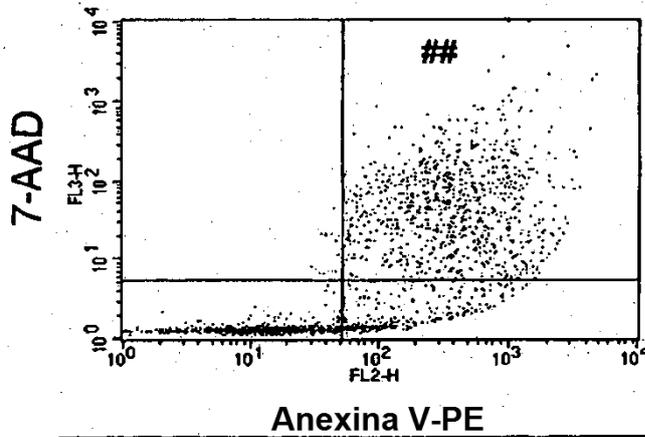


Figura 22



	## % 7-AAD / positivo An.V
Ratón 1	5.6 %
Ratón 2	2.5 %

Figura 23