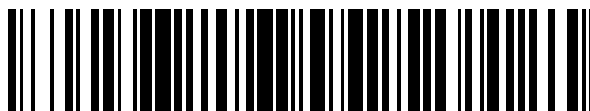


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 844**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2011** **PCT/US2011/056860**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012** **WO12054584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2011** **E 11835055 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018** **EP 2629797**

54 Título: **Péptidos para modular la actividad de linfocitos T y usos de los mismos**

30 Prioridad:

19.10.2010 US 394699 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:

WAGNER, DAVID

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 677 844 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos para modular la actividad de linfocitos T y usos de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos que inhiben la interacción de CD40 y CD154, así como al uso de dichos compuestos para modular la actividad de linfocitos T y tratar enfermedades.

Antecedentes

La inflamación se produce normalmente como respuesta a la infección de microorganismos invasores. Dicha respuesta inflamatoria es beneficiosa ya que es un elemento importante para que el sistema inmunitario localice el agente infeccioso para su eliminación. Sin embargo, en caso de autoinmunidad no existe infección, a pesar del hecho de que esté presente una grave inflamación. La inflamación en este caso, conocida como inflamación crónica aséptica, es perjudicial dado que destruye los tejidos normales. Los resultados de dicha inflamación aséptica alteran la vida y, en algunos casos, la ponen en peligro. Por otra parte, al igual que con la inflamación aguda, este proceso está mediado por células inmunitarias, incluyendo linfocitos T.

Una de las principales preocupaciones de la medicina moderna es cómo controlar la inflamación aséptica crónica (ACI por sus siglas en inglés), como pueda ser la que tiene lugar durante las enfermedades autoinmunitarias, y cómo controlar la inflamación aguda derivada de trauma. La inflamación, tanto crónica como aguda, conlleva degeneración tisular y pérdida de la función de órganos importantes con el tiempo. ACI no se limita a una sola enfermedad, sino que contribuye a numerosas enfermedades autoinmunitarias, entre las que se incluyen, pero sin limitarse a ellas, diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, incluyendo los tipos de asma autoinmune, aterosclerosis, vasculitis, hipertensión, tiroiditis incluyendo enfermedades de Hashimoto y Graves, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Paget, enfermedad de Addison, síndrome de dificultad respiratoria aguda, lesión pulmonar aguda y ACI asociada a trasplante de órganos.

Los trastornos autoinmunitarios se clasifican en dos tipos: específicos de órgano (dirigido principalmente a un órgano) y no específicos de órgano (muy diseminado por todo el cuerpo). Entre los ejemplos de trastornos autoinmunitarios específicos de órgano se incluyen diabetes tipo 1 dependiente de insulina, que afecta al páncreas; tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves, que afectan a la glándula tiroidea; anemia perniciosa, que afecta a la sangre; enfermedad de Addison, que afectan a las glándulas suprarrenales; hepatitis crónica activa, que afecta al hígado; miastenia grave que afecta al músculo; y esclerosis múltiple, que afecta al tejido del sistema nervioso. Un ejemplo de trastorno autoinmune no específico de un órgano es la artritis reumatoide. Las enfermedades autoinmunitarias suelen ser crónicas, debilitantes y mortales. Los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) estiman que hasta 23.500.000 personas en Norteamérica padecen una enfermedad autoinmunitaria con tendencia a aumentar. Se ha estimado que las enfermedades autoinmunitarias se encuentran entre las diez principales causas de mortalidad entre las mujeres de todos los grupos de edad hasta los 65 años.

La inflamación aguda, tal como se observa durante un traumatismo o septicemia, también está mediada por células inmunitarias. Si bien aún no se han identificado todos los mediadores moleculares de este proceso, se ha relacionado sólidamente un papel prominente de linfocitos T, macrófagos/monocitos, neutrófilos, etc. Por lo tanto, un medio para modular estos tipos de células controlaría necesariamente la respuesta inflamatoria.

Se ha demostrado que un subconjunto único de linfocitos T contribuye al desarrollo de la enfermedad autoinmunitaria. Dichas células se caracterizan fenotípicamente como CD41⁺CD40⁺ (Waid, D.M., G.M. Vaitaitis y J. Wagner, D.H. 2004. *European Journal of Immunology* 34: 1488; Vaitaitis, G.M., M. Poulin, R.J. Sanderson, K.J. Haskins, y D.H. Wagner Jr. 2003. *Cutting Edge, J. Immunol.* 170: 3455; Wagner, D.H., Jr., G. Vaitaitis, R. Sanderson, M. Poulin, C. Dobbs y K. Haskins. 2002. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 99: 3782; Wagner, D.H., Jr., E. Newell, R. Sanderson, J.H. Freed, y M.K. Newell. 1999. *International Journal of Molecular Medicine* 4: 231) y se conocen como linfocitos Th40. La expresión de CD40 está asociada normalmente a células presentadoras de antígeno y la mayor parte de la técnica anterior describe que CD40 se expresa en linfocitos B, macrófagos, monocitos, etc. Sin embargo, las proteínas CD40 se expresan también en linfocitos T (Waid, D.M., G.M. Vaitaitis, y J. Wagner, D.H. 2004. *European Journal of Immunology* 34/1488; Vaitaitis, G.M., M. Poulin, R.J. Sanderson, K.J. Haskins y D.H. Wagner Jr., 2003. *Cutting Edge, J. Immunol.* 170-3455; Wagner, D.H., Jr., G. Vaitaitis, R. Sanderson, M. Poulin, C. Dobbs y K. Haskins. 2002. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 99: 3782; Wagner, D.H., Jr., E. Newell, R. Sanderson, J.H. Freed y M.K. Newell. 1999. *International Journal of Molecular Medicine* 4: 231; Bourgeois, C., B. Rocha y C. Tanchot. 2002. *Science* 297: 2060; Fanslow, W.C., K.N. Clifford, M. Seaman, M.R. Alderson, M.K. Spriggs, R.J. Armitage y F. Ramsdell. 1994. *Journal of Immunology* 152: 4262; Ramsdell, F., M.S. Seaman, K.N. Clifford y W.C. Fanslow. 1994. *Journal of Immunology* 152: 2190; Grabstein, K.H., C.R. Maliszewski, K. Shanebeck, T.A. Sato, M.K. Spriggs, W.C. Fanslow y R.J. Armitage. 1993. *Journal of Immunology* 150: 3141; Armitage, R.J., C.R. Maliszewski, M.R. Alderson, K.H. Grabstein, M.K. Spriggs y W.C. Fanslow. 1993. *Seminars in Immunology* 5: 401; Cooper, C.J., G.L. Turk, M. Sun, A.G. Farr y P.J. Fink. 2004. *J. Immunol* 173: 6532). Mientras que los linfocitos Th40 comprenden una

proporción del compartimento periférico CD4⁺ en ratones no autoinmunes, no tratados previamente (Waid, D.M., G.M. Vaitaitis y J. Wagner, D.H. 2004. *European Journal of Immunology* 34: 1488; Wagner, D.H., Jr., E. Newell, R. Sanderson, J.H. Freed y M.K. Newell. 1999. *International Journal of Molecular Medicine* 4: 231), y en seres humanos (Waid, D.M., R.J. Wagner, A. Putnam, G.M. Vaitaitis, N.D. Pennock, D.C. Calverley, P. Gottlieb, y D.H. Wagner, Jr. 2007. *Clin Immunol* 124: 138), dicha proporción se expande drásticamente hasta un 50 % del compartimento CD4⁺ en ratones propensos a autoinmunidad (Waid, D.M., G.M. Vaitaitis y J. Wagner. 2004. *European Journal of Immunology* 34: 1488; Wagner, D.H., Jr., G. Vaitaitis, R. Sanderson, M. Poulin, C. Dobbs y K. Haskins, 2002. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 99: 3782; Wagner, D.H., Jr., E. Newell, R. Sanderson, J.H. Freed y M.K. Newell. 1999. *International Journal of Molecular Medicine* 4:231) y seres humanos (Waid, D.M., R.J. Wagner, A. Putnam, G.M. Vaitaitis, N.D. Pennock, D.C. Calverley, P. Gottlieb, y D.H. Wagner, Jr. 2007. *Clin Immunol* 124: 138). Estos linfocitos T no expresan marcadores de activación temprana y se producen en el fenotipo indiferenciado de ratones no desafiados. En ratones NOD diabéticos, los linfocitos Th40 se producen en niveles exagerados en el bazo, los ganglios linfáticos y el páncreas, incluso antes del inicio de la diabetes (Waid, D.M., G.M. Vaitaitis y J. Wagner, D.H. 2004. *European Journal of Immunology* 34: 1488; Wagner, D.H., Jr., G. Vaitaitis, R. Sanderson, M. Poulin, C. Dobbs y K. Haskins, 2002. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 99: 3782). Se observa un número y un porcentaje elevado de estos linfocitos T en la sangre periférica de pacientes con diabetes de tipo 1 cuando se compara con controles no autoinmunitarios y pacientes con diabetes de tipo 2 (Waid, D.M., R.J. Wagner, A. Putnam, G.M. Vaitaitis, N.D. Pennock, D.C. Calverley, P. Gottlieb y D.H. Wagner, Jr. 2007. *Clin Immunol* 12:138).

El aumento de linfocitos Th40 observado podría significar que dichos linfocitos T son sensibles al antígeno o que la expresión de CD40 es inducida por activación. Asimismo, varios clones de linfocitos T diabetogénicos son CD40⁺ (Wagner, D.H., Jr., G. Vaitaitis, R. Sanderson, M. Poulin, C. Dobbs y K. Haskins, 2002. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 99: 3782). Los linfocitos Th40 primarios purificados de ratones NOD diabéticos y de ratones NOD pre-diabéticos (12 semanas de vida) transfieren con éxito la diabetes de tipo 1 a receptores NOD.scid, lo cual demuestra directamente la patogenicidad de dicho subconjunto de linfocitos T (Waid, D.M., Vaitaitis G.M. y J. Wagner, D.H. 2004. *European Journal of Immunology* 34: 1488; Wagner, D.H., Jr., G. Vaitaitis, R. Sanderson, M. Poulin, C. Dobbs y K. Haskins. 2002. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 99: 3782). Se ha demostrado que los linfocitos Th40 se infiltran en las células beta de los islotes destruyendo la producción de insulina, lo cual indica la especificidad del antígeno de los islotes (Waid, D.M., G.M. Vaitaitis y J. Wagner, D.H. 2004. *European Journal of Immunology* 34: 1488; Wagner, D.H., Jr., G. Vaitaitis, R. Sanderson, M. Poulin, C. Dobbs y K. Haskins. 2002. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 99: 3782). Se ha demostrado asimismo que se requieren linfocitos Th40 para la transferencia de diabetes. Los linfocitos T periféricos (bazo y ganglio linfático regional) con un empobrecimiento de CD40 y después empobrecimiento de CD25, Treg, no fueron capaces de transferir diabetes a los receptores de Scid. A pesar de la eliminación de Treg, si está ausente el subconjunto autoagresivo linfocitos T CD40⁺, no tiene lugar la transferencia de la enfermedad.

Si bien los linfocitos Th40 son importantes en el desarrollo de autoinmunidad, otro factor importante es la expresión del Ligando CD40, CD154. El CD154 es inducido temporalmente en linfocitos T activados como respuesta a la estimulación con CD3/TCR (Lederman, S., M. Yellin, A. Krichevsky, J. Belko, J. Lee y L. Chess. 1992. *Journal of Experimental Medicine* 175: 1091). La expresión de CD154 también se ha demostrado en plaquetas, monocitos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas, fibroblastos, músculo liso y células endoteliales (Russo, S., B. Bussolati, I. Deambrosis, F. Mariano y G. Camussi, 2003. *J Immunol* 171: 5489; Stumpf, C., C. Lehner, S. Eskafi, D. Raaz, A. Yilmaz, S. Ropers, A. Schmeisser, J. Ludwig, W.G. Daniel y C.D. Garlachs. 2003. *Eur J Heart Fail* 5: 629; Schonbeck, U., y P. Libby. 2001. *Cell Mol Life Sci* 58: 4). CD154 es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y se ha descrito una forma soluble de CD154 (sCD154) (Russo, S., B. Bussolati, I. Deambrosis, F. Mariano y G. Camussi 2003. *J Immunol* 171: 5489; Stumpf, C., C. Lehner, S. Eskafi, D. Raaz, A. Yilmaz, S. Ropers, A. Schmeisser, J. Ludwig, W.G. Daniel y C.D. Garlachs. 2003. *Eur J Heart Fail* 5: 629; Toubi, E. e Y. Shoenfeld. 2004. *Autoimmunity* 37: 457). Por lo tanto, sCD154 puede actuar como una citoquina (Stumpf, C., C. Lehner, S. Eskafi, D. Raaz, A. Yilmaz, S. Ropers, A. Schmeisser, J. Ludwig, W.G. Daniel, y C.D. Garlachs. 2003. *Eur J Heart Fail* 5: 629). Aunque CD154 no se ha relacionado genéticamente en estudios T1D, sCD154 aparece significativamente elevado en T1D y puede desempeñar un papel en el proceso patológico (Varo, N., D. Vicent, P. Libby, R. Nuzzo, A.L. Calle-Pascual, M.R. Bernal, A. Fernández-Cruz, A. Veves, P. Jarolim, J.J. Varo, A. Goldfine, E. Horton, y U. Schonbeck. 2003. *Circulation* 107: 2664; Cipollone, F., F. Chiarelli, G. Davi, C. Ferri, G. Desideri, M. Fazia, A. Lezzi, F. Santilli, B. Pini, C. Cuccurullo, S. Tumini, A. Del Ponte, A. Santucci, F. Cuccurullo y A. Mezzetti. 2005. *Diabetologia* 48: 1216; Devaraj, S., N. Graser, S. Griffen, J. Wang- Polagruto, E. Miguelino, y I. Jialal. 2006. *Diabetes* 55: 774). Se ha establecido la importancia de la interacción CD40 - CD154 en la autoinmunidad (Wagner, D.H., Jr., G. Vaitaitis, R. Sanderson, M. Poulin, C. Dobbs y K. Haskins. 2002. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 99: 3782; Kobata, T., M. Azuma, H. Yagita y K. Okumura. 2000. *Rev. Immunogenet* 2:74; Homann, D., A. Jahreis, T. Wolfe, A. Hughes, B. Coon, M.J. van Stipdonk, K.R. Prilliman, S.P. Schoenberger y M.G. von Herrath. 2002. *Immunity* 16: 403; Goodnow, C.C. 2001. *Lancet* 357: 2115; Balasa, B., T. Krahle, G. Patstone, J. Lee, R. Tisch, H.O. McDevitt, y N. Sarvetnick. 1997. *Journal of Immunology* 159: 4620). El bloqueo de la interacción CD40-CD154 impide la artritis inducida por colágeno (Durie, F.H., R.A. Fava, T.M. Foy, A. Aruffo, J.A. Ledbetter y R.J. Noelle. 1993. *Science* 281: 1328) encefalitis autoinmune experimental (Howard, L.M. y S.D. Miller. 2004. *Autoimmunity* 37: 411), prostatitis (Grossman, M.E., E. Davila y E. Celis. 2001. *J Immunother* 24: 237) y, sobre todo, diabetes tipo 1 en el modelo de ratón NOD (Balasa, B., T. Krahle, G. Patstone, J. Lee, R. Tisch, H.O. McDevitt y N. Sarvetnick, 1997. *Journal of Immunology* 159: 4620). En el modelo de diabetes, fue esencial administrar un anticuerpo para bloquear CD154 a ratones NOD a las 3 semanas de vida; a las 9 semanas, los anticuerpos bloqueadores no tuvieron efecto sobre la prevención de la diabetes

(Balasa, B., T. Krahle, G. Patstone, J. Lee, R. Tisch, H.O. McDevitt y N. Sarvetnick, 1997. *Journal of Immunology* 159: 4620).

El trabajo anterior ha demostrado asimismo que el subconjunto de linfocitos Th40 induce la transcripción, traducción y translocación nuclear de RAG1 y RAG2, (Vaitaitis, G.M., M. Poulin, R.J. Sanderson, K.J. Haskins y D.H. Wagner Jr. 2003. *Cutting Edge, J. Immunol.* 170: 3455) cuando CD40 está activado. La activación de CD3 no induce RAG1 o RAG2 en linfocitos T (Vaitaitis, G.M., M. Poulin, R.J. Sanderson, K.J. Haskins y D.H. Wagner Jr., 2003. *Cutting Edge, J. Immunol.* 170:3455). Tras la inducción de RAG1/RAG2, tiene lugar una revisión de TCR mediada por CD40 en los linfocitos T periféricos (Vaitaitis, G.M., M. Poulin, R.J. Sanderson, K.J. Haskin y D.H. Wagner Jr. 2003. *Cutting Edge, J. Immunol.* 170:3455). La inducción de CD40 de la revisión del TCR depende de RAG. Los linfocitos T aislados de un ratón TCR-Tg experimentan revisión de TCR cuando CD40 está activado, pero los linfocitos T del ratón TCR-Tg.RAG-/- no revisan el TCR cuando CD40 está activado (Wagner, D.H., Jr., E. Newell, R. Sanderson, J.H. Freed y M.K. Newell. 1999. *International Journal of Molecular Medicine* 4:231).

Se han propuesto múltiples opciones de tratamiento para abordar y controlar tanto la inflamación crónica como la aguda. Muchos enfoques emplean medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que atacan a la producción de leucotrienos y prostaglandinas, productos celulares que causan inflamación localizada. Otros enfoques utilizan fármacos inmunosupresores más potentes, como ciclofosfamida, metotrexato y azatioprina, que suprimen la respuesta inmune y detienen la progresión de la enfermedad. Otros tratamientos más implican el uso de anticuerpos monoclonales diseñados para alterar las respuestas inmunes a los propios tejidos, tal como ocurre durante las enfermedades autoinmunes. Sin embargo, todos estos tratamientos suelen tener efectos secundarios graves a largo plazo.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de contar con métodos más seguros y eficaces para el tratamiento y la prevención de enfermedades autoinmunes. La presente divulgación aborda esta necesidad mediante la descripción de un nuevo método para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Sumario

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido que inhibe la unión de CD40 a CD154 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un paciente, teniendo dicho péptido una longitud menor de 20 aminoácidos y comprendiendo al menos una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8.

En ciertas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en diabetes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus (SLE), EPOC y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA).

En otras realizaciones, el péptido tiene una longitud de 6 a 15 aminoácidos y comprende una secuencia núcleo que consiste en SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones, el péptido tiene una longitud de 6, 13 o 15 aminoácidos.

En algunas realizaciones, el péptido es SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, el péptido se une a una proteína CD40 con una Kd mayor que 10^6 .

En otras realizaciones, el péptido inhibe la interacción de CD40 con CD154 de tal manera que impide la expansión de linfocitos Th40.

En otras realizaciones más, el péptido inhibe la interacción de CD40 con CD154 de tal manera que reduce el número de linfocitos Th40.

En otras realizaciones más aún, el péptido inhibe la interacción de CD40 con CD154 de tal manera que altera el perfil de expresión de citoquina de una población de células tratadas con dicho péptido.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para inhibir la interacción entre una proteína CD40 y una proteína CD154 que comprende poner en contacto dicha proteína CD40 con un péptido del primer aspecto que se une a dicha proteína CD40 en el sitio de unión a CD154, inhibiendo de este modo la interacción de dichas proteínas CD40 y CD154.

Asimismo, en el presente documento se describe un nuevo método para modular la inflamación y, en particular, la inflamación que se produce como resultado de una enfermedad autoinmunitaria. Dicho método se basa en el conocimiento de que la interacción entre el ligando de CD40 (proteína CD154) y la proteína CD40 expresada en linfocitos T (linfocitos Th40) es importante en el desarrollo de la enfermedad autoinmunitaria, así como en la aclaración de los restos críticos en CD40 y CD154 que son importantes para dicha interacción. La presente divulgación se refiere al bloqueo de la interacción entre una proteína CD40 y una proteína CD154 mediante el uso de péptidos pequeños que interactúan con la proteína CD40 en un sitio en el que se uniría normalmente la proteína

CD154. Se describe asimismo el uso de dichos péptidos para reducir el nivel de linfocitos Th40, reduciendo así la gravedad de la enfermedad, así como nuevos métodos para detectar linfocitos Th40.

En el presente documento se describe un péptido que interactúa con una proteína CD40 de tal manera que modula la inflamación. Los péptidos preferentes son aquellos que tienen una longitud menor de 25 aminoácidos y que se unen a una proteína CD40, inhibiendo así su interacción con una proteína CD154. Los péptidos preferentes son aquellos que comprenden una porción del sitio de unión a CD40 de una proteína CD154.

Asimismo, en el presente documento se describe un método para inhibir la interacción entre una proteína CD40 y una proteína CD154, comprendiendo dicho método poner en contacto la proteína CD40 con un péptido que interactúa con la proteína CD40. Los péptidos preferentes interactúan con la proteína CD40 en el sitio de unión a CD154. Preferentemente, dichos péptidos tienen una longitud menor de 20 aminoácidos. Son incluso más preferentes los péptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 3-10.

Asimismo, en el presente documento se describe un método para modular la inflamación en un animal o un cultivo de células, comprendiendo dicho método administrar a dicho animal, o a dichas células, un péptido que interactúa con una proteína CD40 de tal manera que modula la inflamación. Los péptidos preferentes son aquellos que interactúan con la proteína CD40 en el sitio de unión a CD154, modulando así la inflamación. Los péptidos preferentes modulan la inflamación reduciendo el nivel de linfocitos Th40 a no más del 25 % de la población total de linfocitos T. Dichos métodos pueden utilizarse para tratar enfermedades autoinmunitarias como la diabetes.

En el presente documento se describe un medio para detectar linfocitos T auto-agresivos, comprendiendo dicho método poner en contacto de una población de linfocitos T con un péptido que se une a la proteína CD40 y la detección del péptido unido a CD-40.

Asimismo, en el presente documento se describe un método para identificar a un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria, comprendiendo dicho método la obtención de una muestra que contiene linfocitos T de un paciente para su ensayo, la puesta en contacto de la muestra con un péptido que se une a la proteína CD40, la detección del péptido unido a CD-40 y la determinación del nivel de linfocitos Th40 a partir de la cantidad de CD40 unido, en el que un nivel de linfocitos Th40 superior al 25 % de la población total de linfocitos T indica que el paciente está en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria.

Breve descripción de las figuras

- Fig. 1 Efecto de diversos péptidos de CD154 en el desarrollo de diabetes en ratones NOD
- Fig. 2 Efecto de un péptido de 15 meros de CD154 en la relación con CD4/CD8 en ratones NOD
- Fig. 3 Reversión de la diabetes en ratones NOD utilizando un péptido de 15 meros de CD154
- Fig. 4 Detección de linfocitos Th40 usando un péptido de 15 meros de CD154
- Fig. 5 Exploración de linfocitos B mediante el uso de un péptido de 15 meros de CD154
- Fig. 6 Comparación de los niveles de linfocitos Th40 en ratones diabéticos y no diabéticos
- Fig. 7. Efecto del tratamiento con el péptido de 15 meros sobre la granulación de insulina del páncreas
- Fig. 8. Efecto de mutaciones en el péptido de 15 meros sobre la capacidad del péptido de 15 meros para inhibir el desarrollo de diabetes en ratones NOD.

Descripción detallada

La presente invención se basa en el descubrimiento de que un subconjunto único de linfocitos T, que expresan proteína CD40 y, por lo tanto, se hace referencia a ellos como linfocitos Th40, contribuye a la inflamación autoinmune. Por otra parte, la implicación de los linfocitos Th40 en el proceso autoinmune depende de la interacción entre la proteína CD40 expresada en la superficie del linfocito T y la proteína CD154. La interacción entre CD40 y CD154 tiene como resultado la entrega de señales de activación entre las células y la posterior activación del linfocito Th40. Dicha activación tiene como resultado la propagación del linfocito Th40 y un aumento de la inflamación (por ejemplo, un aumento en el número de células inmunitarias y moléculas inmuno-reguladoras, presentes en el sistema). En consecuencia, la inhibición de la interacción CD40/CD154 puede modular la actividad de los linfocitos Th40 y, en virtud de ello, afectar a la inflamación. En el presente documento se divulgan péptidos que modifican la interacción entre una proteína CD40 y una proteína CD154, modulando así la inflamación. En particular, la presente invención se refiere a péptidos que modifican la interacción entre la proteína CD40 expresada en la superficie de un linfocito T y una proteína CD154, modificando así la actividad de linfocitos T y modulando la inflamación para tratar enfermedades autoinmunes. Asimismo, en el presente documento, se divulga el uso de tales péptidos para detectar linfocitos Th40.

Antes de describir mejor la presente invención, debe entenderse que la invención no se limita de forma estricta a las realizaciones descritas en particular, ya que, naturalmente, pueden variar. Asimismo, ha de entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene como único fin describir realizaciones particulares sin pretender limitarla, ya que el alcance de la presente invención quedará limitado únicamente por las reivindicaciones.

Debe señalarse que, tal como se utilizan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno(a)" y "el/la", incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Debe entenderse asimismo que, tal como se utiliza en el presente documento, el término "una" entidad se refiere a una o más de dichas entidades. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico. Siendo así, los términos y expresiones "un", "uno(a)", "uno(a) o más" y "al menos uno(a)" pueden utilizarse indistintamente. De forma similar, las expresiones "que comprende", "que incluye" y "que tiene", pueden emplearse indistintamente.

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos empleados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden habitualmente las personas especializadas en la materia en la que se encuadra la presente invención. Si bien, en la puesta en práctica y en los ensayos de la presente invención, es posible utilizar cualquier método o material similar o equivalente de los descritos en el presente documento, se describen a continuación, los métodos y materiales preferentes. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento divulgan y describen los métodos y/o materiales en conexión con los cuales se citan las publicaciones. Las publicaciones tratadas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. En el presente documento, no debe interpretarse nada como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a antedatar dicha publicación en virtud de la invención anterior. Asimismo, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, lo cual es posible que tenga que ser confirmado independientemente.

Se podrá apreciar que también se puede proporcionar ciertas características, que se describen dentro del contexto de realizaciones por separado, para mayor claridad, en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención descritas en el contexto de una única realización, para mayor brevedad, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier sub-combinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones quedan específicamente abarcadas en la presente divulgación y se divulgan en el presente documento como si todas y cada una de dichas combinaciones se divulgara individual y explícitamente en el presente documento. Asimismo, todas las sub-combinaciones quedan también abarcadas específicamente y se divulgan en el presente documento como si todas y cada una de dichas sub-combinaciones se divulgaran individual y explícitamente en el presente documento.

Asimismo, tal como se utiliza en el presente documento, el término animal se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Entre los mamíferos adecuados en los que se aplican los métodos de la presente divulgación se incluyen, pero sin limitarse a ellos, animales de granja, animales de competición, mascotas, primates, ratones, ratas, caballos, perros, gatos y seres humanos. Pueden utilizarse indistintamente los términos animal, sujeto o paciente.

En el presente documento se divulga un péptido que interactúa con una proteína CD40 de tal manera que modula la inflamación. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos interactuar, interacción y similares significan que dos moléculas alcanzan una proximidad física suficiente como para provocar una modulación de la inflamación. Un tipo de interacción es una interacción de unión. En dicha interacción, el péptido se asocia con CD40 para formar un complejo. Un ejemplo de formación de complejo es la asociación de un antígeno con un anticuerpo. La unión de un péptido con una proteína CD40 puede ser reversible (por ejemplo, interacciones de unión no covalente) o no reversible (por ejemplo, interacciones de unión covalente). Por otra parte, una interacción reversible puede ser fuerte o débil, determinándose la fuerza de la interacción por las fuerzas (p. ej., cargas iónicas, unión de hidrógeno, interacciones de van der Waals, etc.) ejercidas por cada proteína sobre la otra proteína en el complejo. Los factores que afectan a la fuerza de una interacción entre dos moléculas son conocidas entre las personas especializadas en la materia. Una medida útil de la fuerza de unión entre dos moléculas, como pueda ser un péptido y una proteína, es la constante de disociación (Kd). Los péptidos preferentes divulgados en el presente documento son aquellos que se unen a una proteína CD40 con una Kd de no más de aproximadamente 1×10^{-6} M, aproximadamente 1×10^{-7} M o aproximadamente 1×10^{-8} M. Los péptidos particularmente preferentes son aquellos que tienen una Kd de menos de aproximadamente 1×10^{-9} M. En una realización, un péptido se une a una proteína CD40 con una Kd de menos de 100 nM, de menos de 50 nM, de menos de 25 nM, de menos de 10 nM, de menos de 5 nM, de menos de 3 nM, de menos de 2 nM o de menos de 1 nM. Los métodos para medir y analizar interacciones de unión entre un péptido y una proteína CD40 son conocidos entre las personas especializadas en la materia.

Tal como se utiliza en el presente documento, modular la inflamación significa cambiar el nivel de linfocitos Th40 presente en un animal, o en un cultivo de linfocitos T. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos nivel, número, recuento y concentración pueden emplearse indistintamente. La modulación de la inflamación puede significar un aumento o una disminución en el número de linfocitos Th40 presente en el entorno inflamatorio. En consecuencia, es posible hacer referencia a la modulación como positiva o negativa. La modulación positiva (también conocida como regulación al alza) de la inflamación, se refiere a un aumento del número de linfocitos Th40 en el entorno inflamatorio. La modulación negativa (también conocida como regulación a la baja) de la inflamación se refiere a una reducción en el número de linfocitos Th40 presentes en el entorno inflamatorio. Un péptido preferente es aquel que regula a la baja la inflamación, reduciendo así el número de linfocitos Th40 presentes en el

entorno inflamatorio. La modulación positiva y negativa de la inflamación puede derivar o no en un cambio del tipo y la cantidad de moléculas inmuno-reguladoras presentes en el entorno inflamatorio.

Las personas especializadas en la materia apreciarán que tanto un sistema de cultivo de células como el sistema inmunitario de un animal comprenden niveles basales de células inmunitarias y moléculas inmuno-reguladoras. Las expresiones nivel basal y nivel normal pueden emplearse indistintamente. Con respecto al sistema inmunitario de un animal, tal como se utiliza en el presente documento, el nivel basal de un tipo de célula inmunitaria (por ejemplo, linfocito Th40) o una molécula inmuno-reguladora, se refiere al número promedio de ese tipo de célula, o molécula inmuno-reguladora, presente en una población de individuos considerados sanos (es decir, sin enfermedad metabólica, autoinmune ni infecciosa). Con respecto a un sistema de cultivo celular, tal como se utiliza en el presente documento, el nivel basal de un tipo de célula inmunitaria, o una molécula inmuno-reguladora, se refiere al nivel promedio de ese tipo de célula, o molécula inmuno-reguladora, presente en una población de células que no está activada. Las personas especializadas en la materia podrán determinar si se activa un linfocito T o una población de dichas células. Por ejemplo, la expresión de las proteínas CD69, CD25 y/o CD154 mediante una célula indica que la célula ha sido activada.

El nivel basal de una célula o molécula puede ser una cantidad específica (p. ej., una concentración) o puede abarcar un intervalo de cantidades. Los niveles basales, o intervalos, de células inmunitarias y moléculas inmuno-reguladoras son conocidos entre las personas especializadas en la materia. Por ejemplo, en un individuo sano, el nivel normal de linfocitos T CD4⁺ presentes en la sangre humana es de 500-1500 células/ml. La variabilidad de esta medición puede derivarse de las diferencias en el método utilizado para determinar el recuento de células. Asimismo, es posible registrar también los niveles normales de células como un porcentaje de una población total de células. Por ejemplo, en un individuo sano, los linfocitos Th40 constituyen menos del 25 % de la población total de linfocitos T. Por lo tanto, tal como se emplea en el presente documento, el término inflamación se refiere a un entorno inflamatorio en el que los linfocitos Th40 constituyen más de aproximadamente 25 %, más de aproximadamente 30 %, más de aproximadamente 35 %, más de aproximadamente 40 %, más de aproximadamente 45 %, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 75 % o más de aproximadamente 80 % de la población total de linfocitos T. Por otra parte, un péptido preferente es aquel que reduce el nivel de linfocitos Th40 a menos de aproximadamente 50 %, menos de aproximadamente 45 %, menos de aproximadamente 40 %, menos de aproximadamente 35 %, menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente el 27 %, o igual a aproximadamente el 25 % de la población total de linfocitos T. Los métodos para medir diferentes tipos de linfocitos T en la población de linfocitos T son conocidos entre las personas especializadas en la materia. Asimismo, en el presente documento se divulga un nuevo método para detectar linfocitos Th40 utilizando los péptidos de la presente divulgación.

Tal como se emplea en el presente documento, la expresión entorno inflamatorio se refiere a la población células inmunitarias global y moléculas inmuno-reguladoras relacionadas, que están presentes en un cultivo de células, o en el cuerpo de un animal. Siendo así, la expresión entorno inflamatorio abarca los tipos, y/o las cantidades relativas de células inmunitarias y moléculas inmuno-reguladoras (por ejemplo, citoquinas) presentes en un cultivo de células, o en un animal, que participan en la modificación de una reacción inflamatoria. Entre los ejemplos de células que abarca dicha expresión entorno inflamatorio se incluyen, sin limitación, linfocitos T, neutrófilos, macrófagos, granulocitos y similares. El entorno inflamatorio se refiere a las células y moléculas que median la inflamación tanto aguda como crónica. Las personas especializadas en la materia apreciarán que el entorno inflamatorio hace referencia al sistema al que se administran los péptidos de la divulgación. En una realización, el sistema es un sistema de cultivo celular. En una realización, el sistema es un animal completo.

Un péptido preferente es aquel que interactúa selectivamente con una proteína CD40 en solución, según se determina aplicando un ensayo, como por ejemplo un ensayo inmunoabsorbente, o sobre la superficie de un linfocito T. Tal como se emplea en el presente documento, los términos selectivamente, selectivo, específico y similares indican que el péptido tiene una afinidad mayor para una proteína CD40 que para las proteínas no relacionadas con la proteína CD40. Más específicamente, los términos selectivamente, selectivo, específico y similares indican que la afinidad del péptido por CD40 es estadística y significativamente mayor que su afinidad para un control negativo (por ejemplo, una proteína no relacionada como albúmina) medida aplicando un ensayo convencional (p.ej., ELISA). Las técnicas adecuadas para someter a ensayo la capacidad de un péptido de interactuar selectivamente con una proteína CD40 son conocidas entre las personas especializadas en la materia. Dichos ensayos pueden ser ensayos *in vitro* o *in vivo*. Entre los ejemplos de ensayos útiles se incluyen, pero sin limitarse a ellos, inmunoensayo ligado a enzimas, inmunoensayo ligado a enzimas competitivo, radioinmunoensayo, inmunoensayo de fluorescencia, ensayo de quimioluminiscencia, ensayo de flujo lateral, ensayo de flujo continuo, ensayo de aglutinación, un ensayo de partículas (p. ej., mediante el uso de partículas como, por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, partículas magnéticas o polímeros plásticos, como perlas de látex o poliestireno), ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de inmunotransferencia (p.ej., transferencia de Western), ensayo de fosforescencia, ensayo de flujo continuo, ensayo de cromatografía, ensayo basado en electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayo espectrofotométrico, ensayo de partículas, ensayo sensorial electrónico y ensayo de citometría de flujo. Los métodos para realizar dicho ensayos son perfectamente conocidos entre las personas especializadas en la materia. En una realización, puede realizarse un ensayo usando células en cultivo, o puede

realizarse en un animal completo. Los ensayos pueden diseñarse para proporcionar resultados cualitativos, cuantitativos o semicuantitativos, dependiendo de cómo se utilicen y del tipo de resultado deseado.

En el presente documento, se divulgan péptidos que interactúan con una proteína CD40 como para modificar la interacción de la proteína CD40 con una proteína CD154, modulando así la inflamación. El efecto del péptido en la interacción CD40/CD154 puede ser positivo o puede ser negativo. Por ejemplo, el péptido puede interactuar con la proteína CD40 de tal manera que aumente la fuerza de la interacción entre la proteína CD40 y una proteína CD154. Alternativamente, el péptido puede interactuar con la proteína CD40 de manera que disminuye la fuerza de la interacción entre la proteína CD40 y una proteína CD154. Los métodos para medir la fuerza de unión entre el péptido y una proteína CD40 son conocidos entre las personas especializadas en la materia. Un péptido preferente de la presente invención es aquel que reduce la fuerza de la interacción entre una proteína CD40 y una proteína CD154. Los péptidos preferentes de la presente invención reducen la fuerza de unión entre una proteína CD40 y una proteína CD154 en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos 95 %. Un péptido particularmente preferente es aquel que inhibe completamente la unión de CD40 a CD154. La inhibición completa de la unión entre CD40 y CD154 significa que, cuando se aproxima un péptido de la presente invención a una proteína CD40 y una proteína CD154 en condiciones que normalmente permitirían la interacción entre CD40 y CD154, no se produce dicha interacción ni se estimulan las señales de activación en la célula que expresa CD40. En consecuencia, no tiene lugar la modulación de la inflamación mediada por CD40/CD154. En una realización, el péptido interactúa con la proteína CD40 de tal manera que reduce el nivel de inflamación en el sistema. En una realización, el péptido interactúa con la proteína CD40 de tal manera que inhibe el desarrollo de inflamación en el sistema.

Si bien los péptidos de la presente invención pueden interactuar con cualquier sitio en la proteína CD40, los péptidos preferentes de la presente invención interactúan con la proteína CD40 en un emplazamiento que se solapa con el sitio de unión a CD154. En una realización, un péptido de la presente invención interactúa con la proteína CD40 en el sitio de unión a CD154. Un ejemplo de dicho péptido es un antagonista competitivo del ligando CD40. Tal como se emplea en el presente documento, los péptidos que interfieren con la unión de una proteína CD154 a una proteína CD40, o que la inhiben, se conocen como péptidos interferentes pequeños (SIP). Tal como se emplea en el presente documento, un péptido interferente pequeño es un péptido que, a través de propiedades físico-químicas, interfiere con la interacción entre una proteína CD40 y una proteína CD154, impidiendo así la entrega de las señales de activación a la célula portadora de CD40, limitando de este modo la activación de la célula portadora de CD40 y, en consecuencia, la inflamación. Tal como se ha demostrado en el presente documento, las consecuencias de dicha interferencia son la prevención de la activación y propagación de linfocitos T, así como la prevención o reducción de la inflamación.

Un péptido útil para poner en práctica los métodos divulgados en el presente documento debería ser de un tamaño suficiente para interactuar con la proteína CD40 como para modular la inflamación. Las personas especializadas en la materia deducirán que, preferentemente, los péptidos son cortos, ya que son más fáciles y menos caros de producir. Los péptidos preferentes son aquellos que tienen una longitud menor de 20 aminoácidos. Un péptido preferente es aquel que tiene una longitud de 6, 13 o 15 aminoácidos. En una realización, el péptido consiste en un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. A continuación, se muestran en la Tabla 1 las secuencias de dichos péptidos.

Tabla 1

SEQ ID NO	SECUENCIA	Descripción
1	MIETYSQPSP RSVATGLPAS MKIFMYLLTV FLITQMIGSV LFAVYLHRRRL DKVEEEVNLH EDFVFIKKLK RCNKGEGSL S LLNCEEMRRQ FEDLVKDITL NKEEKKENSF EMQGEDEDPQ IAAHVVSEAN SNAASVLQWA KKGYYTMKSN LVMLENGKQL TVKREGLYV YTVQVTFCSNR EPSSQRPFIV GLWLKPSSGS ERILLKAANT HSSSQLCEQQ SVHLGGVFEL QAGASVFVNV TEASOVTHRV GESSEGLLKL	SwissPro 27548.2 Ligando CD40 ratón (Proteína CD154)
2	MIETYNQTSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRRRL DKIEDERNLH EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYTMSN NLVTLENGKQ LTVKRQGLY IYAQVTFCSN REASSQAPFI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFVN VTDPSQVSHG TGFTSFGLLK L	SwissPro 29965 Ligando CD40 humano (Proteína CD154)
3	KGY	Secuencia núcleo
4	KKGYYT	6 meros
5	AKKGYYTM	8 meros, ratón
6	AEKGYT	8 meros, ser humano

7	VLQWAKKGYYTMKSK	15 meros, ratón
8	VLQWAEKGYYTMSNN	15 meros, ser humano
9	NAASVLQWAKKGYYTMKSNLVMLE	24 meros
10	ISQAVHAAHAEINEAGR	15 meros de ovoalbúmina; péptido de control
11	G-L-Q-W-A-K-K-G-Y-T-M-K-S-N	Gly-1
12	V-G-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	Gly-2
13	V-L-G-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	Gly-3
14	V-L-Q-G-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	Gly-4
15	V-L-Q-W-G-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	Gly-5
16	V-L-Q-W-A-G-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	Gly-6
17	V-L-Q-W-A-K-G-G-Y-Y-T-M-K-S-N	Gly-7
18	V-L-Q-W-A-K-K-G-G-Y-T-M-K-S-N	Gly-8
19	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-G-T-M-K-S-N	Gly-9
20	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-G-M-K-S-N	Gly-10
21	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-G-K-S-N	Gly-11
22	ISQAVHAAHAEINEAGR	15 meros de ovoalbúmina; péptido de control
23	YVQGKANLKSCLMYT	Péptido desordenado

Se ha demostrado que la interacción de una proteína CD40 y de una proteína CD154, tiene lugar en regiones concretas dentro de cada proteína. Los autores de la invención han demostrado ahora que, sorprendentemente, un péptido que comprende únicamente una porción corta de la región CD154 que interactúa con CD40, es capaz de unirse a una proteína CD40, modulando así la inflamación. Por lo tanto, una realización de la presente divulgación es un péptido que comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína CD154 de manera que el péptido interactúa con la proteína CD40 como para modular la inflamación. En una realización, la interacción del péptido con la proteína CD40 tiene como resultado la modulación negativa de la inflamación. En un aspecto, el péptido comprende al menos una porción de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En un aspecto preferente, el péptido es lo más corto posible, pero comprende suficiente proteína CD154 para permitir la interacción con una proteína CD40 como para modular la inflamación. En una realización, un péptido de la presente divulgación comprende 6, 13 o 15 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, e interactúa con CD40 de tal manera que modula la inflamación. Un péptido preferente comprende una secuencia núcleo que consiste en lisina-glicina-tirosina-tirosina (KGYT, SEQ ID NO: 3), que corresponde a los aminoácidos 142-145 de la SEQ ID NO: 1 y aminoácidos 143-146 de la SEQ ID NO: 2. Los péptidos útiles pueden comprender regiones adicionales de secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 que son adyacentes a la secuencia núcleo, siempre y cuando el péptido sea capaz de modular la inflamación. En una realización de la divulgación, un péptido comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, siempre y cuando el péptido interactúe con la proteína CD40 como para modificar la inflamación. En una realización, un péptido consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

Si bien los péptidos de la divulgación pueden consistir completamente en secuencias que son responsables de la interacción del péptido con una proteína CD40, pueden contener adicionalmente secuencias de aminoácidos que no interactúan con una proteína CD40, pero que tienen otras funciones útiles. A la secuencia que interactúa con CD40 se la puede añadir cualquier secuencia de aminoácidos adicional útil, siempre y cuando las secuencias adicionales no tengan un efecto indeseado sobre la capacidad de la secuencia que interactúa con CD40 para interactuar con una proteína CD40. Por ejemplo, además de la secuencia de aminoácidos responsable de la interacción con una proteína CD40, un péptido puede contener secuencias de aminoácidos que son útiles para visualizar o purificar el péptido. Dichas secuencias actúan como marcadores (p. ej., enzimas) o etiquetas (sitios de unión de anticuerpos). Entre los ejemplos de dichos marcadores y etiquetas se incluyen, pero sin limitarse solo a ellos, B-galactosidasa, luciferasa, glutatión-s-transferasa, tiorredoxina, etiquetas de HIS, etiquetas de biotina y etiquetas fluorescentes. Los expertos en la materia conocerán otras secuencias útiles para marcar y etiquetar proteínas.

Igualmente, los péptidos de la presente invención pueden modificarse, siempre y cuando dicha modificación no afecte significativamente a la capacidad del péptido para modular la inflamación. Dichas modificaciones pueden realizarse, por ejemplo, para aumentar la estabilidad, la solubilidad o la capacidad de absorción de la proteína. Entre los ejemplos de dichas modificaciones, se incluyen, pero sin limitarse a ellos, pegilación, glicosilación y modificación química del péptido.

Los péptidos de la presente invención pueden obtenerse de la naturaleza (por ejemplo, obtenerse de plantas, animales o microorganismos) o pueden producirse en un laboratorio (por ejemplo, por síntesis o recombinación). Los péptidos preferentes son aquellos que se sintetizan. Se incluyen asimismo péptidos que son combinaciones de moléculas naturales y sintéticas. Los expertos en la materia conocen métodos generales para producir y aislar péptidos recombinantes o sintéticos. Debe observarse que, tal como se utiliza en el presente documento, una molécula aislada o biológicamente pura es aquella que se ha extraído de su medio natural. Siendo así, las

expresiones aislado, biológicamente puro, y similares, no reflejan necesariamente el grado en que la proteína ha sido purificada.

Tal como se ha descrito en el presente documento, la interacción entre la proteína CD40 y la proteína CD154 es necesaria para la participación de los linfocitos Th40 en la inflamación autoinmune. En consecuencia, la inhibición de la interacción entre una proteína CD40 y CD154 utilizando péptidos de la presente invención es un método útil para modificar la inflamación autoinmune. En el presente documento, se describe un método para reducir la interacción entre una proteína CD40 y una proteína CD154 que comprende introducir en un entorno que contiene una proteína CD40 y una proteína CD154 un péptido que interactúa con la proteína CD40, de tal manera que reduce la interacción entre la proteína CD40 y la proteína CD154. En un aspecto, el péptido reduce la interacción entre la proteína CD40 y la proteína CD154 en al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %. En una realización, el péptido reduce la interacción entre la proteína CD40 y la proteína CD154 en un factor de al menos 10, al menos 100, al menos 1.000, al menos 10.000. Los métodos de medición de la fuerza de la interacción entre la proteína CD40 y la proteína CD154 han sido descritos anteriormente y son conocidos entre las personas especializadas en la materia.

Asimismo, en el presente documento se divulga un método para modular la inflamación que comprende poner en contacto una proteína CD40 con un péptido que interactúa con la proteína CDE40 de tal manera que modula la inflamación. En un aspecto, la interacción entre el péptido y la proteína CD40 aumenta el número de linfocitos Th40 en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. En una realización, la interacción entre el péptido y la proteína CD40 aumenta el número de linfocitos Th40 en un factor de al menos 10, al menos 100, al menos 1.000, al menos 10.000. Se divulga también un método para reducir la inflamación en un paciente, comprendiendo dicho método administrar al paciente un péptido de la divulgación. En una realización, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. En una realización, el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. En una realización preferente, la interacción del péptido con la proteína CD40 disminuye el número de linfocitos Th40 en al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %. En otra realización, la interacción del péptido con la proteína CD40 disminuye el número de linfocitos Th40 en un factor de al menos 10, al menos 100, al menos 1.000, al menos 10.000. En una realización preferente, se reduce el nivel de linfocitos Th40 de modo que los linfocitos Th40 comprenden no más de aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 % o aproximadamente 40 % de la población total de linfocitos T.

Los péptidos y métodos, tal como se divulgan en el presente documento, son adecuados para su uso en un cultivo celular, así como para tratar a un paciente. Tal como se utiliza en el presente documento, el término paciente se refiere a cualquier animal que necesita dicho tratamiento. El animal puede ser un ser humano o un animal no humano. Un animal preferente para su tratamiento es un mamífero. Puede administrarse un péptido o aplicarse de por sí, o como composiciones farmacéuticas. Es posible administrar un péptido de la presente invención, o una composición farmacéutica del mismo, a un paciente a través de diversas rutas, entre las que se incluyen, sin limitarse a ellas, inyección (p.ej., intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intraperitoneal), inhalación, administración oral (p.ej., en una píldora, comprimido, cápsula, polvo, jarabe, solución, suspensión, película fina, dispersión o emulsión), transdérmica, transmucosa, pulmonar, bucal, intranasal, sublingual, intracerebral, intravaginal, rectal o tópica o a través de cualquier otro método adecuado conocido entre las personas especializadas en la materia.

A través de técnicas clínicas convencionales conocidas en la técnica puede determinarse la cantidad de un péptido de la presente invención y/o una composición farmacéutica del mismo eficaz. Dicha cantidad depende, entre otros factores, del paciente en tratamiento, incluyendo el peso, la edad y el estado del paciente, el efecto esperado del compuesto, la forma de administración y el criterio del médico tratante.

Es posible administrar un péptido de la presente invención, o una composición farmacéutica del mismo, en solitario o en combinación con otro u otros agentes farmacéuticos, incluyendo otros compuestos. La composición farmacéutica concreta depende del modo de administración deseado, como saben las personas especializadas en la materia.

Dado que los autores de la invención han descubierto que los linfocitos Th40 están íntimamente relacionados con el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias, los péptidos y métodos divulgados en el presente documento pueden utilizarse para modificar la inflamación derivada de dichas enfermedades. Por lo tanto, se divulga en el presente documento un método para tratar enfermedad autoinmunitaria en un paciente que necesita dicho tratamiento, comprendiendo dicho método administrar a un paciente un péptido que interactúa con la proteína CD40, reduciendo así la inflamación. En una realización, el péptido interactúa con la proteína CD40 de tal manera que afecta a la interacción entre CD40 y CD154, reduciendo así la inflamación. En una realización preferente, la interacción del péptido con la proteína CD40 reduce el número de linfocitos Th40 en un paciente a un nivel igual al observado en sujetos que no tienen enfermedad autoinmunitaria. La presente invención es adecuada para tratar a cualquier

paciente que tenga una enfermedad autoinmunitaria cuyo desarrollo dependa de los linfocitos Th40. Más concretamente, los péptidos de la presente invención son adecuados para reducir el nivel de linfocitos Th40 en dichos pacientes. En una realización preferente, un péptido de la presente invención reduce el nivel de linfocitos Th40 en un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria en aproximadamente el 25 % como máximo de la población total de linfocitos T. Entre los ejemplos de dicha enfermedad incluyen, pero sin limitarse a ellas, asma, diabetes tipo 1; esclerosis múltiple; lupus eritematoso sistémico; artritis reumatoide; enfermedad de Crohn; enfermedad inflamatoria intestinal; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) incluyendo tipos de asma autoinmune; aterosclerosis; vasculitis; hipertensión; tiroiditis incluyendo las enfermedades de Hashimoto y Graves; cirrosis biliar primaria; enfermedad de Paget; La enfermedad de Addison; síndrome de dificultad respiratoria aguda, lesión pulmonar aguda; ACI asociado a trasplante de órganos; hipertensión, etc.

Un ejemplo de una enfermedad que es particularmente susceptible de tratamiento mediante el uso de un péptido de la presente invención es la diabetes. En la diabetes, está alterada la producción de insulina, o respuesta del cuerpo a ella. En consecuencia, las células no pueden utilizar la glucosa en la sangre y los niveles de dicho azúcar se elevan. Los ratones se consideran diabéticos cuando su nivel de glucosa en sangre es superior a 250 mg/dl durante tres días consecutivos. En los seres humanos, un nivel de glucosa en sangre normal y promedio es de 60-110 mg/dl. Sin embargo, los diabéticos tienen niveles de glucosa en sangre de al menos 130 mg/dl, y generalmente mucho más altos. Por tanto, en el presente documento, se divulga un método para prevenir la diabetes en un individuo en riesgo de desarrollar diabetes, comprendiendo dicho método administrar al individuo un péptido de la presente invención. Dicho riesgo puede derivar de factores familiares (por ejemplo, herencia) o de otros factores, como el estado físico del individuo. Los métodos de evaluación de riesgos son conocidos entre las personas especializadas en la materia. En una realización, se administra el péptido en el momento en que el nivel de glucosa en sangre del individuo es de aproximadamente 60 mg/dl a aproximadamente 110 mg/dl. En una realización, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, siempre y cuando el péptido pueda regular negativamente la inflamación. En una realización, el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

Los autores de la invención han demostrado también que, sorprendentemente, el péptido de la presente invención puede utilizarse para revertir el proceso patológico en individuos que ya presentan signos de diabetes. Por lo tanto, en el presente documento, se divulga un método para revertir la diabetes que comprende administrar a un paciente diagnosticado con diabetes, un péptido de la presente invención. En una realización, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, siempre y cuando el péptido pueda regular negativamente la inflamación. En una realización, el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "revertir la diabetes" significa reducir el nivel de glucosa en sangre de un individuo diabético a un nivel comparable al observado en un individuo no diabético. Como se ha señalado, el nivel de glucosa en sangre de un sujeto no diabético es de aproximadamente 60 mg/dl a aproximadamente 110 mg/dl. Por lo tanto, en el presente documento, se divulga un método para reducir el nivel de glucosa en sangre en un paciente diagnosticado con diabetes a menos de 110 mg/dl, y preferentemente entre 60 mg/dl y 110 mg/dl.

Tal como se ha descrito, los péptidos de la presente invención se unen selectivamente a una célula que expresa CD40. En consecuencia, los péptidos de la presente invención pueden utilizarse para identificar linfocitos Th40. Por lo tanto, una realización de la divulgación es un método para detectar Th40, comprendiendo dicho método poner en contacto una población de linfocitos T con un péptido de la presente invención. En una realización preferente, se marca el péptido con un marcador detectable, como, por ejemplo, luciferasa o fosfatasa alcalina. Dicha detección se puede realizar aplicando técnicas de ensayo conocidas entre las personas especializadas en la materia. En general, un ensayo para detectar linfocitos Th40 empleando un péptido de la presente invención comprende (a) obtener una muestra de células; (b) poner en contacto un péptido de la presente invención con dichas células en condiciones adecuadas para permitir la unión del péptido a los linfocitos Th40, si están presentes; (c) lavar dichas células empleando condiciones que interrumpen las interacciones no específicas, y que eliminan el péptido sin unir; y (d) detectar el péptido unido a las células. La detección del péptido unido se puede lograr directa o indirectamente. Por ejemplo, puede conseguirse una detección directa utilizando un péptido marcado con un marcador detectable, tal como se divulga en el presente documento. Después de la etapa de lavado indicada, se exploran las células simplemente en cuanto a la presencia de marcador detectable. La presencia de marcador detectable en la muestra de células indica la presencia de linfocitos Th40. Alternativamente, la detección indirecta implica el uso de una segunda molécula, como pueda ser un anticuerpo, que se une al péptido. En un ensayo de detección indirecta, tras la etapa de lavado indicada, se añade a la muestra de células una molécula de detección que se une al péptido. La molécula de detección está marcada con un marcador detectable. Después de lavar la molécula de detección no unida, se exploran las células en cuanto a la presencia de marcador detectable. La presencia de marcador detectable en la muestra de células indica la presencia de linfocitos Th40. Debe entenderse que los ensayos descritos en el presente documento sirven como ejemplos de ensayos útiles, pudiéndose emplear otras técnicas de ensayo. Las personas especializadas en la materia conocerán técnicas de ensayo adecuadas, y también se describen en, por ejemplo, Cloning Molecular: A Laboratory Manual, Sambrook, J., Fritsch, EF, y Maniatis, T, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2ª Edición (diciembre de 1989).

La tecnología de ensayo descrita también puede emplearse para identificar otras moléculas que modifican la interacción entre una proteína CD40 con una proteína CD514. Entre los ejemplos de dichas moléculas se incluyen, pero sin limitarse a ellas, proteínas, péptidos y moléculas pequeñas. Por ejemplo, se pueden diseñar ensayos que determinen la capacidad de las moléculas para competir con un péptido de la presente invención por la unión a un linfocito Th40. Por ejemplo, se puede mezclar un péptido marcado con un marcador detectable con una molécula de ensayo y una población de células conocida por contener linfocitos Th40, en condiciones que permitan la unión del péptido con los linfocitos Th40. Tras un período de incubación apropiado, se lavan las células para eliminar el péptido sin unir y se exploran las células en cuanto a la presencia de un marcador detectable. Alternativamente, el péptido marcado podría unirse a linfocitos Th40 primero y, después de una etapa de lavado para eliminar el péptido sin unir, podría añadirse la molécula de ensayo a las células con contenido de péptido unido. Tras un período de incubación y una etapa de lavado para eliminar la molécula sin unir, o péptido liberado, se exploran las células en cuanto a la presencia de un marcador detectable. En cualquier caso, la ausencia del marcador detectable en la muestra de células indica que la molécula de ensayo puede competir con el péptido por la unión a los linfocitos Th40, mientras que la presencia del marcador detectable indicaría que la molécula de ensayo no inhibe la unión del péptido a Th40 células. La inhibición de la unión no tiene por qué ser del 100%, ya que dicho ensayo también sería útil para identificar moléculas que inhiben parcialmente la unión del péptido con los linfocitos Th40. Las personas especializadas en la materia entenderán que dichos ensayos implicarían el uso de controles positivos (p.ej., péptido sin marcar) y controles negativos (p.ej. proteína/molécula conocida por no unirse a linfocitos Th40).

Dado que los mayores niveles de linfocitos Th40 están asociados al desarrollo de enfermedad autoinmunitaria, las directrices divulgadas en el presente documento pueden servir para identificar pacientes en riesgo de desarrollar enfermedad autoinmunitaria. Por lo tanto, en el presente documento, se divulga un método para identificar a un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria. En una realización, se identifican los pacientes en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria obteniendo una muestra de un paciente para su análisis, poniendo en contacto la porción de linfocitos T de dicha muestra con un péptido de la presente invención y determinando el nivel de linfocitos Th40 presente en la muestra, en la que un nivel de linfocitos Th40 superior a aproximadamente 25 % de la población total de linfocitos T indica que el paciente está en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria. En una realización, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, siempre y cuando el péptido se una a la proteína CD40. En una realización, el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. En una realización preferente, el péptido está marcado con un marcador detectable adecuado como, por ejemplo, luciferasa o fosfatasa alcalina.

Se divulgan también kits útiles para poner en práctica los métodos divulgados en el presente documento. Una realización es un kit para modular la inflamación en un animal o en células en cultivo, comprendiendo dicho kit un péptido que interactúa con una proteína CD40 de tal manera que modula la inflamación. En una realización, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, siempre y cuando el péptido pueda regular negativamente la inflamación. En una realización, el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. Otra realización es un kit para determinar el nivel de linfocitos Th40, comprendiendo dicho kit un péptido que interactúa con una proteína CD40 y medios para detectar el péptido unido a CD40. Los kits también pueden contener reactivos y componentes asociados, como, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, tampones, etiquetas, envases, inserciones, tubos, viales, jeringas y similares.

Los ejemplos que se exponen a continuación tienen un fin ilustrativo no pretendiéndose limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

En este ejemplo se demuestra el efecto de diversos fragmentos peptídicos de CD154 en las relaciones CD4/CD8 y el desarrollo de diabetes en ratones NOD.

Se diseñaron los péptidos basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína CD154 de ratón (SEQ ID NO: 1) de la base de datos SwissPro. Se realizó el pedido de los péptidos en New England Peptide. Se suspendieron los péptidos liofilizados en solución salina estéril a 1 mg/ml. A continuación, se inyectaron 100 µg de un péptido en particular en la vena caudal de ratones NOD de 8-9 semanas de vida. Los ratones de control recibieron 100 µl de solución salina estéril. Esto es bastante antes del inicio de la diabetes, pero después de que haya comenzado el daño a los islotes pancreáticos. Tres días después de la inyección inicial, se inyectaron otros 100 µg de péptido (o 100 µl de solución salina en el caso de los ratones de control) en la vena caudal. Los ratones fueron inyectados con péptido (o solución salina) semanalmente. A las 10 semanas de vida, se llevó un seguimiento de los ratones en cuanto a la diabetes, según lo indicó un nivel de glucosa en sangre superior a 250 mg/dl durante tres días consecutivos. En la Figura 1 se presentan los resultados de este estudio. Durante este tiempo, también se extrajo

sangre de la vena caudal, o mediante punción venal submandibular, y se determinó el nivel de células CD4⁺ y CD8⁺ por citometría de flujo utilizando anticuerpos para la proteína CD4 y la proteína CD8. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 2.

Los resultados demuestran que el tratamiento con un péptido no relacionado con la proteína CD154 no redujo el desarrollo de diabetes en ratones NOD. En cambios, el tratamiento de ratones con un péptido de 15 meros derivado de proteína CD154 evitó el inicio de la diabetes. Asimismo, tanto los péptidos de 6 meros como los de 10 meros derivados de proteína CD154, tuvieron efectos significativos sobre el desarrollo de la diabetes. Además, los datos demuestran que el péptido de 15 meros no comprometió el sistema inmunitario como resultado, según lo determinó la relación CD4/CD8.

Ejemplo 2

En este ejemplo se demuestra el efecto del péptido de 15 meros sobre la hiperglucemia en ratones NOD recién diabéticos.

Por vía intravenosa se inyectaron 100 ug del péptido de 15 meros en seis ratones a los que se había administrado el péptido de 6 meros del Ejemplo 1 y que posteriormente desarrollaron diabetes. Después, se administró a estos ratones inyecciones semanales del péptido de 15 meros en la vena caudal y se controló el nivel de glucosa en sangre dos veces a la semana. Se administró el péptido de 15 meros durante un total de diez semanas y una vez transcurridas, se detuvo el tratamiento. En la Figura 3, se muestran los resultados de este estudio.

En este estudio se demuestra que la inyección del péptido de 15 meros en ratones ya diabéticos puede revertir la hiperglucemia. Asimismo se demuestra que el cese del tratamiento tiene como resultado una hiperglucemia en curso de 7 semanas.

Ejemplo 3

En este estudio se demuestra la capacidad del péptido de 15 meros de unirse a linfocitos Th40 y linfocitos B.

Se aisló el total de linfocitos de ratones NOD de 9 semanas de vida. Los linfocitos se incubaron con anti-CD, anti-CD8 y un péptido de 15 meros marcado con FITC y después se analizaron por citometría de flujo. Se sometieron a selección las células en cuanto a CD4 (se incluyeron las poblaciones de CD4^{hi} y CD4^{lo}) y CD4 frente al péptido de 15 meros. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 4.

Se aislaron los linfocitos B de los bazo de ratones NOD. Se purificaron las células MHC-II⁺ clasificadas desde el total de linfocitos. Se tiñeron las células con el péptido de 15 meros marcado con FITC, anti-CD40, y marcadores de linfocitos B CD19 y CD21. Se sometieron a selección células MHC-II⁺ en cuanto a CD19⁺ y CD21⁺ y después se midió el péptido de 15 meros frente al anticuerpo Cd40. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 5.

En este estudio, se demuestra que una sustancial mayoría, el 90 % de los linfocitos T CD40⁺, también se unen al péptido de 15 meros, lo que demuestra que el péptido de 15 meros es muy específico para las células CD40⁺. Se demuestra asimismo que mientras el 90 % de los linfocitos B eran CD40 positivos, solo el 8 % de los linfocitos B se unieron al péptido de 15 meros.

Ejemplo 4

En este ejemplo se demuestra el nivel de células CD40 positivas en la sangre de sujetos diabéticos tipo I y sujetos no diabéticos (control).

Se obtuvo 1 ml de sangre completa de cada individuo y se incubó con péptido de 15 meros conjugado con biotina. A continuación, se expusieron las células a peroxidasa de rábano picante rusticano (HRP)- avidina, se lavaron y se determinó la absorbancia a 405 nm con un espectrofotómetro. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 6.

En este estudio se demuestra que glóbulos de pacientes que tienen diabetes tipo I, presentaron una mayor actividad de unión a péptidos de 15 meros que las células de controles no diabéticos.

Ejemplo 5

En este ejemplo se demuestra el nivel de granulación de insulina observado en el páncreas de ratones NOD tratados con el péptido de 15 meros o un péptido de ovoalbúmina.

Al inicio de la diabetes, se inyectaron a seis ratones NOD 100 µg/ml del péptido de 15 meros (SEQ ID NO: 9), lo que tuvo como resultado la reversión de la hiperglucemia en un 80 % de los receptores. Seis semanas después de la reversión de la hiperglucemia, se sacrificó a los ratones y se les extrajo el páncreas para su análisis. Se fijó el

páncreas, se seccionó y después se tiñó usando una tinción de aldehído/fuschsina que permite la detección de gránulos de insulina. Se puntuó la granulación del tejido de la siguiente manera: 4 = completamente granulado; 3 = 75 % de islotes granulados; 2 = 50 % de islotes granulados y peri-insulitis; 1 = 25 % de islotes granulados; 0 = no se detectaron gránulos de insulina. En la Figura 7, se muestran los resultados de este análisis.

Este análisis demuestra que el péptido de 15 meros conservó gránulos de insulina en la mayoría de los ratones y se mejoró significativamente en ratones diabéticos con reversión mediante el péptido en comparación con ratones diabéticos que recibieron un péptido no pertinente.

Ejemplo 6

En este ejemplo se demuestra el efecto de las mutaciones en el péptido de 15 meros en su capacidad para prevenir el inicio de diabetes.

Se diseñaron y produjeron péptidos tal como se describe en el Ejemplo 1. Se produjeron variantes de péptidos de modo que en cada variante, una glicina estaba sustituida por un aminoácido correspondiente a un aminoácido en las posiciones 1-9 de SEQ ID NO: 9, como sigue:

Gly 1	G-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N (SEQ ID NO: 11)
Gly 2	V-G-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N (SEQ ID NO: 12)
Gly 3	V-L-G-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N (SEQ ID NO: 13)
Gly 4	V-L-Q-G-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N (SEQ ID NO: 14)
Gly-5	V-L-Q-W-G-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N (SEQ ID NO: 15)
Gly-6	V-L-Q-W-A-G-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N (SEQ ID NO: 16)
Gly-7	V-L-Q-W-A-K-G-G-Y-Y-T-M-K-S-N (SEQ ID NO: 17)
Gly-9	V-L-Q-W-A-K-K-G-G-Y-T-M-K-S-N (SEQ ID NO: 18)
Gly-10	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-G-T-M-K-S-N (SEQ ID NO: 19)
Gly-11	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-G-M-K-S-N (SEQ ID NO: 20)
Gly-12	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-G-K-S-N (SEQ ID NO: 21)

Se colocaron los ratones NOD en grupos de 10 y se inyectó a los ratones de cada grupo IV, semanalmente, 50 µg de péptido de tipo silvestre (WT; leyenda) o uno de los péptido variantes (en PBD, pH 7,2) enumerados. Se llevó un seguimiento del desarrollo de la diabetes midiendo los niveles de glucosa en sangre semanalmente. Se consideró que los ratones eran "diabéticos" cuando la glucosa en sangre fue de 250 mg/dl o más en 2 lecturas consecutivas. Las inyecciones comenzaron a las 6 semanas de vida = pre-diabetes.

En este ejemplo se demuestra que la sustitución de una glicina en cualquiera de las posiciones 1-7 o 9-12 reduce la capacidad del péptido de 15 meros de inhibir el desarrollo de diabetes. También muestra que dichas mutaciones no eliminan por completo la capacidad del péptido de 15 meros mutado para inhibir el desarrollo de la diabetes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wagner, David

<120> PÉPTIDOS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE LINFOCITOS T Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 2848-113-PCT

<140> Aún no asignado

<141> 19-10-2011

<150> 61/394.699

<151> 19-10-2010

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 260

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

ES 2 677 844 T3

Met	Ile	Glu	Thr	Tyr	Ser	Gln	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser	Val	Ala	Thr	Gly
1				5					10					15	
Leu	Pro	Ala	Ser	Met	Lys	Ile	Phe	Met	Tyr	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Leu
			20					25					30		
Ile	Thr	Gln	Met	Ile	Gly	Ser	Val	Leu	Phe	Ala	Val	Tyr	Leu	His	Arg
		35					40					45			
Arg	Leu	Asp	Lys	Val	Glu	Glu	Glu	Val	Asn	Leu	His	Glu	Asp	Phe	Val
	50					55					60				
Phe	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Cys	Asn	Lys	Gly	Glu	Gly	Ser	Leu	Ser
65					70					75					80
Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Met	Arg	Arg	Gln	Phe	Glu	Asp	Leu	Val	Lys
				85					90					95	
Asp	Ile	Thr	Leu	Asn	Lys	Glu	Glu	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Phe	Glu	Met
			100					105					110		
Gln	Arg	Gly	Asp	Glu	Asp	Pro	Gln	Ile	Ala	Ala	His	Val	Val	Ser	Glu
		115					120					125			
Ala	Asn	Ser	Asn	Ala	Ala	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Lys	Lys	Gly	Tyr
	130					135					140				
Tyr	Thr	Met	Lys	Ser	Asn	Leu	Val	Met	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Gln	Leu
145					150					155					160

Thr Val Lys Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Thr Gln Val Thr Phe
165 170 175

Cys Ser Asn Arg Glu Pro Ser Ser Gln Arg Pro Phe Ile Val Gly Leu
180 185 190

Trp Leu Lys Pro Ser Ser Gly Ser Glu Arg Ile Leu Leu Lys Ala Ala
195 200 205

Asn Thr His Ser Ser Ser Gln Leu Cys Glu Gln Gln Ser Val His Leu
210 215 220

Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val
225 230 235 240

Thr Glu Ala Ser Gln Val Ile His Arg Val Gly Phe Ser Ser Phe Gly
245 250 255

Leu Leu Lys Leu
260

<210> 2

<211> 261

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

5

10

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 3

Lys Gly Tyr Tyr
1

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 4

ES 2 677 844 T3

Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr
1 5

5
<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Péptido sintético
<400> 5

Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
1 5

15
<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Péptido sintético
<400> 6

Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
1 5

25
<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Péptido sintético
<400> 7

Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys Ser Lys
1 5 10 15

35
<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> Péptido sintético
<400> 8

Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn
1 5 10 15

45
<210> 9
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50
<220>

<223> Péptido sintético

<400> 9

Asn Ala Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
1 5 10 15

Lys Ser Asn Leu Val Met Leu Glu
20

5

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

15 <400> 10

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

Arg

20 <210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Péptido sintético

<400> 11

Gly Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys Ser Asn
1 5 10 15

30 <210> 12
<211> 15
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 12

40 Val Gly Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys Ser Asn
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

50 <400> 13

ES 2 677 844 T3

		Val	Leu	Gly	Trp	Ala	Lys	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Met	Lys	Ser	Asn
		1				5					10					15
5		<210> 14 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
10		<220> <223> Péptido sintético														
		Val	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Met	Lys	Ser	Asn
		1				5					10					15
15		<210> 15 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
20		<220> <223> Péptido sintético														
		<400> 15														
		Val	Leu	Gln	Trp	Gly	Lys	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Met	Lys	Ser	Asn
25		1				5					10					15
30		<210> 16 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
35		<220> <223> Péptido sintético														
		<400> 16														
		Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Gly	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Met	Lys	Ser	Asn
		1				5					10					15
40		<210> 17 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
45		<220> <223> Péptido sintético														
		<400> 17														
		Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Lys	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Met	Lys	Ser	Asn
50		1				5					10					15
55		<210> 18 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <400> 18

Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Gly Tyr Thr Met Lys Ser Asn
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Péptido sintético

15 <400> 19

Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Gly Thr Met Lys Ser Asn
 1 5 10 15

20 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 20

Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Gly Met Lys Ser Asn
 1 5 10 15

30

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Péptido sintético

40 <400> 21

Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Gly Lys Ser Asn
 1 5 10 15

45 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 22

Ile	Ser	Gln	Ala	Val	His	Ala	Ala	His	Ala	Glu	Ile	Asn	Glu	Ala	Gly
1				5					10					15	

Arg

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 23

Tyr	Val	Gln	Gly	Lys	Ala	Asn	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	Met	Tyr	Thr
1				5					10					15

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que inhibe la unión de CD40 con CD154 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un paciente, en donde dicho péptido tiene una longitud menor de 20 aminoácidos y comprende al menos una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8.
2. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y síndrome de dificultad respiratoria aguda.
3. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido tiene una longitud de 6 a 15 aminoácidos y comprende una secuencia núcleo que consiste en SEQ ID NO: 3.
4. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene una longitud de 6 a 15 aminoácidos.
5. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido es SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8.
6. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido se une a una proteína CD40 con una Kd mayor de 10^6 .
7. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido inhibe la interacción de CD40 con CD154 de tal manera que impide la expansión de linfocitos Th40.
8. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido inhibe la interacción de CD40 con CD154 de tal manera que reduce el número de linfocitos Th40.
9. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido inhibe la interacción entre CD40 y CD154 de tal manera que altera el perfil de expresión de citoquina de una población de células tratadas con dicho péptido.
10. Un método *in vitro* para inhibir la interacción entre una proteína CD40 y una proteína CD154, que comprende poner en contacto dicha proteína CD40 con el péptido de la reivindicación 1 que se une a dicha proteína CD40 en el sitio de unión a CD154, inhibiendo de este modo la interacción de dichas proteínas CD40 y CD154.

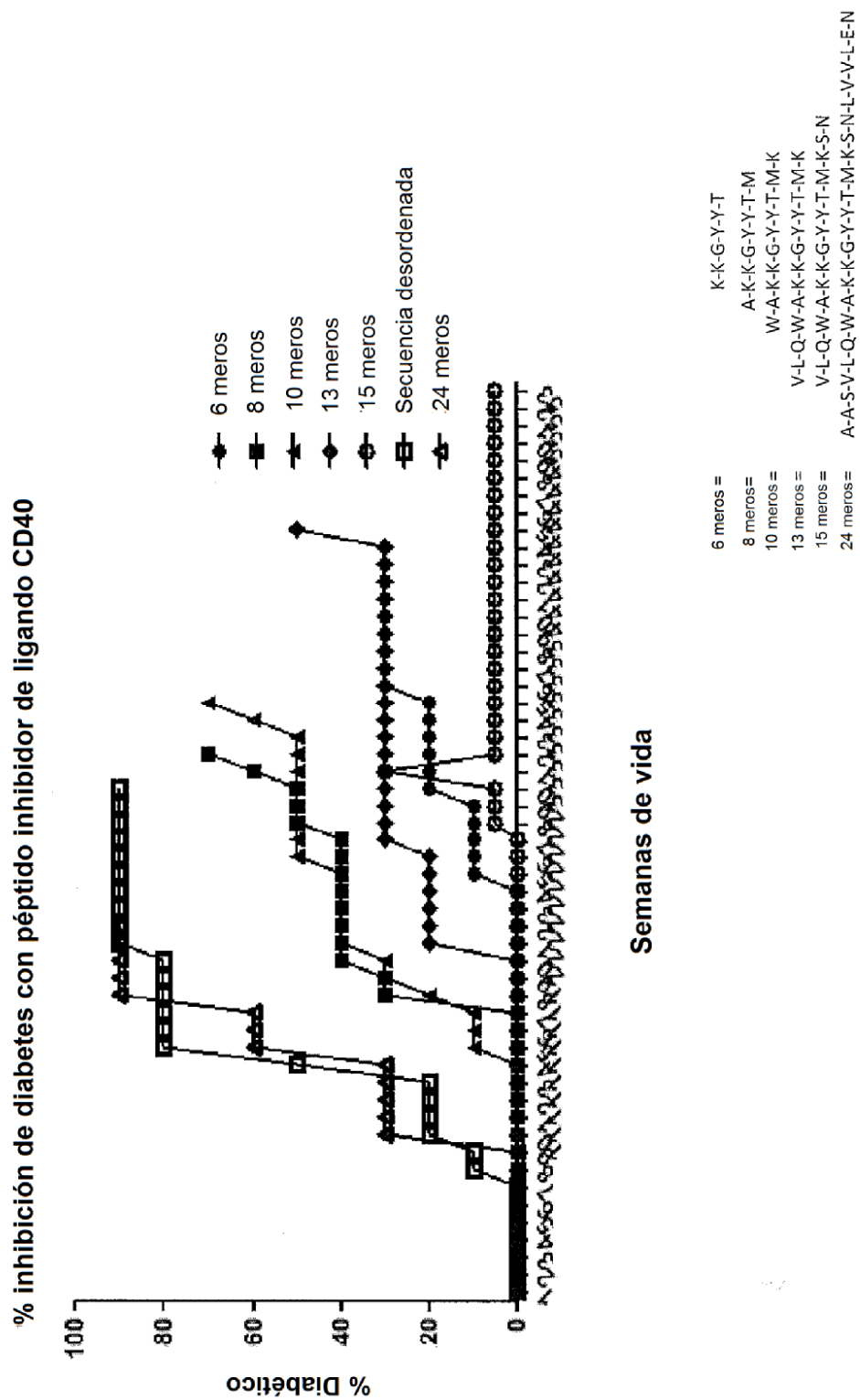
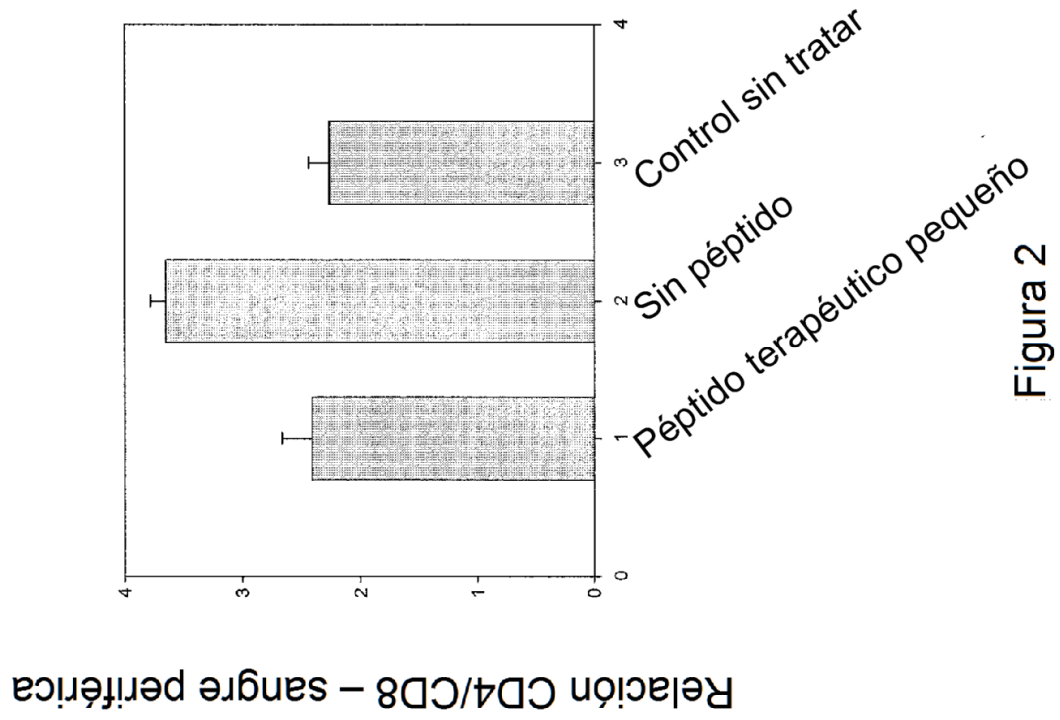


Figura 1



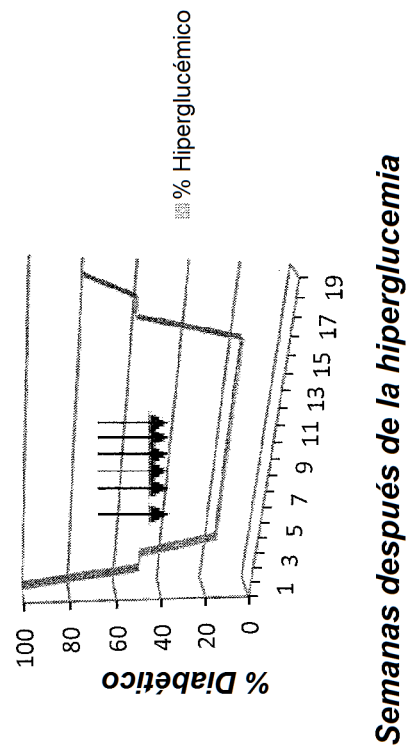


Figura 3

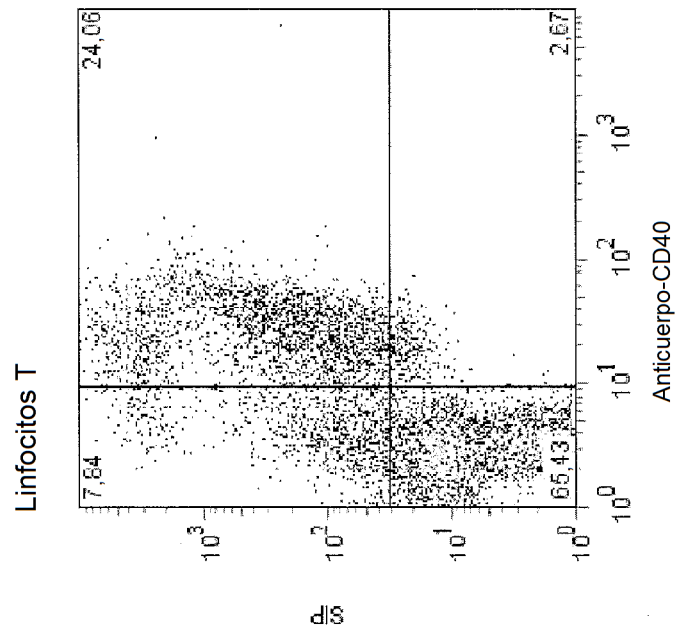


Figura 4

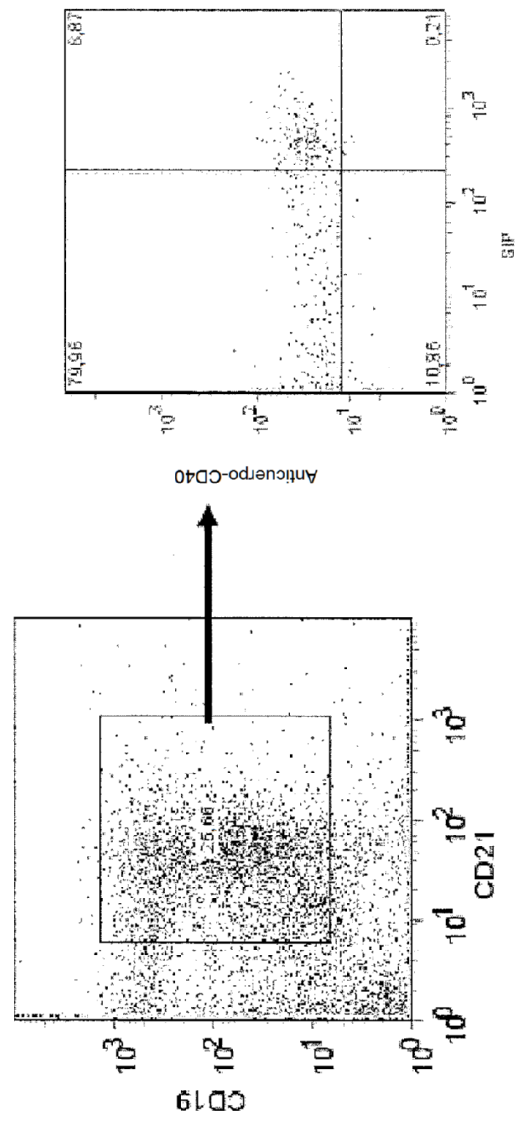


Figura 5

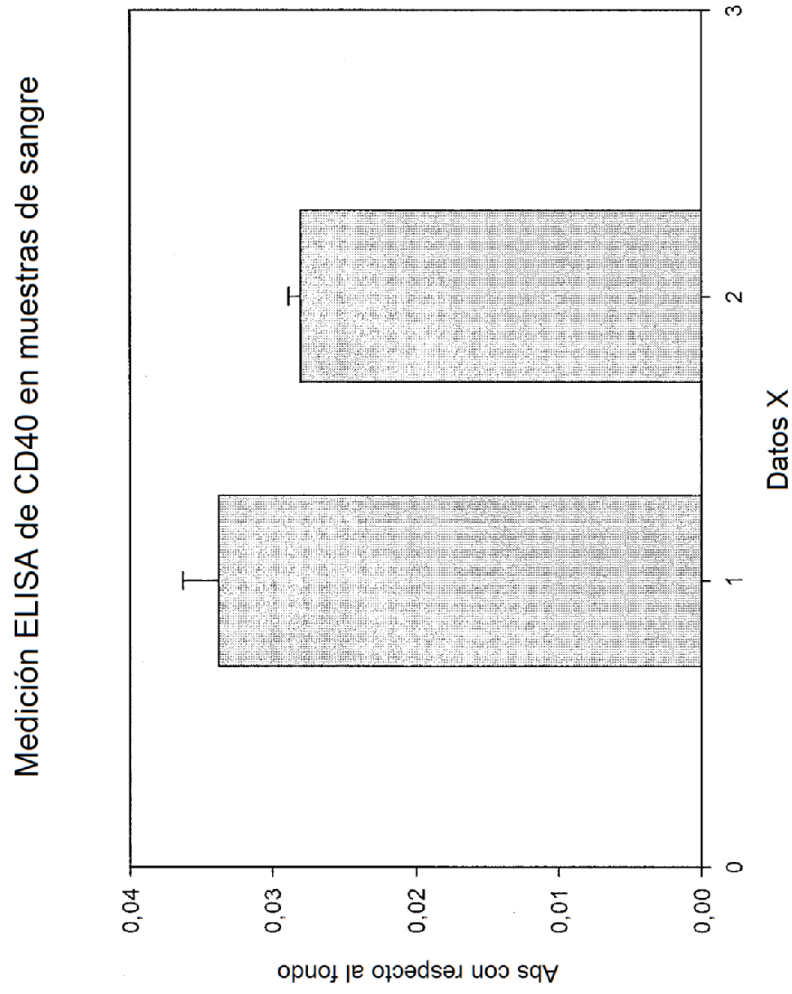


Figura 6

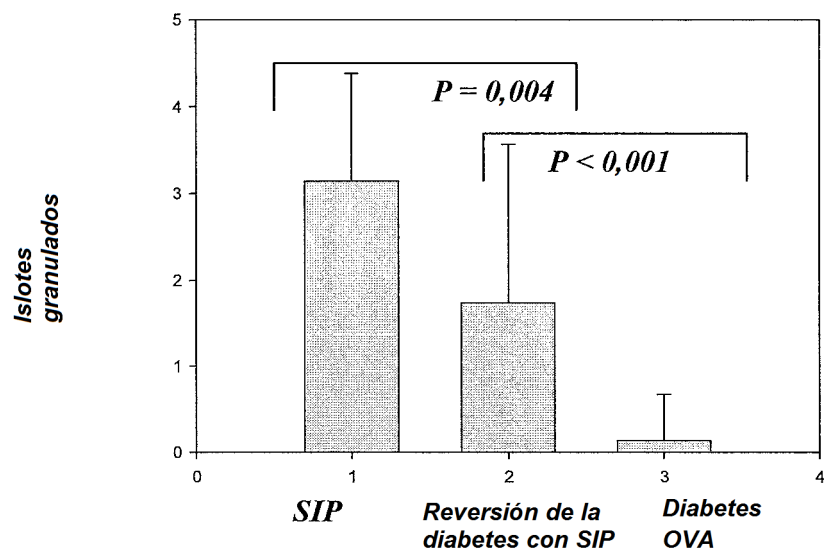


Figura 7

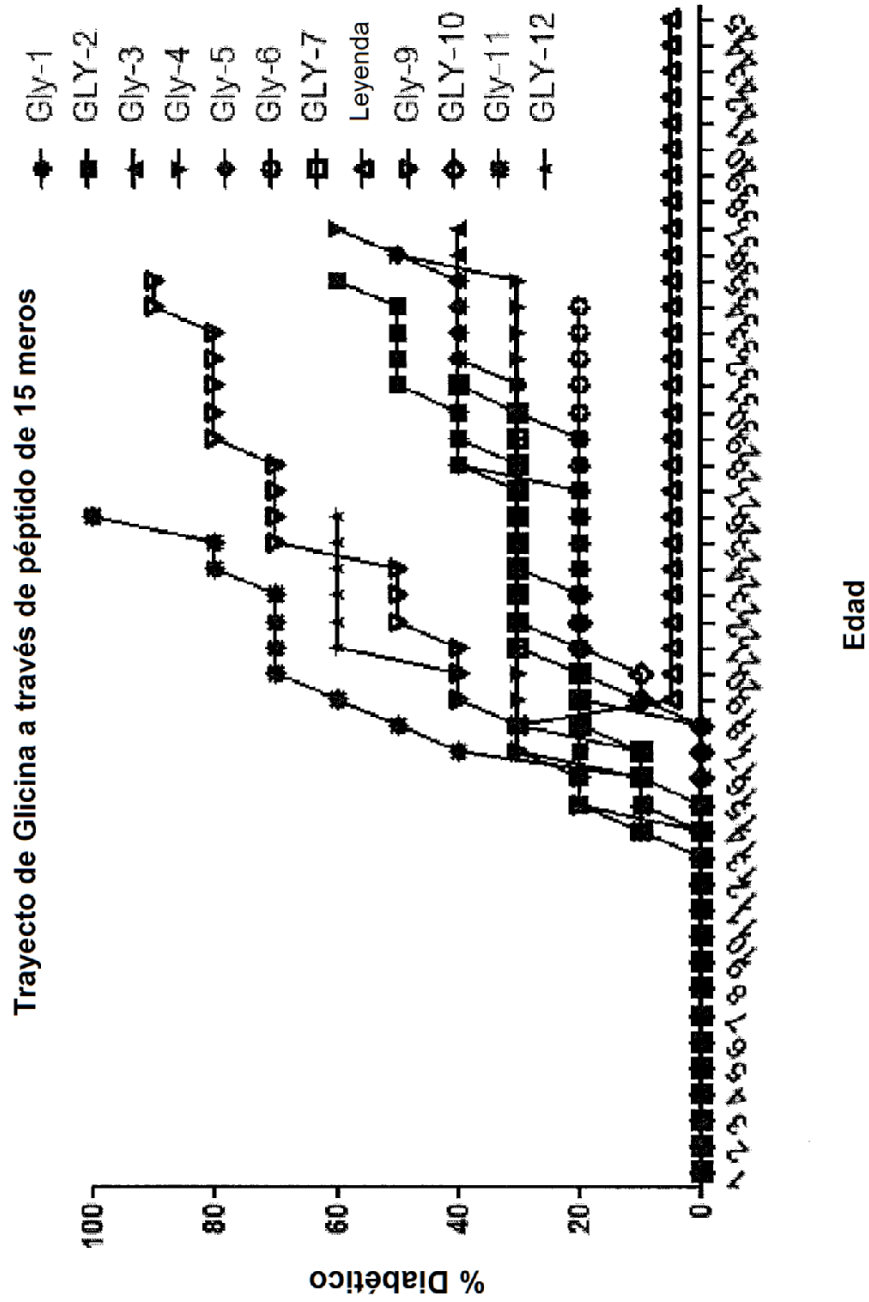


Figura 8