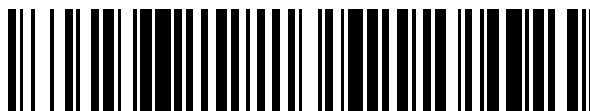


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 676**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 35/17</b>	(2015.01)
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/74</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/06</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/08</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/0783</b>	(2010.01)
<b>G01N 33/50</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/569</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/12</b>	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2015 PCT/EP2015/057258**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15150492**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015 E 15715708 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 3126374**

54 Título: **Péptido de donante aislado derivado de MHC y usos del mismo**

30 Prioridad:

**01.04.2014 EP 14163072**

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

**04.03.2019**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR y  
UNIVERSITE DE NANTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GUILLONNEAU, CAROLE;  
ANEGON, IGNACIO y  
PICARDA, ELODIE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 702 676 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 de donante aislado derivado de MHC y usos del mismo

**Campo**

La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia

**5 Antecedentes**

10 El trasplante alógeno de humano a humano sigue siendo el mejor tratamiento para reemplazar órganos que han fallado tras una enfermedad. La incompatibilidad entre las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de las células del receptor y del donante es la principal barrera para el éxito a largo plazo del trasplante de órganos. La inducción de tolerancia al aloinjerto se ha convertido en un objetivo fundamental y ciertas estrategias de tolerancia están empezando a ser aplicadas clínicamente. Se ha descrito que diferentes poblaciones de Tregs son capaces de inducir tolerancia a órganos alogénicos. La mayoría de estos Tregs son Tregs CD4<sup>+</sup>, mientras que los Tregs CD8<sup>+</sup> están peor definidos.

15 Se ha descrito previamente que el bloqueo de la coestimulación de la interacción CD40-CD40L, una de las estrategias más eficaces para prolongar la supervivencia de aloinjertos de órganos, induce linfocitos Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> (denominados Tregs CD8<sup>+</sup>CD40lg) con potente capacidad supresora (1,2). Se ha demostrado que los Treg [linfocitos T reguladores] CD8<sup>+</sup>CD40lg específicos al donante, a diferencia de los Treg naturales CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup>, transferían tolerancia a receptores de trasplantes no modificados. Además, estos linfocitos actuaban de manera inusual, ya que la supervivencia de aloinjertos dependía de su secreción de interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) para potenciar la expresión de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por parte de las células dendríticas (DC) y de las células endoteliales (EC) de injerto (1). Recientemente también se ha demostrado que la actividad supresora de los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg se realizaba principalmente en presencia de DC plasmacitoides (pDC) y que en la supresión estaba implicada la proteína tipo fibrinógeno 2 (FGL2) (2).

20 El requisito de una interacción de los TCR en la formación de la población de linfocitos T reguladores es un debate activo y vigente. Algunos estudios sugieren que la especificidad y la diversidad de los TCR son críticas para la función y la potencia de los Treg CD8<sup>+</sup> *in vivo* (3). Diferentes modelos para los Treg CD4<sup>+</sup> han demostrado que los Treg específicos a un antígeno son supresores más potentes que los linfocitos Treg irrestringidos. También es sabido para los Treg CD4<sup>+</sup> que la diversidad de los TCR es crítica para la selección y la diferenciación tímica, y recientemente ese ha descrito su impacto en la generación y la función de los Treg. La secuenciación de alto rendimiento ha demostrado que los Treg no modificados con gran diversidad de TCR se expanden más eficientemente, son más adaptables y más eficaces en la supresión de la enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD) tras una transferencia adoptiva que los Treg restringidos al TCR. Usando Immunoscope®, se ha demostrado anteriormente que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg acumulaban un repertorio sesgados hacia el elemento V $\beta$ 11 (2), lo que sugería la posibilidad de una expansión clonal. Hasta la fecha, se sabe poco sobre las características de reconocimiento de esta población de Treg, o de las poblaciones de Treg CD8<sup>+</sup> en general. Así, el papel exacto de la interacción TCR/MHC/péptido en la actividad de los Treg sigue siendo tema de debate.

25 Además, sigue existiendo una gran necesidad de proporcionar estrategias terapéuticas eficaces basadas en la supresión, arbitrada por los Treg, de la respuesta inmunitaria contra el trasplante (tales como los anticuerpos específicos al donante que están asociados con el rechazo arbitrado por anticuerpos), evitando así la necesidad de usar fármacos inmunosupresores inespecíficos, que tienen los inconvenientes de aumentar el ritmo cardiaco de enfermedades oportunistas (por ejemplo, infecciones virales o fúngicas) y de aumentar la mortalidad de los pacientes trasplantados.

30 Van Denderen et al. (4) describen péptidos de donante que provocan una respuesta proliferativa *in vitro* de esplenocitos totales (fundamentalmente linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> efectoras, linfocitos B, macrófagos, células NK, células NKT...) procedentes de animales injertados que habían tolerado o bien rechazado su aloinjerto. Identificaron péptidos de donante que provocan una respuesta positiva en receptores que habían rechazado su autoinjerto, péptidos de donante que provocan una respuesta positiva en receptores que habían tolerado su autoinjerto y péptidos de donante que provocan una respuesta positiva en ambos grupos.

35 Debería hacerse notar que el péptido 13 descrito en dicho artículo no provocó respuesta alguna en los receptores con rechazo o tolerancia. En cuanto a este artículo, el péptido 13 nunca habría sido seleccionado ni usado para inducir la tolerancia.

Además, la estimulación de esplenocitos totales con el péptido 14 llevaron a la activación de las células procedentes de receptores con rechazo y a una menor activación de las células procedentes de receptores con tolerancia. Este resultado sugirió que este péptido era reconocido por las células presentes en ambos receptores, pero especialmente en receptores con rechazo y, así, no podía ser usado para inducir la tolerancia.

Por último, los autores no identifican al subconjunto de células que es estimulado por los diferentes alo péptidos. Dada la población de células usada para este ensayo *in vitro*, es probable que los péptidos sean reconocidos por células efectoras que representan el 90% de los linfocitos T en los esplenocitos.

### Compendio

- 5 La presente invención está definida por las reivindicaciones. En particular, la presente invención versa sobre:
- un método *in vitro* o *ex vivo* para generar una población de Tregs CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup>, que comprende una etapa de cultivo de una población de Tregs CD8<sup>+</sup> con un caldo de cultivo que comprende un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID NO: 2 en presencia de una población de células dendríticas plasmacitoides,
  - 10 – un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID NO: 2 para ser usado como fármaco,
  - un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID NO: 2 para ser usado en la inducción de tolerancia en un paciente necesitado de la misma, y
  - 15 – un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID NO: 2 para ser usado en la prevención o la reducción del rechazo de trasplantes en un paciente necesitado de las mismas.

### Descripción detallada

20 Los inventores investigaron si la fina especificidad del TCR de los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg influye en la función de los Treg y en la supervivencia de aloinjertos y, así, demostraron por vez primera en trasplantes que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg inducidos reconocían un péptido subdominante (denominado Bu31) derivado de una región polimórfica de moléculas de MHC de clase II del donante. Este péptido expandía los Treg CD8<sup>+</sup> en presencia de pDCs, al menos *ex vivo*, e inducía la tolerancia en receptores trasplantados no modificados sin tratamiento adicional.

#### Péptidos de la divulgación

La presente divulgación versa sobre un péptido aislado de longitud que oscila entre 11 y 16 aminoácidos que se deriva de una molécula de MHC de clase II que comprende la secuencia de aminoácidos: SDVGEYR (SEC ID NO: 1).

25 En una realización particular, dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos: YLRYDSDVGEYRAVTE (SEC ID NO: 2) (también denominada Bu31)

Según la presente divulgación, los péptidos dados a conocer en la presente memoria pueden ser producidos por métodos convencionales de síntesis automatizada de péptidos o por expresión recombinante. Los principios generales para el diseño y la fabricación de proteínas son muy conocidos para los expertos en la técnica.

30 Los péptidos de la presente divulgación pueden ser sintetizados en solución o en un soporte sólido según técnicas convencionales. Hay disponibles diversos sintetizadores automáticos que pueden ser usados según protocolos conocidos descritos en Stewart y Young; Tam et al., 1983; Merrifield, 1986 y Barany y Merrifield, Gross y Meienhofer, 1979. Los péptidos de la presente divulgación también pueden ser sintetizados mediante tecnología de fase sólida empleando un sintetizador ejemplar de péptidos tal como el Modelo 433A de Applied Biosystems Inc. La pureza de cualquier péptido dado, generado a través de síntesis automatizada de péptidos o a través de métodos recombinantes, puede ser determinada usando análisis de HPLC de fase inversa. La autenticidad química de cada péptido puede ser establecida por cualquier método conocido para los expertos en la técnica. Como alternativa a la síntesis automatizada de péptidos, puede emplearse tecnología de ADN recombinante, en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido elegido es insertada en un vector de expresión, transformada o transfectada a una célula anfitriona apropiada y cultivada en condiciones adecuadas para la expresión descritas a continuación en la presente memoria. Se prefieren en especial métodos recombinantes para producir péptidos más largos (polipéptidos).

#### Métodos de obtención de una población de linfocitos T reguladores

45 En otro aspecto, la presente divulgación versa sobre un método *in vitro* o *ex vivo* para generar una población de Tregs, que comprende una etapa de cultivo de una población de Tregs con un caldo de cultivo que comprende un péptido aislado de una longitud que oscila entre 11 y 16 aminoácidos que se deriva de una molécula de MHC de clase II que comprende la secuencia de aminoácidos: SDVGEYR (SEC ID NO: 1) en presencia de una población de células dendríticas.

50 En una realización, la presente divulgación versa sobre un método *in vitro* o *ex vivo* para generar una población de Tregs CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup>, que comprende una etapa de cultivo de una población de Tregs CD8<sup>+</sup> con un caldo de cultivo que comprende un péptido aislado de la presente divulgación en presencia de una población de células dendríticas plasmacitoides (pDC).

En una realización, las pDCs son pDCs maduras.

En una realización, dicho péptido aislado consiste en la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID NO:2 (YLRVSDVGEYRAVTE) (Bu31).

5 Según se la usa en la presente memoria, la expresión “caldo de cultivo” se refiere a cualquier caldo capaz de soportar el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos T en linfocitos T reguladores. Normalmente, consiste en un caldo base que contiene nutrientes (una fuente de carbono, aminoácidos), un tampón del pH y sales, que puede ser complementado con factores de crecimiento y/o antibióticos. Normalmente, el caldo base puede ser caldo RPMI 1640, DMEM, IMDM, X-VIVO o AIM-V, siendo todos ellos caldos estándar disponibles comercialmente.

10 Las formulaciones preferidas de caldos que soportan el crecimiento y la diferenciación de linfocitos T no modificados en linfocitos T reguladores incluyen el caldo químicamente definido (CDM). Según se la usa en la presente memoria, la expresión “caldo químicamente definido” (CDM) se refiere a una solución nutritiva para el cultivo de células que contiene únicamente componentes especificados, preferentemente componentes de estructura química conocida. Un caldo químicamente definido es un caldo libre de suero y libre de fibroblastos.

15 La etapa de cultivo de una población de Tregs CD8<sup>+</sup> con el péptido de la presente divulgación en presencia de una población de pDCs se llevará a cabo durante el tiempo necesario requerido para la presentación de dicho péptido por las pDC a los Treg CD8<sup>+</sup>.

Normalmente, el cultivo de una población de Tregs CD8<sup>+</sup> con el péptido de la presente divulgación en presencia de una población de pDCs se llevará a cabo desde el día 1 hasta la semana 1 o más.

En una realización particular, el método puede comprender la etapa adicional de aislar la población de linfocitos T reguladores así generada.

#### 20 Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto de la presente divulgación versa sobre una composición farmacéutica que comprende un péptido aislado de longitud que oscila entre 11 y 16 aminoácidos que se deriva de una molécula de MHC de clase II que comprende la secuencia de aminoácidos: SDVGEYR (SEC ID NO: 1).

25 En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende el péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos YLRVSDVGEYRAVTE (SEC ID NO: 2) (Bu31).

Cualquier agente terapéutico de la presente divulgación descrito anteriormente puede ser combinado con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, con matrices de liberación sostenible, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

30 “Farmacéuticamente” o “farmacéuticamente aceptable” se refieren a entidades moleculares y a composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o perjudicial en otro sentido cuando son administradas a un mamífero, especialmente un ser humano, según resulte apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de carga, un diluyente, un material encapsulante o una formulación auxiliar de cualquier tipo no tóxico, sólido, semisólido o líquido.

35 La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y la posología dependen de la afección que deba ser tratada, de la gravedad de la enfermedad, de la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

40 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser formuladas para una administración tópica, oral, intranasal, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación susceptible de ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro sódico, potásico, cálcico o de magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o suero fisiológico, permitan la constitución de soluciones inyectables.

45 Las dosis usadas para la administración pueden ser adaptadas en función de diversos parámetros y, en particular, en función del modo de administración usado, de la patología relevante o, alternativamente, de la duración de tratamiento deseada. Por ejemplo, se encuentra perfectamente dentro del dominio de la técnica iniciar las dosis del compuesto a niveles inferiores a las requeridas para lograr el efecto terapéutico y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo, de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al sujeto que ha de ser tratado. Un medicamento contiene normalmente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferentemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad efectiva del fármaco es suministrada normalmente con un nivel de dosificación entre 0,0002 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente entre aproximadamente 0,001 mg/kg y 7 mg/kg de peso corporal por día.

Para preparar composiciones farmacéuticas, puede disolverse o dispersarse una cantidad efectiva de un polipéptido o un ácido nucleico según la presente divulgación en un medio acuoso o vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Las formas farmacéuticas adecuadas para un uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas; formulaciones que incluyen aceite de ajonjolí, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en un grado en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos.

10 Las soluciones de los compuestos activos como sales de base libre o farmacéuticamente aceptables pueden ser preparadas en agua debidamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden ser preparadas en glicerol, polietilenglicoles líquidos, mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el desarrollo de microorganismos.

15 Los péptidos según la presente divulgación y otros agentes terapéuticos de la presente divulgación pueden ser formulados creando una composición neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que son formadas con ácidos inorgánicos, como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. También pueden derivarse sales formadas con los grupos carboxilo libres de bases inorgánicas, como, por ejemplo, hidróxidos sódicos, potásicos, amónicos, cálcicos o férricos, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

20

El vehículo también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la debida fluidez, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede efectuarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos; por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos; por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción; por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

25

30 Las soluciones estériles inyectables se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los demás ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos preferidos de preparación son técnicas de vacuosecado y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo plus más cualquier ingrediente deseado adicional procedentes de una solución filtrada estéril de los mismos.

35

También se contempla la preparación de soluciones más y muy concentradas para su inyección directa en las que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar lugar a una penetración sumamente rápida, que administra concentraciones elevadas de los agentes activos a un área pequeña.

40

Tras la formulación, las soluciones serán administradas de una manera compatible con la formulación posológica y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones son fácilmente administradas de diversas formas posológicas, tales como el tipo de soluciones inyectables descrito anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares.

45 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución puede ser adecuadamente tamponada y el diluyente líquido vuelto isotónico en primer lugar con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos para los expertos en la técnica teniendo en cuenta la presente divulgación. Por ejemplo, se podría disolver una dosificación en 1 ml de solución isotónica de NaCl y bien ser añadida a 1000 ml de líquido hipodermoclítico, o bien ser inyectada en el sitio de perfusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Ocurrirá necesariamente alguna variación en la dosificación, dependiendo del estado del sujeto al que ha de tratarse. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

50

55 Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tales como la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para la administración oral; cápsulas de liberación temporizada; y cualquier otra forma usada actualmente.

Métodos y usos terapéuticos

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para ser usados en la inducción de tolerancia inmunitaria en un paciente necesitado de la misma.

La presente divulgación también proporciona métodos y composiciones para ser usados en la prevención o la reducción del rechazo de trasplantes en un paciente necesitado de los mismos.

5 En consecuencia, la presente divulgación versa sobre un péptido aislado de longitud que oscila entre 11 y 16 aminoácidos que se deriva de una molécula de MHC de clase II que comprende la secuencia de aminoácidos: SDVGEYR (SEC ID NO: 1) variante para ser usado como fármaco.

En una realización, dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos YLRYDSVGEYRAVTE (SEC ID NO: 2) (Bu31).

10 En otro aspecto, la presente divulgación versa sobre un péptido aislado de longitud que oscila entre 11 y 16 aminoácidos que se deriva de una molécula de MHC de clase II que comprende la secuencia de aminoácidos: SDVGEYR (SEC ID NO: 1) para ser usado en la inducción de tolerancia en un paciente necesitado de la misma.

En una realización, dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos YLRYDSVGEYRAVTE (SEC ID NO: 2) (Bu31).

15 Según es usada en la presente memoria, la expresión “tolerancia inmunológica” se refiere a un estado de falta de respuesta del sistema inmunitario a sustancias o tejidos que tienen la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria. Los péptidos de la presente divulgación son útiles para lograr la tolerancia, o la tolerancia parcial, contra el trasplante tras efectuar dicha trasplantación. Según se usa en la presente memoria, una “tolerancia parcial” es una tolerancia inmunológica parcial que da a lugar a una respuesta inmunitaria reducida.

20 Según es usada en la presente memoria, la expresión “respuesta inmunitaria” incluye respuestas inmunitarias arbitradas por linfocitos T y/o arbitradas por linfocitos B. Respuestas inmunitarias ejemplares incluyen las respuestas de linfocitos T —por ejemplo, la producción de citoquinas y la citotoxicidad celular—; además, la expresión respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que son afectadas indirectamente por la activación de los linfocitos T —por ejemplo, la producción de anticuerpos (respuestas humorales) y la activación de células sensibles a las citoquinas; por ejemplo, los macrófagos—. Las células inmunitarias implicadas en la respuesta inmunitaria incluyen los linfocitos, tales como los linfocitos B y los linfocitos T (linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Th1 y Th2); células presentadoras de antígenos (por ejemplo, células profesionales presentadoras de antígenos, como las células dendríticas); células asesinas; células mieloides, tales como macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

30 Por ejemplo, las respuestas inmunitarias están implicadas en el rechazo de trasplantes, así como en el resultado fisiológico concomitante de tales respuestas inmunitarias, tales como, por ejemplo, fibrosis intersticial, arteriosclerosis crónica de injerto o vasculitis.

35 Así, los pacientes tratados con un péptido de la presente divulgación, en comparación con pacientes no tratados, presentan las siguientes características fisiológicas: a) un menor nivel de respuesta inmunitaria contra el trasplante (arbitrada al menos en parte, según se cree, por respuestas inmunitarias arbitradas por linfocitos B, más en particular anticuerpos específicos al donante); b) un retraso en el inicio o en el avance de una respuesta inmunitaria contra el trasplante; o c) un menor riesgo de inicio o de avance de una respuesta inmunitaria contra el trasplante.

Por “paciente necesitado del mismo” se quiere decir un individuo que padece o es susceptible de padecer un rechazo de trasplante que ha de ser tratado. Los individuos que han de ser tratados en el marco de la presente divulgación son mamíferos, preferentemente seres humanos.

40 En otro aspecto adicional, la presente divulgación versa sobre un péptido aislado de longitud que oscila entre 11 y 16 aminoácidos que se deriva de una molécula de MHC de clase II que comprende la secuencia de aminoácidos: SDVGEYR (SEC ID NO: 1) para ser usada en la prevención o la reducción del rechazo de trasplantes en un paciente necesitado del mismo.

45 En una realización, dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos YLRYDSVGEYRAVTE (SEC ID NO: 2) (Bu31).

50 Según se la usa en la presente memoria, la expresión “prevenir o reducir el rechazo de trasplantes” pretende abarcar la prevención o la inhibición del rechazo inmunitario a los trasplantes, así como el retraso en el inicio o el avance del rechazo inmunitario a los trasplantes. La expresión también pretende abarcar la prolongación de la supervivencia de un trasplante en un paciente, o revertir el fracaso de un trasplante en un paciente. Además, la expresión pretende abarcar la mejoría de un síntoma de un rechazo inmunitario de un trasplante, incluyendo, por ejemplo, la mejoría de una complicación inmunológica asociada con el rechazo inmunitario, tal como, por ejemplo, fibrosis intersticial, arteriosclerosis crónica de injerto o vasculitis.

Según se la usa en la presente memoria, la expresión “rechazo de un trasplante” abarca el rechazo a trasplantes tanto agudo como crónico. “Rechazo agudo” es el rechazo por parte del sistema inmunitario de un receptor de un trasplante

de tejido, cuando el tejido trasplantado es inmunológicamente foráneo. El rechazo agudo se caracteriza por la infiltración del tejido de trasplante por células inmunitarias del receptor, que llevan a cabo su función efectora y destruyen el tejido del trasplante. El inicio del rechazo agudo es rápido y generalmente se produce en los seres humanos unas semanas después de la cirugía de trasplante. Generalmente, el rechazo agudo puede ser inhibido o suprimido con fármacos inmunosupresores como la rapamicina, la ciclosporina y similares. En los seres humanos, el “rechazo crónico” generalmente acontece entre varios meses y años después del injerto, incluso en presencia de una inmunosupresión con éxito del rechazo agudo. La fibrosis es un factor común en el rechazo crónico de todos los tipos de trasplantes de órganos.

El término “trasplantación” y variaciones del mismo se refieren a la inserción de un trasplante (denominado también injerto) en un receptor, ya sea la trasplantación singénica (en la que el donante y el receptor son genéticamente idénticos), alógena (en la que el donante y el receptor son de origen genético diferente, pero de la misma especie) o xenógena (en la que el donante y el receptor son de especies diferentes). Así, en un escenario típico, el anfitrión es humano y el injerto es un isoinjerto, derivado de un ser humano de un origen genético igual o diferente. En otro escenario, el injerto se deriva de una especie diferente de aquella a la que es trasplantado, incluyendo animales de especies ampliamente separadas filogenéticamente; por ejemplo, un corazón de babuino trasplantado a un anfitrión humano.

En una realización, el donante del trasplante es un ser humano. El donante del trasplante puede ser un donante vivo o un donante fallecido, concretamente un donante cadavérico.

En una realización, el trasplante es un órgano, un tejido o células.

Según se lo usa en la presente memoria, el término “órgano” se refiere a un órgano sólido vascularizado que lleva a cabo una función específica o un grupo de funciones dentro de un organismo. El término órgano incluye, sin limitación: corazón, pulmón, riñón, hígado, páncreas, piel, útero, hueso, cartilago, intestino delgado o grueso, vejiga, cerebro, mama, vasos sanguíneos, esófago, tubo de Falopio, vesícula biliar, ovarios, páncreas, próstata, placenta, médula espinal, extremidad —incluyendo superior e inferior—, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, uréter, uretra, útero. Según se lo usa en la presente memoria, el término “tejido” se refiere a cualquier tipo de tejido en un ser humano o en animales, e incluye, sin limitación, tejido vascular, tejido dérmico, tejido hepático, tejido pancreático, tejido neural, tejido urogenital, tejido gastrointestinal, tejido esquelético —incluyendo hueso y cartilago—, tejido adiposo, tejido conectivo —incluyendo tendones y ligamentos, tejido amniótico, tejido coriónico, duramadre, pericardio, tejido muscular, tejido glandular, tejido facial, tejido oftálmico.

En una realización particular de la presente divulgación, el trasplante es un alotrasplante cardíaco.

Según se lo usa en la presente memoria, el término “células” se refiere a una composición enriquecida para células de interés, preferentemente una composición que comprende al menos un 30%, preferentemente al menos un 50%, aun más preferentemente al menos un 65% de dichas células.

En ciertas realizaciones, las células se seleccionan del grupo constituido por células madre hematopoyéticas multipotentes derivadas de la médula ósea, de la sangre periférica o de sangre del cordón umbilical; o células diferenciadas pluripotentes (es decir, células madre embrionarias (ES) o células madre pluripotentes inducidas (iPS)) o multipotentes derivadas de células madre de diferentes linajes celulares, como cardiomiocitos, células beta-pancreáticas, hepatocitos, neuronas, etc...

En una realización, la composición de células de usada para el trasplante alógeno de células madre hematopoyéticas (HSCT) y, así, comprende células madre hematopoyéticas multipotentes, habitualmente derivadas de la médula ósea, de sangre periférica o de sangre del cordón umbilical.

El HSCT puede ser curativo para pacientes con leucemia y linfomas. Sin embargo, una importante limitación del HCR alógeno es el desarrollo de la enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD), que se produce de manera severa en aproximadamente el 30-50% de los seres humanos que reciben esta terapia.

Los péptidos de la presente divulgación son útiles en la inducción de la tolerancia inmunológica y, así, en la prevención o la reducción de la enfermedad de injerto contra anfitrión (GvHD).

En consecuencia, en una realización, el paciente necesitado de ello está afectado con una enfermedad seleccionada del grupo constituido por leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia mieloide crónica (LMC); síndrome mielodisplásico (SMD)/síndrome mieloproliferativo; linfomas, como los linfomas de Hodgkin y no de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (LLC) y mieloma múltiple.

La invención será ilustrada, además, por las siguientes figuras y los siguientes ejemplos. Sin embargo, no debería interpretarse que estos ejemplos y estas figuras limiten en modo alguno el alcance de la presente invención.

## Figuras

**Figura 1: Análisis de la activación de los Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> en respuesta a la estimulación de péptidos derivados de un donante. (A)** Se cocultivaron Tregs CD8<sup>+</sup> durante 6 días con pDC singénicas maduras con CpG en presencia de péptidos. Para cada experimento, al porcentaje de Tregs CD25 positivos después de 6 días de cultivo únicamente con pDCs, se le dio el valor 1. El valor medio 1 es igual a 32,85 ± 1,98%. Los resultados se expresan como la proporción ± EEM [error estándar de la media] entre el porcentaje de células CD25 positivas tras la estimulación con péptidos y el porcentaje de células CD25 positivas en la condición de control sin péptido. \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 en contraposición con la condición de control (valor 1,0). n=4 a 18 para cada péptido. **(B)** Análisis de la activación de los Treg en respuesta a derivados peptídicos más cortos de Bu31. A la izquierda, 15 derivados de Bu31 son detallados y clasificados por la longitud aa de la secuencia, de 9 aa a 15 aa. La caja destaca una aa discrepante entre el donante y el receptor. A la derecha, la activación de los Treg en respuesta a los derivados de Bu31 fue analizada por la expresión de CD25. Se cocultivaron Tregs CD8<sup>+</sup> durante 6 días con pDC singénicas maduras con CpG en presencia de cada péptido. Las barras representan la proporción entre el porcentaje de células CD25 positivas tras la estimulación con péptidos y el porcentaje de células CD25 positivas en la condición de control sin péptido. \*p<0,05, \*\*p<0,01 en contraposición con la condición de Bu31. n=3 a 14 para cada péptido.

**Figura 2: Fenotipo de los Treg CD8<sup>+</sup> tras la estimulación con alopéptidos ex vivo. (A)** Se cultivaron durante 6 días Tregs y pDC singénicas maduras con CpG, solos, con un péptido de control o con el péptido Bu31. La expresión de los marcadores indicados fue analizada en los Treg CD8<sup>+</sup> en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA **(A)** o mediante citometría de flujo **(B)** tras la estimulación *in vitro*. Los gráficos representan la media ± EEM. \*p<0,05, \*\*p<0,01, n=4 a 7.

**Figura 3: Los Treg activados con Bu31 mantuvieron una actividad supresora eficiente.** Se cocultivaron durante 6 días Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg nuevos y pDC singénicas maduras con CpG, bien con Bu31 o con un péptido de control. En el día 6, los Treg fueron aislados por clasificación celular (TCR+) y su función reguladora fue analizada midiendo su capacidad de suprimir el ensayo de RLM [reacción de linfocitos mixtos]. En el día 6 del cultivo, se analizó la proporción relativa de linfocitos T LEW.1A CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> no modificados marcados con CFSE tras su estimulación con pDCs LEW.1W del donante en ausencia o presencia de Tregs CD8<sup>+</sup> estimulados con péptido durante 6 días con una proporción 1:1 de efector:supresor. Los gráficos representan la media±EEM. \*p<0,05 (izquierda). Los trazados son representativos de cuatro experimentos independientes (derecha).

**Figura 4: Inducción de tolerancia tras una perfusión con el péptido Bu31 in vivo.** Los receptores fueron no tratados (n=9) o tratados con perfusión peptídica continua a corto plazo mediante minibombas osmóticas i.p. [intraperitoneales] que suministraban 0,5 mg/día (n=6) o 1 mg/día (n=5) de péptido. \*\*p<0,01 Bu31 1 mg/día en contraposición con no tratados y Bu31 0,5 mg/día.

**Figura 5: Inducción de tolerancia tras una perfusión con el péptido Bu31 in vivo.** Los receptores fueron no tratados (n=9) o tratados con perfusión continua de péptido mediante minibombas osmóticas de i.p. (ALZET), que suministraban desde el día -7, y durante 28 días, ya fuera 20,83 µg/hora solo (Bu31 0,5 mg/día: n=6), o 40,66 µg/hora en la LEW.1W/LEW.1A (Du51 1 mg/día: n=5) o combinado con una combinación de cepas de mAc anti-CD8 (OX8) (n=2) o BN/LEW.1A (Du51 1 mg/día (BN/1A): n=4).

**Figura 6: Respuestas inmunitarias antidonante.** La producción de aloanticuerpos fue evaluada en animales no modificados (n=3), injertados no tratados (n=3) y tratados con Du51 a largo plazo (n=4). Se recogieron sueros <30 días después del rechazo o > 120 días después del trasplante. Los sueros fueron incubados con esplenocitos del donante y analizados por citometría de flujo para encontrar la producción de Ac [anticuerpos] de IgG, IgG1 o IgG2b. El gráfico representa MFI ± EEM.

**Figura 7. Potencial supresor in vitro de los Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> procedentes de receptores tratados con Bu31.** La proliferación de linfocitos T LEW.1A CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> no modificados marcados con CFSE estimulados con pDCs LEW.1W del donante fue analizada tras 6 días de cultivo, en presencia de Tregs LEW.1A CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> procedentes de receptores no modificados o tratados con Bu31 con diferentes proporciones efector:supresor. La proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> por sí sola fue ~80% y se le dio el valor 100 en cada experimento. Los gráficos representan la media ± EEM de la proliferación relativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. \*p<0,05.

#### Ejemplo: MHCII<sup>+</sup>/alopéptido inducen tolerancia

##### Material y métodos

Animales y modelos de trasplante cardíaca: Se realizaron alotrasplantes de corazón entre ratas macho LEW.1W (RT1.A<sup>u</sup> como donantes) completamente incompatibles con MHC y LEW.1A (RT1.A<sup>a</sup> como receptoras), según se ha descrito previamente (1).

Transferencia de genes arbitrada por adenovirus: La codificación de Ad para la porción extracelular de la CD40 de ratón fusionada a los dominios constantes del IgG1 humano (AdCD40lg) y el adenovirus (Ad) no codificante recombinante Add324 así como el procedimiento de administración del intrainjerto han sido descritos previamente (1). De manera sucinta, se inyectaron lentamente partículas adenovirales (2·10<sup>10</sup> partículas infecciosas) en 3 puntos en las paredes ventriculares cardíacas.



- Bibliotecas de péptidos: Se diseñaron bibliotecas de péptidos 16-méricos solapados con un retraso de 4 aa para cubrir todas las secuencias polimórficas de MHC-I RT1.A<sup>u</sup> (dominios alfa 1, 2 y 3), MHC-II RT1.B<sup>u</sup> (todos los dominios) y MHC-II RT1.D<sup>u</sup> (dominios alfa2 y beta1), según se ha publicado anteriormente (4-6) y fabricados por GL Biochem Ltd. Péptidos liofilizados fueron disueltos en DMSO estéril al 0,4%/agua esterilizada y almacenados a -80°C. Como péptidos de control, los inventores usaron diversos péptidos no activantes alógenos, n<sup>os</sup> 7, 26 y 39, *in vitro*.
- Se diseñaron péptidos degenerados 9 a 15-méricos solapados con un retraso de 1 a 2 aa para cubrir la secuencia del péptido 16-mérico positivamente aislado y sintetizado por GL Biochem Ltd.
- Se demostró, mediante HPLC analítica de fase inversa, que todos los péptidos eran >95% homogéneos y se confirmaron las secuencias aa. Los péptidos fueron diluidos en RPMI-1640 completo a una concentración de 120µg/ml.
- Purificación de linfocitos: Los linfocitos T fueron purificados según se ha descrito anteriormente (2). De manera sucinta, esplenocitos totales fueron mermados con un cóctel de linfocitos T anti-γδ (V65), células anti-CD45RA (OX33), células NK anti-CD161 (3.2.3) y monocitos anti-CD11b/c (OX42) usando perlas magnéticas (Dyna). Los linfocitos T enriquecidos fueron marcados con anti-CD45RC-biotina (OX22) y estreptavidina-PE-Cy7, anti-CD8α-PE (OX8), anti-TCRαβ-Alexa 647 (R73) y mAc anti-CD25<sup>-</sup> FITC (OX39). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> y los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> fueron clasificados después de la regulación de las células TCRαβ<sup>+</sup> con FACSAria (BD Biosciences). La pureza de las poblaciones clasificadas fue mayor del 99%.
- Se purificaron células dendríticas plasmacitoides (pDC) según se ha descrito anteriormente (2). De manera sucinta, esplenocitos recuperados tras la digestión con colagenasa fueron purificados adicionalmente mediante la merma negativa con mAc de linfocitos T anti-TCR (R73 y V65) y linfocitos B anti-CD45RA (OX33). Las células enriquecidas fueron marcadas con anti-CD45R-PE (His24), anti-CD4-APC (OX35), anti-TCR-FITC (R73) y anti-CD45RA-FITC (OX33). Las pDC, definidas como células CD45R y CD4 positivas, fueron clasificadas después de la regulación sobre células FITC negativas.
- Reacción de linfocitos mixtos: Para ensayos de cocultivo de RLM, se pusieron en pocillos pDCs de ratas LEW.1A no modificadas (1,25×10<sup>4</sup> células), Tregs CD8<sup>+</sup>CD40lg singénicos (5×10<sup>4</sup> células) y 120 µg/ml de péptidos alógenos por triplicado en 200µl de caldo RPMI-1640 completo en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 6 días at 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las pDC fueron maduradas con 0,5µM de CpG ODN 1826.
- Para los ensayos supresores de RLM, se pusieron en placas linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> marcados con CFSE clasificados con origen en LEW.1A (5×10<sup>4</sup> células) y pDC alógenas aisladas de animales LEW.1W donantes (1,25×10<sup>4</sup> células) por triplicado durante 6 días en un volumen final de 200µl de caldo RPMI-1640 completo en placas de 96 pocillos de fondo redondo con linfocitos Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> no modificados recién purificados clasificados por FACS o linfocitos Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg expandidos por péptidos (5×10<sup>4</sup> células).
- Para las estimulaciones anti-CD3/anti-CD28, se recubrieron placas de 96 pocillos de fondo redondo con mAc anti-CD3 (1 µg/ml, BD Biosciences) durante 1 hora a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub>, luego fueron lavadas y se añadieron 5·10<sup>4</sup> linfocitos Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg a cada pocillo en 200µl de RPMI-1640 completo más anti-CD28 (10 µg/ml) durante 1, 2, 3 y 6 días.
- La proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> no modificados marcados con CFSE y el fenotipo de los Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> fueron analizados por citometría de flujo en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences) después de la regulación sobre células TCR+CD4<sup>+</sup> o células TCR+CD8<sup>+</sup> entre células vivas (DAPI negativas).
- Tinción extracelular e intracelular: Para la tinción extracelular, las células fueron teñidas con los siguientes mAc: anti-TCRαβ (R73, conjugado con Alexa Fluor 647), anti-CD8α (OX8, conjugado con PE-Cy7, Ebiosciences), anti-CD4 (W3.25, conjugado con PE-Cy7), anti-CD45RC (OX22, conjugado con FITC), anti-CD28 (JJ319, marcado con biotina), anti-CD71 (OX26, marcado con biotina), anti-CD25 (OX39, marcado con biotina) y anti-MHC-II (OX6, marcado con biotina).
- Para la tinción intracelular, las células fueron teñidas a continuación para Foxp3 (marcado con biotina, Ebiosciences) usando el juego de reactivos BD cytofix/cytoperm (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante.
- Todos los mAc biotinilados fueron visualizados usando estreptavidina-PerCP.Cy5.5 (BD Biosciences). Se usó un citofluorímetro FACSCanto II (BD Biosciences) para medir la fluorescencia, y los datos fueron analizados usando el soporte lógico FlowJo (Tree Star, Inc. USA, versión 7.6.5). Las células fueron clasificadas primeramente por su morfología, y las células muertas excluidas, seleccionando células viables DAPI negativas.
- Ensayos de citoquinas: Se midieron IFN<sub>γ</sub>, IL-10 en sobrenadantes del cocultivo usando ELISA, de BD Biosciences OptEIA, IL-12 y TGFβ usando ELISA de Invitrogen y R&D System, respectivamente.
- Análisis estadístico: Para el ensayo de activación con péptidos, se efectuó una prueba de rangos con signo de Wilcoxon no paramétrica, comparando la mediana de columna con un valor hipotético de 1,0. La significación estadística para el fenotipo de las células activadas, la expresión de las citoquinas y el ensayo de proliferación fueron evaluados por una prueba t bicaudal de Mann-Whitney. La supervivencia del injerto fue analizada mediante la prueba

de rangos logarítmicos de Kaplan-Meier. Los análisis se efectuaron con el soporte lógico GraphPad Prism 5.04 (GraphPad).

Autorización del estudio: Todos los estudios en animales fueron autorizados por el comité regional francés de ética de la región del Loira para el cuidado y el uso de animales.

5 Producción de complejos biotinilados RT1-A<sup>a</sup>-péptido: De manera sucinta, la cadena pesada de RT1-A<sup>a</sup> y la β2microglobulina (b2m) fueron clonadas en pET24 y producidas en *Escherichia coli* BL21-DE3. Se produjeron proteínas recombinantes como cuerpos de inclusión, disueltas en 8M de urea y replegadas *in vitro* según se ha descrito anteriormente para complejos humanos HLA-A2/péptido (15). El RT1-A<sup>a</sup>, el b2m y el péptido Bu31-10 fueron replegados en 0,4M de L-arginina, 0,1M Tris pH8, 2mM EDTA, 5mM de glutatión reducido y 0,5mM de glutatión oxidado durante 5 días a 4 °C. A continuación, la solución fue concentrada y el tampón cambiado sobre una membrana de amoníaco de 10 Kd (Millipore, Bedford, Massachusetts). Los complejos plegados de MHC/péptido fueron biotinilados con la enzima BirA (Avidity, Denver, Colorado) durante 5 horas a 30°C y desalados en una columna de desalación Hiprep 26/10 (GE Healthcare). Acto seguido, los complejos de MHC/péptido fueron purificados mediante cromatografía con Q-Sepharose de intercambio aniónico. La biotinilación fue comprobada mediante tetramerización con estreptavidina (Sigma Aldrich) a una proporción molar de 4:1.

20 Tetramerización y tinción: La tetramerización de RT1.A<sup>a</sup>/Bu31-10 se llevó a cabo a temperatura ambiente mediante la adición de estreptavidina-PE (Jackson ImmunoResearch) o estreptavidina-APC (BD Biosciences) a una concentración molar de 4:1, en cuatro partes alícuotas iguales añadidas en intervalos de 15 minutos. Asimismo, el tetrámero de control RT1.A<sup>a</sup>/MTF-E (ILFPSSERLISNR) (SEC ID NO: 22) fue conjugado con estreptavidina-BV421 (Biolegend) y representó un 1,6±0,7% de la tinción inespecífica entre las células específicas Bu31-10. Estos tres reactivos fueron mezclados y añadidos a células en placas a 10 µg/ml durante 1 hora a 4°C. Las células fueron tincionadas, además, para CD8 y CD45RC, y la fluorescencia fue analizada en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences, Mountain View, California). Las células fueron clasificadas primeramente por su morfología, y las células muertas excluidas, seleccionando células DAPI negativas.

25 Tratamiento con péptidos *in vivo*: Los péptidos 16-méricos fueron disueltos DMSO/PBS al en 0,4% antes de la inyección. Para el primer protocolo, se inyectaron i.v. dosis individuales de péptido (500µg/inyección) en diferentes momentos antes y después del trasplante en los días -6, -3, 0, +3 y +7 en los receptores LEW.1A injertados. En el segundo protocolo, se implantaron intraperitonealmente (i.p.) minibombas osmóticas (ALZET, Cupertino, California, EE. UU.) en receptores, y administraron continuamente ya fuera 20,83 o 41,66 µg/hora de péptidos 16-méricos durante 30 14 días. Una primera bomba fue implantada en el día -7 antes del trasplante y fue sustituida por una segunda en el día +7, que permitía la administración de 14 o 28 mg de péptido por animal durante 28 días consecutivos. Se inyectó i.p. un mAc de merma anti-CD8α (OX8, IgG1, 3 mg/kg) dos veces en semana desde el día -7 hasta el rechazo. Los aloinjertos fueron monitorizados diariamente por palpación, y el rechazo del aloinjerto se definió como el cese completo de latidos del corazón palpables.

35 Análisis morfométrico de injertos cardiacos: El tercio superior del injerto fue fijado en paraformaldehído y embebido en parafina. Se tincionaron secciones coronales de 5 µm con hematoxilina-eosina-azafrán. Los tejidos fueron analizados por un patólogo desconocedor de los grupos, y el rechazo crónico fue evaluado según se ha descrito anteriormente (16).

40 Detección de aloanticuerpos específicos al donante: Los aloanticuerpos fueron analizados por citofluorimetría según se ha descrito en otro lugar (14). De manera sucinta, tras la digestión por colagenasa D y lisis de hematíes, los esplenocitos alógenos fueron incubados con suero inactivado por calor diluido (1/8), y luego con anticuerpos de IgG de cabra anti rata conjugados con FITC (específicos a la cadena H+L) (Jackson Laboratories), un mAc de IgG1 de ratón anti rata (MCA 194, Serotec) o IgG2b (MCA 195, Serotec). La unión de anticuerpos fue revelada usando F(ab)'2 de IgG de cabra anti ratón acoplado con FITC (Jackson Laboratories). Las células fueron analizadas usando un 45 citofluorímetro FACS Canto II (BD Biosciences, Mountain View, California) y los resultados fueron expresados como fluorescencia media del canal para cada suero.

## Resultados

### Activación de Tregs CD8<sup>+</sup>CD40lg *in vitro*.

50 Para identificar el reconocimiento del TCR de complejos alógenos de MHC/péptido por los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg y la subsiguiente activación de su función, los inventores tuvieron que seleccionar un marcador específico de la activación, permitiendo el análisis por citometría de flujo tras la exposición a una estimulación antigénica. Por lo tanto, los inventores seleccionaron moléculas expresadas en diferentes momentos por los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg tras la estimulación con anticuerpos policlonales anti-CD3 y anti-CD28. La expresión de moléculas en Tregs CD8<sup>+</sup>CD40lg recién aislados ha sido evaluada anteriormente por Q RT-PCR (1) y se demostró que, entre estas moléculas, CD25 e IFNγ eran 55 marcadores que distinguían a los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg de otras poblaciones celulares. Los inventores analizaron por citometría de flujo en los días 0, 1, 2, 3 y 6 su expresión de CD71, CD25 e IFNγ.

Los inventores confirmaron, en el día 0, que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg expresaban bajos niveles de CD71 (0,83±0,1%), CD25 (12,74±6,1%) e IFNγ (5,57±3,3%). Tras la estimulación policlonal, la expresión de CD71, CD25 e IFNγ aumentó

significativamente desde el primer día y permaneció estable en el tiempo, respectivamente con 82±4,5%, 98,1±1,9% y 91,7±7% de células positivas en el día 6.

En conclusión, los inventores identificaron tres marcadores de interés para los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg con baja expresión basal y regulación significativa al alza tras la estimulación. Dado que CD25 era el marcador más abundante y el primero regulado al alza, y puesto que era un marcador descrito previamente por los inventores y otros (1, 3), los inventores seleccionaron este marcador para evaluar la activación de los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg para los aspectos restantes de este estudio.

Los linfocitos Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg reconocieron dos péptidos derivados del MHC de clase II del donante

En el modelo de aloinjerto cardiaco de rata con MHC no coincidente, los donantes (RT1<sup>u</sup>) y los receptores (RT1<sup>a</sup>) discrepan para todas las moléculas de MHC. Por lo tanto, los inventores alinearon las secuencias de aminoácidos (aa) de MHC I y II del donante y el receptor y diseñaron 82 péptidos 16-méricos solapados haciendo coincidir los dominios polimórficos de las moléculas de MHC I y II del donante (4-6). Los péptidos fueron agrupados en primer lugar en repositorios de 6 a 8 péptidos (30µg/ml de cada péptido) y verificados en un ensayo *in vitro* en el que se cultivaron durante 3 o 6 días células dendríticas plasmacitoides (pDC) singénicas inmaduras o maduras del receptor y Tregs CD8<sup>+</sup>CD40lg clasificados procedentes de receptores portadores de aloinjertos a largo plazo tratados con CD40lg. Con las pDC inmaduras, los inventores no observaron ninguna activación significativa de los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg en el día 3 o el día 6 con ninguno de los repositorios de péptidos alógenos. Tras la estimulación con pDC maduras y repositorios de péptidos alógenos, los inventores observaron en el día 3 una ligera regulación al alza de la expresión de CD25 de una pequeña población de Tregs CD8<sup>+</sup>CD40lg, y, en el día 6, una regulación significativa al alza de la expresión de CD25 tras la estimulación alógena. Estos resultados sugerían que algunos péptidos alógenos eran reconocidos eficientemente por los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg y que este reconocimiento llevaba a una mayor expresión de CD25. También demostraba que las pDC debían estar maduras en el ensayo de los inventores.

A continuación, los inventores comprobaron la capacidad estimuladora de los 82 alopéptidos individuales en presencia de pDC singénicas maduras no modificadas y de Tregs CD8<sup>+</sup>CD40lg purificados procedentes de supervivientes a largo plazo en un cultivo de 6 días (Figura 1A). Los inventores observaron que dos péptidos inducían una regulación sumamente significativa al alza de la expresión de CD25 en la superficie celular de los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg: el péptido nº 31 (denominado Bu31, 1,67±0,09 veces con respecto a sin péptido alguno, p<0,0001), cuya secuencia se solapa con la secuencia del péptido nº 32 (p<0,05), y el péptido nº 51 (denominado Du51, 2,07±0,18 veces con respecto a sin péptido alguno, p<0,001). El Du51 inducía una regulación más fuerte al alza de la expresión de CD25 que Bu31, sugiriendo que Du51 es el péptido dominante reconocido por los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg, mientras que el Bu31 es subdominante. Estos resultados demostraron que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg específicos al antígeno reconocían principalmente dos péptidos: Bu31 (YLRYSDDVGEYRAVTE) y Du51, derivados, respectivamente de la cadena β1 de las moléculas RT1.B<sup>u</sup> y RT1. D<sup>u</sup> de MHC de clase II del donante.

Los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg reconocieron varios péptidos subdominantes alógenos largos

Para determinar la secuencia del péptido donante subdominante natural reconocido por los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg específicos al antígeno, los inventores usaron una biblioteca de péptidos degenerados que oscilaba entre péptidos 9-méricos con un retraso de un aa y péptidos 15-méricos con un retraso de dos o más aa derivados de los péptidos 16-méricos subdominantes Bu31 y 32 (etiquetados nº 31-1 a nº 31-15) (Figura 1B y Tabla 1). El diseño de esta biblioteca se basaba en resultados anteriores y en informes publicados (7- 10) y comprobada en el mismo ensayo *in vitro* descrito anteriormente. Curiosamente, las bibliotecas de péptidos aleatorios han establecido que las moléculas RT1-A<sup>a</sup> de MHC de clase I de rata mostraban una fuerte preferencia por los péptidos 9 a 15-méricos que tenían una arginina (R) en el terminal C (10).

Tabla 1: Lista de péptidos usados en el presente estudio

Nombre	Secuencia	Longitud (aa)	SEC ID NO:
<b>Bu31</b>	YLRYSDDVGEYRAVTE	16	2
<b>32</b>	DSDVGEYRAVTELGPR	16	3
<b>31-1</b>	YLRYSDDVG	9	4
<b>31-2</b>	LRYSDVGE	9	5
<b>31-3</b>	RYSDVGEY	9	6
<b>31-4</b>	YSDVGEYR	9	7
<b>31-5</b>	DSDVGEYRA	9	8

Nombre	Secuencia	Longitud (aa)	SEC ID NO:
31-6	SDVGEYRAV	9	9
31-7	DVGEYRAVT	9	10
31-8	VGEYRAVTE	9	11
31-9	GEYRAVTELGR	11	12
31-10	YLRYS <b>SDVGEYR</b>	12	13
31-11	VGEYRAVTELGR	12	14
31-12	DVGEYRAVTELGR	13	15
31-13	YLRYS <b>SDVGEYRAV</b>	14	16
31-14	<b>SDVGEYRAVTELGR</b>	14	17
31-15	LRY <b>SDVGEYRAVTE</b>	15	18

5 Ninguno de los péptidos derivados 9-méricos nº 31-1 a nº 31-8 fue capaz de inducir una activación de los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg equivalente a la observada con el Bu31 16-mérico. Sin embargo, los inventores pudieron inducir una regulación al alza de CD25 mucho más intensa y significativa con cuatro péptidos derivados: 31-10, 31-13, 31-14 y 31-15, que sugería el reconocimiento de derivados bastante largos que tenían una secuencia SDVGEYR común. Al contrario que otros derivados, la regulación al alza de CD25 inducida por estos péptidos no fue significativamente diferente de la inducida por Bu31 (Figura 1B).

10 En conjunto, estos resultados mostraron que a los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg les fueron presentados varios péptidos subdominantes derivados del MHC de clase II, de longitud mayor que 9 aa y que comprendían una secuencia común (SDVGEYR) y que tal presentación indujo la activación de las células específicas.

Los linfocitos Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg activados con Bu31 presentaron un fenotipo modificado y suprimieron eficientemente los linfocitos T activados específicos al antígeno

15 El fenotipo de los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg activados con Bu31 fue analizado 6 días tras la estimulación (Figuras 2A y 2B). Los inventores demostraron previamente que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg actuaban mediante la secreción de altos niveles de IFN $\gamma$ , que, a su vez, inducían la expresión deIDO por las DC y las EC de injerto, y que esta acción era necesaria para la inducción de la tolerancia *in vivo* (1). Según estos resultados, los inventores observaron que la estimulación de los Treg CD8<sup>+</sup> por el péptido en presencia de pDCs condujo a una expresión significativamente mayor de IFN $\gamma$ , lo más probable por los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg activados (Figura 2A). En los mismos sobrenadantes del cultivo, los inventores no observaron modificación alguna de la expresión de IL-12, TGF $\beta$  y IL-10 que pudiera ser producida tanto por los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg como por las pDC. Los inventores también observaron una regulación al alza de CD71, CD28 y del MHC de clase II, pero ninguna modificación de la expresión de Foxp3 tras 6 días de estimulación con péptidos (Figura 2B).

25 Los inventores demostraron previamente que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg, en presencia de pDC alógenas o de pDC singénicas y de un lisado de células del donante, podían suprimir la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> singénicos efectores, lo que demostraba que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg actuaban a través del sistema directo e indirecto de alorreconocimiento, y que son células supresoras más eficientes que los Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> no modificados (2). Aquí, los inventores investigaron si los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg estimulados con Bu31 podían suprimir eficientemente la proliferación de linfocitos T efectores tras 6 días de cocultivo y mantenían así su actividad supresora, en comparación con los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg estimulados con un péptido de control no activante. Los inventores llevaron a cabo un ensayo de RLM estimulando Tregs CD8<sup>+</sup>CD40lg durante 6 días en presencia de pDC singénicas y Bu31 o un péptido no activante. Los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg estimulados con péptidos fueron clasificados entonces usando FACS Aria y añadidos en un ensayo de RLM directa de pDC alógenas clasificadas y linfocitos T efectores singénicos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> marcados con CFSE. Los inventores emitieron la hipótesis de que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg expandidos ejercerían una regulación inespecífica de la proliferación de los linfocitos T efectores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> estimulados por el sistema de alorreconocimiento directo (11, 12). Para evaluar esto, los inventores midieron la proporción relativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en división en el día 6 del cocultivo (Figura 3). En ausencia de Tregs, los inventores observaron una proporción relativa del 80,5% de linfocitos T efectores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en división en el día 6, lo que sugería que los linfocitos T efectores que respondían habrían proliferado mucho. La adición de Tregs estimulados con Du51 dio lugar a una disminución significativa en la proporción relativa de linfocitos T efectores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en división, lo que mostraba una inhibición significativa de la división de los linfocitos T efectores que respondían con respecto a los Treg estimulados por un péptido no activante. Así, los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg específicos al antígeno Bu31 mantuvieron una

actividad supresora eficiente tras su activación *in vitro*, y los Treg que quedaron sin estimular durante 6 días perdieron su actividad supresora y empezaron a morir por desatención.

Inducción de tolerancia mediante tratamiento *in vivo* con un péptido subdominante

5 Para determinar adicionalmente el potencial del péptido subdominante identificado en la generación *in vivo* de Tregs CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> y en la supervivencia de aloinjertos, los animales fueron tratados con el péptido como monoterapia. Dado que tales péptidos pequeños son eliminados rápidamente del cuerpo de receptor, el uso de minibombas osmóticas permitía una administración intraperitoneal constante de 0,5 mg/día durante 28 días, empezando el día -7 antes del trasplante. Esta dosis no era suficiente para inducir la prolongación de la supervivencia de aloinjertos. Curiosamente, una dosis dos veces más alta del péptido —es decir, 1 mg/día— indujo una supervivencia indefinida de los aloinjertos en el 80% de los receptores (\*\*p<0,01 en comparación con 0,5 mg/día y sin tratamiento alguno) (Figura 4).

Identificación de los Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> específicos a Bu31-10 usando un tetrámero de MHC de clase I reveló su enriquecimiento en receptores tratados con CD40lg

15 Los inventores generaron un tetrámero RT1.A<sup>9</sup>/Bu31-10 de MHC de clase I que fue marcado con ficoeritrina (PE) y alofocianina (APC) y tincionaron poblaciones específicas en el bazo y el injerto. Las células fueron tincionadas primero con una mezcla de tetrámeros RT1.A<sup>9</sup>/Bu31-10 conjugados con PE y conjugados con APC, junto con un tetrámero RT1.A<sup>9</sup>/MTF-E de control marcado con BV421 según se ha descrito anteriormente. Las células fueron tincionadas de manera secundaria con CD8-PCy7 y CD45RC-FITC para identificar a los Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup>. Con tal estrategia, los inventores son capaces de identificar un 0,281% en el bazo y un 1,11% en el injerto de células específicas a Bu31 entre los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg. En la población de Tregs CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> de bazo no modificados, los inventores evaluaron la frecuencia de precursores en el 0,187%, demostrando que incluso 120 días tras el trasplante y el tratamiento con CD40lg, la frecuencia seguía incrementada aproximadamente 2 veces en el bazo, muy enriquecida en el injerto y que, en los animales no modificados, los inventores podían identificar un repositorio de Tregs específicos del donante.

25 En conjunto, estos resultados demostraron que los inventores eran capaces de generar un tetrámero RT1A<sup>9</sup>/Bu31-10 funcional para detectar Tregs CD8<sup>+</sup> subdominantes específicos a un aloantígeno, una población que era significativamente mayor tras el trasplante y el tratamiento con CD40lg.

Inducción de tolerancia por un tratamiento *in vivo* con el péptido subdominante Bu31 correlacionado con una mayor capacidad supresora de los Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> y la total inhibición de las respuestas de anticuerpos antidonante

30 Para determinar adicionalmente el potencial del péptido subdominante identificado en la potenciación *in vivo* de los Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> y en la supervivencia de aloinjertos, los animales fueron tratados con minibombas osmóticas con una administración interperitoneal constante de 0,5 o 1mg de péptido por día durante 28 días, empezando el día -7 antes del trasplante. Curiosamente, este protocolo permitió una prolongación significativa de la supervivencia de aloinjertos (p<0,01 en comparación con el péptido de control y sin tratamiento alguno) con un 80% de supervivencia indefinida de los aloinjertos usando 1mg/día del péptido Bu31 en comparación con el péptido de control (Figura 5). Para demostrar que la tolerancia inducida por la perfusión del péptido dependía de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, los inventores cotrataron al receptor con la perfusión del péptido y un mAc (OX8) de merma anti-CD8, según se ha descrito anteriormente (1). La administración de anticuerpos anti-CD8 abolió por completo la supervivencia de los aloinjertos, indicando que se requería el reconocimiento del MHC de clase I o del antígeno por parte de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el establecimiento de la tolerancia obtenida por la perfusión del péptido.

Es importante destacar que los injertos de terceros en ratas marrones noruegas (BN) fueron rechazados con rapidez el día 7 tras el trasplante, demostrando que la perfusión del péptido Bu31 induce tolerancia específica al donante arbitrada por los Treg CD8<sup>+</sup>.

45 Los corazones injertados de receptores supervivientes a largo plazo tratados con el péptido Bu31 fueron analizados en busca de signos de rechazo crónico, de presencia de anticuerpos antidonante y de supresión de Tregs CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> *in vitro* hacia linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores (Figuras 6 y 7). El análisis anatomopatológico del injerto de los receptores a largo plazo no mostró signo alguno de rechazo crónico según un baremo previamente establecido (14). Los inventores observaron una total inhibición de la producción total de aloanticuerpos IgG, IgG1, e IgG2b en receptores supervivientes a largo plazo tratados con Bu31 con respecto a ratas no tratadas, lo que podría correlacionarse con la ausencia de rechazo crónico (14) (Figura 6). Por último, los inventores confirmaron que estos Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup> activados inducidos por el péptido presentaban una actividad supresora superior *ex vivo*, dado que inhiben significativamente la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores de una manera dependiente de la dosis y más eficientemente que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg recién purificados (Figura 7).

55

## Referencias:

1. Guillonneau, C., Hill, M., Hubert, F.X., Chiffolleau, E., Herve, C., Li, X.L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Menoret, S., et al. 2007. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117: 1096-1106.
- 5 2. Li, X.L., Menoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. 2010. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* 185:823-833.
- 10 3. Sagoo, P., Ali, N., Garg, G., Nestle, F.O., Lechler, R.I., y Lombardi, G. 2011. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 3:83ra42.
4. van Denderen, B., Peche, H., Gagne, K., Usal, C., Cuturi, M.C., y Souillou, J.P. 2001. Identification of immunodominant donor MHC peptides following rejection and donor strain transfusion-induced tolerance of heart allografts in adult rats. *Eur J Immunol* 31:1333-1339.
- 15 5. Ballet, C., Renaudin, K., Degauque, N., Le Mai, H., Boëffard, F., Lair, D., Berthelot, L., Feng, C., Smit, H., Usal, C., et al. 2008. Indirect CD4<sup>+</sup> TH1 response, anti-donor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long term recipients conditioned by donor antigens priming. *Am J Transplant* 9:697-708.
6. Ettinger, R.A., Moustakas, A.K., y Lobatón, S.D. 2004. Open reading frame sequencing and structure-based alignment of polypeptides encoded by RT1-Bb, RT1-Ba, RT1-Db, and RT1-Da alleles. *Immunogenetics* 56:585-596.
- 20 7. Thorpe, C.J., Moss, D.S., Powis, S.J., Howard, J.C., Butcher, G.W., y Travers, P.J. 1995. An analysis of the antigen binding site of RT1.Aa suggests an allele-specific motif. *Immunogenetics* 41:329-331.
8. Powis, S.J., Young, L.L., Joly, E., Barker, P.J., Richardson, L., Brandt, R.P., Melief, C.J., Howard, J.C., y Butcher, G.W. 1996. The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 4:159-165.
- 25 9. Stevens, J., Wiesmuller, K.H., Barker, P.J., Walden, P., Butcher, G.W., y Joly, E. 1998. Efficient generation of major histocompatibility complex class I-peptide complexes using synthetic peptide libraries. *J Biol Chem* 273:2874-2884.
10. Stevens, J., Wiesmuller, K.H., Walden, P., y Joly, E. 1998. Peptide length preferences for rat and mouse MHC class I molecules using random peptide libraries. *Eur J Immunol* 28:1272-1279.
- 30 11. Karim, M., Feng, G., Wood, K.J., y Bushell, A.R. 2005. CD25+CD4<sup>+</sup> regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood* 105:4871-4877.
- 35 12. Wan, Q., Kozhaya, L., Imberg, K., Mercer, F., Zhong, S., Krogsgaard, M., y Unutmaz, D. 2013. Probing the effector and suppressive functions of human T cell subsets using antigen-specific engineered T cell receptors. *PLoS One* 8:e56302.
13. Gras S, Kjer-Nielsen L, Burrows SR, McCluskey J, Rossjohn J. 2008. T-cell receptor bias and immunity. *Curr Opin Immunol.* 20(1):119-25.
- 40 14. Guillonneau, C., Seveno, C., Dugast, A.S., Li, X.L., Renaudin, K., Haspot, F., Usal, C., Veziere, J., Anegon, I., y Vanhove, B. 2007. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40lg-treated heart allograft recipients. *J Immunol* 179:8164-8171.
15. Garboczi, D.N., Hung, D.T., y Wiley, D.C. 1992. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3429-3433.
- 45 16. Guillonneau, C., Louvet, C., Renaudin, K., Heslan, J.M., Heslan, M., Tesson, L., Vignes, C., Guillot, C., Choi, Y., Turka, L.A., et al. 2004. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol* 172:1619-1629.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSERM UNIVERSITE DE NANTES

<120> Péptido de donante aislado derivado de MHC y usos del mismo

5 <130> 14069GUILLONNEAU/AS

<150> EP 14 163 072.3

<151> 01-04-2014

10 <160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Secuencia común

<400> 1  
Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ser  
1 5

25 <210> 2  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Bu31 subdominante

<400> 2  
Tyr Leu Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu  
1 5 10 15

35 <210> 3  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Péptido 32

<400> 3  
Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro  
1 5 10 15

45 <210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> 9-mero péptido 31-1

55 <400> 4  
Tyr Leu Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly  
1 5

60 <210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
 <223> 9-mero péptido 31-2  
 5 <400> 5  
 Leu Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu  
 1 5  
 <210> 6  
 <211> 9  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> 9-mero péptido 31-3  
 15 <400> 6  
 Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr  
 1 5  
 <210> 7  
 <211> 9  
 20 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> 9-mero péptido 31-4  
 25 <400> 7  
 Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg  
 1 5  
 <210> 8  
 <211> 9  
 30 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> 9-mero péptido 31-5  
 35 <400> 8  
 Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala  
 1 5  
 <210> 9  
 <211> 9  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> 9-mero péptido 31-6  
 <400> 9  
 Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val  
 50 1 5  
 <210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 55 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> 9-mero péptido 31-7  
 <400> 10  
 60



Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr  
 1 5

<210> 11  
 <211> 9  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> 9-mero péptido 31-8

10 <400> 11  
 Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu  
 1 5

15 <210> 12  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> 11-mero péptido 31-09

<400> 12  
 Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg  
 1 5 10

25 <210> 13  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> 12-mero péptido 31-10

<400> 13  
 Tyr Leu Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg  
 1 5 10

35 <210> 14  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> 12-mero péptido 31-11

<400> 14  
 Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg  
 1 5 10

45 <210> 15  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial

<220>  
 <223> 13-mero péptido 31-12

55 <400> 15  
 Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 14  
 60 <212> PRT

ES 2 702 676 T3

<213> Artificial

<220>  
<223> 14-mero péptido 31-13

5

<400> 16  
Tyr Leu Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val  
1 5 10

<210> 17  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> 14-mero péptido 31-14

15

<400> 17  
Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg  
1 5 10

20

<210> 18  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

25

<220>  
<223> 15-mero péptido 31-15

30

<400> 18  
Leu Arg Tyr Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu  
1 5 10 15

<210> 19  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> Péptido 33

40

<400> 19  
Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg  
1 5 10 15

<210> 20  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

45

<220>  
<223> Péptido 34

50

<400> 20  
Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg Ala Val Thr Glu  
1 5 10 15

<210> 21  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

55

<220>  
<223> Secuencia común

60

<400> 21

Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg  
1 5

<210> 22  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Tetrámero RT1.Aa/MTF-E de control

10

<400> 22  
Ile Leu Phe Pro Ser Ser Glu Arg Leu Ile Ser Asn Arg  
1 5 10

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método *in vitro* o *ex vivo* de generación de una población de Tregs CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>baja</sup>, que comprende una etapa de cultivo de una población de Tregs CD8<sup>+</sup> con un caldo de cultivo que comprende un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID NO: 2 en presencia de una población de células dendríticas plasmacitoides.
2. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID NO: 2 para ser usado como fármaco.
3. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID NO: 2 para ser usado en la inducción de tolerancia en un paciente necesitado de la misma.
- 10 4. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID NO: 2 para ser usado en la prevención o la reducción del rechazo de trasplantes en un paciente necesitado de las mismas.

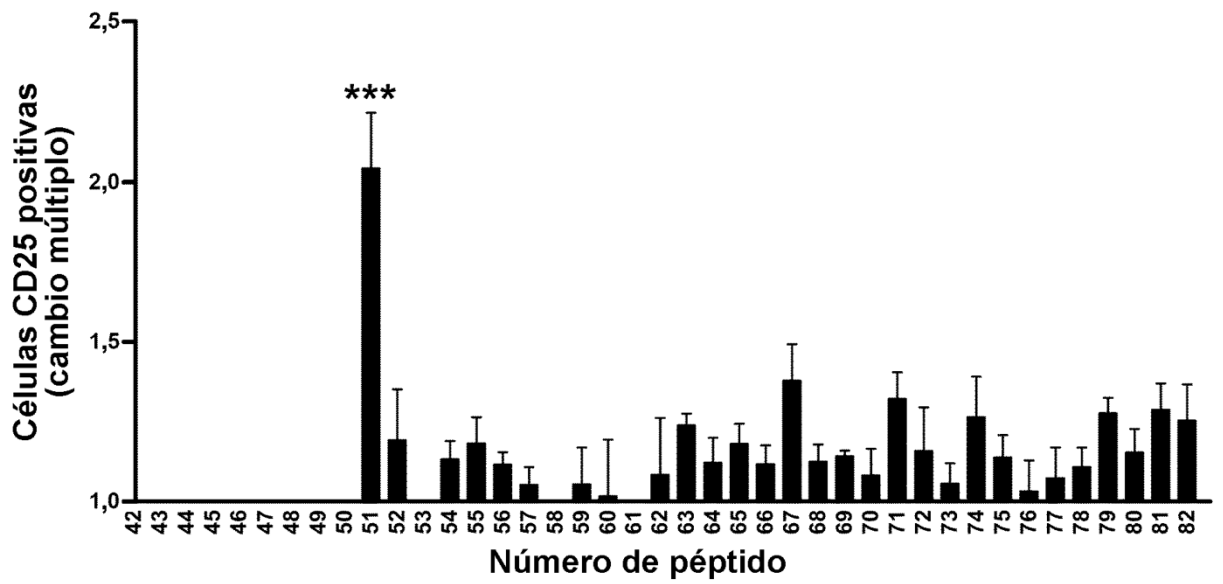
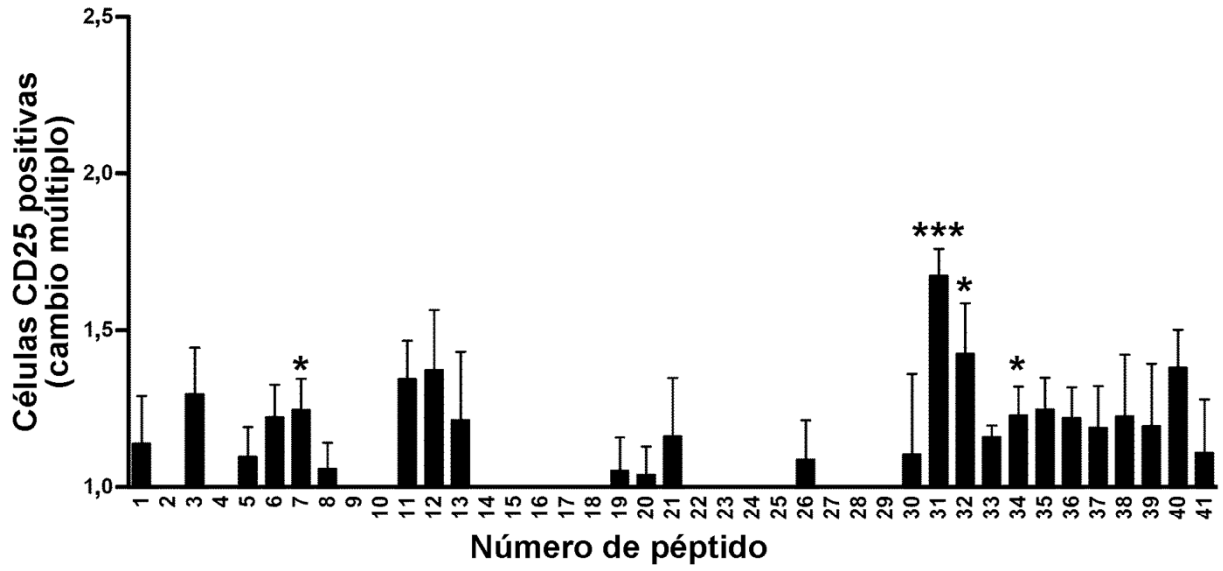


Figura 1A

Nombre	Secuencia	Longitud (aa)
Bu31	Y L R Y D S D V G E Y R A V T E	16
32	D S D V G E Y R A V T E L G R P	16
31-1	Y L R Y D S D V G	9
31-2	L R Y D S D V G E	9
31-3	R Y D S D V G E Y	9
31-4	Y D S D V G E Y R	9
31-5	D S D V G E Y R A	9
31-6	S D V G E Y R A V	9
31-7	D V G E Y R A V T	9
31-8	V G E Y R A V T E	9
31-9	G E Y R A V T E L G R	11
31-10	Y L R Y D S D V G E Y R	12
31-11	V G E Y R A V T E L G R	12
31-12	D V G E Y R A V T E L G R	13
31-13	Y L R Y D S D V G E Y R A V	14
31-14	S D V G E Y R A V T E L G R	14
31-15	L R Y D S D V G E Y R A V T E	15

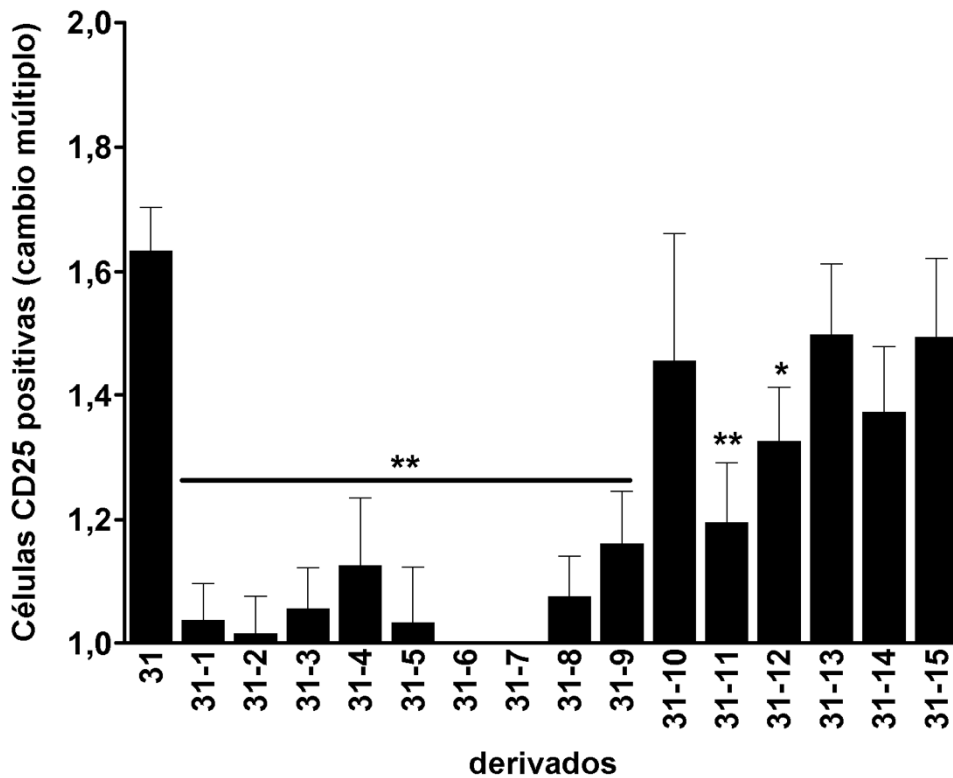


Figura 1B

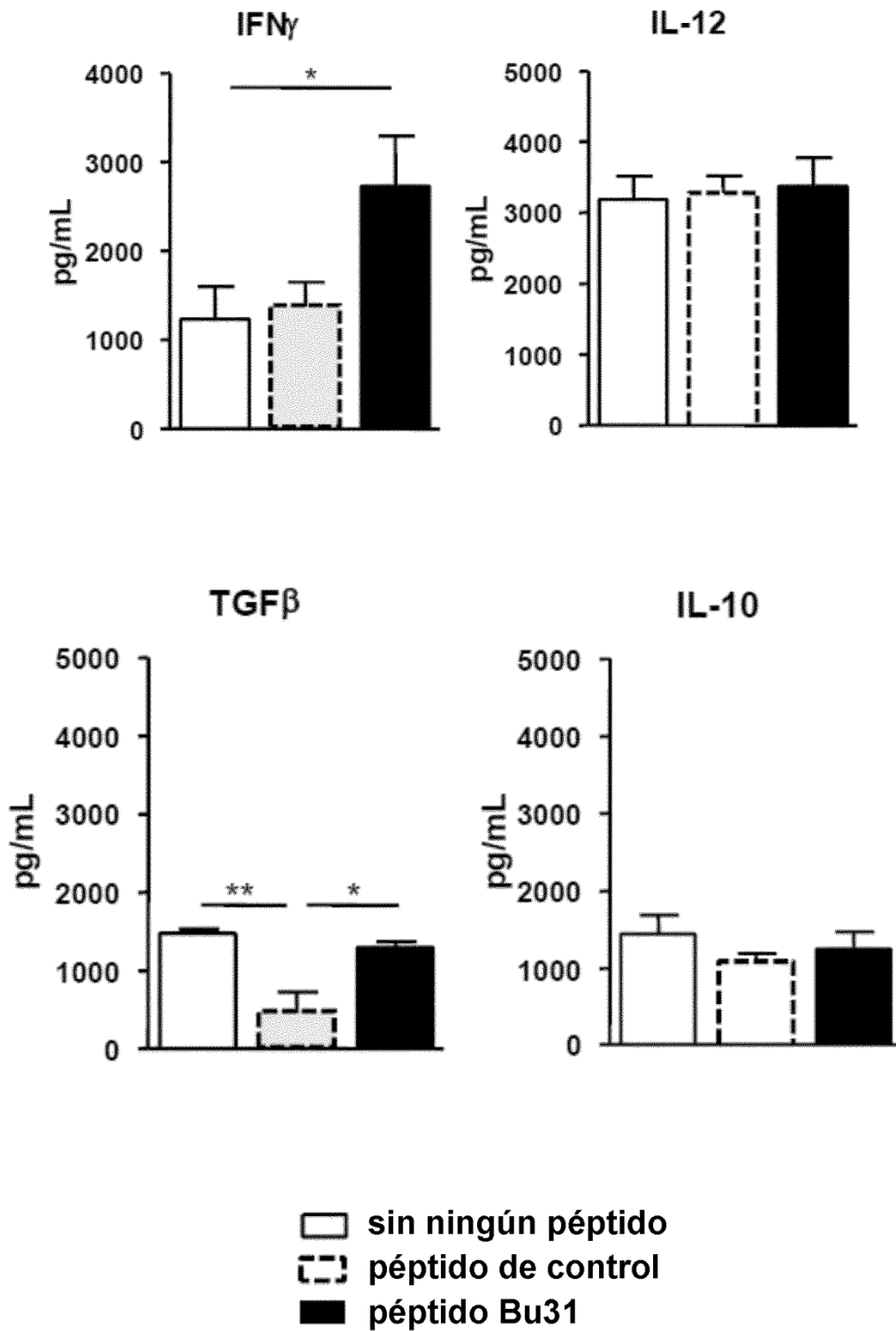


Figura 2A

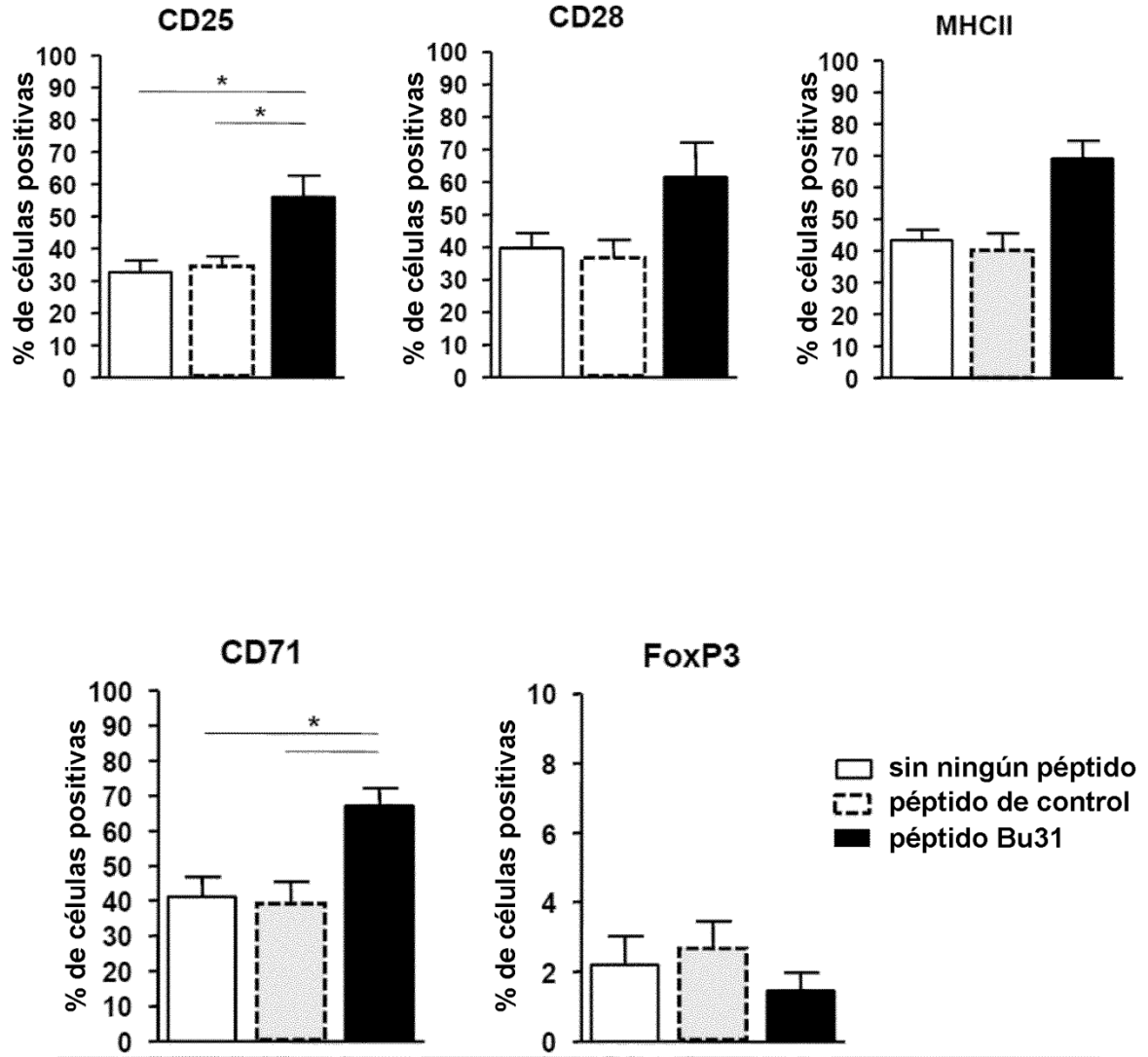


Figura 2B



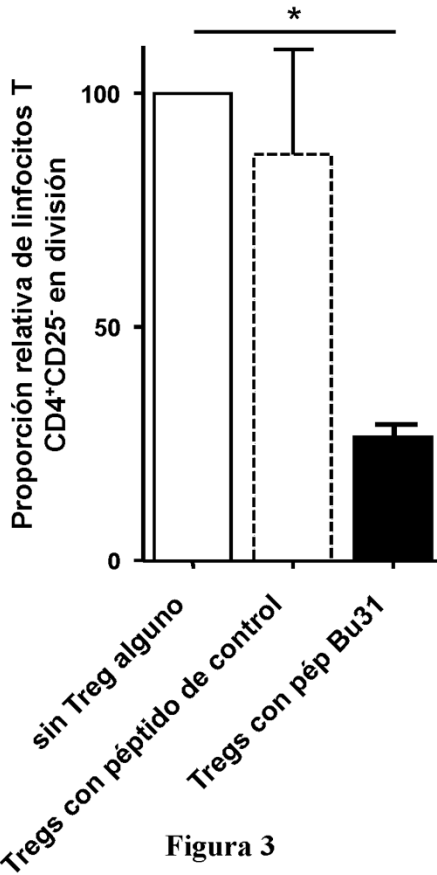


Figura 3

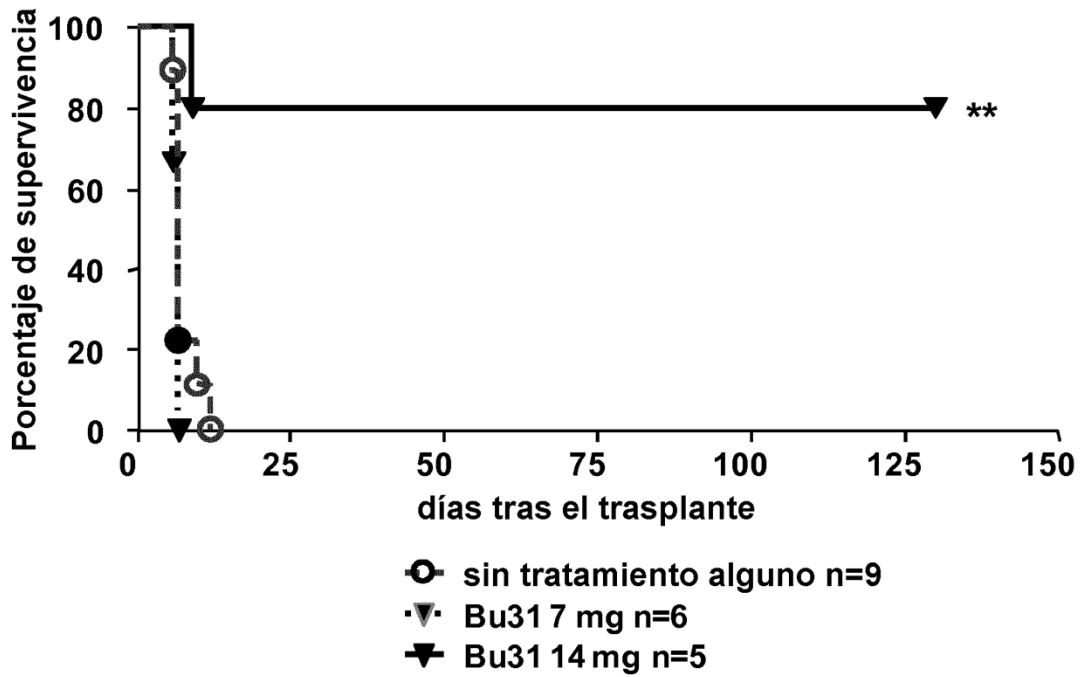


Figura 4

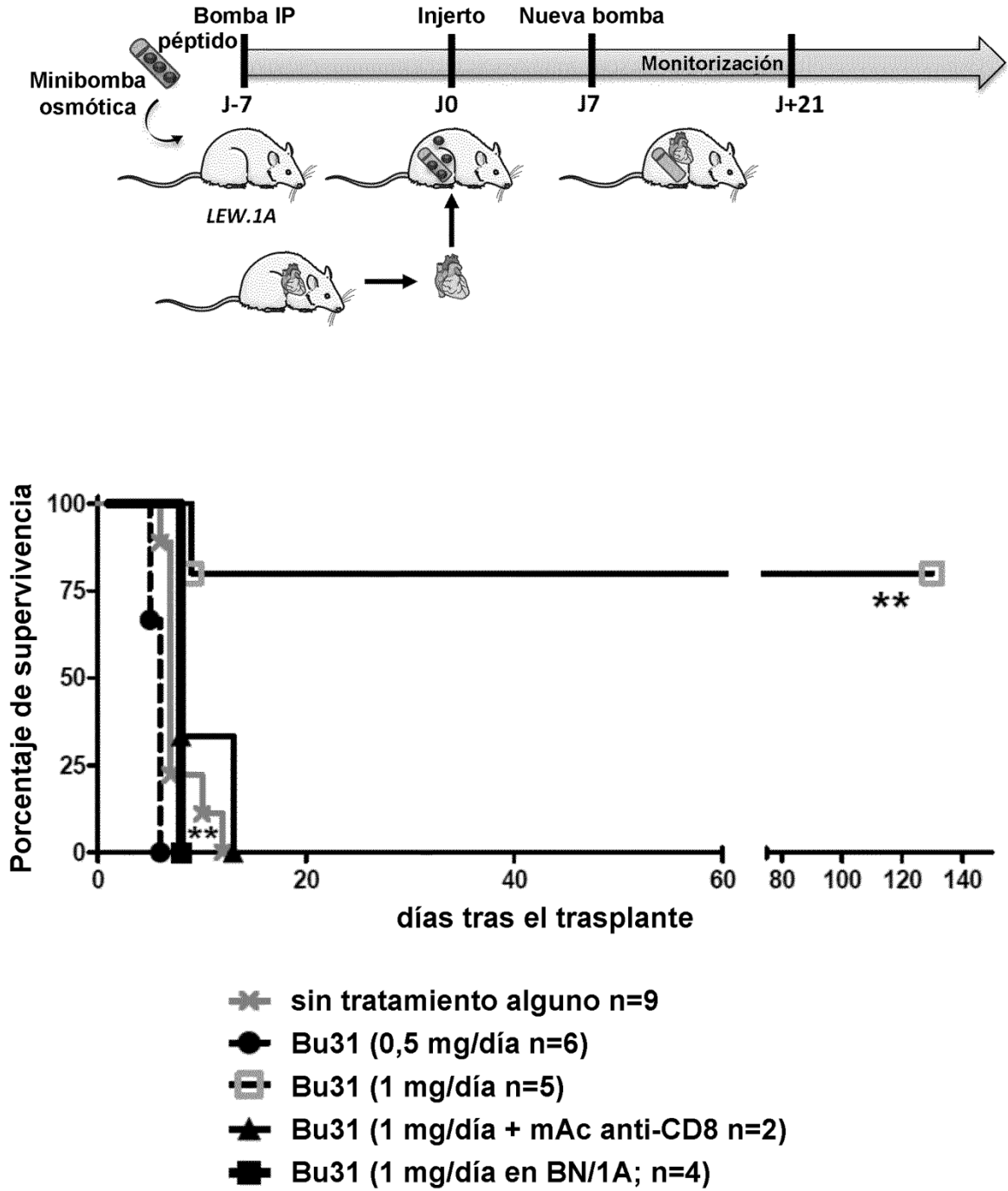


Figura 5

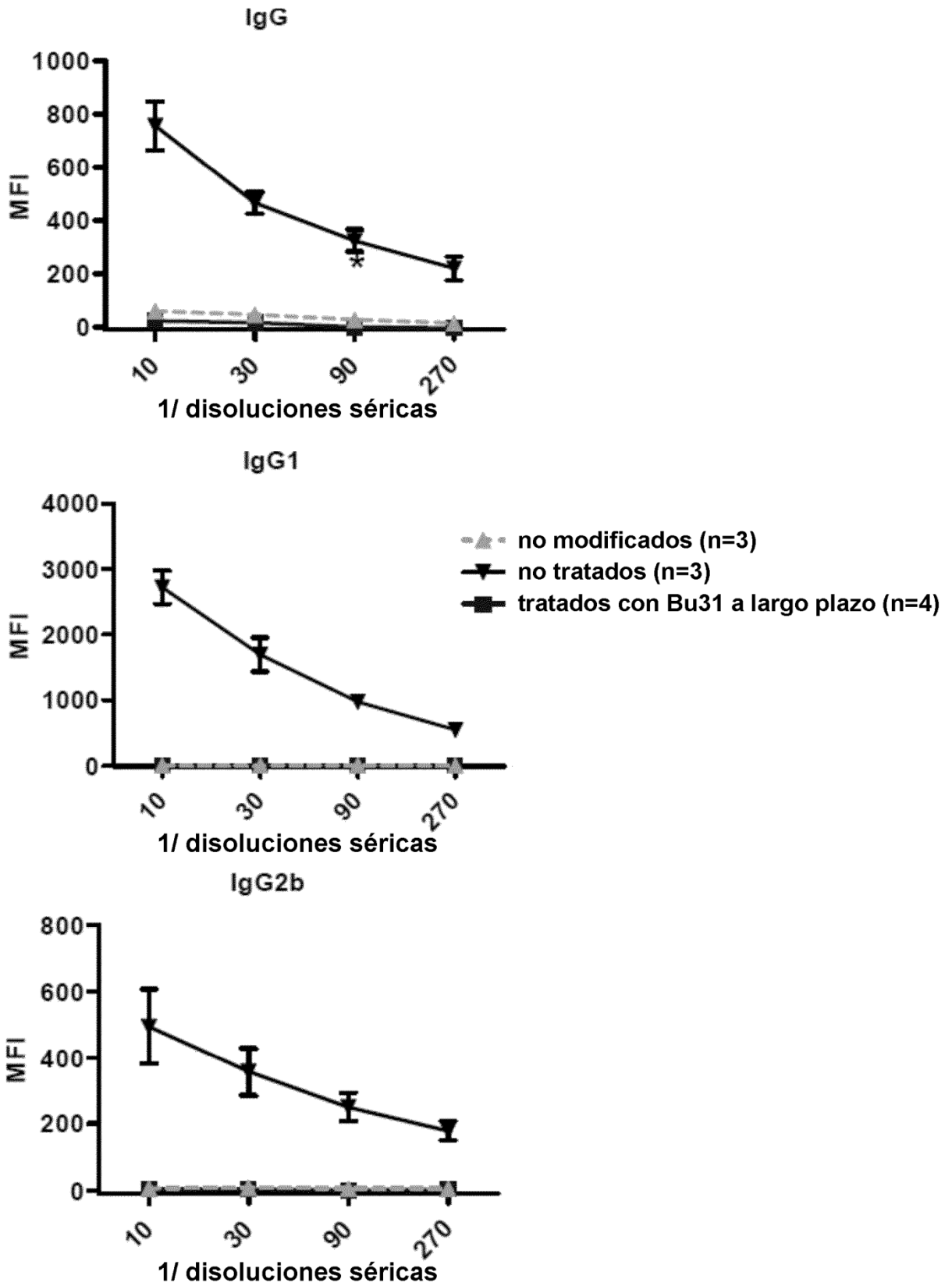


Figura 6

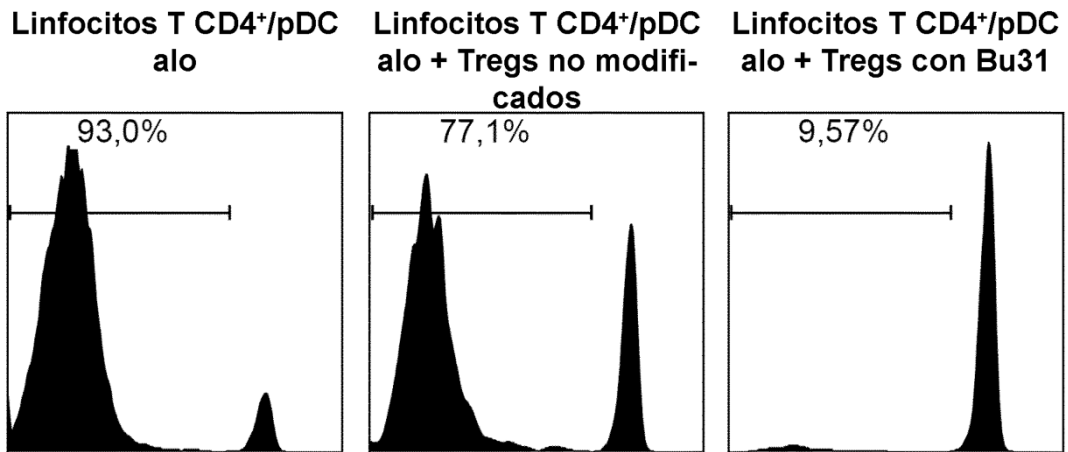
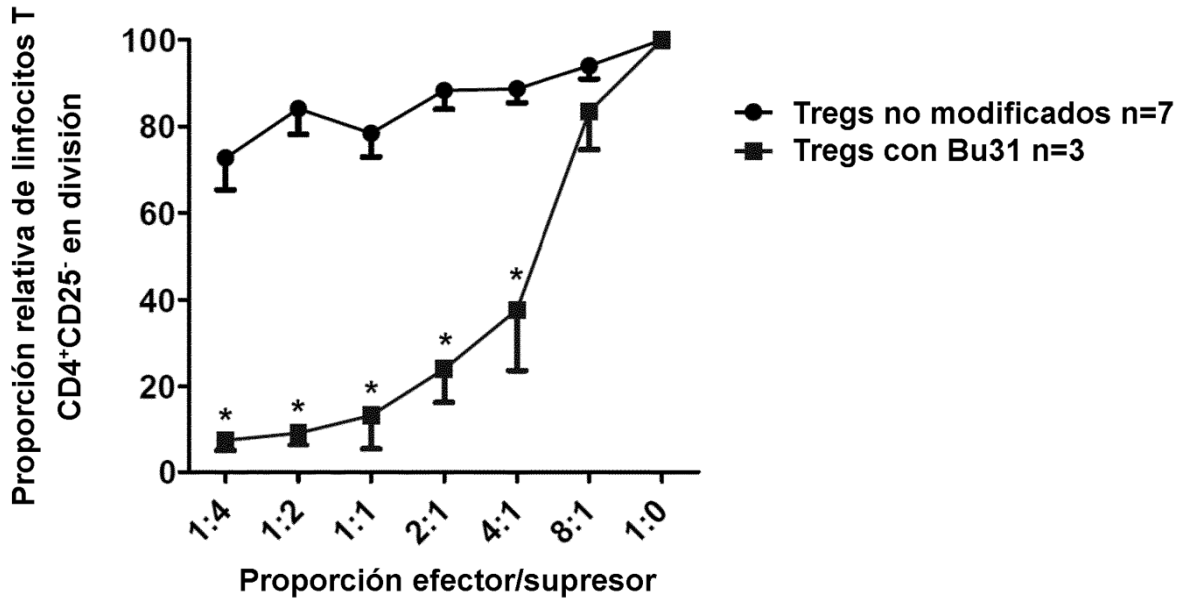


Figura 7