

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 660**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2014 PCT/IB2014/058234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14111841**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2014 E 14703176 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2945965**

54 Título: **Péptido**

30 Prioridad:
15.01.2013 GB 201300683

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2018

73 Titular/es:
**APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED
(100.0%)
Riverside Court Beaufort Park
ChepstowGwent NP16 5UH, GB**

72 Inventor/es:
**WRAITH, DAVID;
STREETER, HEATHER y
ORDONEZ, LAURENCE**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 694 660 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

Péptido

5 La presente invención se refiere a péptidos de la proteína proteolipídica (PLP). En particular, la invención se refiere a péptidos que derivan de una de las regiones hidrófilas de PLP que son capaces de unirse a una molécula de MHC y presentarse a un linfocito T *in vitro* sin el procesamiento del antígeno. La invención también se refiere al uso de tales péptidos en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad.

10 Antecedentes

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad degenerativa crónica que afecta al sistema nervioso central, caracterizada por la desmielinización de los axones nerviosos. La EM puede provocar numerosos síntomas físicos y mentales, y a menudo progresa hacia una discapacidad tanto física como cognitiva. La aparición de la enfermedad normalmente tiene lugar en adultos jóvenes (20-40 años), es más común en mujeres, y afecta a más de 1 millón de personas en todo el mundo.

15 El trascurso de la enfermedad de EM es variado y puede permanecer latente o progresar de manera constante a lo largo del tiempo. Se han descrito varios subtipos de EM en función de los patrones de progresión. Una persona con EM puede padecer casi cualquier síntoma o signo neurológico, incluyendo cambios en la sensibilidad tales como pérdida de sensibilidad u hormigueo, pinchazos o entumecimiento (hipoestesia y parestesia), debilidad muscular, clono, espasmos musculares o dificultad de movimiento; dificultades con la coordinación y el equilibrio (ataxia); problemas en el habla (disartria) o en la deglución (disfagia), problemas visuales (nistagmo, neuritis óptica, incluyendo fosfenos o diplopía), cansancio, dolor agudo o crónico, y problemas de vejiga y de intestino.

20 Actualmente se cree que la EM es un trastorno mediado por el sistema inmunitario en el que el propio sistema inmunitario del cuerpo ataca y daña a la mielina.

30 No se conoce una cura para la EM. Varias terapias han demostrado beneficios en la restauración de las funciones tras un ataque (recidiva), en la prevención o en la reducción del grado o de la frecuencia de nuevos ataques (recidivas) o en la prevención o en la reducción del alcance de la discapacidad. Sin embargo, muchas terapias actuales de EM se han asociado con efectos adversos o se toleran mal. Por lo tanto, hay una necesidad de terapias alternativas para la EM que sean eficaces en el tratamiento de EM y en el alivio o la reducción de los síntomas de EM.

35 Sumario de la invención

Los presentes inventores han identificado una serie de péptidos que derivan de la proteína proteolipídica (PLP) que se pueden presentar mediante células presentadoras de antígeno fijas a los linfocitos T. Estos péptidos pueden ser útiles en la prevención y/o en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes tales como esclerosis múltiple.

40 En un primer aspecto, por lo tanto, la presente invención proporciona un péptido que es capaz de unirse a una molécula de MHC *in vitro* y de ser presentado a un linfocito T sin procesamiento de antígeno, y que se selecciona de los siguientes péptidos de PLP:

45 PLP 39-53: LTGTEKLIETYFSKN (SEQ ID NO. 7)
 PLP 42-56: TEKLIETYFSKNYQD (SEQ ID NO. 8) y
 PLP 43-57: EKLIETYFSKNYQDY (SEQ ID NO. 9).

50 En un segundo aspecto, se proporciona un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad desmielinizante.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

55 En el presente tratamiento se describe un método para el tratamiento y/o para la prevención de una enfermedad desmielinizante en un sujeto que necesite los mismos que comprende la etapa de administrar un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención al sujeto.

60 En el presente documento se describe el uso de un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para su uso en la prevención y/o en el tratamiento de una enfermedad desmielinizante.

En conexión con el segundo aspecto de la invención, la enfermedad puede ser esclerosis múltiple.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1 - Figura 1: Tres péptidos de PLP responden *in vitro* e *in vitro*, y la respuesta se correlaciona con la predicción de unión de DR2. A, representa a grandes rasgos la predicción de unión de los péptidos de PLP a HLA-DRB1*1501 en simulación computacional (métodos de IEDB y NetMHCII) y la capacidad de estos péptidos para inducir una respuesta proliferativa en estos ratones. B y C representan la capacidad de 4 de estos péptidos largos para inducir EAE (2 experimentos individuales).

10 Figura 2- - Identificación de apítomos en HEAL-26

Figura 3- - Identificación de apítomos en TWTT-28

Figura 4- - Identificación de apítomos en GVLP-28

15 Figura 5 - Protocolo de tolerancia

Figura 6 - Proliferación y producción de citocina de LNC de ratones pretratados con HEAL-26 o POP-4. A, representa la media +/- el error estándar de la media (EEM) de la incorporación de timidina de LNC de ratones pretratados con HEAL-26 o el apítomo POP-4.

20 Figura 7 - Proliferación y producción de citocina de SPL de ratones pretratados con HEAL-26 o POP-4. A, representa la media +/- EEM de la incorporación de timidina de SPL de ratones pretratados con HEAL-26 o el apítomo POP-4.

25 Figura 8 - Proliferación y producción de citocina de LNC de ratones pretratados con TWTT-28. A, representa la media +/- EEM de la incorporación de timidina de LNC de ratones pretratados con apítomo de TWTT-28.

Figura 9 - Proliferación y producción de citocina de SPL de ratones pretratados con TWTT-28. A, representa la media +/- EEM de la incorporación de timidina de SPL de ratones pretratados con apítomo de TWTT-28.

30 Figura 10 - Proliferación y producción de citocina de LNC de ratones pretratados con POP-15. A, representa la media +/- EEM de la incorporación de timidina de LNC de ratones pretratados con apítomo de POP-15.

35 Figura 11 - Proliferación y producción de citocina de SPL de ratones pretratados con POP-15. A, representa la media +/- EEM de la incorporación de timidina de SPL de ratones pretratados con apítomo de POP-15.

Figura 12 - Proliferación y producción de citocina de LNC de ratones pretratados con POP-22. A, representa la media +/- EEM de la incorporación de timidina de LNC de ratones pretratados con apítomo de POP-22.

40 Figura 13 - Proliferación de SPL de ratones pretratados con POP-22. A, representa la media +/- EEM de la incorporación de timidina de SPL de ratones pretratados con apítomo de POP-22.

45 Figura 14 - Proliferación y producción de citocina de LNC de ratones pretratados con POP-22 o GVLP-28. A, representa la media +/- EEM de la incorporación de timidina de LNC de ratones pretratados con POP-22 (panel izquierdo) o el apítomo GVLP-28 (panel derecho).

50 Figura 15 - Proliferación y producción de citocina de SPL de ratones pretratados con POP-22 y GVLP-28. A, representa la media +/- EEM de la incorporación de timidina de SPL de ratones pretratados con POP-22 o el apítomo GVLP-28.

55 Para cada una de las Figuras 6 a 15, B, muestra el índice de estimulación de la incorporación de timidina. C, representa la cantidad de citocina secretada en el sobrenadante del cultivo. En B y C, cada punto por dosis representa un ratón individual y la barra representa la mediana. Se calculó el p usando el test de Mann-Whitney. Solo se muestran los p-valoros bajos. Un p-valor <0,05 se considera significativo.

Descripción detallada

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido.

60 *Péptidos*

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

65

Un péptido de la presente invención es de una longitud que es capaz de unirse a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I o de clase II *in vitro* y ser presentada a un linfocito T sin el procesamiento del antígeno. En otras palabras, los péptidos son capaces de unirse directamente al surco de unión al péptido de la molécula de MHC sin requerir ningún recorte en uno o en ambos extremos.

Los péptidos que se unen a las moléculas de MHC de clase I son normalmente de 7 a 13, más normalmente de 8 a 10 aminoácidos de longitud. La unión del péptido se establece en sus dos extremos mediante contactos entre átomos en la cadena principal del péptido y los sitios invariantes en el surco de unión al péptido de todas las moléculas de MHC de clase I. Hay sitios invariantes en ambos extremos del surco que se unen a los extremos amino terminal y carboxilo terminal del péptido. Las variaciones en la longitud del péptido se acomodan mediante un retorcimiento en la estructura principal del péptido, a menudo en restos de prolina o de glicina que permiten la flexibilidad requerida.

Los péptidos que se unen a las moléculas de MHC de clase II normalmente son de entre 8 y 20 aminoácidos de longitud, más normalmente entre 10 y 17 aminoácidos de longitud, y pueden ser mucho más largas. Estos péptidos se encuentran en una conformación extendida a lo largo del surco de unión al péptido del MHC II que (a diferencia del surco de unión al péptido del MHC de clase II) está abierto en ambos extremos. El péptido se mantiene en su lugar principalmente mediante contactos atómicos de la cadena principal con restos conservados que recubren el surco de unión al péptido.

El péptido de la presente invención se puede preparar usando métodos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlín). Por ejemplo, se pueden sintetizar péptidos mediante técnicas de fase sólida (Roberge JY et al (1995) Science 269: 202-204), escindirlos de la resina, y purificarlos mediante cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (por ejemplo, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman y Co, Nueva York, NY). La síntesis automática se puede lograr, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 43 1 A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

El péptido se puede crear de manera alternativa por medios recombinantes o mediante escisión a partir de un polipéptido más largo. Por ejemplo, el péptido se puede obtener mediante escisión a partir de la proteína proteolipídica de la mielina. La composición de un péptido se puede confirmar mediante análisis de aminoácidos o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman).

Proteína proteolipídica de la mielina (PLP)

La mielina es un material dieléctrico (aislante eléctrico) que forma una capa, la vaina de mielina, normalmente alrededor del axón de una neurona. Es esencial para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso. Algunas de las proteínas que constituyen la mielina son la proteína básica de la mielina (MBP), la glucoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG), y la proteína proteolipídica (PLP).

La proteína proteolipídica de la mielina (PLP), la proteína más abundante de la mielina del sistema nervioso central (SNC), es una proteína integral de membrana hidrófoba.

La secuencia de la PLP humana se muestra en la SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 16

```

1  glleccarc lvgapfaslv atglcffgva lfcgcgheal tgtekliety fsknyqdyey
60  linvihafqy viygtasfff lygallllaeg fyttgavrqi fgdyktticg kglSATVTGG
120 qkgrgsrgqh qahslervch clgkwlghpd kfvgityalt vwlllvfacs avpvyyifnt
180 wttcqsiafp sktsasigsl cadarmygvL pwnafpgkvc gsnllsickt aefqmtfhlf
240 iaafvgaaat lvslltfmia atynfavlkl mgrgtkf

```

El péptido de la invención deriva de una región hidrófila de la secuencia de la PLP. El péptido puede derivar de un fragmento del antígeno que se genera mediante procesamiento natural del antígeno mediante una célula presentadora de antígeno.

Las regiones hidrófilas de PLP son:

PLP 36-61: HEALTHTEKLIETYFSKNYQDYEYLI (SEQ ID No. 17)
 PLP 88-119: EGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKGLSATVTGG (SEQ ID No. 18)
 PLP 104-135: KTTICGKGLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHSLE (SEQ ID No. 19)
 PLP 119-150: GQKGRGSRGQHQAHSLERVCHCLGKWLGHDPK (SEQ ID No. 20)
 PLP 179-206: TWTCQSIAPSKTSASIGSLCADARMY (SEQ ID No. 21)
 PLP 192-219: TSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVC (SEQ ID No. 22)

PLP 207-234: GVLPWNAFPGKVCGSNLLSICKTAEFQM (SEQ ID No. 23)
 PLP 260-276: ATYNFAVLKLMGRGTFK (SEQ ID No. 24)

5 El péptido comprende una parte de la siguiente región de la proteína proteolípida (PLP):
 PLP 36-61: HEALTGTEKLIETYFSKINYQDYELYI (SEQ ID NO. 1)

El péptido comprende una parte de la siguiente región:
 PLP 39-57: LTGTEKLIETYFSKINYQDY (SEQ ID NO. 4)

10 El péptido se selecciona de los siguientes péptidos de PLP:

PLP 39-53: LTGTEKLIETYFSKN (SEQ ID NO. 7)
 PLP 42-56: TEKLIETYFSKINYQD (SEQ ID NO. 8) y
 PLP 43-57: EKLIETYFSKINYQDY (SEQ ID NO. 9).

15 *Apítopos*

En la respuesta inmunitaria adaptativa, los linfocitos T son capaces de reconocer los epítomos internos de un antígeno proteico. Las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *antigen presenting cells*) cogen los antígenos proteicos y los degradan en fragmentos de péptidos cortos. Un péptido se puede unir a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II dentro de la célula y ser transportado a la superficie celular. Cuando se presenta en la superficie celular en conjunto con una molécula del MHC, el péptido puede ser reconocido por un linfocito T (a través del receptor del linfocito T (TCR, del inglés *T cell receptor*)), en cuyo caso, el péptido es un epítomo del linfocito T.

25 Los epítomos de los linfocitos T desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria adaptativa para cualquier antígeno, tanto propio como extraño. El papel principal desempeñado por los epítomos de los linfocitos T en las enfermedades de hipersensibilidad (que incluye las alergias, las enfermedades autoinmunes y el rechazo al trasplante) se ha demostrado mediante el uso de modelos experimentales. Es posible inducir enfermedades inflamatorias o alérgicas mediante la inyección de péptidos sintéticos (basándose en la estructura de los epítomos de los linfocitos T) en combinación con adyuvante.

30 Por el contrario, se ha demostrado que es posible inducir una tolerancia inmunológica hacia determinados epítomos peptídicos mediante la administración de epítomos peptídicos en forma soluble.

35 Se ha demostrado que los antígenos peptídicos solubles son un medio eficaz de inhibición de la enfermedad en encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE - un modelo para la esclerosis múltiple (EM)) (Metzler y Wraith (1993) *Int. Immunol.* 5:1159-1165; Liu y Wraith (1995) *Int. Immunol.* 7:1255-1263; Anderton y Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261); y modelos experimentales de artritis, diabetes y uveorretinitis (revisado en Anderton y Wraith (1998) como anteriormente). También se ha demostrado que es un medio de tratamiento de una enfermedad en curso en EAE (Anderton y Wraith (1998) como anteriormente).

45 El uso de los péptidos tolerogénicos para tratar o prevenir la enfermedad ha llamado mucho la atención. Un motivo para ello es que se ha demostrado que determinados epítomos tolerogénicos pueden regular de manera negativa las respuestas de los linfocitos T para distintos antígenos dentro del mismo tejido. Este fenómeno, conocido como "supresión espectador" significa que debería ser posible inducir tolerancia a más de un epítomo (preferentemente todos los epítomos) dentro de un antígeno dado, y a más de un antígeno para una enfermedad dada, usando un péptido tolerogénico concreto (Anderton y Wraith (1998) como anteriormente). Esto obviaría la necesidad de identificar todos los antígenos patógenos dentro de una enfermedad en particular.

50 Los péptidos también son una opción favorable para la terapia debido a su coste relativamente bajo y al hecho de que se pueden producir análogos de péptidos con propiedades inmunológicas alteradas. Por lo tanto, se pueden modificar los péptidos para alterar sus interacciones bien con el MHC o con el TCR.

55 Un posible problema con esta estrategia es que se ha demostrado que no todos los péptidos que actúan como epítomos de linfocitos T son capaces de inducir tolerancia. El péptido 89-101 de la proteína básica de la mielina (MBP) es un antígeno inmunodominante tras la inmunización y también es un inmunogénico muy eficaz en tanto en términos de primovacunación para la reactividad de linfocitos T como de la inducción de EAE. Sin embargo, se ha demostrado que este péptido es ineficaz en la inducción de la tolerancia cuando se administra en solución (Anderton y Wraith (1998), como anteriormente).

60 Se han propuesto una serie de explicaciones para la jerarquía observada en la capacidad de los epítomos de linfocitos T para inducir tolerancia (revisado en Anderton y Wraith (1998), como anteriormente). En particular, se ha propuesto que hay una correlación entre la afinidad del péptido por el MHC y la tolerogenicidad (Liu y Wraith (1995) como anteriormente), pero esto no concuerda con algunas de las observaciones. Por ejemplo, MBP [89-101], que no es

tolerogénico, se une a I-A^S con una afinidad relativamente alta. Por lo tanto, no es sencillo predecir qué péptidos inducirán tolerancia.

Los presentes inventores han demostrado que, si un epítipo peptídico es de un tamaño apropiado para ser presentado por las APC inmaduras sin el procesamiento del antígeno, puede inducir tolerancia inmunológica (Solicitud de patente internacional número PCT/GB01/03702). La observación de que algunos epítipos de linfocitos T son tolerogénicos y otros son incapaces de inducir tolerancia se puede explicar, por lo tanto, por el hecho de que algunos epítipos requieren el procesamiento del antígeno antes de que sean capaces de ser presentados por una molécula del MHC. Estos epítipos que requieren un procesamiento adicional no inducen tolerancia cuando se administran en una forma soluble, a pesar de su capacidad para inducir la enfermedad cuando se inyectan en combinación con adyuvante.

Los epítipos que no requieren procesamiento adicional son capaces de inducir tolerancia, y se han denominado "apítipos" (del inglés *Antigen Processing Independent epiTOPES*, epítipos independientes del procesamiento de antígeno) por los inventores.

Sistemas de presentación independiente del procesamiento de antígeno (APIPS, del inglés Antigen Processing Independent Presentation Systems)

Los péptidos de la presente invención son capaces de unirse a una molécula del MHC *in vitro* y ser presentada a un linfocito T sin el procesamiento del antígeno.

Es posible probar si un péptido es capaz de unirse a una molécula de MHC sin el procesamiento del antígeno usando un sistema "sin procesamiento". Dicho sistema debería de ser capaz de presentar el antígeno mediante moléculas del MHC a los linfocitos T, pero incapaz de procesar el antígeno. Por lo tanto, se puede probar la capacidad de los péptidos para unirse a una molécula del MHC *in vitro* y de ser presentados a un linfocito T sin el procesamiento del antígeno usando un sistema de presentación independiente del procesamiento del antígeno (APIPS).

Los ejemplos de APIPS incluyen:

- a) APC fija (con o sin anticuerpos para CD28);
- b) Membranas lipídicas que contienen moléculas de MHC de clase I o II (con o sin anticuerpos para CD28); y
- c) MHC natural o recombinante purificado en forma de placa (con o sin anticuerpos contra CD28).

Se conoce el uso de APC fija para investigar respuestas de linfocitos T, por ejemplo, en estudios para investigar el epítipo mínimo dentro de un polipéptido, midiendo la respuesta a los péptidos truncados (Fairchild et al (1996) *Int. Immunol.* 8:1035-1043). La APC se puede fijar usando, por ejemplo, formaldehído (normalmente paraformaldehído) o glutaraldehído.

Las membranas lipídicas (que pueden ser membranas planas o liposomas) se pueden preparar usando lípidos artificiales o pueden ser partes de membrana plasmática/microsomas de la APC.

Cuando están en uso, los APIPS se pueden aplicar a los pocillos de una placa de cultivo tisular. Después se añaden los antígenos peptídicos y se detecta la unión del péptido a la parte del MHC del APIPS mediante la adición de líneas o de clones de linfocitos T. La activación de la línea o del clon de los linfocitos T se puede medir mediante cualquiera de los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, a través de la incorporación de ³H-timidina o mediante la secreción de citocina.

Si un péptido es capaz de ser presentado a un linfocito T mediante un APIPS, entonces es capaz de unirse a la molécula del MHC sin el procesamiento del antígeno, y es un apítipo.

Tolerancia

Los péptidos de la presente invención son capaces de inducir tolerancia a la proteína proteolipídica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tolerogénico" significa capaz de inducir tolerancia.

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

La tolerancia puede ser resultado de o caracterizarse por la inducción de anergia en al menos una parte de los linfocitos T CD4+. Con el fin de activar un linfocito T, un péptido se debe asociar con una APC "profesional" capaz de enviar dos señales a los linfocitos T. La primera señal (señal 1) se envía mediante el complejo MHC-péptido en la superficie celular de la APC y la recibe el linfocito T a través del TCR. La segunda señal (señal 2) se envía mediante moléculas coestimuladoras sobre la superficie de la APC, tales como CD80 y CD86, y la recibe CD28 sobre la superficie de los linfocitos T. Se piensa que cuando un linfocito T recibe la señal 1 en ausencia de señal 2, no se activa y, de hecho, se vuelve anérgico. Los linfocitos T anérgicos son insensibles a posteriores exposiciones al antígeno, y pueden ser capaces de suprimir otras respuestas inmunitarias. Se cree que los linfocitos T anérgicos están implicados en la mediación de la tolerancia de los linfocitos T.

Los péptidos que requieren el procesamiento antes de que puedan ser presentados en conjunto con las moléculas del MHC no inducen tolerancia debido a que tienen que ser manejados por células presentadoras de antígeno maduras. Las células presentadoras de antígeno maduras (tales como macrófagos, linfocitos B y células dendríticas) son capaces de procesar el antígeno, pero también de enviar ambas señales, 1 y 2, a un linfocito T, lo que lleva a la activación de linfocitos T. Los apítosos, por otro lado, serán capaces de unirse al MHC de clase II sobre las APC inmaduras. Por lo tanto, serán presentados a los linfocitos T sin la coestimulación, lo que lleva a la anergia de los linfocitos T y a la tolerancia.

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

Se ha demostrado que, cuando se induce la tolerancia, se reduce la capacidad para proliferar de los linfocitos T CD4+ específicos de antígeno. También, la producción de IL-2, IFN- γ y la producción de IL-4 por estas células se regula de manera negativa, pero aumenta la producción de IL-10. Se ha demostrado que la neutralización de IL-10 en un estado de tolerancia inducida por péptidos restaura por completo la susceptibilidad a la enfermedad. Se ha propuesto que una población de células reguladoras persiste en un estado tolerante, lo que produce IL-10 y media la regulación inmunitaria (Burkhart et al (1999) Int. Immunol. 11:1625-1634).

La inducción de tolerancia, por lo tanto, se puede controlar mediante diversas técnicas que incluyen:

- (a) susceptibilidad reducida para contraer la enfermedad para la que el péptido es un epítipo diana *in vivo*;
- (b) la inducción de anergia en linfocitos T CD4+ (que se puede detectar mediante la posterior exposición con antígeno *in vitro*);
- (c) cambios en la población de linfocitos T CD4+, que incluyen
 - (i) reducción en la proliferación;
 - (ii) regulación negativa en la producción de, por ejemplo, IL-2, IFN- γ e IL-4; y
 - (iii) aumento en la producción de IL-10.

Enfermedades diana

El péptido de la invención se puede usar en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad.

La enfermedad puede ser una enfermedad desmielinizante, tal como adrenoleucodistrofia, enfermedad de desaparición de la materia blanca o esclerosis múltiple (EM).

Los péptidos de la presente invención son particularmente útiles en el tratamiento y/o en la prevención de esclerosis múltiple (EM). La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por múltiples lesiones desmielinizantes diseminadas a través de la materia blanca del SNC y que tiene lugar en diversas zonas y momentos (McFarlin y McFarland, 1982 New England J. Medicine 307:1183-1188 and 1246-1251). Se cree que la EM está mediada por los linfocitos T autorreactivos.

Composición farmacéutica

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos del primer aspecto de la invención.

Los presentes inventores predicen que, a pesar de la "supresión espectador" puede ser necesario dirigir una serie de diferentes clones de linfocitos T con el fin de inducir tolerancia de manera eficaz. Por lo tanto, se pueden administrar multitud de péptidos a un individuo con el fin de prevenir o tratar una enfermedad.

La composición farmacéutica puede, por ejemplo, comprender entre 1 y 20 apítosos, por ejemplo, 1 a 15, 2 a 8 o 4 a 6 apítosos.

Cuando hay dos o más apítopos, la composición farmacéutica puede estar en la forma de un kit, en la que algunos o cada uno de los apítopos se proporcionan de forma separada para la administración simultánea, separada o secuencial.

- 5 Como alternativa (o además) si la composición farmacéutica (o cualquier parte de la misma) se va a administrar en múltiples dosis, se puede envasar cada dosis por separado.

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

- 10 También, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el o cada apítopo se puede mezclar con cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento o agente(s) solubilizante(s) adecuado(s).

15 **Administración**

El péptido se puede administrar en forma soluble en ausencia de adyuvante.

- 20 El péptido se puede administrar por vía intranasal por vía mucosal, subcutánea o intradérmica.

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

- 25 Los estudios en ratones han demostrado que la duración de la administración del péptido requerida para inducir tolerancia depende de la frecuencia del precursor de los linfocitos T en el receptor (Burkhart et al (1999) como anteriormente). En muchos estudios experimentales, se ha demostrado que se requieren dosis repetidas del péptido para inducir la tolerancia (Burkhart et al (1999) como anteriormente). La dosis exacta y el número de dosis del péptido, por lo tanto, dependerán del individuo; sin embargo, en una realización preferida se administran múltiples dosis.

- 30 Si se administran múltiples péptidos de manera simultánea, pueden estar en la forma de una "mezcla" que es adecuada para la administración en una dosis única o en múltiples dosis. Como alternativa, puede ser preferible dar múltiples dosis, pero variar las concentraciones relativas de los péptidos entre las dosis.

- 35 En una realización preferida se puede seguir un protocolo de aumento escalonado de la dosis", en donde al paciente se le dan múltiples dosis con concentraciones en aumento. Tal estrategia se ha utilizado, por ejemplo, para péptidos de fosfolipasa A2 en aplicaciones inmunoterapéuticas frente a la alergia al veneno de abeja (Müller et al (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 y Akdis et al (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

40 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención, pero no deberían interpretarse como una limitación de la misma. La invención, en particular, se refiere a las realizaciones específicas descritas en estos ejemplos

- 45 **EJEMPLO 1 - Investigación de las secciones hidrófilas de la secuencia de la proteína proteolipídica (PLP)**

Materiales y métodos

Antígenos

- 50 Dado que la PLP es una proteína en gran parte hidrófoba, fue necesario usar las partes hidrófilas de la secuencia. Con este fin, se llevaron a cabo estudios de hidropaticidad y se sintetizaron ocho péptidos a partir de los dominios hidrófilos de la molécula de PLP, tal como sigue:

- 55 36-61 (26-mero): HEALTGTEKLIETYFSKNYQDYEYLI-NH2
 88-119 (32-mero): EGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKGLSATVTGG-NH2
 104-135 (32-mero): KTTICGKGLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHSLE-NH2
 119-150 (32-mero): GQKGRGSRGQHQAHSLELVCHCLGKWLGHDPK-NH2
 179-206 (28-mero): TW TTCQSI AFPSKTSASIGSLCADARMY-NH2
 60 192-219 (28-mero): TSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVC-NH2
 207-234 (28-mero): GVL PWN A FPGKVC SNLLSICKTAEFQM-NH2
 260-276 (17-mero): ATYNFAVLKLMGRGTKF-NH2

- 65 Para cada péptido, se llevaron a cabo estudios de simulación computacional para predecir la capacidad de unión de DR2 (HLA-DRB1*1501), y se llevaron a cabo estudios *in vitro* (ensayo de proliferación) e *in vivo* (inducción de EAE) para investigar la respuesta. En la Figura 1 se muestran los resultados.

Tres péptidos demostraron responder tanto a los estudios *in vitro* como a los de *in vivo*, y esto se correlaciona con la predicción de unión de DR2. Estos péptidos fueron HEAL-26, TWTT-28 y GVLP-28 (usando los cuatro primeros aminoácidos mostrados en negrita en las secuencias anteriores para identificar el péptido).
Ejemplo 2 - Identificación de apítosos en HEAL-26

5 Se sintetizó un panel de péptidos 15-meros solapantes que abarcan HEAL-26 usando la química convencional de F-moc. Cada péptido se desplazó en 1 aminoácido, tal como se muestra a continuación:

Péptido HEAL-26	Secuencia
POP-1	HEAL T GTEKLIETYF
POP-2	EAL T GTEKLIETYFS
POP-3	AL T GTEKLIETYFSK
POP-4	LT G TEKLIETYFSKN
POP-5	T G TEKLIETYFSKNY
POP-6	G T EKLIETYFSKNYQ
POP-7	TE K LIETYFSKNYQD
POP-8	E K LIETYFSKNYQDY
POP-9	K L IETYFSKNYQDYE
POP-10	L I ETYFSKNYQDYEY
POP-11	I E TYFSKNYQDYEYL
POP-12	E T YFSKNYQDYEYLI

10 Los péptidos se analizaron usando hibridomas específicos de HEAL-26 de ratones DR2. De estos péptidos, POP-4, POP-7 y POP-8 se identificaron como apítosos.

Ejemplo 3 - Identificación de apítosos en TWTT-28

15 Se sintetizó un panel de péptidos 15-meros solapantes que abarcan TWTT-28 usando la química convencional de F-moc. Cada péptido se desplazó en 1 aminoácido. Los péptidos se analizaron usando hibridomas específicos de TWTT-28 de ratones DR2.

20 Los péptidos POP-14 a POP-18 se identificaron como apítosos, que tienen las siguientes secuencias:

Péptidos de TWTT-28	Secuencia
POP-14	WTTCQ S IAFPSK T SA
POP-15	TTCQ S IAFPSK T SAS
POP-16	TCQ S IAFPSK T SASI
POP-17	CQ S IAFPSK T SASIG
POP-18	Q S IAFPSK T SASIGS

Ejemplo 4 - Identificación de apítosos en GVLP-28

25 Se sintetizó un panel de péptidos 15-meros solapantes que abarcan GVLP-28 usando la química convencional de F-moc. Cada péptido se desplazó en 1 aminoácido. Los péptidos se analizaron usando hibridomas específicos de TWTT-28 de ratones DR2.

El péptido POP-22 se identificó como un apítopo, que tiene la siguiente secuencia: VLPWNAFPGKVC**G**SN.

30 EJEMPLO 5 - Ensayo de tolerancia *ex vivo*

35 Para evaluar la capacidad de los apítosos para inducir la tolerancia, los inventores primero determinaron la capacidad de esos apítosos para inhibir una respuesta inmunitaria *ex vivo*. Para este fin, los ratones HLA-DRB1*1501 se pretrataron con un aumento gradual de la dosis de un apítopo individual y después se primovacunaron con el correspondiente péptido largo. 10 días después de la primovacunación, se cultivaron los esplenocitos (SPL) y las células de los nódulos linfáticos (LNC) y se estimularon con el correspondiente péptido largo durante 3 días para evaluar su proliferación mediante la incorporación de ³H-timidina y la producción de citocina mediante sistemas de perfilado de citocinas multiplex (Figura 5).

40 El estudio de tolerancia muestra que el pretratamiento con POP-4 induce una inhibición de la proliferación de linfocitos T y una supresión de la producción de citocina Th1/Th17 (reducción significativa de IFN- γ , TNF- α e IL-17) en nódulo

linfático (Figura 6) y en bazo (Figura 7). HEAL-26 (Figura 6 y 7) redujo la proliferación y redujo la producción de IL-17 tanto en SPL como en LNC. Pero también se observó un aumento en IL-5, lo que demuestra un desplazamiento de la citocina Th1/Th17 a las citocinas Th2 cuando los ratones se pretratan con HEAL-26.

5 POP-15 y TWTT-28 inhiben muy bien la proliferación y la producción de citocina de SPL y de LNC. Para POP-15, no hay diferencias en la proliferación para los esplenocitos, pero hay ligeras diferencias en la producción de citocinas. De hecho, los ratones tratados con POP-15 producen menos IFN- γ (estadísticamente significativo), menos GM-CSF y menos IL-17. Por otra parte, hay una inhibición significativa de la proliferación de las citocinas (IFN- γ , GM-CSF y IL-17) en las LNC cuando los ratones se tratan con POP-15.

10 Para POP-22, los resultados son menos claros debido a una respuesta muy baja de los ratones PBS. Sin embargo, es posible observar un efecto de un pretratamiento con POP-22 y GVLP-28. De hecho, el índice de estimulación muestra una reducción en la proliferación de LNC con POP-22 (Figura 12 y 14) y GVLP-28 (Figura 14). También se observa una inhibición significativa de la producción de IL-17 por estas células cuando los ratones se pretratan con POP-22 o GVLP-28.

15 Materiales y métodos

Ratones

20 Los ratones HLA-DRB1*1501 (ratones DR2) se obtuvieron de Lars Fugger (LS Madsen et al. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nature genet* 1999. 23, 343-347) y se retrocruzaron con ratones Ab⁰. Los ratones DR2 resultantes expresan la molécula HLA-DRB1*1501 pero no la molécula de MHC de ratón.

25 Péptidos

Los péptidos largos y los péptidos de 15-meros fueron sintetizados por GL Biochem Ltd (Shangai, China) y se almacenaron en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA) a -80 °C.

30 Investigación de péptidos que se unen a HLA-DRB1*1501

Servidor NetMHCII 2.2

35 El servidor NetMHCII 2.2 predice la unión de péptidos a HLA-DRB1*1501 usando redes neuronales artificiales. Los valores de la predicción se dan en valores de CI50 nM. Los péptidos de unión fuerte y débil se indican en el resultado. Los péptidos de unión de alta afinidad tienen un valor de CI50 por debajo de 50 nM, y los péptidos de unión débil unos valores de CI50 por debajo de 500 nM. El resultado se presenta como una puntuación de la predicción que se calcula tal como sigue: $1-\log_{10}(af)$. Dirección de la página web: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII>.

40 *Base de datos de epítotos inmunitarios (IEDB, del inglés Immune Epitope DataBase): método de consenso*

45 Para cada péptido, se generó un rango de percentil para cada uno de los cuatro métodos (ARB, biblioteca combinatoria, SMM_align y Sturniolo) comparando la puntuación del péptido con las puntuaciones de cinco millones de 15-meros aleatorios seleccionados de la base de datos SWISSPROT. Un pequeño rango de percentil numerado indica una alta afinidad. El rango de percentil medio de los cuatro métodos se usó luego para generar el rango para el método de consenso. Dirección de la página web: http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html.

Determinación de la inmunogenicidad de los péptidos largos.

50 *Primovacunación y EAE (encefalomielitis autoinmune experimental)*

55 A los ratones transgénicos HLA-DRB1*1501 se les inyectó 100 μ l que contienen 100 μ g de PBS (Lonza, Verviers, Bélgica) o solo PBS y con adyuvante completo de Freund (CFA, del inglés *Complete Freund Adjuvant*; BD Difco, Oxford, Reino Unido) con 4 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis (MTb, BD Difco, Oxford, Reino Unido) por vía subcutánea en la base de la cola. Para el estudio de EAE, a los ratones se les inyectó con 200 ng de toxina pertussis en el mismo momento que la primovacunación y 2 días después. Después se hizo un seguimiento de los ratones, se pesaron y se puntuó la enfermedad todos los días.

Cultivo de células

60 En el día 10, los drenados de nódulos linfáticos y de bazo se extrajeron y se aislaron los esplenocitos y las células de los nódulos linfáticos y se cultivaron en medio X-vivo 15 (complementado con glutamina, penicilina y estreptomina; Lonza, Verviers, Bélgica) en placas de fondo plano de 96 pocillos. Se cultivaron $0,5 \times 10^6$ células/pocillo en 200 μ l/pocillo con diferentes concentraciones de péptidos para el ensayo de proliferación.

65

Ensayo de proliferación y análisis de citocinas

Después de 3 días en cultivo, se recolectaron 60 µl de sobrenadante (sin alterar a las células) y se congelaron. Se añadieron 25 µl/pocillo de timidina tritiada de la predilución de 20 µCi/ml (solución madre de 5 mCi; PerkinElmer, Waltham, MA) a las células hasta una concentración final de 0,5 µCi/pocillo. Las células se incubaron a 37 °C. después de 18 h, se congelaron las placas. Después se recolectaron las placas descongeladas y se leyeron con contador β-counter (Wallac 1450 MicroBeta TriLux Liquid Scintillation Counter). Después se analizó el sobrenadante con el 10plex FlowCytomix Multiplex de Th1/Th2 de ratón (Bender).

10 *Generación de clones de linfocitos T**Primovacunación y establecimiento de la línea de linfocitos T:*

En el día 0, a cinco ratones transgénicos HLA-DRB1*1501 se les inyectó con 100 µg del péptido largo en CFA con 4 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis en la base de la cola. Se usó un grupo primovacunado con PBS como control para la primovacunación. En el día 10, se recolectó el drenado de los nódulos linfáticos y de los bazos y se aislaron los esplenocitos y las células de los nódulos linfáticos. Se mezclaron los esplenocitos y las células de los nódulos linfáticos y se purificaron los linfocitos Y CD4 usando el kit de purificación negativa (linfocitos T CD4 intactos; Miltneyi, Bergisch Gladbach, Alemania). Después se reestimularon los linfocitos T CD4 con esplenocitos irradiados (3000 rad) como APC (células presentadoras de antígeno) de ratones HLA-DRB1*1501 a una proporción de 1:1 a aproximadamente 5x10⁶ células/ml y con un péptido largo a 10 µg/ml en una placa de 6 pocillos. La estimulación se hizo en medio X-vivo 15 para evitar la activación de células específicas para suero de ternera fetal (FCS). El día 4, se añadieron 20 U/ml de IL-2 humana recombinante (R&D, Mineapolis, MN) a las células. En el día 7, se recolectaron todas las células y las células muertas se eliminaron mediante separación con gradiente de densidad de Ficoll (Histopaque 1083, Sigma-Aldrich, St Louis, MA). Después se reestimularon las células con los esplenocitos irradiados de ratones DR2 con una proporción de APC:linfocitos T CD4 a 2:1. De nuevo, se añadió el péptido largo al cultivo a 10 µg/ml. Esta vez se usó RPMI con FCS al 5 % (Biosera, Ringmer, Reino Unido; complementado con hepes, penicilina, estreptomycin, glutamina: Lonza; y β-mercaptoetanol: gibco). En el día 7, las células se recolectaron, se pasaron por el gradiente de densidad de Ficoll y se fusionaron.

30 *Fusión:*

1x10⁷ células BW5147 (Health Protection Agency Culture Collections, Salisbury, Reino Unido) y 1x10⁶ linfocitos T CD4 se mezclaron juntas y se lavaron en medio sin suero a 37 °C en un tubo de 50 ml utilizando el ajuste de rotura más alto en la centrífuga para obtener un sedimento firme. Se vertió el sobrenadante y el exceso se retiró con una pipeta. Las células se dejaron en un baño de agua durante 5 minutos para dejar que el medio restante gotease y después se retiró con una pipeta. El sedimento celular se resuspendió suavemente pero a conciencia. Después se añadió 1 ml de PEG a 37 °C (solución de polietilenglicol al 40-50 %, Sigma-Aldrich, St Louis, MA) durante 45 segundos, manteniendo las células en un minibaño de agua en la campana. Las células se incubaron a 37 °C durante 45 segundos. Se añadió 1 ml de medio sin suero a 37 °C durante 30 segundos mientras se agitaba el tubo, después se añadieron 2 ml del mismo modo, y después, también se añadieron 3, 4, 10 y 30 ml como antes. El tubo se volteó muy despacio y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Después se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1300 rpm a temperatura ambiente (TA), sin frenar. El sobrenadante se retiró cuidadosamente con una pipeta (se dejó aproximadamente 1 ml por encima del sedimento). Se añadieron 50 ml de medio sin suero a TA sin desplazar el sedimento celular. Las células se sedimentaron mediante centrifugación como anteriormente y se repitió el lavado con medio completo. Después se resuspendieron las células en 50 ml de medio completo con FCS al 10 % a TA y se colocaron en cuatro placas de fondo plano de 96 pocillos (100 µl/pocillo). Después se añadieron 38 ml de RPMI completo con FCS al 10 % y se repitió la etapa previa dos veces hasta finaliza con 3 series de dilución (12 placas en total) incubadas a 37 °C. Después de 48 horas, se añadieron 100 µl de medio HAT (Hipoxantine-aminopterin-timidina, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA) a 2x a cada pocillo. Hacia el día 6, los hibridomas comenzaron a aparecer. Los clones se mantuvieron en medio HAT a 1X hasta que fueron estables, después se dejaron en medio HT (Hipoxantina-timidina Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA) durante 2-3 semanas y después en RPMI completo. Los clones se congelaron regularmente, ya que pueden volverse inestables (90 % de FCS + 10 % de DMSO).

55 *Evaluación de la especificidad de antígeno de los clones*

Se cultivaron 100 µl de células de hibridoma con 5x10⁴ células MGAR (la línea celular humana que expresa HLA-DRB1*1501, Health Protection Agency Culture Collections, Salisbury, Reino Unido) en pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron 50 µl de RPMI completo con FCS al 10 % que contiene un péptido largo a 10 µg/ml o el mismo volumen de DMSO (diluyente del péptido) a los pocillos. Después de 48 h, se retiraron 120 µl de sobrenadante y se realizó un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) de IL-2 de ratón. Los clones que producen IL-2 reconocen el antígeno usado. Los sobrenadantes restantes se congelaron a -20 °C.

60

ELISA de IL-2

Las placas de 96 pocillos (Immunosorb 96 well, Nunc, Roskilde, Dinamarca) se recubrieron con 50 µl/pocillo de Ac de captura anti-IL-2 de ratón en rata purificado (BD Biosciences, Oxford, Reino Unido), se diluyeron a 1:250 en tampón de carbonato (3,56 g de Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA), 8,4 g de NaHCO₃ (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido), 1 litro de agua elgastat; a pH 9,5) y se incubó toda la noche a 4 °C. Tras 2 lavados en PBS-Tween (1 l de PBS a 10x, 9 l de agua destilada, 0,5 ml de Tween (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA)), se añadieron 200 µl/pocillo de PBS con FCS al 10 % y se incubó a TA durante 1 hora. Después de 3 lavados en PBS-Tween, se añadieron a los pocillos 50 µl de sobrenadante o de diluciones del patrón de IL-2 (BD Biosciences, Oxford, Reino Unido) (en PBS con FCS al 10 %) y se incubó durante 2 h a TA. Después de 4 lavados en PBS-Tween (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA), se añadieron 50 µl/pocillo de anti-IL2 de ratón en rata con biotina (BD Biosciences, Oxford, Reino Unido) diluido a 1:1000 en FCS/PBS al 10 % y se incubaron durante 1 hora a TA. Después de 4 lavados, se añadieron 50 µl/pocillo de extravidina peroxidasa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA) diluida a 1:1000 en PBS y se incubó 30 minutos a TA. Después de 4 lavados, se añadieron 50 µl/pocillo de solución* de sustrato y se incubó a TA hasta que se vio un cambio claro de color. La reacción se detuvo usando 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2 M (BDH, Poole, Reino Unido) y se leyeron las placas a 450 nm (550 nm ref) con un lector de ELISA (SpectraMax Pro, Molecular Device, Sunnyvale, CA). *Solución del sustrato: 10 ml de tampón fosfato-citrato 0,1 M (5,14 ml de Na₂HPO₄ 0,2 M (BDH, Poole, Reino Unido), 4,86 ml de citrato 0,1 M (Sigma), 10 ml de agua elgastat), 0,1 ml de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina descongela a 10 mg/ml en DMSO, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA), 6 µl de peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA).

Sistemas de presentación independiente del procesamiento de antígeno

Los clones específicos se probaron después en sus respuestas a los péptidos de 15-meros (POP-1 a POP-12) con células MGAR fijas o no fijas. Para este fin, se cultivan 1x10⁵ células de clones individuales con 5x10⁴ células MGAR fijas o recientes en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Para la fijación de células MGAR, se incubaron 20x10⁶ células MGAR durante 5 minutos con 6 ml de paraformaldehído (PFA, BDH, Poole, Reino Unido) al 0,5 % (a pH 7) a TA y después se añadieron 6 ml de glicina (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) a 0,4 M para detener la reacción. Después se lavaron y resuspendieron las células en RPMI con FCS al 10 %. Se añadieron 10 µg/ml de cada péptido 15-mero diluido en RPMI con FCS al 10 % a pocillos individuales. Un pocillo que contiene DMSO en lugar de péptido se usó para cada clon como un control negativo y un pocillo que contiene el péptido largo se usó como control positivo. Después de 48 h en cultivo, se recolectaron 120 µl de sobrenadante y se analizaron mediante ELISA para evaluar la producción de IL-2.

Inducción de tolerancia con tratamiento con apítopos

Los ratones transgénicos HLA-DRB1*1501 se pretrataron con una dosis en aumento gradual de (0,1, 1, 10 y 3 veces de 100 µg) de apítopo o 100 µl de PBS en el día -15, -13, -11, -8, -6, -4. En el día 0, los ratones se primovacunaron con 100 µg del péptido largo en CFA con 4 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis en la base de la cola. Después de 10 días, se recolectaron los nódulos linfáticos inguinales y el bazo. Después se analizó la proliferación y la producción de citocinas por LNC y por los esplenocitos tal como se describe anteriormente.

Varias modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la invención serán evidentes para los expertos en la materia.

Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe considerarse limitada indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en química o en biología molecular o en campos relacionados pretenden estar abarcadas por la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> APITOPE INTERNATIONAL NV MERCK SERONO S.A.

<120> PÉPTIDO

<130> P044820PCT1

<150> GB1300683.8

<151> 15/01/2013

<160> 33

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 694 660 T3

<210> 1
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 1
 His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser
 1 5 10 15
 Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile
 20 25
 10
 <210> 2
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 2
 Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala
 1 5 10 15
 Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr
 20 25
 20
 <210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 3
 Gly Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met
 20 25
 30
 <210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr
 1 5 10 15
 35
 Gln Asp Tyr
 40
 <210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

ES 2 694 660 T3

Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Ile Gly Ser

5 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

10 Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn
 1 5 10 15

15 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

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

25 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

30 Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp
 1 5 10 15

35 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

40 Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr
 1 5 10 15

45 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

50 Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala
 1 5 10 15

55 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser
 1 5 10 15

ES 2 694 660 T3

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 12
 Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile
 1 5 10 15

 10
 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15
 <400> 13
 Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15

 20
 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 25
 <400> 14
 Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser
 1 5 10 15

 30
 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 15
 Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn
 1 5 10 15

 35
 <210> 16
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 40
 <400> 16

ES 2 694 660 T3

Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe Cys
 20 25 30
 Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr
 35 40 45
 Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val Ile
 50 55 60
 His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe Leu
 65 70 75 80
 Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala Val
 85 90 95
 Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly Leu
 100 105 110
 Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly Gln
 115 120 125
 His Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys Trp
 130 135 140
 Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr Val
 145 150 155 160
 Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile Tyr
 165 170 175

ES 2 694 660 T3

Phe Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr
 180 185 190

Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly Val
 195 200 205

Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu Leu
 210 215 220

Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe Ile
 225 230 235 240

Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr Phe
 245 250 255

Met Ile Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly Arg
 260 265 270

Gly Thr Lys Phe
 275

<210> 17
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 17

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

Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile
 20 25

10

<210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 18

Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
 1 5 10 15

Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly
 20 25 30

20

<210> 19
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 19

ES 2 694 660 T3

Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly
 1 5 10 15

Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly Gln His Gln Ala His Ser Leu Glu
 20 25 30

5 <210> 20
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly Gln His Gln Ala His Ser Leu
 1 5 10 15

10 Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys
 20 25 30

15 <210> 21
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala
 1 5 10 15

Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr
 20 25

20 <210> 22
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 22

Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys
 20 25

30 <210> 23
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 23

Gly Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn

1 5 10 15

Leu Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met
 20 25

ES 2 694 660 T3

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 24
 Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly Arg Gly Thr Lys
 1 5 10 15
 Phe
 10
 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 25
 His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe
 1 5 10 15
 Phe
 20
 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 26
 Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser
 1 5 10 15
 Phe
 30
 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 27
 Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys
 1 5 10 15
 Phe
 40
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 28
 Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr
 1 5 10 15
 Phe
 50
 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55
 <400> 29
 Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln
 1 5 10 15

ES 2 694 660 T3

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 30
Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu
1 5 10 15
10
<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15
<400> 31
Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr
1 5 10 15
20
<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25
<400> 32
Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu
1 5 10 15
30
<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
35
<400> 33
Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido que es capaz de unirse a una molécula de MHC *in vitro* y de ser presentado a un linfocito T sin procesamiento de antígeno, y que se selecciona de los siguientes péptidos de proteína proteolípídica (PLP):
- PLP 39-53: LTGTEKLIETYFSKN (SEQ ID NO. 7)
PLP 42-56: TEKLIETYFSKNYQD (SEQ ID NO. 8) y
PLP 43-57: EKLIETYFSKNYQDY (SEQ ID NO. 9).
- 10 2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad desmielinizante.
3. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad es esclerosis múltiple.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos de acuerdo con la reivindicación 1.

A

	HEAL-26	EGFY-32	KTTI-32	GOKG-32	TWTT-28	TSASI-28	GVLP-28	ATYN-17
Predicción de la unión de DR2 con NetMHC	+	.	.	+	.	.	.	+
Predicción de la unión de DR2 con IEDB	+	+	+
Inducción de la proliferación	++++	++	.	.	+++	.	+++	+++

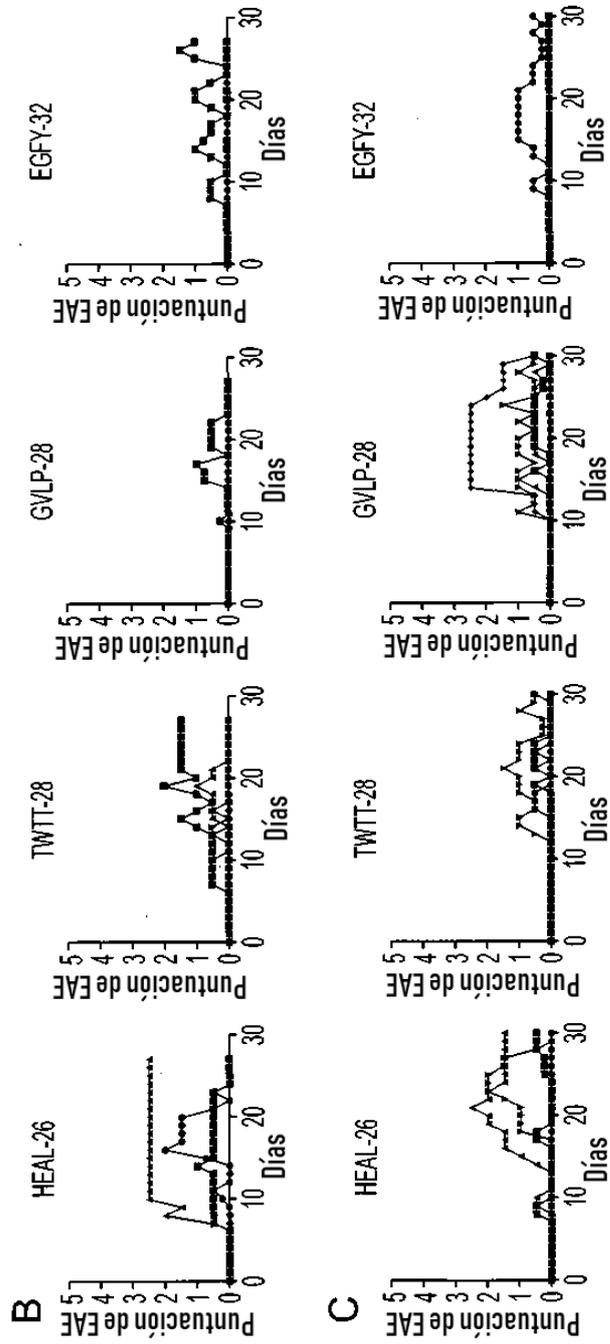


FIG. 1

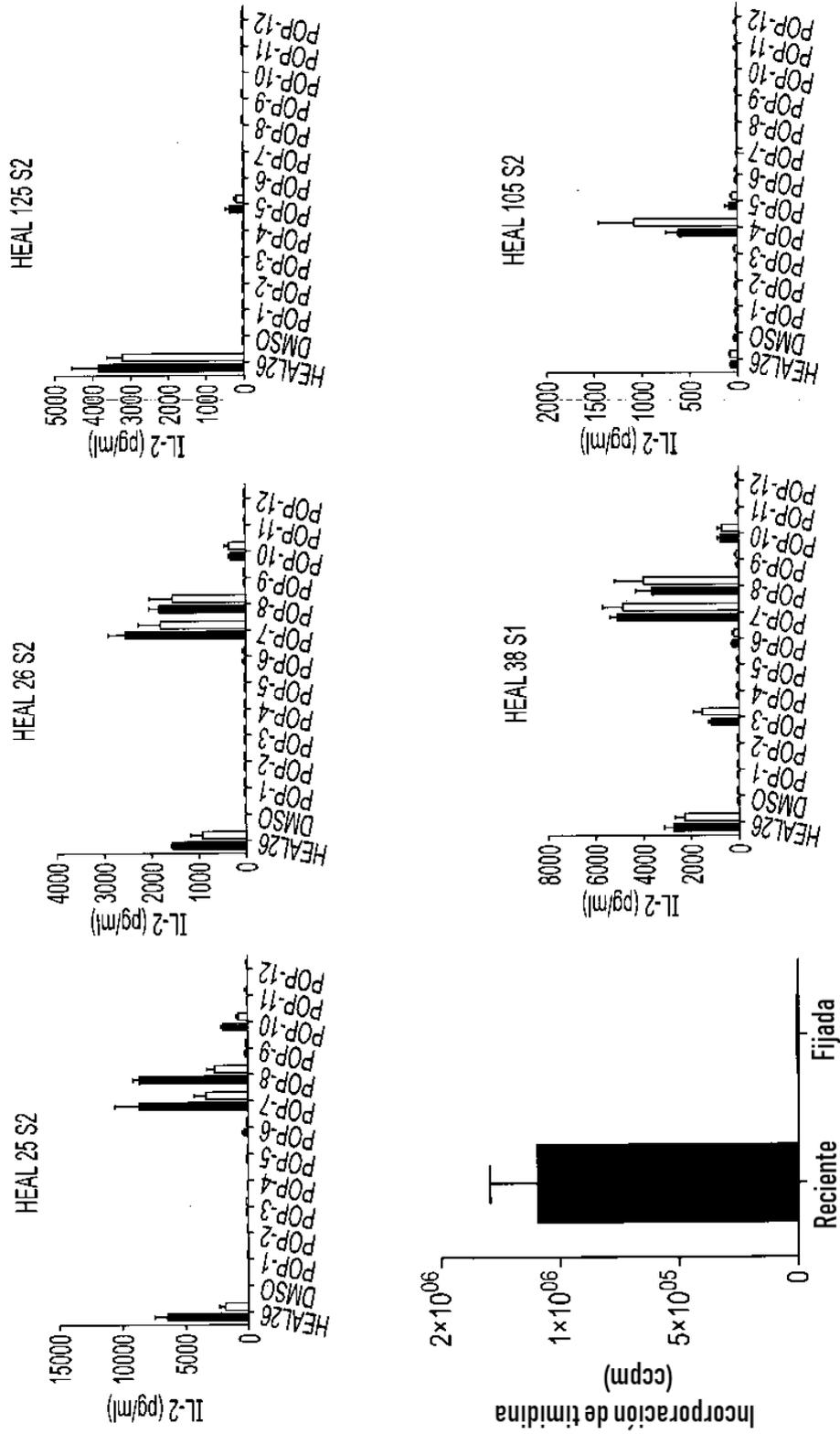


FIG. 2

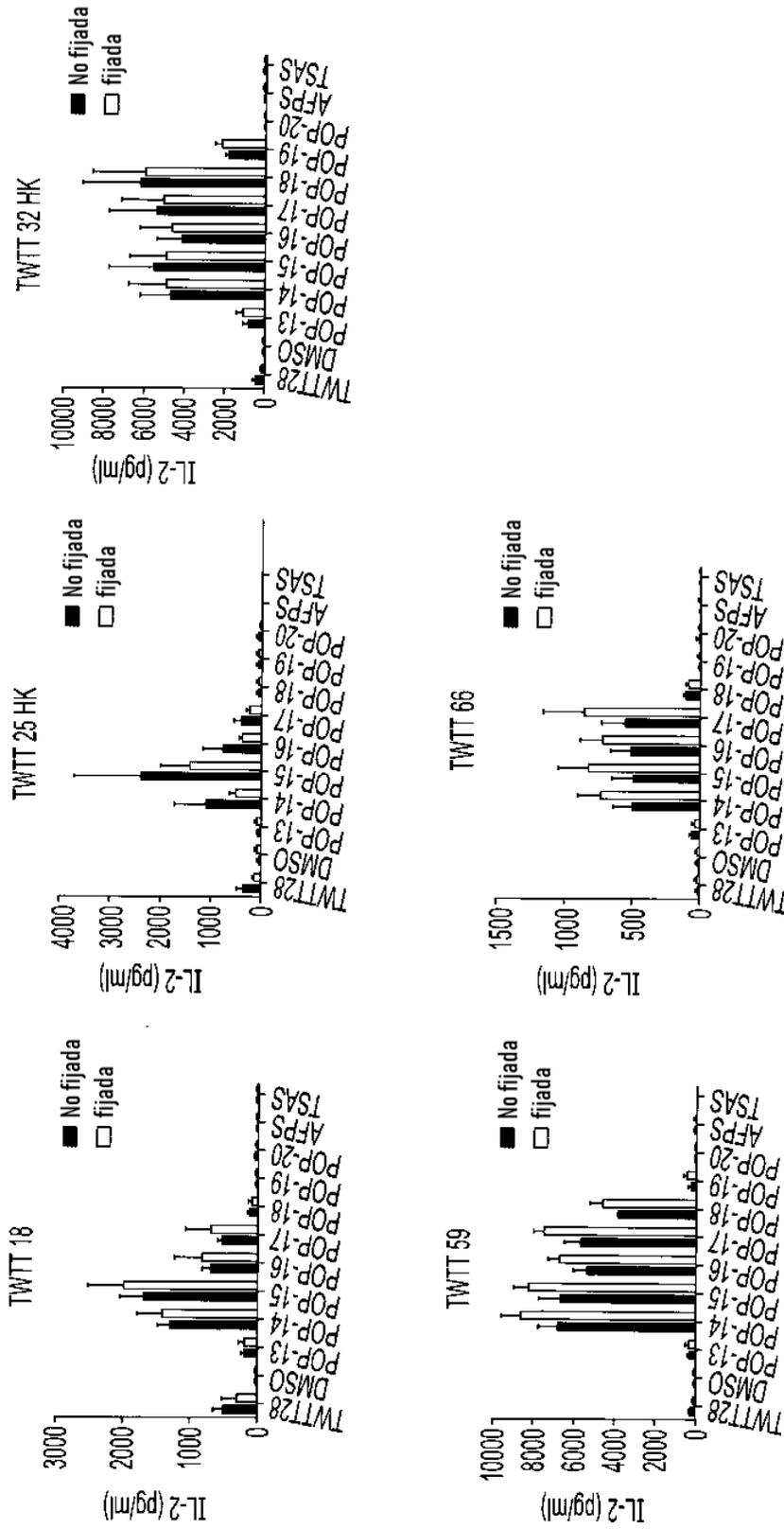


FIG. 3

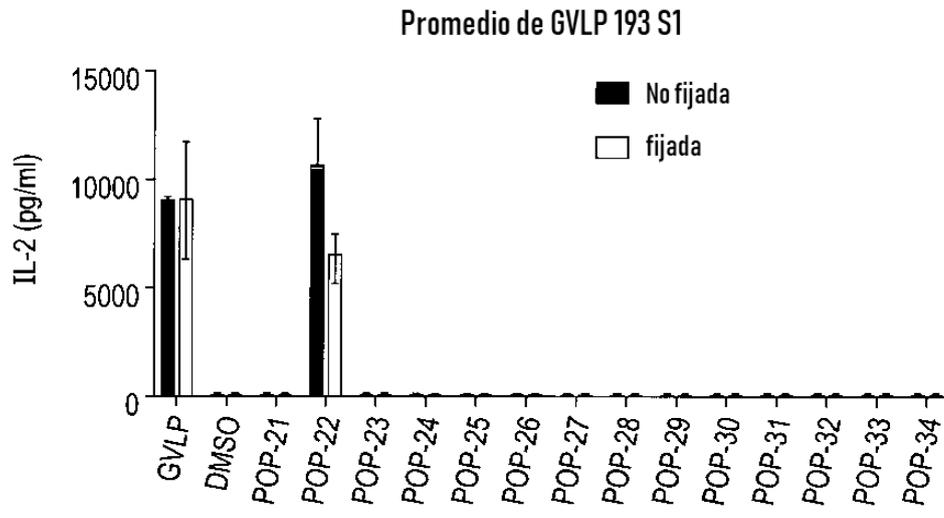


FIG. 4

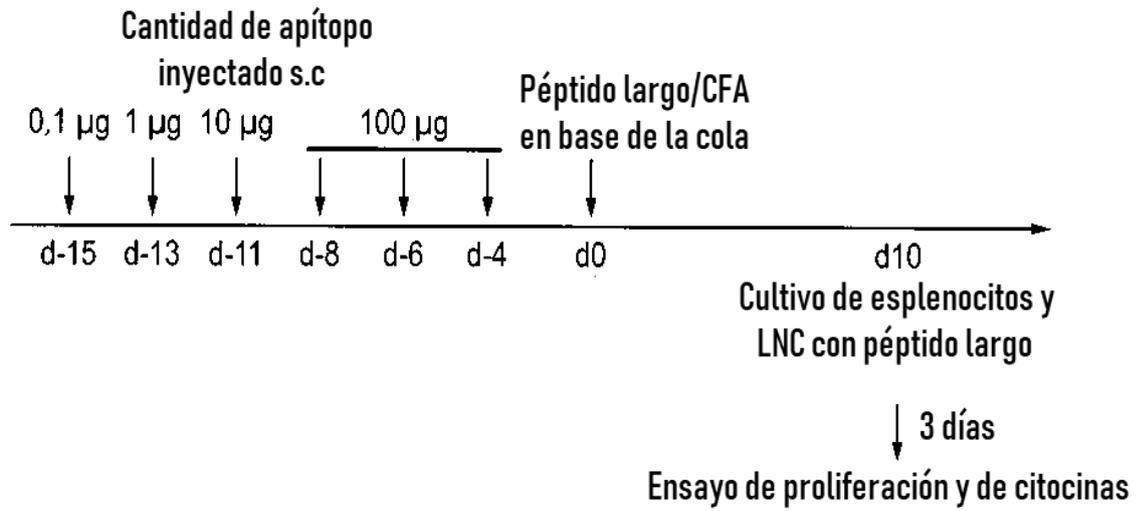


FIG. 5

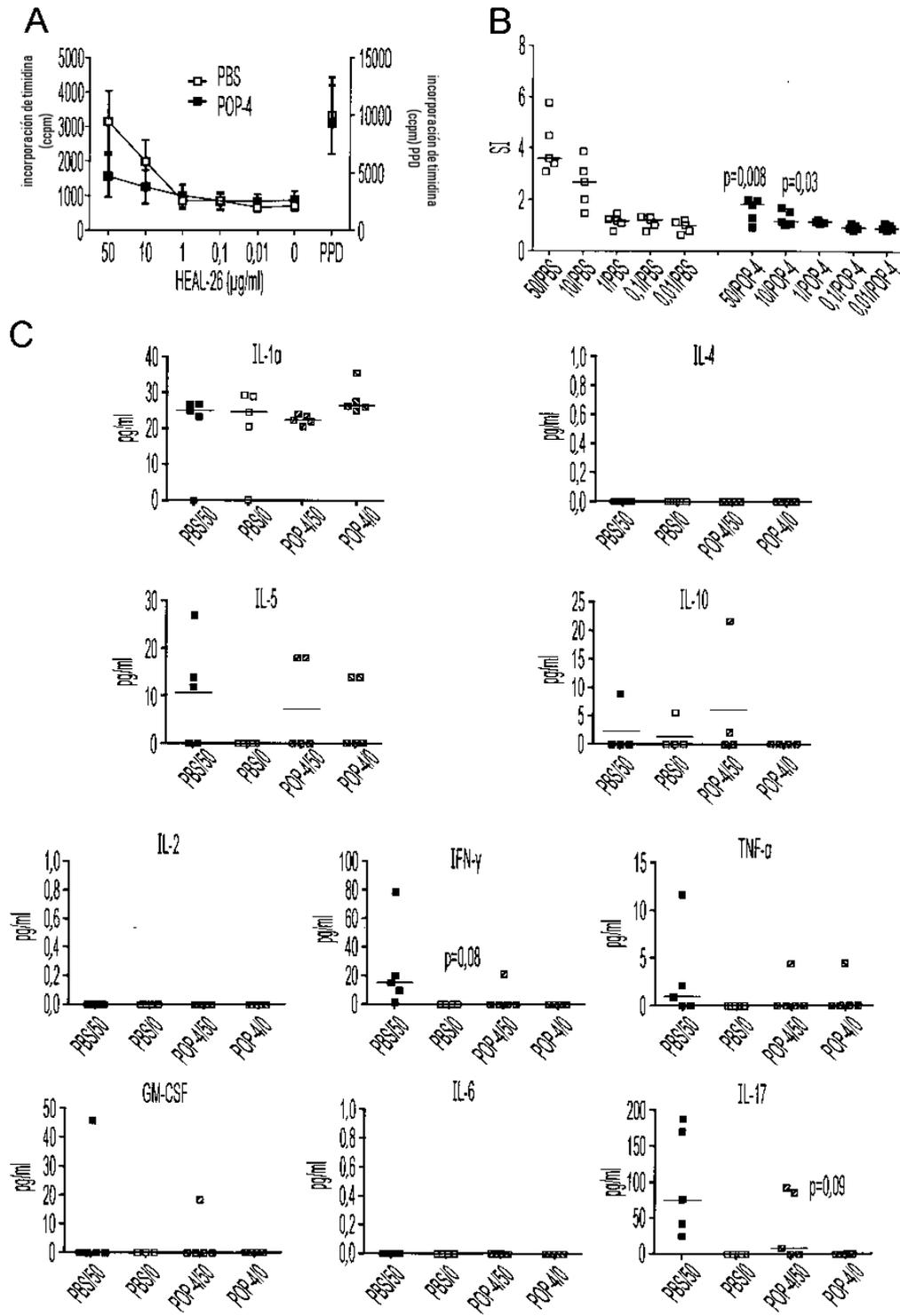


FIG. 6

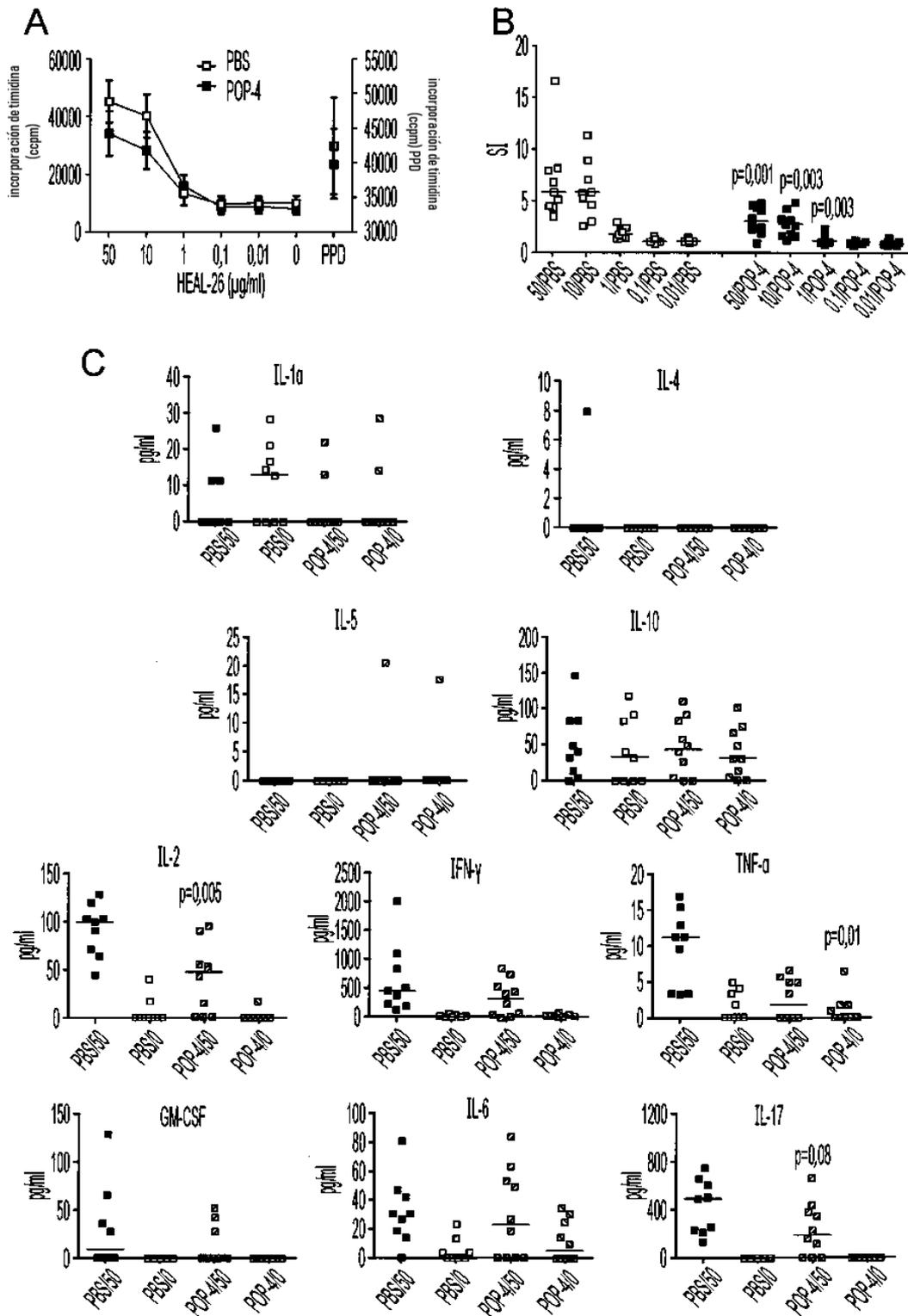


FIG. 7

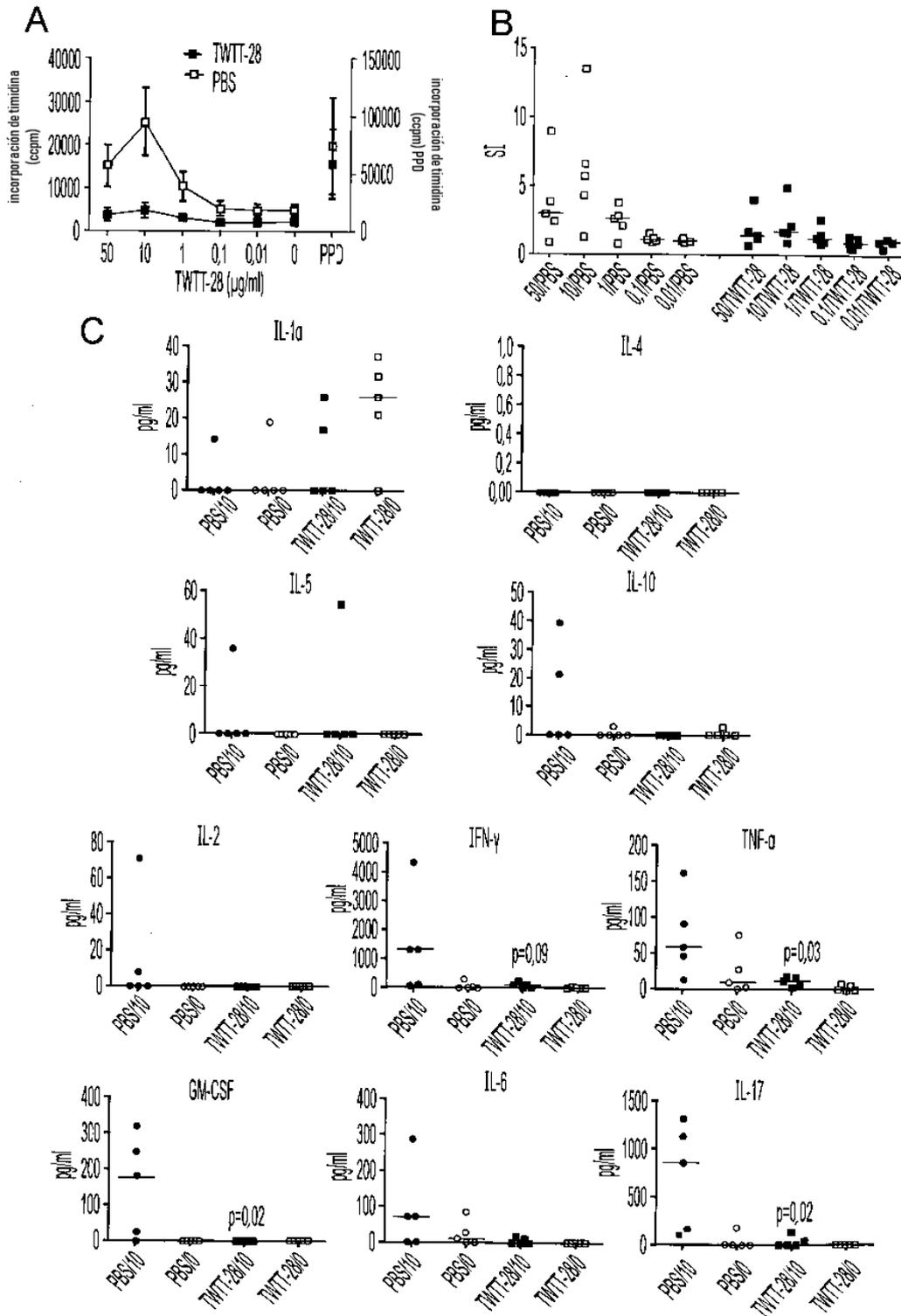


FIG. 8

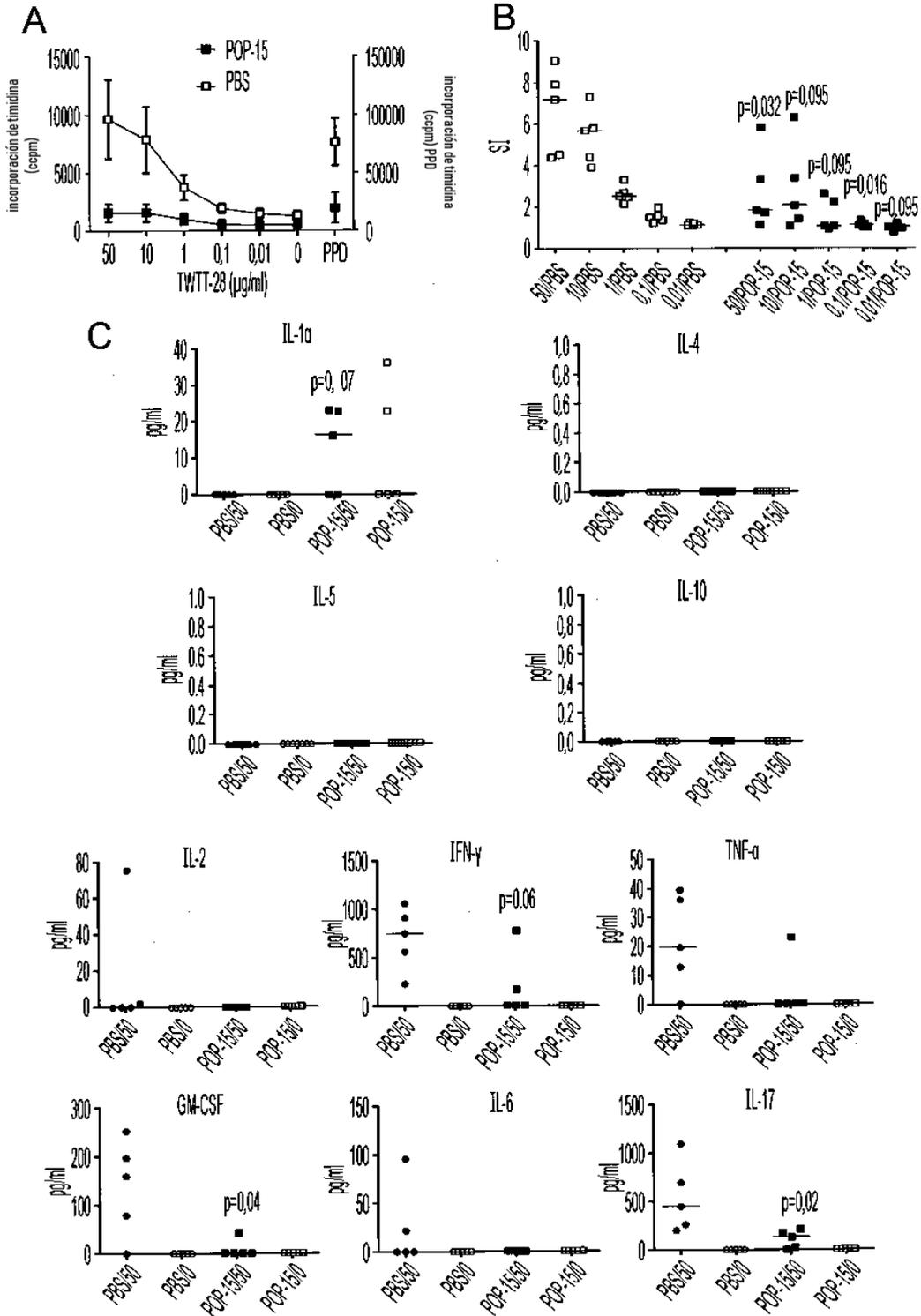


FIG. 10

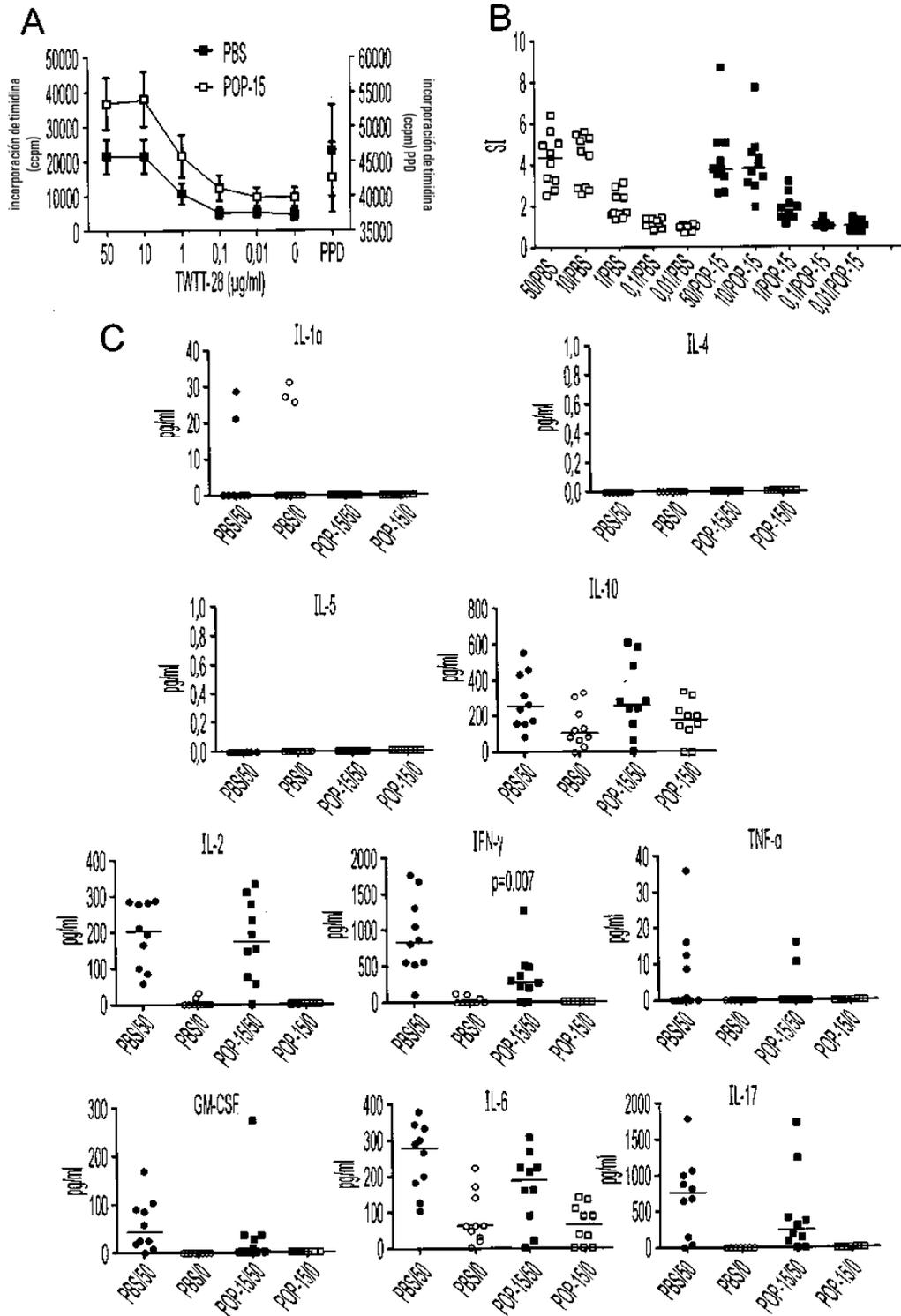


FIG. 11

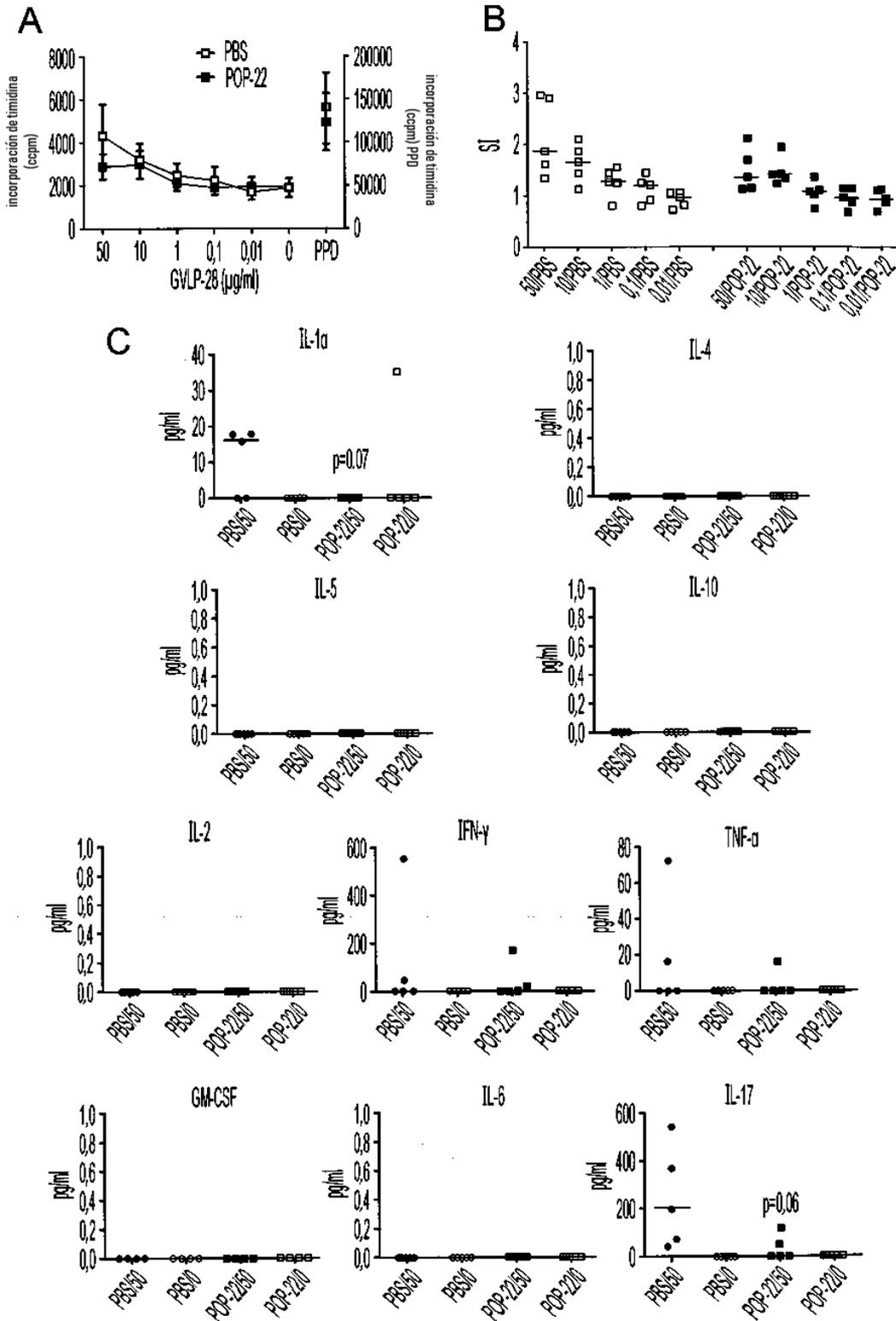


FIG. 12

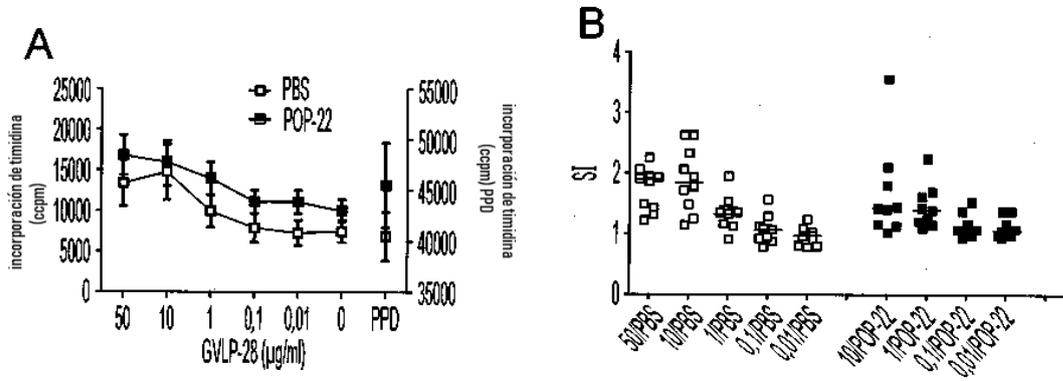


FIG. 13

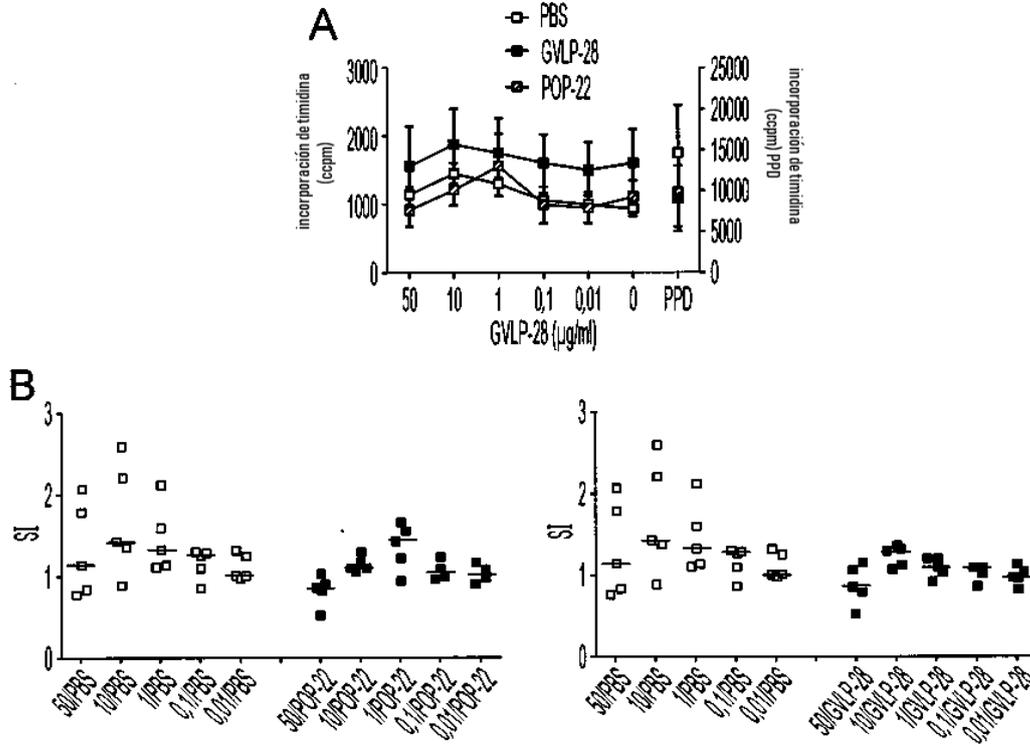


FIG. 14

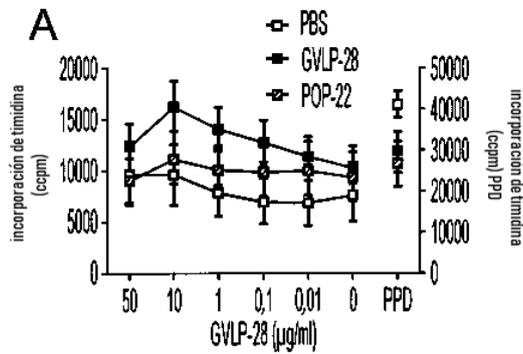


FIG. 15

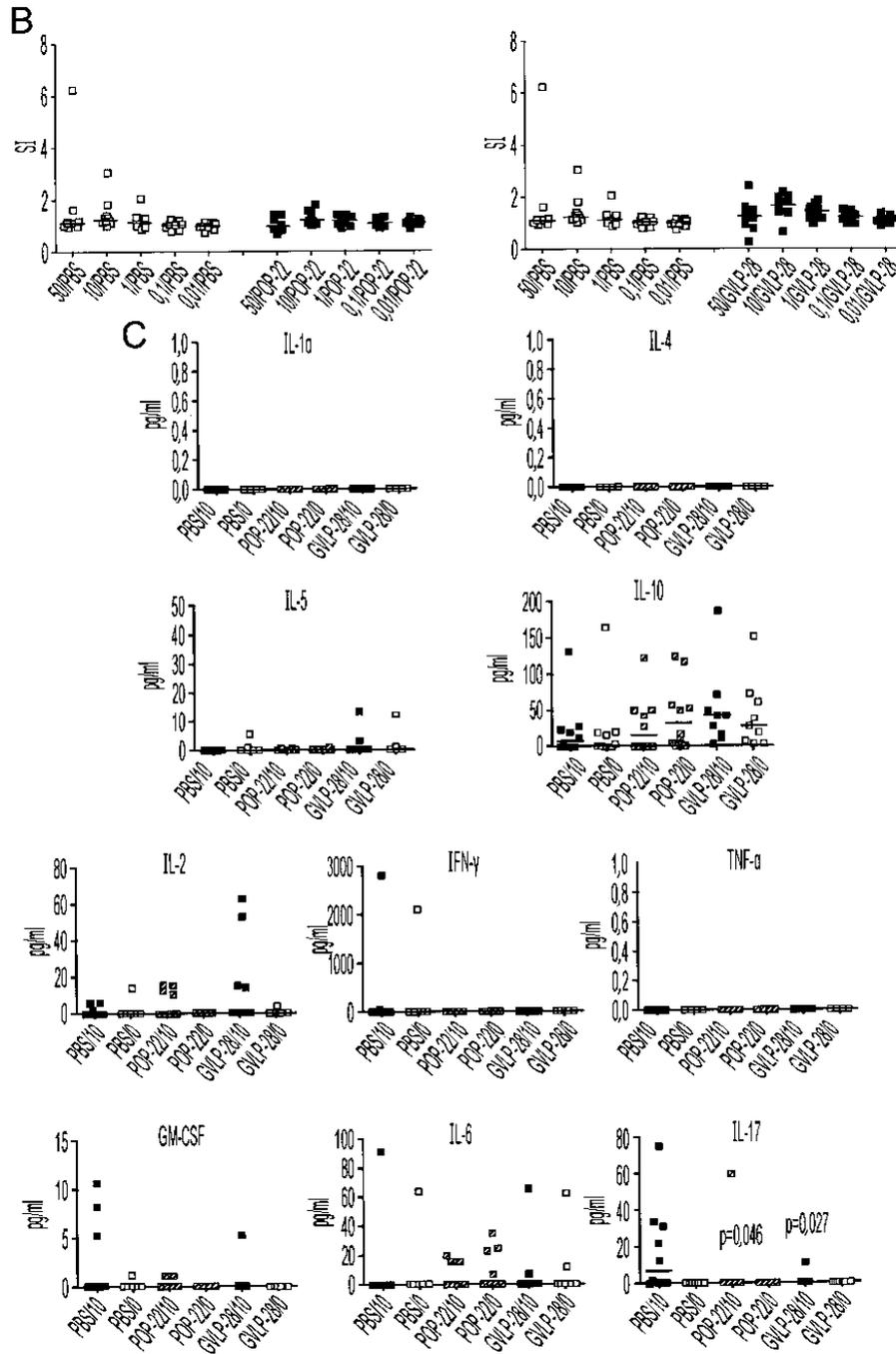


FIG. 15 (continuación)