

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 605**

51 Int. Cl.:

C07K 14/74 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2015 PCT/EP2015/074063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16059236**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2015 E 15787917 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3207053**

54 Título: **Nuevos péptidos inmunógenos**

30 Prioridad:

17.10.2014 GB 201418433

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

01.04.2020

73 Titular/es:

**IMCYSE SA (100.0%)
GIGA B34, Avenue de l'Hôpital 1
4000 Liège , BE**

72 Inventor/es:

**SAINT-REMY, JEAN-MARIE;
CARLIER, VINCENT;
VANDER ELST, LUC y
BURKHART, DAVID**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 751 605 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

Nuevos péptidos inmunógenos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos inmunógenos. Los péptidos se usan en sistemas *in vitro* e *in vivo* para generar linfocitos T CD4+ citolíticos específicos de antígeno. Los péptidos y células obtenidos por estos péptidos se usan como péptidos farmacéuticamente activos para una variedad de trastornos que incluyen enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple.

Antecedentes de la invención

10 El documento WO2008/017517 desvela una nueva clase de péptidos que comprenden un epítipo de linfocitos T de MHC clase II de un antígeno y una secuencia de motivos redox.

15 Las secuencias de motivos redox se han revisado en Fomenko y col., (2003) *Biochemistry* 42, 11214-11225. Las diferentes alternativas de la secuencia de motivos redox son C(X)2C [SEQ ID NO: 71], C(X)2S [SEQ ID NO: 72], C(X)2T [SEQ ID NO:73], S(X)2C(X)[SEQ ID NO: 74], y T(X)2C [SEQ ID NO: 75]. Otro estado de la técnica anterior sobre las secuencias de motivos redox comenta la relevancia de una histidina dentro de la secuencia de motivos redox [Kortemme y col. (1996) *Biochemistry* 35, 14503-14511].

20 El documento WO2008/017517 explica que la combinación de un epítipo de linfocitos T y una secuencia de motivos redox en la proximidad del otro en un péptido proporciona propiedades que no se han reconocido previamente. En particular, tales péptidos tienen la capacidad de generar una población de linfocitos T citolíticos CD4+ que eliminan específicamente las células presentadoras de antígeno que presentan el antígeno que comprende el epítipo de linfocitos T que está presente en el péptido.

25 En consecuencia, estos péptidos pueden usarse para bloquear una respuesta inmune en una etapa muy temprana, es decir, al nivel de la presentación del antígeno. El documento WO2008/017517 demuestra el uso médico de estos péptidos en el tratamiento y prevención de alergias y trastornos inmunes. El concepto se ha publicado posteriormente en Carlier y col. (2012) *Plos one* 7,10 e45366. Otras solicitudes de patente demostraron que tales péptidos pueden usarse en otras aplicaciones médicas en las que se deben evitar respuestas inmunitarias, tales como el tratamiento de tumores, rechazos de trasplantes, respuestas inmunes contra alofactores solubles, respuestas inmunes contra proteínas víricas codificadas por la estructura principal de vectores víricos.

30 En este sentido, el documento WO2013113076 desvela péptidos inmunógenos que comprenden un epítipo de linfocitos T, modificado mediante la adición de una cisteína, la inserción de una cisteína o la mutación a cisteína de un resto en una posición adyacente a pero fuera del sitio de unión al MHC del péptido, lo que da como resultado respuestas de los linfocitos T CD4+ más fuertes que las obtenidas con los mismos péptidos que no comprenden dicha modificación. Dichos péptidos se desvelan para su uso en el tratamiento, la supresión o la prevención de enfermedades tales como enfermedades infecciosas o alérgicas y enfermedades autoinmunes, en la prevención o supresión del rechazo al trasplante, o en la erradicación de células tumorales.

35 Las publicaciones anteriores describen el tipo de secuencia de motivos redox y la separación entre el motivo redox y la secuencia de epítipos de linfocitos T. No se han descrito otros determinantes en los péptidos que puedan proporcionar propiedades mejoradas a los péptidos.

Sumario de la invención

40 Las diferentes alternativas de la secuencia de motivos redox de 4 aminoácidos tal como se menciona en la introducción también pueden escribirse como [CST]-X(2)-C [SEQ ID NO: 76] o C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 77]. La presente divulgación revela que la presencia de un aminoácido Histidina adicional inmediatamente adyacente fuera del motivo (N-terminal del motivo (posición -1) o C-terminal del motivo (posición +5)) aumenta la estabilidad del motivo redox. Por lo tanto, la presente invención se refiere a motivos redox modificados con estructura general o H-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78] o [CST]-X(2)-C-H [SEQ ID NO: 79].

45 Con esta estabilidad mejorada aumenta la actividad reductora específica del péptido, de manera que por ejemplo se puede usar menos péptido o se reduce el número de inyecciones, en comparación con un péptido en el que no está presente la Histidina adicional.

50 Un primer aspecto se refiere a un péptido inmunógeno aislado de entre 13 y 100 aminoácidos que comprende un epítipo de linfocitos T de MHC clase II de un antígeno e inmediatamente adyacente o separado por al menos 7 aminoácidos a partir de tal epítipo un H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] ([SEQ ID NO: 78], [SEQ ID NO: 90] [SEQ ID NO:91]) o un [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H ([SEQ ID NO: 79], [SEQ ID NO: 92] o [SEQ ID NO: 93]) para uso como medicamento.

En ciertas realizaciones, el antígeno no contiene en su secuencia el motivo dentro de una distancia de 10 aminoácidos del epítipo, o incluso no contiene en su secuencia el motivo.

En realizaciones específicas el motivo es la secuencia de motivos redox H-X-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 90] o [CST]-X(2)-C-X-H [SEQ ID NO: 92], o es la secuencia de motivos redox H-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78] o [CST]-X(2)-CH [SEQ ID NO: 79].

5 H-X(0,2)-C-X(2)-C ([SEQ ID NO: 80], [SEQ ID NO: 96] o [SEQ ID NO: 97]) o C-X(2)-C-X(0,2)-H ([SEQ ID NO: 83], [SEQ ID NO: 94] o [SEQ ID NO: 95]).

H-C-X(2)-C [SEQ ID NO: 80] o C-X(2)-C-H [SEQ ID NO: 83].

En realizaciones específicas, los péptidos tienen una longitud de entre 13 y 75 aminoácidos, entre 13 y 50 aminoácidos, o entre 13 y 30 aminoácidos.

10 El epítipo de linfocitos T de MHC de clase II, puede separarse del motivo por una secuencia de como máximo 4 aminoácidos, o por una secuencia de 2 aminoácidos.

En realizaciones específicas, X dentro del motivo redox es Gly o Pro, o X dentro del motivo redox no es Cys.

En otra realización específica, X fuera del motivo redox no es Cys, Ser o Thr.

Los péptidos pueden usarse en la prevención o tratamiento de la esclerosis múltiple (MS), por lo que el antígeno es un autoantígeno implicado en la esclerosis múltiple, tal como MOG.

15 Las modalidades específicas de un péptido para MS comprenden la secuencia de epítopos VVHLYRNGK [SEQ ID NO: 3], tal como HCPYCSRNVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 1], HxCPYCSRNVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 115], o HxxCPYCSRNVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 116].

Los péptidos se pueden usar en la prevención o en el tratamiento de la diabetes, en donde el antígeno es, por ejemplo, proinsulina.

20 Otro aspecto se refiere a péptidos inmunógenos aislados de entre 13 y 100 aminoácidos que comprenden un epítipo de linfocitos T de MHC clase II de un antígeno e inmediatamente adyacentes o separados por un máximo de 7 aminoácidos a partir del epítipo una secuencia de motivos redox H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] ([SEQ ID NO: 78] o [SEQ ID NO: 90], [SEQ ID NO: 91]), [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H [SEQ ID NO: 79], [SEQ ID NO: 92] o [SEQ ID NO: 93], con la condición de que dicho antígeno no contenga en su secuencia el motivo dentro de una distancia de 10 aminoácidos de dicho epítipo.

En cierta realización, el antígeno no contiene en su secuencia dicho motivo.

30 Las realizaciones específicas de motivos H-X-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 90], [CST]-X(2)-C-X-H [SEQ ID NO: 92], H-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78] o [CST]-X(2)-C-H [SEQ ID NO: 79], X(0,2)-C-X(2)-C ([SEQ ID NO: 80], [SEQ ID NO: 96] [SEQ ID NO: 97]), C-X(2)-C-X(0,2)-H ([SEQ ID NO: 83], [SEQ ID NO: 94] [SEQ ID NO: 95]) H-C-X(2)-C [SEQ ID NO: 80] o C-X(2)-C-H [SEQ ID NO: 83].

En las realizaciones específicas de los péptidos, si dicho motivo es H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78, 90 o 91], el motivo se localiza en N-terminal desde el epítipo de linfocitos T dentro del péptido, y en el que, si dicho motivo es [CST]-X(2)-CX(0,2)-H [SEQ ID NO: 79, 92 o 93], el motivo se localiza en C-terminal desde el epítipo de linfocitos T.

35 El motivo puede localizarse en N-terminal desde el epítipo de linfocitos T. Los péptidos pueden tener una longitud de entre 13 y 75 aminoácidos, de entre 13 y 50 aminoácidos, de entre 13 y 30 aminoácidos.

En realizaciones específicas, el epítipo de linfocitos T de MHC de clase II, se separa de dicho motivo por una secuencia de como máximo 4 aminoácidos o se separa del motivo por secuencia de 2 aminoácidos.

En realizaciones específicas X dentro del motivo redox es Gly o Pro, o X dentro del motivo redox no es Cys.

En realizaciones específicas X fuera del motivo redox no es Cys, Ser o Thr.

40 Los péptidos particulares son del autoantígeno MOG o proinsulina.

Los péptidos particulares ejemplares comprenden la secuencia de epítopos VVHLYRNGK [SEQ ID NO: 3], tal como HCPYCSRNVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 1], HxCPYCSRNVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 115], o HxxCPYCSRNVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 116].

45 También se desvelan procedimientos de tratamiento o prevención que comprenden la etapa de administrar una cantidad eficaz de un péptido inmunógeno de entre 13 y 100 aminoácidos que comprenden un epítipo de linfocito T de MHC de clase II de un antígeno, e inmediatamente adyacente o separado por un máximo de 7 aminoácidos de dicho epítipo, una secuencia de motivo redox H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] ([SEQ ID NO: 78], [SEQ ID NO: 90] o [SEQ ID NO: 91]) o una [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H ([SEQ ID NO: 79], [SEQ ID NO: 92] o [SEQ ID NO: 93]).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de uno descrito anteriormente para la generación de linfocitos T

CD4+ citolíticos específicos de antígeno.

Otro aspecto se refiere a un procedimiento para obtener una población de linfocitos T CD4+ que son citolíticos frente a antígenos celulares, comprendiendo el procedimiento las etapas de: proporcionar células sanguíneas periféricas; poner en contacto dichas células *in vitro* con un péptido inmunoógeno de entre 13 y 100 aminoácidos que comprende un epítipo de linfocito T de MHC de clase II de un antígeno, e inmediatamente adyacente o separado por un máximo de 7 aminoácidos de dicho epítipo, una secuencia de motivo redox H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] ([SEQ ID NO:78], [SEQ ID NO:90] o [SEQ ID NO:91]) o una [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H ([SEQ ID NO:79], [SEQ ID NO:92] o [SEQ ID NO:93]); y expandir dichas células en presencia de IL-2.

Otro aspecto se refiere a una población de células obtenible mediante el método anterior de uso como medicamento.

- 10 Otro aspecto se refiere a métodos de tratamiento y prevención que comprenden la etapa de administrar una cantidad eficaz de células como se ha descrito anteriormente.

Breve descripción de las figuras

- 15 Figura 1: Respuesta de líneas de linfocitos T CD4+ humanos sin exposición previa hacia péptidos con un epítipo de linfocitos T de MOG y un motivo redox sin (barras a la derecha) [SEQ ID NO:7] y con Histidina adicional (barras de la izquierda). [SEQ ID NO: 1]

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 20 El término “**péptido**”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de entre 2 y 200 aminoácidos, conectada por enlaces peptídicos, pero que puede comprender estructuras no aminoácidas. Los péptidos de acuerdo con la invención pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de los mismos, o pueden contener aminoácidos que no se producen naturalmente incorporados por síntesis química de péptidos o por modificación química o enzimática. El término “**antígeno**”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura de una macromolécula, típicamente proteína (con o sin polisacáridos) o hecha de una composición proteica que comprende uno o más haptenos y que comprende epítopos de linfocitos T. El término “**proteína antigénica**” tal como se usa en la presente se refiere a una proteína que comprende uno o más epítopos de linfocitos T. Un auto-antígeno o proteína auto-antigénica, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína humana o animal presente en el cuerpo, que provoca una respuesta inmune dentro del mismo cuerpo humano o animal.

- 30 El término “**proteína antigénica alimentaria o farmacéutica**” se refiere a una proteína antigénica presente naturalmente en un producto alimenticio o farmacéutico, tal como en una vacuna. El término “**epítipo**” se refiere a una o varias porciones (que pueden definir un epítipo conformacional) de una proteína antigénica que está específicamente reconocida y unida por un anticuerpo o una porción del mismo (Fab', Fab2', etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de un linfocito B o T, y que es capaz, por la unión, de inducir una respuesta inmune. El término “**epítipo de linfocitos T**” en el contexto de la presente invención se refiere a un epítipo de linfocitos T dominante, subdominante o menor, es decir, una parte de una proteína antigénica que está específicamente reconocida y unida por un receptor en la superficie celular de un linfocito T. Si un epítipo es dominante, subdominante o menor depende de la reacción inmune provocada contra el epítipo. La dominancia depende de la frecuencia con la que los epítopos son reconocidos por los linfocitos T y capaces de activarlos, entre todos los posibles epítopos de linfocitos T de una proteína.

- 40 El epítipo de linfocitos T es un epítipo reconocido por moléculas de MHC de clase II, que consiste en una secuencia de +/- 9 aminoácidos que encaja en el surco de la molécula de MHC II. Dentro de una secuencia peptídica que representa un epítipo de linfocitos T, los aminoácidos en el epítipo están numerados P1 a P9, los aminoácidos N-terminales del epítipo están numerados P-1, P-2 y así sucesivamente, los aminoácidos C-terminales del epítipo se numeran P+1, P+2 y así sucesivamente. Los péptidos reconocidos por moléculas de MHC de clase II y no por moléculas de MHC clase I se denominan epítopos de linfocitos T restringidos de MHC de clase II. El término “**MHC**” se refiere a “**antígeno de histocompatibilidad mayor**”. En humanos, los genes MHC son conocidos como genes HLA (“**antígeno leucocitario humano**”). A pesar de que no existe una convención consistentemente seguida, algunas publicaciones usan HLA para referirse a moléculas de proteína HLA y MHC para referirse a los genes que codifican las proteínas HLA. Como tales, los términos “**MHC**” y “**HLA**” son equivalentes cuando se usan en el presente documento. El sistema HLA en el hombre tiene su equivalente en el ratón, es decir, el sistema H2. Los genes HLA más intensamente estudiados son los nueve genes denominados MHC clásicos: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLAs DQB1, HLA-DRA y HLA -DRB1. En los seres humanos, el MHC se divide en tres regiones: Clase I, II y III. Los genes A, B y C pertenecen al MHC clase I, mientras que los seis genes D pertenecen a la clase II. Las moléculas del MHC de clase I están hechas de una única cadena polimórfica que contiene 3 dominios (alfa 1, 2 y 3), que se asocia con la microglobulina beta 2 en la superficie celular. Las moléculas de clase II están formadas por 2 cadenas polimórficas, cada una con 2 cadenas (alfa 1 y 2, y beta 1 y 2).

Las moléculas del MHC de clase I se expresan prácticamente en todas las células nucleadas.

Los fragmentos de péptidos presentados en el contexto de moléculas de MHC de clase I son reconocidos por linfocitos T CD8+ (linfocitos T citolíticos o CTL). Los linfocitos T CD8+ con frecuencia maduran en efectores citolíticos que pueden lisar células que llevan el antígeno estimulante. Las moléculas de MHC Clase II se expresan principalmente en linfocitos activados y células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T CD4+ (linfocitos T colaboradores o Th) se activan con el reconocimiento de un fragmento de péptido único presentado por una molécula de MHC clase II, que normalmente se encuentra en una célula presentadora de antígeno como un macrófago o célula dendrítica. Los linfocitos T CD4+ proliferan y segregan citocinas tales como IL-2, IFN-gamma e IL-4 que soportan respuestas mediadas por anticuerpos y por células.

Los HLA funcionales se caracterizan por un surco de unión profundo al que se unen los péptidos endógenos así como también los péptidos potencialmente antigénicos. El surco se caracteriza además por tener una forma y propiedades fisicoquímicas bien definidas. Los sitios de unión de HLA clase I están cerrados, en el sentido de que los extremos peptídicos están fijados en los extremos del surco. También están involucrados en una red de enlaces de hidrógeno con restos de HLA conservados. En vista de estas restricciones, la longitud de péptidos unidos está limitada a 8-10 restos. Sin embargo, se ha demostrado que péptidos de hasta 12 restos de aminoácidos son también capaces de unirse a HLA de clase I. La comparación de las estructuras de diferentes complejos de HLA confirmó un modo general de unión en el que los péptidos adoptan una conformación relativamente lineal y extendida, o pueden implicar restos centrales para salirse del surco.

En contraste con los sitios de unión de HLA de clase I, los sitios de clase II están abiertos en ambos extremos. Esto permite que los péptidos se extiendan desde la región real de unión, de este modo "colgando hacia afuera" en ambos extremos. Los HLA de Clase II pueden por tanto unirse a ligandos peptídicos de longitud variable, que van desde 9 a más de 25 restos de aminoácidos. Similar a HLA de clase I, la afinidad de un ligando de clase II se determina por un componente "constante" y un componente "variable". La parte constante de nuevo resulta de una red de enlaces de hidrógeno formados entre restos conservados en el surco HLA de clase II y la cadena principal de un péptido unido. Sin embargo, este patrón de enlace de hidrógeno no se limita a los restos de N-terminal y C-terminal del péptido, sino que se distribuye a lo largo de toda la cadena. Este último es importante porque restringe la conformación de péptidos complejados a un modo de unión estrictamente lineal. Esto es común para todos los alotipos de clase II. El segundo componente que determina la afinidad de unión de un péptido es variable debido a ciertas posiciones de polimorfismo dentro de sitios de unión de clase II. Diferentes alotipos forman diferentes huecos complementarios dentro del surco, lo que explica la selección de péptidos dependiente de subtipos, o especificidad. Es importante destacar que las restricciones sobre los restos de aminoácidos mantenidos dentro de los huecos de clase II son en general "más suaves" que para la clase I. Hay mucha más reactividad cruzada de péptidos entre diferentes alotipos de HLA de clase II. La secuencia de los +/- 9 aminoácidos de un epítipo de linfocitos T de MHC de clase II que encaja en el surco de la molécula de MHC II se numeran normalmente de P1 a P9. Los aminoácidos adicionales N-terminales del epítipo están numerados P-1, P-2 y así sucesivamente, los aminoácidos C-terminales del epítipo están numerados P+1, P+2 y así sucesivamente.

El término "homólogo", tal como se usa en el presente documento con referencia a los epítipos usados en el contexto de la invención, se refiere a moléculas que tienen al menos un 50%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% de identidad de secuencia de aminoácidos con el epítipo natural, manteniendo de este modo la capacidad del epítipo de unirse a un anticuerpo o receptor de superficie celular de un linfocito B y/o T. Los homólogos particulares de un epítipo corresponden al epítipo natural modificado en un máximo de tres, más particularmente en un máximo de 2, más particularmente en un aminoácido.

El término "derivado", tal como se usa en la presente con referencia a los péptidos desvelados en el presente documento, se refiere a moléculas que contienen al menos la porción activa peptídica (es decir, capaz de generar actividad de linfocitos T CD4+ citolíticos) y, además, una parte complementaria que puede tener diferentes propósitos tales como estabilizar los péptidos o alterar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del péptido.

El término "identidad de secuencia" de dos secuencias tal como se usa en el presente documento se refiere al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos divididos entre el número de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia más corta cuando las dos secuencias están alineadas. En particular, la identidad de secuencia es del 70% al 80%, del 81% al 85%, del 86% al 90%, del 91% al 95%, del 96% al 100%, o del 100%.

Las expresiones "polinucleótido (o ácido nucleico) que codifica un péptido" y "polinucleótido (o ácido nucleico) codificante de péptido" tal como se usan en el presente documento se refieren a una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa en un entorno apropiado, da como resultado la generación de la secuencia de péptidos relevante o un derivado u homólogo de la misma. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos incluyen las secuencias normales que codifican el péptido, así como derivados y fragmentos de estos ácidos nucleicos capaces de expresar un péptido con la actividad requerida. El ácido nucleico que codifica un péptido desvelado en el presente documento o fragmento del mismo es una secuencia que codifica el péptido o fragmento del mismo que se origina a partir de un mamífero o que corresponde a un fragmento de péptido de mamífero, más particularmente un péptido humano.

Las expresiones "trastornos inmunes" o "enfermedades inmunes" se refieren a enfermedades en las que una reacción del sistema inmune es responsable o sostiene un mal funcionamiento o una situación no fisiológica en un

organismo. Entre los trastornos inmunitarios se incluyen, entre otros, trastornos alérgicos y enfermedades autoinmunes.

Las expresiones "enfermedades alérgicas" o "trastornos alérgicos" tal como se usan en el presente documento se refieren a enfermedades caracterizadas por reacciones de hipersensibilidad del sistema inmune a sustancias específicas llamadas alérgenos (tales como polen, picaduras, fármacos o alimentos). Alergia es el conjunto de signos y síntomas observados cada vez que un paciente atópico encuentra un alérgeno al que ha sido sensibilizado, lo que puede dar lugar al desarrollo de diversas enfermedades, en particular enfermedades respiratorias y síntomas como el asma bronquial. Existen varios tipos de clasificaciones y la mayoría de los trastornos alérgicos tienen diferentes nombres dependiendo de dónde se encuentre en el cuerpo de mamífero. La "hipersensibilidad" es una reacción indeseable (dañina, que produce molestias y a veces letal) producida en un individuo tras la exposición a un antígeno al que se ha sensibilizado; "Hipersensibilidad inmediata" depende de la producción de anticuerpos IgE y por lo tanto es equivalente a la alergia.

Las expresiones "enfermedad autoinmune" o "trastorno autoinmune" se refieren a enfermedades que resultan de una respuesta inmune anómala de un organismo contra sus propias células y tejidos debido a un fallo del organismo para reconocer sus propias partes constituyentes (hasta el nivel submolecular) como "propias". El grupo de enfermedades se puede dividir en dos categorías, enfermedades específicas del órgano y enfermedades sistémicas. Un "alérgeno" se define como una sustancia, usualmente una macromolécula o una composición proteica que genera la producción de anticuerpos IgE en individuos pacientes predispuestos, particularmente genéticamente dispuestos (atópicos). Definiciones similares se presentan en Liebers y col. (1996) Clin. Exp. Allergy 26, 494-516.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo, que produce el efecto terapéutico o preventivo deseado en un paciente. Por ejemplo, en referencia a una enfermedad o trastorno, es la cantidad que reduce hasta cierto punto uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno y, más particularmente, vuelve, parcial o completamente, a los parámetros fisiológicos o bioquímicos normales asociados con o causantes de la enfermedad o trastorno. Típicamente, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad del péptido desvelado en el presente documento o derivado del mismo, que conducirá a una mejora o restauración de la situación fisiológica normal. Por ejemplo, cuando se usa para tratar terapéuticamente a un mamífero afectado por un trastorno inmune, es una cantidad diaria de péptido/kg de peso corporal del mamífero. Como alternativa, cuando la administración es a través de terapia génica, la cantidad de ADN desnudo o vectores víricos se ajusta para asegurar la producción local de la dosis relevante del péptido desvelado en el presente documento, del derivado o del homólogo del mismo.

El término "natural" cuando se refiere a un péptido, se refiere al hecho de que la secuencia es idéntica a un fragmento de una proteína natural (tipo silvestre o mutante). En contraste con esto, el término "artificial" se refiere a una secuencia que como tal no se da en la naturaleza. Una secuencia artificial se obtiene a partir de una secuencia natural mediante modificaciones limitadas tales como el cambio/delección/supresión de uno o más aminoácidos dentro de la secuencia natural o añadiendo/eliminando los aminoácidos en N-terminal o C-terminal de una secuencia de origen natural.

En este contexto, se observa que los fragmentos peptídicos se generan a partir de antígenos, típicamente en el contexto del escaneo de epítopos. Por coincidencia, tales péptidos pueden comprender en su secuencia un epítipo de MHC clase II y en su proximidad una secuencia con el motivo redox modificado H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78, 90 o 91] o [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H [SEQ ID NO: 79, 92 o 93]. En el presente documento, "proximidad" significa que entre la secuencia de epítopos del MHC de clase II y entre los motivos H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78, 90 o 91] o [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H [SEQ ID NO: 79, 92 o 93] anteriores, puede haber una secuencia de aminoácidos de 7 aminoácidos como máximo, de 4 aminoácidos como máximo, de 2 aminoácidos como máximo o incluso de 0 aminoácidos (en otras palabras el epítipo y la secuencia de motivos son inmediatamente adyacentes entre sí). Por consiguiente, los ejemplos específicos excluyen fragmentos peptídicos de antígenos que comprenden accidentalmente también un linfocito T de clase MHC y una secuencia motivo redox inmediatamente adyacentes entre sí o separadas por una secuencia de aminoácidos de hasta 2, 4 o 7 aminoácidos.

Otros ejemplos específicos de la presente invención excluyen fragmentos peptídicos de antígenos que comprenden accidentalmente un epítipo de linfocitos T de clase II de MHC y una secuencia de motivos redox, independientemente de la separación entre el epítipo y el motivo redox modificado con motivos. Se estudian fragmentos peptídicos de antígenos para las propiedades inmunogénicas pero generalmente no se usa un agente terapéutico (aparte del campo de la alergia y la vacunación de tumores). Por lo tanto, en ausencia de cualquier conocimiento de las propiedades mejoradas de los péptidos desvelados en el presente documento, el uso de tales péptidos como medicamentos es sin precedentes.

Los aminoácidos se denominan en el presente documento con su nombre completo, su abreviatura de tres letras o su abreviatura de una letra.

Los motivos de las secuencias de aminoácidos se escriben en el presente documento de acuerdo con el formato de Prosite. Los motivos se usan para describir una cierta variedad de secuencias en partes específicas de una secuencia. El símbolo X se usa para una posición en la que se acepta cualquier aminoácido. Las alternativas se

indican enumerando los aminoácidos aceptables para una posición dada, entre corchetes ('[]'). Por ejemplo: [CST] representa un aminoácido seleccionado de Cys, Ser o Thr. Los aminoácidos que se excluyen como alternativas se indican enumerándolos entre llaves ('{}'). Por ejemplo: {AM} significa cualquier aminoácido excepto Ala y Met. Los diferentes elementos de un motivo están separados entre sí por un guión. La repetición de un elemento idéntico dentro de un motivo puede indicarse colocando detrás de ese elemento un valor numérico o un intervalo numérico entre paréntesis. Por ejemplo: X(2) corresponde a X-X; X (2, 5) corresponde a 2, 3, 4 o 5 aminoácidos X, A(3) corresponde a A-A-A.

Por lo tanto, H-C-X(2)-C [SED ID NO: 80] puede escribirse como HCXXC [SED ID NO: 80]. Igualmente, C-X(2)-C-X(0,2) representa las tres posibilidades en las que hay entre H y C, ninguno, uno o dos aminoácidos; CXXCH [SEQ ID NO: 83], CXXCXH [SEQ ID NO: 94] y CXXCXXH [SEQ ID NO: 95].

Del mismo modo, H-X(0,2)-C-X(2)-C representa las tres posibilidades en las que hay entre H y C, ninguno, uno o dos aminoácidos. A saber, HCXXC [SEQ ID NO: 80], HXCXXC [SEQ ID NO: 96] y HXXCXXC [SEQ ID NO: 97].

Para distinguir entre los aminoácidos X, aquellos entre H y C se llaman aminoácidos externos X (subrayado único en la secuencia anterior), aquellos dentro del motivo redox se llaman aminoácidos internos X (doble subrayado en la secuencia anterior).

X representa cualquier aminoácido, particularmente un L-aminoácido, más particularmente uno de los 20 L-aminoácidos naturales.

Un péptido, que comprende un epítipo de linfocito T y una secuencia de motivos de péptidos modificados, que tiene actividad reductora, es capaz de generar una población de linfocitos T CD4+ citolíticos específicos de antígeno hacia células presentadoras de antígeno.

Por consiguiente, en su sentido más amplio, la invención se refiere a péptidos que comprenden al menos un epítipo de linfocitos T de un antígeno (propio o no) con un potencial para desencadenar una reacción inmunitaria y un motivo de secuencia de tioreductasa modificada con una actividad reductora sobre enlaces peptídicos disulfuro. El epítipo de linfocito T y la secuencia de motivo redox modificado pueden estar inmediatamente adyacentes entre sí en el péptido u opcionalmente separados por uno o más aminoácidos (denominada secuencia de enlace). Opcionalmente, el péptido comprende adicionalmente una secuencia dirigida al endosoma y/o secuencias adicionales de "flanqueo".

Los péptidos desvelados en el presente documento comprenden un epítipo de linfocitos T de MHC de clase II de un antígeno (propio o no) con un potencial para desencadenar una reacción inmune, y un motivo redox modificado. La actividad reductora de la secuencia de motivos en el péptido puede ensayarse en cuanto a su capacidad para reducir un grupo sulfhidrilo tal como en el ensayo de solubilidad de insulina en el que la solubilidad de la insulina se altera tras la reducción o con un sustrato marcado con fluorescencia tal como insulina. Un ejemplo de tal ensayo se describe con más detalle en la sección experimental de la presente solicitud.

El motivo redox modificado puede estar situado en el lado del extremo amino del epítipo de linfocitos T o en el C-terminal del epítipo de linfocitos T.

Los fragmentos peptídicos con actividad reductora se encuentran en las tioreductasas que son pequeñas enzimas reductoras de disulfuro que incluyen glutaredoxinas, nucleoredoxinas, tioredoxinas y otras oxidorreductasas de tiol/disulfuro (Holmgren (2000) Antioxid. Redox Signal, 2, 811-820, Jacquot y col. (2002) Biochem. Pharm. 64, 1065-1069). Son multifuncionales, ubicuas y se encuentran en muchos procariotas y eucariotas. Ejercen una actividad reductora de los enlaces disulfuro en proteínas (tales como enzimas) a través de cisteínas activas redox dentro de secuencias de consenso de dominio activo conservadas: C-X(2)-C [SEQ ID NO: 71], C-X(2)-S [SEQ ID NO: 72], C-X(2)-T [SEQ ID NO: 73], S-X(2)-C [SEQ ID NO: 74], T-X(2)-C [SEQ ID NO: 75] (Fomenko y col., 2003) Biochemistry 42, 11214-11252, Fomenko y col., (2002) Prot. Science 11, 2285-2296), en donde X representa cualquier aminoácido. Los dominios también se encuentran en proteínas más grandes tales como disulfuro isomerasa (PDI) y fosfolipasa C específica de fosoinositida.

El motivo redox de 4 aminoácidos como el que se conoce de, por ejemplo, Fomenko y el documento WO2008/017517 comprende una cisteína en la posición 1 y/o 4; por lo tanto el motivo es C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 77] o [CST]-X(2)-C [SEQ ID NO: 76]. Tal motivo de cuatro péptidos se denominará "el motivo". El motivo en un péptido puede ser cualquiera de las alternativas C-X(2)-C [SEQ ID NO: 71], S-X(2)-C [SEQ ID NO: 74], T-X(2)-C [SEQ ID NO: 75], C-X(2)-S [SEQ ID NO: 72] o C-X(2)-T [SEQ ID NO: 73]. En particular, los péptidos contienen el motivo de secuencia C-X(2)-C [SEQ ID NO: 71].

El motivo redox "modificado" de los péptidos desvelados en el presente documento difiere de la técnica anterior en que la cisteína inmediatamente adyacente y fuera del motivo está presente una histidina, es decir el motivo redox modificado se escribe como H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78, 90 o 91] o [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H [SEQ ID NO: 79, 92 o 93].

Las realizaciones de la presente invención son H-XX-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 91], H-X-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO:

90], H-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78], [CST]-X(2)-C-XX-H [SEQ ID NO: 93], [CST]-X(2)-C-X-H [SEQ ID NO: 92], y [CST]-X(2)-CH [SEQ ID NO: 79].

Realizaciones más específicas son

- 5 H-C-X(2)-S [SEQ ID NO: 81],
 H-X-C-X(2)-S [SEQ ID NO: 98],
 H-XX-C-X(2)-S [SEQ ID NO: 99],
 H-C-X(2)-T [SEQ ID NO: 82],
 H-X-C-X(2)-T [SEQ ID NO: 100],
 H-XX-C-X(2)-T [SEQ ID NO: 101],
 10 S-X(2)-C-H [SEQ ID NO: 84],
 S-X(2)-C-X-H [SEQ ID NO: 102],
 S-X(2)-CXX-H [SEQ ID NO: 103],
 T-X(2)-C-H [SEQ ID NO: 85],
 T-X(2)-C-X-H [SEQ ID NO: 104],
 15 T-X(2)-C-XX-H [SEQ ID NO: 105],
 C-X(2)-C-H [SEQ ID NO: 83],
 C-X(2)-C-X-H [SEQ ID NO: 94],
 C-X(2)-C-XX-H [SEQ ID NO: 95],
 20 H-C-X(2)-C [SEQ ID NO: 80],
 H-X-C-X(2)-C [SEQ ID NO: 96],
 H-XX-C-X(2)-C [SEQ ID NO: 97].

En realizaciones específicas de la invención, los péptidos con un motivo H-C-X(2)-C-H [SEQ ID NO: 86] están excluidos del alcance de la invención.

- 25 Otras realizaciones específicas son péptidos en los que un aminoácido de cisteína del motivo redox está flanqueado por dos secuencias de histidina tales como HCHxC [SEQ ID NO: 106] o CxxHCH [SEQ ID NO: 107]

30 Como se explica en detalle más adelante, los péptidos desvelados en el presente documento pueden prepararse mediante síntesis química, lo que permite la incorporación de aminoácidos no naturales. Por consiguiente, "C" en los motivos redox modificados redox citados anteriormente representa ya sea cisteína u otros aminoácidos con un grupo tiol tal como mercaptovalina, homocisteína u otros aminoácidos naturales o no naturales con una función tiol. Con el fin de tener actividad reductora, las cisteínas presentes en un motivo redox modificado no deben ocurrir como parte de un puente disulfuro de cistina. Sin embargo, un motivo redox modificado redox puede comprender cisteínas modificadas tales como cisteína metilada, que se convierte en cisteína con grupos tiol libres *in vivo*. X puede ser cualquiera de los 20 aminoácidos naturales, incluyendo S, C o T o puede ser un aminoácido no natural. En realizaciones particulares adicionales, X es un aminoácido con una cadena lateral pequeña tal como Gly, Ala, Ser o Thr. En otras realizaciones particulares, X no es un aminoácido con una cadena lateral voluminosa tal como Trp. En otras realizaciones particulares X no es cisteína. En otras realizaciones particulares, por lo menos un X en el motivo redox modificado es His. En otras realizaciones particulares adicionales, al menos un X en el redox modificado es Pro.

- 40 Los péptidos pueden comprender además modificaciones para aumentar la estabilidad o solubilidad, tales como la modificación del grupo NH₂ de N-terminal o el grupo COOH de C-terminal (por ejemplo, la modificación del COOH en un grupo CONH₂).

45 En los péptidos desvelados en el presente documento que comprenden un motivo redox modificado, el motivo está localizado de manera que, cuando el epítipo encaja en el surco MHC, el motivo permanece fuera del surco de unión al MHC. El motivo redox modificado se coloca o inmediatamente adyacente a la secuencia del epítipo dentro del péptido [es decir, una secuencia enlazadora de cero aminoácidos entre el motivo y el epítipo], o se separa del epítipo de linfocitos T mediante un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos de 7 aminoácidos o menos. Más particularmente, el enlazador comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. Las realizaciones específicas son péptidos con un enlazador de aminoácidos 0, 1 o 2 entre la secuencia del epítipo y la secuencia del motivo redox modificado. Como alternativa, un enlazador puede comprender 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos. En aquellos péptidos en los que la secuencia de motivo redox modificada es adyacente a la secuencia de epítopos, esto se indica como posición P-4 a P-1 o P+ 1 a P+ 4 en comparación con la secuencia de epítopos. Aparte de un enlazador peptídico, pueden usarse otros compuestos orgánicos como enlazadores para enlazar las partes del péptido entre sí (por ejemplo, la secuencia de motivo redox modificado con la secuencia del epítipo de linfocitos T).

55 Los péptidos desvelados en el presente documento pueden comprender además secuencias de aminoácidos cortas adicionales en N-terminal o C-terminal de la secuencia que comprende el epítipo de linfocitos T y el motivo redox modificado. Tal secuencia de aminoácidos se denomina en general una "secuencia flanqueante". Una secuencia flanqueante puede colocarse entre el epítipo y una secuencia de orientación endosomal y/o entre el motivo redox modificado y una secuencia de orientación endosomal. En ciertos péptidos, que no comprenden una secuencia de orientación endosomal, una secuencia corta de aminoácidos puede estar presente en N-terminal y/o en C-terminal en el extremo del motivo redox modificado y/o la secuencia del epítipo en el péptido. Más particularmente una

secuencia flanqueante es una secuencia de entre 1 y 7 aminoácidos, más particularmente una secuencia de 2 aminoácidos.

El motivo redox modificado puede estar situado en el N-terminal del epítipo.

5 En ciertas realizaciones, en las que el motivo redox modificado contiene una cisteína, esta cisteína está presente en el motivo redox modificado en la posición alejada del epítipo, por lo tanto el motivo redox modificado se produce por ejemplo como H-C-X(2)-T [SEQ ID NO: 82] o H-C-X(2)-S [SEQ ID NO: 81] en N-terminal del epítipo o se produce como TX(2)-CH [SEQ ID NO: 85] o SX(2)-CH [SEQ ID NO: 84] en C-terminal del epítipo.

10 En ciertos ejemplos, se proporcionan péptidos que comprenden una secuencia de epítipo y una secuencia de motivo redox modificado. En otras realizaciones particulares, el motivo redox modificado se produce varias veces (1, 2, 3, 4 o incluso más veces) en el péptido, por ejemplo como repeticiones del motivo redox modificado que pueden estar espaciadas entre sí por uno o más aminoácidos o como repeticiones que son inmediatamente adyacentes entre sí. Como alternativa, se proporcionan uno o más motivos redox modificados tanto en N-terminal como en C-terminal de la secuencia del epítipo de linfocitos T.

15 Otras variaciones previstas para los péptidos desvelados en el presente documento incluyen péptidos que contienen repeticiones de una secuencia de epítipo de linfocitos T en la que cada secuencia de epítipos está precedida y/o seguida por el motivo redox modificado (por ejemplo, repeticiones de "epítipo redox modificado" o repeticiones de "motivo redox modificado-epítipo redox modificado-motivo redox modificado". En este caso, todos los motivos redox modificados pueden tener la misma secuencia, pero esto no es obligatorio. Se observa que las secuencias repetitivas de péptidos que comprenden un epítipo que en sí comprende el motivo redox modificado también
20 resultará en una secuencia que comprende tanto el epítipo como un motivo redox modificado. En tales péptidos, el motivo redox modificado dentro de una secuencia de epítipo funciona como un motivo redox modificado fuera de una segunda secuencia de epítipos.

25 Normalmente, los péptidos de la presente invención comprenden solo un epítipo de linfocitos T. Como se describe a continuación, un epítipo de linfocitos T en una secuencia de proteínas puede identificarse mediante ensayos funcionales y/o uno o más en ensayos de predicción de sílice. Los aminoácidos en una secuencia de epítipo de linfocitos T se numeran de acuerdo con su posición en el surco de unión de las proteínas MHC. Un epítipo de linfocitos T presente dentro de un péptido está constituido por entre 8 y 25 aminoácidos, aunque más particularmente entre 8 y 16 aminoácidos, aunque más particularmente consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos.

30 En una realización más particular, el epítipo de linfocitos T consiste en una secuencia de 9 aminoácidos. En una realización particular adicional, el epítipo de linfocitos T es un epítipo, que se presenta a linfocitos T por moléculas MHC de clase II [epítipos de linfocitos T restringidos de MHC de clase II]. Normalmente, la secuencia de epítipo de linfocitos T se refiere al octapéptido o más específicamente a la secuencia de nueve péptidos que encaja en la hendidura o surco de una proteína de MHC II. El epítipo de linfocitos T de los péptidos desvelados en el presente
35 documento puede corresponder bien a una secuencia de epítipo natural de una proteína o puede ser una versión modificada de la misma, siempre que el epítipo de linfocitos T modificado mantenga su capacidad para unirse dentro de la hendidura de MHC, similar a la secuencia natural del epítipo de linfocitos T. El epítipo de linfocitos T modificado puede tener la misma afinidad de unión para la proteína MHC que el epítipo natural, pero también puede tener una afinidad disminuida. En particular, la afinidad de unión del péptido modificado es no menos de 10 veces
40 menor que el péptido original, más particularmente no menos de 5 veces menos. Los péptidos de la presente invención tienen un efecto estabilizador sobre complejos de proteínas. Por consiguiente, el efecto estabilizador del complejo péptido-MHC compensa la afinidad disminuida del epítipo modificado para la molécula de MHC.

45 La secuencia que comprende el epítipo de linfocitos T y el compuesto reductor dentro del péptido puede enlazarse adicionalmente a una secuencia de aminoácidos (u otro compuesto orgánico) que facilita la captación del péptido en endosomas tardíos para procesamiento y presentación dentro de los determinantes del MHC de clase II. La orientación de los endosomas tardíos está mediada por las señales presentes en la cola citoplásmica de las proteínas y corresponden a motivos peptídicos bien identificados, tales como el motivo a base de dileucina [DE] XXXL[L]I [SEQ ID NO: 87] o DXXLL [SEQ ID NO: 88], el motivo a base de tirosina YXXΦ [SEQ ID NO: 89] o el denominado motivo de racimo ácido. El símbolo Φ representa residuos de aminoácidos con cadenas laterales
50 hidrófobas voluminosas tales como Phe, Tyr y Trp. Las secuencias de objetivo del endosoma tardío permiten el procesamiento y la presentación eficiente del epítipo de linfocitos T derivado de antígeno por moléculas MHC de clase II. Tales secuencias de direccionamiento endosómico están contenidas, por ejemplo, dentro de la proteína gp75 (Vijayaradhi y col., (1995) J. Cell. Biol. 130, 807-820), la proteína gamma CD3 humana, la HLA-BM 11 (Copier y col. (1996) J. Immunol., 157, 1017-1027), la cola citoplasmática del receptor DEC205 (Mahnke y col., (2000) J. Cell Biol. 151, 673-683). Otros ejemplos de péptidos que funcionan como señales de clasificación para el endosoma se desvelan en la revisión de Bonifacio y Traub (2003) Annu. Rev. Biochem. 72, 395-447. Como
55 alternativa, la secuencia puede ser la de un epítipo subdominante o menor de linfocitos T de una proteína, lo que facilita la captación en el endosoma tardío sin superar la respuesta de los linfocitos T hacia el antígeno. La secuencia de orientación de endosomas tardíos puede situarse bien en el extremo amino terminal o en el carboxilo
60 terminal del péptido derivado de antígeno para su captación y procesamiento eficaces y también puede acoplarse a

través de una secuencia flanqueante, tal como una secuencia peptídica de hasta 10 aminoácidos. Cuando se usa un epítipo de linfocitos T menor para el objetivo de orientación, este último se encuentra típicamente en el extremo amino-terminal del péptido derivado de antígeno.

- 5 Por consiguiente, la presente divulgación contempla péptidos de proteínas antigénicas y su uso en la obtención de reacciones inmunes específicas. Estos péptidos pueden corresponder a fragmentos de proteínas que comprenden dentro de su secuencia, es decir, un compuesto reductor y un epítipo de linfocitos T separados por un máximo de 10, preferentemente 7 aminoácidos o menos. Como alternativa, y para la mayoría de las proteínas antigénicas, los péptidos desvelados en el presente documento se generan acoplando un compuesto reductor, más particularmente un motivo redox modificado reductor, tal como se describe en el presente documento, en N-terminal o en C-terminal a un epítipo de linfocito T de la proteína antigénica directamente adyacente a la misma o con un enlazador de como máximo 10, más particularmente al menos 7 aminoácidos). Además, la secuencia de epítopos de linfocitos T de la proteína y/o el motivo redox modificado puede ser modificada y/o una o más secuencias flanqueantes y/o una secuencia objetivo puede ser introducida (o modificada) en comparación con la secuencia natural. Por lo tanto, dependiendo de si las características de los péptidos desvelados en el presente documento se pueden encontrar dentro de la secuencia de la proteína antigénica de interés, los péptidos de la presente invención pueden comprender una secuencia que es 'artificial' o 'natural'. Los péptidos de la presente invención pueden variar sustancialmente de longitud. La longitud de los péptidos puede variar de 13 o 14 aminoácidos, es decir, que consiste en un epítipo de 8-9 aminoácidos, adyacente al mismo, el motivo redox modificado 5 aminoácidos con la histidina, hasta 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos. Por ejemplo, un péptido puede comprender una secuencia de orientación endosomal de 40 aminoácidos, una secuencia flanqueante de aproximadamente 2 aminoácidos, un motivo como se describe en el presente documento de 5 aminoácidos, un enlazador de 4 aminoácidos y un péptido de epítipo de linfocitos T de 9 aminoácidos. Por consiguiente, en realizaciones particulares, los péptidos completos consisten en entre 13 aminoácidos hasta 50, 75, 100 o 200 aminoácidos. Más particularmente, cuando el compuesto reductor es un motivo redox modificado tal como se desvela en el presente documento, la longitud de la secuencia (artificial o natural) que comprende el epítipo y el motivo redox modificado conectado opcionalmente mediante un enlazador (denominada en la presente secuencia de "motivos redox modificados con epítipo"), sin la secuencia endosomal de orientación, es crítica. El "motivo redox modificado con epítipo" tiene más particularmente una longitud de 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos. Tales péptidos de 13 o 14 a 19 aminoácidos pueden estar opcionalmente acoplados a una señal de orientación endosomal cuyo tamaño es menos crítico.
- 30 Como se ha detallado anteriormente, en realizaciones particulares, los péptidos de la presente invención comprenden un motivo redox modificado reductor, tal como se describe en el presente documento, unido a una secuencia de epítipo de linfocitos T.

Un número pequeño de secuencias de proteínas, fragmentos de proteínas o péptidos sintéticos pueden por coincidencia comprender una secuencia de motivos redox modificados. Sin embargo, la posibilidad de que estas proteínas comprendan un epítipo de linfocitos T de clase MHC en la proximidad de la secuencia redox modificada se vuelve muy pequeña. Si existen tales péptidos probablemente se conocerán a partir de experimentos de escaneo de epítopos en los que se sintetizan conjuntos de fragmentos peptídicos solapantes. En tales publicaciones el interés va al epítipo y descuidan la relevancia de un motivo redox modificado con una Histidina y la relevancia de tales péptidos en aplicaciones médicas.

40 Tales péptidos son, por lo tanto, divulgaciones fortuitas no relacionadas con el concepto inventivo de la presente divulgación.

En otras realizaciones particulares, los péptidos desvelados en el presente documento son péptidos que comprenden epítopos de linfocitos T que no comprenden una secuencia de aminoácidos con propiedades redox dentro de su secuencia natural.

45 Sin embargo, en realizaciones alternativas, el epítipo de linfocitos T puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos que asegure la unión del epítipo a la hendidura del MHC. Cuando un epítipo de interés de una proteína antigénica comprende un motivo redox modificado tal como se describe aquí dentro de su secuencia de epítopos, los péptidos inmunógenos según la presente invención comprenden la secuencia de un motivo redox modificado como se describe aquí y/o de otra secuencia reductora acoplada en N-terminal o en C-terminal a la secuencia del epítipo de manera que (contrariamente al motivo redox modificado presente dentro del epítipo, que está enterrado dentro de la hendidura), el motivo redox modificado adjunto puede asegurar la actividad reductora.

50 Por consiguiente, el epítipo de linfocitos T y el motivo son inmediatamente adyacentes o separados entre sí y no se solapan. Para determinar el concepto de "inmediatamente adyacente" o "separado", se determina la secuencia de 8 o 9 aminoácidos que se ajusta a la hendidura del MHC y se determina la distancia entre este octapéptido o nonapéptido con el pentapéptido del motivo redox modificado.

Generalmente, los péptidos de la presente invención no son naturales (por lo tanto no hay fragmentos de proteínas como tales) sino péptidos artificiales que contienen, además de un epítipo de linfocitos T, un motivo redox modificado tal como se describe en el presente documento, por lo que el motivo redox modificado se separa inmediatamente del epítipo de linfocitos T mediante un enlazador que consta de hasta siete, más particularmente

hasta cuatro o hasta 2 aminoácidos.

Se ha demostrado que tras la administración (es decir, la inyección) a un mamífero de un péptido desvelado en el presente documento (o una composición que comprende tal péptido), el péptido genera la activación de linfocitos T que reconocen el epítipo de linfocitos T derivado de antígeno y proporciona una señal adicional al linfocito T a través de la reducción del receptor de superficie. Esta activación supra-óptima da como resultado linfocitos T que adquieren propiedades citolíticas para la célula que presenta el epítipo de linfocitos T, así como propiedades supresoras en las linfocitos T observantes. De este modo, los péptidos o la composición que comprende los péptidos descritos en el presente documento, que contienen un epítipo de linfocitos T derivado de antígeno y, fuera del epítipo, un motivo redox modificado, pueden usarse para la inmunización directa de mamíferos, incluyendo seres humanos. La invención proporciona así péptidos de la invención o derivados de los mismos, para uso como medicamento. Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos terapéuticos que comprenden administrar uno o más péptidos desvelados en el presente documento a un paciente que lo necesite.

La presente invención ofrece procedimientos mediante los cuales se pueden obtener linfocitos T específicos de antígeno dotados de propiedades citolíticas mediante inmunización con péptidos pequeños. Se ha descubierto que los péptidos que contienen (i) una secuencia que codifica un epítipo de linfocitos T de un antígeno y (ii) una secuencia de consenso con propiedades redox, y que además opcionalmente comprende también una secuencia para facilitar la captación del péptido en endosomas tardíos para presentación eficiente de MHC-clase II, generan linfocitos T supresores. Las propiedades inmunogénicas de los péptidos desvelados en el presente documento son de particular interés en el tratamiento y prevención de reacciones inmunitarias.

Los péptidos desvelados en el presente documento se usan como medicamento, más particularmente se usan para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno inmune en un mamífero, más en particular en un ser humano.

La presente invención describe procedimientos de tratamiento o prevención de un trastorno inmune de un mamífero que necesita el tratamiento o prevención, usando los péptidos desvelados en el presente documento, homólogos o derivados de los mismos, comprendiendo los procedimientos la etapa de administrar al mamífero que padece o en riesgo de padecer un trastorno inmune, una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos desvelados en el presente documento, homólogos o derivados de los mismos, de manera que se reduzcan los síntomas del trastorno inmune. Se prevé el tratamiento tanto de seres humanos como de animales, como mascotas y animales de granja. En un ejemplo, el mamífero a tratar es un ser humano. Los trastornos inmunitarios mencionados anteriormente están en una realización particular seleccionada entre enfermedades alérgicas y enfermedades autoinmunes. Las enfermedades alérgicas se describen convencionalmente como enfermedades mediadas por el tipo 1 o enfermedades mediadas por IgE. Las manifestaciones clínicas de las enfermedades alérgicas incluyen asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y reacciones anafilácticas a picaduras de insectos o fármacos. Las enfermedades alérgicas son causadas por reacciones de hipersensibilidad del sistema inmune a sustancias específicas llamadas alérgenos (como polen, picaduras, fármacos o alimentos). La forma más grave de un trastorno alérgico es el choque anafiláctico, que es una emergencia médica. Los alérgenos incluyen alérgenos aerotransportados, como los de los ácaros del polvo doméstico, las mascotas y los pólenes. Los alérgenos también incluyen alérgenos ingeridos responsables de la hipersensibilidad al alimento, incluyendo frutas, verduras y leche. Con el fin de tratar las enfermedades anteriores, los péptidos de acuerdo con la invención se generan a partir de las proteínas antigénicas o alérgenos conocidos o creídos como un factor causante de la enfermedad. Los alérgenos que pueden usarse para la selección de epítopos de linfocitos T son típicamente alérgenos que se seleccionan del grupo que consiste en: alérgenos alimenticios presentes en cacahuètes, pescado, por ejemplo, bacalao, clara de huevo, crustáceos, por ejemplo, camarón, leche, por ejemplo, leche de vaca, trigo, cereales, frutos de la familia Rosacea (manzana, ciruela, fresa), verduras de las familias Liliaceae, Cruciferae, Solanaceae y Umbelliferae, frutos de cáscara, sésamo, cacahuete, soja y otros alérgenos de la familia de las leguminosas, especias, melón, aguacate, mango, higo, plátano,... alérgenos de los ácaros del polvo doméstico de Dermatophagoides spp o D. pteronyssinus, D. farinae y D. microceras, Euroglyphus maynei o Blomia sp., alérgenos de insectos presentes en cucarachas o himenópteros, alérgenos de polen, especialmente pólenes de árbol, césped y malezas, alérgenos de los animales, especialmente en perros, gatos, caballos y roedores, alérgenos de hongos, especialmente de Aspergillus, Alternaria o Cladosporium, y alérgenos ocupacionales presentes en productos como el látex, amilasa, etc.

Como ejemplo de alérgenos, en el contexto de la presente invención el péptido derp 2 CGFSSNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID NO: 9] se modifica en HCGFSSNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID NO: 10] o HCGFCSNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID NO: 11]. Como otro ejemplo en alérgenos, el péptido der p 2 CHGSEPCIIHRGKPF [SEQ ID NO: 12], se modifica en HCHGSEPCIIHRGKPF [SEQ ID NO: 13], HCHGCEPCIIHRGKPF [SEQ ID NO: 14] más típicamente en HCxGSEPCIIHRGKPF [SEQ ID NO: 15] o HCxGCEPCIIHRGKPF en donde x no es His o Cys [SEQ ID NO: 16].

Como otro ejemplo de alérgenos, el péptido de lactoglobulina beta CHGCAQKKIIAEK [SEQ ID NO: 17] se modifica en HCHGCAQKKIIAEK [SEQ ID NO: 18], más típicamente en HCxGCAQKKIIAEK, en donde x no es Cys o His [SEQ ID NO: 19].

Como ejemplo de enfermedad autoinmune, el péptido de peroxidasa tiroidea CGPCMNEELTERL [SEQ ID NO: 20]

se modifica en HCGPCMNEELTERL [SEQ ID NO: 21].

Como ejemplo de enfermedad autoinmune, el péptido de tiroglobulina CGPSAALTWVQTH [SEQ ID NO: 22] se modifica en HCGPCAALTWVQTH [SEQ ID NO: 23].

5 La presente invención se refiere además a péptidos con el motivo redox modificado que comprende epítomos de linfocitos T de MHC clase II de proteínas víricas que están codificadas por la estructura principal de vectores víricos usados en terapia génica y vacunación génica. La presente divulgación se refiere además a procedimientos de tratamiento o prevención de la respuesta inmunogénica frente a un vector vírico. Ejemplos de vectores víricos (por ejemplo, de adenovirus, virus adenoasociado, virus herpes o poxvirus, retrovirus o lentivirus) y proteínas víricas (por ejemplo, proteína de la cápside) se desvelan en el documento WO2009101204.

10 Como ejemplo de la enseñanza de la presente divulgación, se modifica el péptido adenovírico CHGCPTLLYLFEV [SEQ ID NO: 24] en HCHGCPTLLYLFEV [SEQ ID NO: 25], más típico HCxGCPTLLYLFEV en donde X no es Cys o His [SEQ ID NO: 26].

Como otro ejemplo, el péptido de proteína 2 adenovírica tardía CGPCGGYVPFHIQVP [SEQ ID NO: 27] se modifica en HCGPCGGYVPFHIQVP [SEQ ID NO: 28].

15 La presente invención se refiere además a péptidos con el motivo redox modificado que comprende epítomos de linfocitos T de MHC de clase II de proteínas de patógenos intracelulares. La presente divulgación se refiere además a procedimientos de tratamiento y prevención de infecciones por patógenos intracelulares. Ejemplos de patógenos intracelulares (virus [virus de ADN frente a ARN, virus de cadena simple frente a virus de cadena doble, bacterias, micobacterias o parásitos con un ciclo de vida intracelular) y los antígenos se tratan en el documento
20 WO2009101208 (por ejemplo, Herpesviridae, Flaviviridae y Picornaviridae, influenza, virus del sarampión y de inmunodeficiencia, papilovirus, bacterias y micobacterias incluyendo Mycobacterium tuberculosis y otras micobacterias patógenas para seres humanos o animales tales como Yersinia, Brucellae, Chlamydiae, Mycoplasmae, Rickettsiae, Salmonellae y Shigellae. Los parásitos incluyen Plasmodiums, Leishmanias, Trypanosomas, Toxoplasma gondii, Listeria sp., Histoplasma sp.

25 Como otro ejemplo, el antígeno CSP de la malaria CGHCDKHIEQYLK [SEQ ID NO: 29], se modifica en HCGHCDKHIEQYLK [SEQ ID NO: 30], más típico en HCGxCDKHIEQYLK, en donde x no es Cys o His [SEQ ID NO: 31].

30 Como otro ejemplo, el péptido CGHCEKKICKMEK [SEQ ID NO: 32] del mismo antígeno se modifica en HCGHCEKKICKMEK [SEQ ID NO: 33], más típicamente en HCGxCEKKICKMEK [SEQ ID NO: 34], en donde x no es Cys o His.

Como otro ejemplo, el péptido de la hemaglutinina de influenza se modifica de CGHCKYVKQNTLK [SEQ ID NO:35] en HCGHCKYVKQNTLK [SEQ ID NO:36], más típicamente en HCGxCKYVKQNTLK, en donde x no es Cys o His [SEQ ID NO: 37].

35 Como otro ejemplo, el péptido del antígeno de Leishmania Lack CGHCEHPIVVSGS [SEQ ID NO:38] se modifica en HCGHCEHPIVVSGS [SEQ ID NO: 39], más típico HCGxCEHPIVVSGS, en donde X no es Cys o His [SEQ ID NO: 40].

Como otro ejemplo, el péptido de la subunidad gp120 de la proteína Env de HIV, se modifica a partir de CGHCRAMYAPPIA [SEQ ID NO: 41] en HCGHCRAMYAPPIA [SEQ ID NO: 42], más típicamente en HCGxCRAMYAPPIA, en donde x no es Cys o His [SEQ ID NO: 43].

40 La presente invención se refiere además a péptidos con el motivo redox modificado que comprende epitopos de linfocitos T de MHC de clase II alofactores solubles tales como los usados en terapias de reemplazo. La presente divulgación se refiere además a procedimientos de tratamiento y prevención de reacciones inmunes contra alofactores solubles. Los ejemplos de alofactores solubles se desvelan en el documento WO2009101206.

45 Como ejemplo de la presente invención, el péptido de la región determinante de complementariedad (CDR) 3 de la región VH del anticuerpo B02C11, contra el factor VIII, CHGCYCAVPDDPDA [SEQ ID NO: 44], se modifica en HCHGCYCAVPDDPDA [SEQ ID NO: 45], más típicamente en HCxGCYCAVPDDPDA, en donde x no es Cys o His [SEQ ID NO: 46].

50 Como otro ejemplo, el péptido derivado de otro anticuerpo anti-Factor VIII, CGHCGGIRLHPHYSIR [SEQ ID NO: 47] se modifica en HCGHCGGIRLHPHYSIR [SEQ ID NO: 48], más típicamente en HCGxCGGIRLHPHYSIR en donde x no es Cys o His [SEQ ID NO: 49].

La presente invención se refiere además a péptidos con el motivo redox modificado que comprende epítomos de linfocitos T de MHC clase II de antígenos asociados a tumores. La presente divulgación se refiere además a procedimientos de tratamiento y prevención de tumores. Los ejemplos de tumores relevantes (por ejemplo, oncogén, protooncogén, proteína vírica, un factor superviviente, determinante clonotípico) y antígenos asociados a tumores se

describen en el documento WO WO2009101205. Tales antígenos asociados a tumores incluyen antígenos víricos de virus que causan tumores tales como HPV, antígenos asociados a tumores de un paciente que tienen una secuencia de tipo silvestre pero tienen una expresión aumentada en tumores o antígenos que tienen una secuencia mutada por mutaciones puntuales, deleciones, desplazamiento de marco o reordenaciones cromosómicas.

5 Como ejemplo de la enseñanza de la presente invención, se modifica el péptido MAGE-3 CHGCRYQVPGSDP [SEQ ID NO: 50] en HCHGCRYQVPGSDP [SEQ ID NO: 51], más típicamente en HCxGCRYQVPGSDP, en donde x no es Cys o His [SEQ ID NO: 52].

10 Como otro ejemplo, el péptido de ciclina D CHGCFVALCATDV [SEQ ID NO: 53] se modifica en HCHGCFVALCATDV EQ ID NO: 54], más típicamente en HCxGCFVALCATDV, en donde X no es Cys o His [SEQ ID NO: 55].

Como otro ejemplo, el péptido sobreviviente CHGCFKELEGWEP [SEQ ID NO: 56] se modifica en HCHGCFKELEGWEP [SEQ ID NO: 57], más típicamente en HCxGCFKELEGWEP en donde X no es Cys o His [SEQ ID NO: 58].

15 Como otro ejemplo, el péptido CHGCVASSYAAAQ [SEQ ID NO: 59] del virus Epstein Barr se modifica en HCHGCVASSYAAAQ [SEQ ID NO: 60], más típico en HCxGCVASSYAAAQ en donde X no es Cys o His [SEQ ID NO: 61].

20 La presente invención se refiere además a péptidos con el motivo redox modificado que comprende epítomos de linfocitos T de MHC clase II de proteína aloantigénica de un aloinjerto. La presente divulgación se refiere además a procedimientos de tratamiento y prevención del rechazo de aloinjertos. Los ejemplos son injertos de médula ósea, injertos de órganos sólidos tales como riñón, pulmón, corazón, hígado, páncreas, hueso o piel, o injertos celulares tales como injerto de células de sangre de cordón, injerto de células madre o injertos de células de islotes pancreáticos. Los ejemplos de proteínas aloantigénicas se desvelan en el documento WO2009100505, tales como antígenos de histocompatibilidad menores, antígenos de histocompatibilidad principales o antígenos específicos de tejido.

25 Como un ejemplo de la presente divulgación, el péptido del antígeno Dby murino CHGCFNSNRANSS [SEQ ID NO: 62] se modifica en HCHGCFNSNRANSS [SEQ ID NO: 63], más específicamente en HCxGCFNSNRANSS, en donde x no es Cys o His [SEQ ID NO: 64].

30 En otro ejemplo, la secuencia de Dby humana CGHCLVLAPTREL [SEQ ID NO: 65], se modifica en HCGHCLVLAPTREL [SEQ ID NO: 66], más particularmente en HCGxCLVLAPTREL, en donde x no es Cys o His [SEQ ID NO: 67].

En otro ejemplo, el péptido CGHCPEFLEQKRA [SEQ ID NO: 68] específico de la cepa Black 6 de murino se modifica en HCGHCPEFLEQKRA [SEQ ID NO: 69], más típicamente en HCGxPEFLEQKRA, en donde x no es Cys o His [SEQ ID NO: 70].

35 Para todos los péptidos anteriores se prevé una variante adicional, en la que entre la Histidina y la Cisteína están presentes uno o dos aminoácidos X. Típicamente, estos aminoácidos externos X no son His, Cys, Ser o Thr.

40 Los péptidos desvelados en el presente documento también pueden usarse en procedimientos de diagnóstico *in vitro* para detectar linfocitos T CD4+ restringidos de clase II en una muestra. En este procedimiento, se pone en contacto una muestra con un complejo de una molécula de MHC de clase II y un péptido desvelado en el presente documento. Los linfocitos T CD4+ se detectan midiendo la unión del complejo con células en la muestra, donde la unión del complejo a una célula es indicativa de la presencia de linfocitos T CD4+ en la muestra.

El complejo puede ser una proteína de fusión del péptido y una molécula de MHC de clase II. Como alternativa, las moléculas de MHC en el complejo son tetrámeras. El complejo puede proporcionarse como una molécula soluble o puede unirse a un vehículo.

45 El epítomo de linfocitos T correspondiente a una proteína antigénica (o inmunógeno) adecuado para su uso en el contexto de la presente invención es típicamente un epítomo universal o promiscuo de linfocitos T (es decir, un epítomo de linfocitos T capaz de unirse a una mayoría de las moléculas del MHC de clase II), más particularmente presente sobre un alérgeno aerotransportado o un alérgeno alimentario. En realizaciones particulares, el alérgeno se selecciona del grupo que consiste en alérgenos de rinosinusitis, alérgenos alérgicos de asma bronquial y alérgenos de dermatitis atópica. Los alérgenos también pueden ser alérgenos principales presentes en los moldes o diversos fármacos tales como hormonas, antibióticos, enzimas, etc. (Véase también la definición en Clin. Exp. Allergy 26, 494-516 (1996) y en Molecular Biology of Allergy and Immunology, Ed. R. Bush (1996)). Otros alérgenos relacionados con enfermedades alérgicas específicas son también bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse en Internet, por ejemplo, en www.allergome.org.

55 Las enfermedades autoinmunes se clasifican en general en dos categorías, específicas de órgano y enfermedades sistémicas. No se identifica la etiología precisa de las enfermedades autoinmunes sistémicas. Por el contrario, las

5 enfermedades autoinmunes específicas de órganos están relacionadas con una respuesta inmune específica incluyendo linfocitos B y T, que se dirige al órgano y por lo tanto induce y mantiene un estado crónico de inflamación local. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes específicas de órganos incluyen diabetes de tipo 1, miastenia gravis, tiroiditis y esclerosis múltiple. En cada una de estas afecciones, se ha identificado un solo o un pequeño número de autoantígenos, incluyendo la insulina, el receptor del músculo acetilcolina, la peroxidasa tiroidea y la proteína básica mayor, respectivamente. Está bien reconocido que la supresión de esta respuesta inmunitaria específica de órgano es beneficiosa y conduce a una recuperación parcial o completa de la función del órgano. Sin embargo, no hay terapia, lo que suprimiría tal respuesta inmune de una manera específica del antígeno. La terapia actual hace uso de la supresión no específica obtenida mediante el uso de corticoesteroides y agentes inmunosupresores, todos ellos con efectos secundarios significativos relacionados con su ausencia de especificidad, limitando así su uso y su eficacia general. Una lista no limitante de ejemplos de trastornos autoinmunes específicos de órganos y autoantígenos implicados en el mismo que se contemplan dentro del contexto de la presente invención son:

| | |
|--|--|
| Enfermedades tiroideas: | tiroglobulina, peroxidasa tiroidea, receptor de TSH |
| Diabetes tipo 1: | insulina (proinsulina), ácido glutámico descarboxilasa (GAD), tirosina fosfatasa IA-2, proteína de choque térmico HSP65, proteína específica de subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa de islote (IGRP) |
| Adrenalitis: | 21-OH hidroxilasa |
| Síndromes poliendocrinos: | 17-alfa hidroxilasa, histidina descarboxilasa, triptófano hidroxilasa, tirosina hidroxilasa |
| Gastritis y anemia perniciosa: | factor intrínseco H+/K+ ATPasa |
| Esclerosis múltiple: | glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG), proteína básica de mielina (MBP), proteolípido (PLP) |
| Miastenia gravis: | receptor de acetil-colina |
| Enfermedades oculares: | Proteína de unión al retinol (RBP) |
| Enfermedades del oído interno: | colágeno tipo II y tipo IX |
| Enfermedad celíaca: | Transglutaminasa tisular |
| Enfermedades inflamatorias intestinales: | Proteína histona H1 de pANCA |
| Aterosclerosis: | Proteína de choque térmico HSP60 |

15 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan péptidos inmunógenos que comprenden un epítipo de linfocitos T de un antígeno (propio o no) con un potencial para desencadenar una reacción inmune. En una realización particular, el epítipo de linfocitos T es un epítipo de linfocitos T dominante.

20 En consecuencia, en realizaciones particulares, los procedimientos de tratamiento y prevención de la presente divulgación comprenden la administración de un péptido inmunógeno como se describe en el presente documento, en el que el péptido comprende un epítipo de linfocito T de una proteína antigénica que desempeña un papel en la enfermedad a tratar (por ejemplo tal como los descritos anteriormente). En otras realizaciones particulares, el epítipo usado es un epítipo dominante.

25 La presente divulgación se refiere además a procedimientos para producir péptidos con un epítipo de linfocitos T de MHC clase II y un motivo redox modificado.

30 En una primera etapa, el procedimiento comprende la etapa de proporcionar la secuencia de una proteína antigénica de interés e identificar una secuencia de epítipo de linfocito T de MHC clase II en el antígeno. Las secuencias de epítopos pueden haberse descrito todavía para la proteína antigénica considerada. Como alternativa, se determinan mediante procedimientos *in silico*, procedimientos *in vitro* o procedimientos *in vivo*. Además, se selecciona la proteína antigénica para determinar la presencia del motivo redox modificado, que no requiere procedimientos *in silico* específicos.

Existe una probabilidad muy pequeña, pero existente, de que una proteína antigénica contenga dentro de su

secuencia un motivo H-X(0,2)C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78, 90 o 91] o [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H [SEQ ID NO: 79, 92 o 93] en estrecha proximidad de una secuencia de epítipo de linfocitos T (es decir, separada del epítipo de linfocitos T por 7 o menos aminoácidos). Si es así, puede usarse un fragmento de la proteína antigénica que comprende epítipo de linfocitos T y motivo para los procedimientos y usos de la presente invención. El epítipo en las proteínas
 5 puede haberse tratado en la técnica anterior, pero no se trata la presencia, y mucho menos la relevancia del motivo redox modificado. No ha existido, en consecuencia, ningún incentivo en la técnica anterior para seleccionar tales fragmentos peptídicos, o para usar tales fragmentos peptídicos para los procedimientos desvelados en el presente documento. En ciertas realizaciones, en las que el péptido se basa en un fragmento de una proteína que contiene un epítipo de linfocitos T de MHC de clase II y un motivo redox modificado, tal secuencia peptídica puede modificarse
 10 adicionalmente cambiando la longitud de la secuencia entre el epítipo y el epítipo modificado redox, cambiando los aminoácidos en la secuencia enlazadora, cambiando una Ser o Thr en el motivo en una Cisteína o cambiando aminoácidos en una o ambas posiciones X dentro del motivo.

Otras proteínas antigénicas que se usan para el diseño de péptidos pueden contener una secuencia H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78, 90 o 91] o [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H [SEQ ID NO: 79, 92 o 93] que está más alejada de un
 15 epítipo de linfocitos T de MHC de clase II (más de 7 aminoácidos de la secuencia de epítipos).

En tales casos puede producirse un péptido en el que solo se acorta la distancia entre el epítipo y el motivo y se conserva la secuencia del motivo y los aminoácidos adyacentes. Si se considera adecuado, los aminoácidos fuera del motivo, Serina o treonina en el motivo o una o ambas posiciones X se cambian. Las proteínas antigénicas más
 20 generales que se usan para el diseño de péptidos no contendrán una secuencia H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78, 90 o 91] o [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H [SEQ ID NO: 79, 92 o 93] dentro de su secuencia proteica. Los péptidos de acuerdo con la presente divulgación se prepararán sintetizando un péptido en el que el epítipo de linfocitos T y el motivo redox modificado estarán separados por 0 a 7 aminoácidos. En ciertas realizaciones, el motivo redox modificado puede obtenerse introduciendo 1, 2 o 3 mutaciones fuera de la secuencia del epítipo, para preservar el entorno de secuencia tal como se da en la proteína. Típicamente, los aminoácidos en P-2 y P-1, así como en P+10 y
 25 P+11, con referencia al nonapéptido que son parte de la secuencia natural, se conservan en la secuencia peptídica. Estos restos flanqueantes generalmente estabilizan la unión al MHC de clase II. En otras realizaciones, la secuencia N-terminal o C-terminal del epítipo no estará relacionada con la secuencia de la proteína antigénica que contiene la secuencia de epítipos de linfocitos T.

En otras realizaciones específicas, los péptidos se preparan modificando péptidos con un epítipo de linfocitos T y un
 30 motivo C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 77] o [CST]-X(2)-C [SEQ ID NO: 76] como se desvela en el documento WO2008/017517. La adición de una histidina o la modificación de un aminoácido en una Histidina conduce a los péptidos de la presente divulgación con una secuencia H-X(2,0)-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO: 78, 90 o 91] o [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H [SEQ ID NO: 79, 92 o 93].

Así, basándose en los procedimientos anteriores para diseñar un péptido, se genera un péptido por síntesis química
 35 de péptidos, procedimientos de expresión recombinante o, en casos más excepcionales, fragmentación proteolítica o química de proteínas.

Los péptidos producidos en los procedimientos anteriores pueden ensayarse en cuanto a la presencia de un epítipo de linfocitos T en procedimientos *in vitro* e *in vivo*, pueden ensayarse en cuanto a su actividad reductora en ensayos
 40 *in vitro*. Como control de calidad final, los péptidos se pueden ensayar en ensayos *in vitro* para verificar si los péptidos pueden generar linfocitos T CD4+ que son citotóxicos a través de una vía apoptótica para células presentadoras de antígeno que presentan el antígeno que contiene la secuencia de epítipos que también está presente en el péptido con el motivo redox modificado.

La identificación y selección de un epítipo de linfocitos T a partir de proteínas antigénicas, para su uso en el contexto de la presente invención, es conocida por los expertos en la técnica.

45 Para identificar un epítipo adecuado para su uso en el contexto de la presente invención, las secuencias peptídicas aisladas de una proteína antigénica se prueban, por ejemplo, mediante técnicas de biología de linfocitos T, para determinar si las secuencias peptídicas provocan una respuesta de linfocitos T. Las secuencias de péptidos descubiertas que generan una respuesta de linfocitos T se definen como que tienen actividad estimulante de linfocitos T.

50 La actividad estimulante de linfocitos T humanos se puede ensayar adicionalmente cultivando linfocitos T obtenidos a partir de un individuo sensible a, por ejemplo, un alérgeno de ácaros (es decir, un individuo que tenga una respuesta inmune mediada por IgE a un alérgeno de ácaros) con un péptido/epítipo derivado del alérgeno y determinar si la proliferación de linfocitos T ocurre en respuesta al péptido/epítipo medido, por ejemplo, por captación celular de timidina tritiada. Los índices de estimulación para respuestas de linfocitos T a péptidos/epítipos
 55 pueden calcularse como el CPM máximo en respuesta a un péptido/epítipo dividido por el CPM de control. Un índice de estimulación de linfocitos T (S.I.) igual o superior a dos veces el nivel de fondo se considera "positivo". Se usan resultados positivos para calcular el índice de estimulación media para cada péptido/epítipo para el grupo de péptidos/epítipos ensayados.

Los epítomos de linfocitos T no naturales (o modificados) pueden opcionalmente ser probados en su afinidad de unión a moléculas de MHC de clase II. Esto puede realizarse de diferentes maneras. Por ejemplo, se obtienen moléculas solubles de HLA de clase II por lisis de células homocigóticas para una molécula de clase II dada. Esta última se purifica por cromatografía de afinidad. Las moléculas solubles de clase II se incuban con un péptido de referencia marcado con biotina producido de acuerdo con su fuerte afinidad de unión para esa molécula de clase II. Los péptidos a evaluar para la unión de clase II se incuban a continuación a diferentes concentraciones y su capacidad para desplazar el péptido de referencia de su unión de clase II se calcula mediante la adición de neutravidina. Los procedimientos se pueden encontrar en, por ejemplo, Texier y col., (2000) *J. Immunology* 164, 3177 - 3184).

De acuerdo con la presente invención, las propiedades inmunogénicas de los epítomos de linfocitos T se incrementan uniéndolo al motivo redox modificado que tiene propiedades reductoras mejoradas. Particularmente, los péptidos de la presente invención que comprenden al menos un epítomo de linfocitos T y el motivo redox modificado como se describe en el presente documento tienen un índice de estimulación de linfocitos T promedio mayor o igual a 2,0. Un péptido que tiene un índice de estimulación de linfocitos T mayor o igual a 2,0 se considera útil como agente terapéutico. Más particularmente, los péptidos desvelados en el presente documento tienen un índice de estimulación de linfocitos T medio de al menos 2,5, al menos 3,5, al menos 4,0, o incluso al menos 5,0. Además, los péptidos tienen típicamente un índice de positividad (P.I.) de al menos aproximadamente 100, al menos 150, al menos aproximadamente 200 o al menos aproximadamente 250. El índice de positividad para un péptido se determina multiplicando el índice de estimulación de linfocitos T medio por el porcentaje de individuos, en una población de individuos con una respuesta inmune (por ejemplo, sensible a los ácaros del polvo doméstico)(por ejemplo, al menos 9 individuos, al menos 16 individuos o al menos 29 o 30, o incluso más), que tienen linfocitos T que responden al péptido (correspondiendo así al SI multiplicado por la naturaleza promiscua del péptido/epítomo). Por lo tanto, el índice de positividad representa tanto la fuerza de una respuesta de linfocitos T a un péptido (S.I.) como la frecuencia de una respuesta de linfocitos T a un péptido en una población de individuos con una respuesta inmune (por ejemplo) sensible a los ácaros del polvo doméstico.

Con el fin de determinar los epítomos óptimos de linfocitos T mediante, por ejemplo, técnicas de mapeo fino, se modifica un péptido que tiene actividad estimuladora de linfocitos T y que comprende por lo menos un epítomo de linfocitos T determinado por técnicas de biología de linfocitos T por adición o delección de restos de aminoácido en el extremo amino o carboxilo del péptido y se ensayan para determinar un cambio en la reactividad de linfocitos T al péptido modificado. Si se descubre que dos o más péptidos que comparten un área de solapamiento en la secuencia de proteína natural tienen actividad estimuladora de linfocitos T humanos, según se determina mediante técnicas de biología de linfocitos T, se pueden producir péptidos adicionales que comprenden la totalidad o una porción de los péptidos y estos péptidos se pueden probar por un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, los péptidos se seleccionan y se producen recombinantemente o sintéticamente. Los epítomos o péptidos de linfocitos T se seleccionan basándose en diversos factores, incluyendo la resistencia de la respuesta de linfocitos T al péptido/epítomo (por ejemplo, índice de estimulación) y la frecuencia de la respuesta de linfocitos T al péptido en una población de individuos.

Adicionalmente y/o como alternativa, pueden usarse uno o más algoritmos *in vitro* para identificar una secuencia de epítomo de linfocitos T dentro de una proteína antigénica. Los algoritmos adecuados incluyen, pero no se limitan a los descritos en Zhang y col. (2005) *Nucleic Acids Res* 33, W180-W183 (PREDBALB); Salomon & Flower (2006) *BMC Bioinformatics* 7, 501 (MHCBN); Schuler y col. (2007) *Methods Mol. Biol.* 409, 75-93 (SYFPEITHI); Donnes & Kohlbacher (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, W194-W197 (SVMHC); Kolaskar y Tongaonkar (1990) *FEBS Lett.* 276, 172-174, Guan y col. (2003) *Appl. Bioinformatics* 2, 63-66 (MHCpred) y Singh y Raghava (2001) *Bioinformatics* 17, 1236-1237 (Propred).

Más particularmente, tales algoritmos permiten la predicción dentro de una proteína antigénica de una o más secuencias octapeptídicas o nonapeptídicas que encajarán en el surco de una molécula de MHC II y esto para diferentes tipos de HLA.

Los péptidos desvelados en el presente documento pueden generarse usando técnicas de ADN recombinante, en bacterias, levaduras, células de insectos, células vegetales o células de mamíferos. En vista de la longitud limitada de los péptidos, pueden prepararse por síntesis química de péptidos, en la que los péptidos se preparan acoplando los diferentes aminoácidos entre sí. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión de, por ejemplo, D-aminoácidos, aminoácidos con cadenas laterales no naturales o aminoácidos naturales con cadenas laterales modificadas tales como cisteína metilada.

Los procedimientos de síntesis química de péptidos están bien descritos y los péptidos se pueden pedir a compañías como Applied Biosystems y otras compañías.

La síntesis de péptidos puede realizarse tanto en síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) como en contraposición a la síntesis de péptidos en fase de disolución. Los métodos SPPS más conocidos son la química en fase sólida t-Boc y Fmoc:

Durante la síntesis de péptidos se usan varios grupos protectores. Por ejemplo, las funciones hidroxilo y carboxilo están protegidas por el grupo t-butilo, la lisina y el triptófano están protegidos por el grupo t-Boc, y la asparagina,

- glutamina, cisteína e histidina están protegidas por el grupo tritilo y la arginina está protegida por el grupo pbf. Si es apropiado, los grupos protectores pueden dejarse en el péptido después de la síntesis. Los péptidos pueden unirse entre sí para formar péptidos más largos usando una estrategia de ligación (acoplamiento quimioselectivo de dos fragmentos peptídicos no protegidos) tal como se describió originalmente por Kent (Schnelzer y Kent (1992), J. Pept. Protein Res. 40, 180-193) y revisado por ejemplo en Tam y col. (2001) Biopolymers 60, 194-205 proporciona el tremendo potencial para conseguir la síntesis de proteínas que está más allá del alcance de SPPS. Muchas proteínas con el tamaño de 100-300 residuos se han sintetizado con éxito por este procedimiento. Los péptidos sintéticos han seguido desempeñando un papel cada vez más crucial en los campos de investigación de la bioquímica, farmacología, neurobiología, enzimología y biología molecular debido a los enormes avances en SPPS.
- 10 Como alternativa, los péptidos se pueden sintetizar usando moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos desvelados en el presente documento en un vector de expresión apropiado que incluye las secuencias de nucleótidos codificantes. Tales moléculas de ADN pueden prepararse fácilmente usando un sintetizador de ADN automatizado y la conocida relación codón-aminoácido del código genético. Tal molécula de ADN también puede obtenerse como ADN genómico o como ADNc usando sondas de oligonucleótidos y metodologías convencionales de hibridación. Tales moléculas de ADN pueden incorporarse en vectores de expresión, incluyendo plásmidos, que están adaptados para la expresión del ADN y la producción del polipéptido en un hospedador adecuado tal como una bacteria, por ejemplo, Escherichia coli, célula de levadura, célula animal o célula vegetal.

- Las propiedades físicas y químicas de un péptido de interés (por ejemplo, solubilidad, estabilidad) se examinan para determinar si el péptido es/sería adecuado para su uso en composiciones terapéuticas. Típicamente esto se optimiza ajustando la secuencia del péptido. Opcionalmente, el péptido puede modificarse después de la síntesis (modificaciones químicas, por ejemplo, adición/delección de grupos funcionales) usando técnicas conocidas en la materia.

- Se cree que los epítomos de linfocitos T por sí mismos desencadenan eventos tempranos a nivel de los linfocitos T colaboradores uniéndose a una molécula de HLA apropiada en la superficie de una célula presentadora de antígeno y estimulando la subpoblación relevante de linfocitos T. Estos acontecimientos llevan a la proliferación de linfocitos T, la secreción de linfocinas, reacciones inflamatorias locales, reclutamiento de células inmunes adicionales al sitio y activación de la cascada de linfocitos B que lleva a la producción de anticuerpos. Un isotipo de estos anticuerpos, IgE, es fundamentalmente importante en el desarrollo de síntomas alérgicos y su producción está influenciada tempranamente en la cascada de eventos, a nivel del linfocito T colaborador, por la naturaleza de las linfocinas secretadas. Un epítomo de linfocitos T es el elemento básico o la unidad más pequeña de reconocimiento por un receptor de linfocitos T en el que el epítomo comprende restos de aminoácidos esenciales para el reconocimiento del receptor, que son contiguos en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Sin embargo, tras la administración de los péptidos con un epítomo de linfocitos T y un motivo redox, se cree que suceden los siguientes eventos:

- 35 activación de linfocitos T específicos de antígeno (i) resultantes de la interacción cognada con el péptido derivado de antígeno presentado por moléculas de MHC de clase II;
- la secuencia de reductasa reduce las proteínas de superficie de linfocitos T, tales como la molécula CD4, cuyo segundo dominio contiene un puente disulfuro constreñido. Esto transduce una señal en linfocitos T. Entre una serie de consecuencias relacionadas con el aumento de la vía oxidativa, los acontecimientos importantes son el aumento de la afluencia de calcio y la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo. Esto último da como resultado una transcripción aumentada de IFN-gamma y granzimas, lo que permite que las células adquieran propiedades citolíticas a través de un mecanismo inductor de apoptosis; la propiedad citolítica afecta a las células que presentan el péptido mediante un mecanismo que implica la secreción de granzima B y las interacciones Fas-FasL. Dado que el efecto de muerte celular se obtiene a través de una vía apoptótica, las células citolíticas son un término más apropiado para estas células que las células citotóxicas. La destrucción de las células diana que presentan el antígeno evita la activación de otros linfocitos T específicos para los epítomos situados en el mismo antígeno o un antígeno no relacionado que sería procesado por la misma célula presentadora de antígeno; una consecuencia adicional de la activación de linfocitos T es suprimir la activación de linfocitos T espectadores por un mecanismo dependiente de contacto célula-célula. En este caso, los linfocitos T activados por un antígeno presentado por una célula presentadora de antígeno diferente también se suprimen siempre que tanto los linfocitos T citolíticos como los linfocitos T observadores estén muy próximos, es decir activados en la superficie de la misma célula presentadora de antígeno.

El mecanismo de acción postulado anteriormente se sustenta con los datos experimentales revelados en la solicitud de PCT citada anteriormente y en las publicaciones del presente inventor.

- 55 La presente invención proporciona procedimientos para generar linfocitos T CD4+ citolíticos específicos de antígeno *in vivo* o *in vitro* e, independientemente de ellos, procedimientos para discriminar linfocitos T CD4+ citolíticos de otras poblaciones celulares tales como Foxp3+ Treg basadas en datos de expresión característicos.

La presente divulgación describe procedimientos *in vivo* para la producción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno. Una realización particular se refiere al procedimiento para producir o aislar los linfocitos T CD4+ mediante

la inmunización de animales (incluyendo seres humanos) con los péptidos de la invención tal como se describe en el presente documento y aislando a continuación los linfocitos T CD4+ de los animales inmunizados. La presente divulgación describe procedimientos *in vitro* para la producción de linfocitos T CD4+ citotóxicos específicos de antígenos hacia APC. La presente invención proporciona procedimientos para generar linfocitos T CD4+ citotóxicos específicos de antígeno hacia APC.

En un ejemplo, se proporcionan procedimientos que comprenden el aislamiento de células sanguíneas periféricas, la estimulación de la población celular *in vitro* por un péptido inmunógeno desvelado en el presente documento y la expansión de la población celular estimulada, más particularmente en presencia de IL-2. Los procedimientos según la divulgación tienen la ventaja de que se produce un número elevado de linfocitos T CD4+ y que se pueden generar los linfocitos T CD4+ que son específicos para la proteína antigénica (usando un péptido que comprende un epítipo específico de antígeno).

En una realización alternativa, los linfocitos T CD4+ se pueden generar *in vivo*, es decir, mediante la inyección de los péptidos inmunógenos descritos en el presente documento a un sujeto, y la recolección de los linfocitos T CD4+ citotóxicos generados *in vivo*.

Los linfocitos T CD4+ citotóxicos específicos de antígeno hacia APC, obtenibles por los procedimientos de la presente invención son de particular interés para la administración a mamíferos para inmunoterapia, en la prevención de reacciones alérgicas y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Se prevé el uso de células alogénicas y autogénicas.

Las poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos se obtienen tal como se describe más adelante en el presente documento.

Los linfocitos T CD4+ citotóxicos específicos de antígeno, como se describen en el presente documento, pueden usarse como un medicamento, más particularmente para su uso en terapia celular adoptiva, más particularmente en el tratamiento de reacciones alérgicas agudas y recaídas de enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple. Se usan linfocitos T CD4+ citotóxicos aislados o poblaciones de células, más particularmente poblaciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos específicos de antígeno generados tal como se describe para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de trastornos inmunes. Se desvelan procedimientos de tratamiento usando los linfocitos T CD4+ citotóxicos aislados o generados.

Tal como se explica en el documento WO2008/017517, los linfocitos T CD4+ citotóxicos hacia APC se pueden distinguir de linfocitos Treg naturales basados en las características de expresión de las células. Más particularmente, una población de linfocitos T CD4+ citotóxicos demuestra una o más de las siguientes características en comparación con una población de linfocitos Treg naturales:

una expresión aumentada de marcadores de superficie incluyendo CD103, CTLA-4, FasL e ICOS tras la activación,
 expresión intermedia de CD25,
 expresión de CD4, ICOS, CTLA-4, GITR y baja o ninguna expresión de CD127 (IL7-R), sin expresión de CD27,
 expresión del factor de transcripción T-bet y egr-2 (Krox-20) pero no del represor de transcripción Foxp3,
 una alta producción de IFN-gamma y no o solo trazas de IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 o TGF-beta.

Además, los linfocitos T citotóxicos expresan CD45RO y/o CD45RA, no expresan CCR7, CD27 y presentan altos niveles de granzima B y otras granzimas así como ligando Fas.

Los péptidos desvelados en el presente documento, mediante la administración a un animal vivo, típicamente un ser humano, inducirán a linfocitos T específicos que ejercen una actividad supresora sobre los linfocitos T espectadores.

Este mecanismo también implica y los resultados experimentales muestran que los péptidos desvelados en el presente documento, aunque comprenden un epítipo de linfocitos T específico de un determinado antígeno, pueden usarse para la prevención o tratamiento de trastornos provocados por una reacción inmune contra otros epítopos de linfocitos T del mismo antígeno o en ciertas circunstancias incluso para el tratamiento de trastornos provocados por una reacción inmune contra otros epítopos de linfocitos T de otros antígenos diferentes si se presentaran a través del mismo mecanismo por moléculas de MHC de clase II en la vecindad de linfocitos T activadas por péptidos de la invención.

Se describen poblaciones de células aisladas del tipo de células que tienen las características descritas anteriormente, que además son específicas del antígeno, es decir, capaces de suprimir una respuesta inmune específica del antígeno.

Los péptidos desvelados en el presente documento también pueden usarse en procedimientos de terapia génica bien conocidos en la técnica y la terminología usada en el presente documento que explica el uso de péptidos de acuerdo con la divulgación incluye también el uso de ácidos nucleicos que codifican o expresan péptidos inmunógenos de acuerdo con la invención.

La presente divulgación describe secuencias de ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la presente invención y procedimientos para su uso. En el contexto de la presente invención se prevén diferentes procedimientos para conseguir, mediante la terapia génica, niveles de péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención en un mamífero *in vivo*.

5 Las moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican secuencias de proteínas pueden usarse como ADN desnudo o en liposomas u otros sistemas lipídicos para su administración a células diana. Otros procedimientos para la transferencia directa de ADN plasmídico en células son bien conocidos por los expertos en la técnica para su uso en terapia génica humana e implican dirigir el ADN a receptores sobre células mediante la complejación del ADN plasmídico a proteínas. En su forma más simple, la transferencia de genes puede realizarse simplemente inyectando
10 pequeñas cantidades de ADN en el núcleo de una célula, a través de un proceso de microinyección. Una vez que los genes recombinantes se introducen en una célula, pueden ser reconocidos por los mecanismos normales de las células para la transcripción y la traducción, y se expresará un producto génico. También se han intentado otros procedimientos para introducir el ADN en un mayor número de células. Estos procedimientos incluyen: transfección, en la que el ADN precipita con fosfato de calcio y se introduce en las células por pinocitosis; electroporación, en la que las células están expuestas a grandes impulsos de voltaje para introducir orificios en la membrana);
15 lipofección/fusión de liposoma, en la que el ADN se empaqueta en vesículas lipofílicas que se funden con una célula diana; y el bombardeo de partículas usando ADN ligado a pequeños proyectiles. Otro procedimiento para introducir ADN en las células es acoplar el ADN a proteínas químicamente modificadas. Las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar los endosomas y de mejorar la captación del ADN en las células. La mezcla de adenovirus a soluciones que contienen complejos de ADN o la unión de ADN a polisina unida covalentemente a adenovirus usando agentes de reticulación de proteínas mejora sustancialmente la captación y expresión del gen recombinante. También se pueden usar vectores de virus adenoasociados para la administración génica en células vasculares. Tal como se usa en el presente documento, "transferencia génica" significa el procedimiento de introducción de una molécula de ácido nucleico extraño en una célula, que se realiza comúnmente para permitir la
25 expresión de un producto particular codificado por el gen. El producto puede incluir una proteína, polipéptido, ARN o ARN antisentido, o ARN enzimáticamente activo. La transferencia génica puede realizarse en células cultivadas o mediante administración directa en mamíferos. En otra realización, se proporciona un vector que comprende una secuencia de molécula de ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la divulgación. En otra realización, el vector se genera de tal manera que la secuencia de la molécula de ácido nucleico se expresa solo en un tejido específico. Los procedimientos para conseguir la expresión de genes específicos de tejidos son bien conocidos en la técnica. Esto puede lograrse, por ejemplo, colocando la secuencia que codifica un péptido de acuerdo con la invención bajo el control de un promotor que dirige la expresión en uno o más tejidos particulares.

Se pueden usar vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, adenovirus, virus adenoasociados, virus herpes, virus ARN o virus del papiloma bovino, para el suministro de secuencias nucleotídicas
35 (por ejemplo, ADNc) que codifican para péptidos, homólogos o derivados de las mismas de acuerdo con la invención en los tejidos diana o población de células. Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores víricos recombinantes que contienen tales secuencias codificantes.

Por consiguiente, la presente divulgación desvela el uso de un ácido nucleico que es capaz de expresar los péptidos de la divulgación, *in vivo*, para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades dirigidas por una respuesta inmune
40 a un antígeno extraño o propio. De acuerdo con una realización, el ácido nucleico capaz de expresar *in vivo* un péptido de acuerdo con la divulgación es una secuencia que codifica el péptido, que está unido operativamente a un promotor. Tal secuencia puede administrarse directa o indirectamente. Por ejemplo, un vector de expresión que contiene la secuencia codificante para un péptido de acuerdo con la invención se puede insertar en células, después de lo cual las células se cultivan *in vitro* y luego se inyectan o se infunden en el paciente. Como alternativa, el ácido nucleico capaz de expresar *in vivo* un péptido de acuerdo con la invención es una secuencia que modifica la expresión endógena de las células. El procedimiento de terapia génica puede implicar el uso de un vector de adenovirus que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención o una molécula de ácido nucleico desnuda que codifica un péptido de acuerdo con la invención. Como alternativa, pueden inyectarse células manipuladas que contienen una molécula de ácido
50 nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la invención.

Cuando se asegura la administración de uno o más péptidos de acuerdo con la invención mediante transferencia génica (es decir, la administración de un ácido nucleico que asegura la expresión de péptidos de acuerdo con la invención *in vivo* después de la administración), se puede determinar la dosificación apropiada del ácido nucleico basándose en la cantidad de péptido expresada como resultado del ácido nucleico, tal como por ejemplo
55 determinando la concentración de péptido en la sangre después de la administración. Por tanto, en una realización particular, los péptidos de la invención se administran mediante el uso de polinucleótidos que codifican los péptidos, ya sea en un vector de expresión o no, y por lo tanto la presente divulgación también se refiere a procedimientos de terapia génica. Otra realización particular se refiere al uso de procedimientos para inducir una sobreexpresión local de los péptidos de la invención para el tratamiento o prevención de trastornos inmunes.

60 La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más péptidos de acuerdo con la presente invención, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se ha detallado anteriormente, la presente invención se refiere también a las composiciones para su uso como medicamento o a

procedimientos para tratar a un mamífero de un trastorno inmune usando la composición y al uso de las composiciones para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de los trastornos inmunitarios. La composición farmacéutica podría ser, por ejemplo, una vacuna adecuada para tratar o prevenir trastornos inmunitarios, especialmente alergias transmitidas por el aire y alimenticias, así como enfermedades de origen alérgico. Como un ejemplo descrito más adelante de una composición farmacéutica, un péptido de acuerdo con la invención se adsorbe sobre un adyuvante adecuado para administración a mamíferos, tal como hidróxido de aluminio (alumbre). Típicamente, se inyectan 50 µg del péptido adsorbido en alumbre por vía subcutánea en 3 ocasiones a un intervalo de 2 semanas. Debe ser obvio para los expertos en la técnica que son posibles otras vías de administración, incluyendo oral, intranasal o intramuscular. Además, el número de inyecciones y la cantidad inyectada pueden variar dependiendo de las afecciones a tratar. Además, pueden usarse otros adyuvantes que el alumbre, siempre que faciliten la presentación de péptidos en la presentación de MHC de clase II y la activación de linfocitos T. De este modo, aunque es posible administrar los ingredientes activos solos, típicamente se presentan como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, tanto para uso veterinario como para uso humano, de la presente invención comprenden al menos un ingrediente activo, como se ha descrito anteriormente, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, que comprenden, como ingrediente activo, uno o más péptidos según la invención, mezclados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención debe comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo, tal como se indica a continuación con respecto al procedimiento de tratamiento o prevención. Opcionalmente, la composición comprende además otros ingredientes terapéuticos. Otros ingredientes terapéuticos adecuados, así como su dosificación usual dependiendo de la clase a la que pertenecen, son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden seleccionarse de otros fármacos conocidos usados para tratar trastornos inmunes.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa cualquier material o sustancia con la que se formula el ingrediente activo con el fin de facilitar su aplicación o diseminación al lugar a tratar, por ejemplo disolviendo, dispersando o difundiendo la composición y/o facilitar su almacenamiento, transporte o manipulación sin alterar su eficacia. Incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares. Se pueden incluir ingredientes adicionales para controlar la duración de la acción del péptido inmunógeno en la composición. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que se ha comprimido para formar un líquido, es decir, las composiciones desveladas en el presente documento se pueden usar adecuadamente como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos, aerosoles, ungüentos, cremas, comprimidos, gránulos o polvos. Los vehículos farmacéuticos adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas y su formulación son bien conocidos por los expertos en la técnica, y no hay ninguna restricción particular a su selección dentro de la presente invención. También pueden incluir aditivos tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, adhesivos, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares, siempre y cuando sean compatibles con la práctica farmacéutica, es decir, vehículos y aditivos que no causen daño permanente a los mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar de cualquier manera conocida, por ejemplo mezclando homogéneamente, recubriendo y/o triturando los ingredientes activos, en un procedimiento de una o varias etapas, con el material de vehículo seleccionado y, cuando sea apropiado, los otros aditivos tales como agentes tensioactivos. También pueden prepararse por micronización, por ejemplo con el fin de obtenerlas en forma de microesferas que tienen normalmente un diámetro de aproximadamente 1 a 10 µm, concretamente para la fabricación de microcápsulas para la liberación controlada o sostenida de los ingredientes activos.

Los agentes tensioactivos adecuados, también conocidos como emulgentes o emulsionantes, que se usarán en las composiciones farmacéuticas de la presente invención son materiales no iónicos, catiónicos y/o aniónicos que tienen buenas propiedades emulsionantes, dispersantes y/o humectantes. Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen tanto jabones solubles en agua como agentes tensioactivos sintéticos hidrosolubles. Los jabones adecuados son sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, sales de amonio no sustituidas o sustituidas de ácidos grasos superiores (C10-C22), por ejemplo, las sales sodio o potasio de ácido oleico o esteárico, o de mezclas de ácidos grasos naturales obtenibles en forma de aceite de coco o aceite de sebo. Los tensioactivos sintéticos incluyen sales de sodio o de calcio de ácidos poliacrílicos; sulfonatos y sulfatos grasos; derivados de bencimidazol sulfonados y alquilarilsulfonatos. Los sulfonatos o sulfatos grasos suelen estar en forma de sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, sales de amonio no sustituidas o sales de amonio sustituidas con un radical alquilo o acilo que tiene de 8 a 22 átomos de carbono, por ejemplo, la sal de sodio o de calcio del ácido lignosulfónico o ácido dodecilsulfónico o una mezcla de sulfatos de alcoholes grasos obtenidos de ácidos grasos naturales, sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de ésteres de ácido sulfúrico o sulfónico (tal como laurilsulfato de sodio) y ácidos sulfónicos de alcohol graso/aductos de óxido de etileno. Los derivados de bencimidazol sulfonados adecuados contienen típicamente de 8 a 22 átomos de carbono. Ejemplos de alquilarilsulfonatos son las sales de sodio, calcio o alcanolamina del ácido dodecil bencensulfónico o ácido dibutil-naftalensulfónico o un producto de condensación de ácido naftalen-sulfónico/formaldehído. También son adecuados los fosfatos correspondientes, por ejemplo, sales de éster de ácido fosfórico y un aducto de p-nonilfenol con óxido de etileno y/o propileno, o fosfolípidos. Los fosfolípidos adecuados para este fin son los fosfolípidos naturales (procedentes de células animales o vegetales) o sintéticos del

tipo cefalina o lecitina tales como por ejemplo, fosfatidil-etanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, lisolecitina, cardiolipina, dioctanilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y sus mezclas.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen derivados polietoxilados y poli-propoxilados de alquilfenoles, alcoholes grasos, ácidos grasos, aminas alifáticas o amidas que contienen al menos 12 átomos de carbono en la molécula, alquilarensulfonatos y dialquilsulfosuccinatos, tales como derivados de éteres poliglicólicos de alcoholes alifáticos y cicloalifáticos, ácidos grasos saturados e insaturados y alquilfenoles, conteniendo los derivados típicamente 3 a 10 grupos éter glicólico y 8 a 20 átomos de carbono en el resto hidrocarburo (alifático) y 6 a 18 átomos de carbono en el resto alquilo del alquilfenol. Otros tensioactivos no iónicos adecuados son aductos solubles en agua de óxido de polietileno con propilenglicol, etilendiamino-polipropilenglicol que contiene de 1 a 10 átomos de carbono en la cadena alquímica, aductos que contienen 20 a 250 grupos de éter etilenglicólico y/o 10 a 100 grupos de éter propilenglicólico. Tales compuestos contienen usualmente de 1 a 5 unidades de etilenglicol por unidad de propilenglicol. Ejemplos representativos de tensioactivos no iónicos son nonilfenol-polietoxietanol, éteres poliglicólicos de aceite de ricino, aductos de polipropileno/óxido de polietileno, tributilfenoxipolietoxietanol, polietilenglicol y octilfenoxipolietoxietanol. También son adecuados tensioactivos no iónicos los ésteres de ácidos grasos de polietileno sorbitán (tales como trioleato de sorbitán de polioxi-etileno), glicerol, sorbitán, sacarosa y pentaeritritol. Los tensioactivos catiónicos adecuados incluyen sales de amonio cuaternario, particularmente haluros, que tienen 4 radicales hidrocarbonados opcionalmente sustituidos con halo, fenilo, fenilo sustituido o hidroxilo; por ejemplo sales de amonio cuaternario que contienen como sustituyente N al menos un radical alquilo de C8-C22 (por ejemplo, cetilo, laurilo, palmitilo, miristilo, oleilo y similares) y, como sustituyentes adicionales, radicales alquilo inferior, bencilo y/o hidroxialquilo inferior no sustituidos o halogenados.

Una descripción más detallada de los agentes tensioactivos adecuados para este propósito puede encontrarse, por ejemplo, en "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual" (MC Publishing Crop., Ridgewood, Nueva Jersey, 1981), "Tensid-Taschenbuch", 2d ed. (Hanser Verlag, Viena, 1981) y "Encyclopaedia of Surfactants, (Chemical Publishing Co., Nueva York, 1981). Los péptidos, homólogos o derivados de los mismos desvelados en el presente documento (y sus sales fisiológicamente aceptables o composiciones farmacéuticas todas incluidas en el término "ingredientes activos") se pueden administrar por cualquier ruta apropiada al estado a tratar y apropiado para los compuestos, aquí el Proteínas y fragmentos a administrar. Las vías posibles incluyen formas regionales, sistémicas, orales (sólidas o inhaladas), rectales, nasales, tópicas (incluyendo oculares, bucales y sublinguales), vaginales y parenterales (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural). La vía de administración preferida puede variar con, por ejemplo, la condición del receptor o con las enfermedades a tratar. Como se describe en el presente documento, el vehículo o los vehículos óptimamente son "aceptables" en el sentido de que son compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de la misma. Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural). Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Tales procedimientos incluyen la etapa de poner en asociación el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta. Se puede preparar un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos creados por compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar recubiertos o ranurados opcionalmente y pueden formularse de manera que proporcionen liberación lenta o controlada del ingrediente activo en el mismo.

Para tratamientos locales, por ejemplo sobre la piel, tales como de la articulación, las formulaciones se aplican opcionalmente como un ungüento o crema tópica que contiene el ingrediente o ingredientes activos en una cantidad de, por ejemplo, 0,075 al 20 % en p/p (incluyendo ingrediente activos en un intervalo de entre el 0,1 % y el 20 % en incrementos del 0,1 % en p/p tal como el 0,6 % en p/p, el 0,7 % en p/p, etc.), particularmente del 0,2 al 15 % en p/p y más particularmente del 0,5 al 10 % en p/p. Cuando se formulan en un ungüento, los ingredientes activos pueden emplearse con una base de ungüento parafínico o miscible con agua. Como alternativa, los ingredientes activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos el 30 % en p/p de un alcohol polihidroxilado, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tales como propilenglicol, butano 1,3-diol, manitol, Sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir deseablemente un compuesto que mejora la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Ejemplos de tales mejoradores de penetración dérmica incluyen sulfóxido de dimetilo y análogos relacionados. La

fase aceitosa de las emulsiones de esta invención puede constituirse a partir de ingredientes conocidos de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante (también conocido como emulsor), comprende deseablemente una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con una grasa y un aceite. Opcionalmente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como un estabilizante, típicamente incluyendo tanto un aceite como una grasa. En conjunto, el emulsionante o los estabilizantes constituyen la denominada cera emulsionante y la cera junto con el aceite y la grasa forman la denominada base de ungüento emulsionante que forma la fase oleosa dispersa de las formulaciones de crema.

La elección de aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en el logro de las propiedades cosméticas deseadas, ya que la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de los aceites que se pueden usar en formulaciones de emulsiones farmacéuticas es muy baja. Por lo tanto, la crema debe ser opcionalmente un producto no graso, no manchado y lavable con una consistencia adecuada para evitar la fuga de tubos u otros recipientes. Ésteres alquílicos mono- o dibásicos de cadena lineal o ramificada tales como di-isoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo y particularmente estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de Se pueden usar ésteres de cadena ramificada conocidos como Crodamol CAP. Estos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Como alternativa, se pueden usar lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica al ojo también incluyen gotas para los ojos, donde el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. El ingrediente activo está opcionalmente presente en las formulaciones en una concentración del 0,5 al 20%, adecuadamente del 0,5 al 10 % en particular de aproximadamente el 1,5 % en p/p. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base aromatizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un portador líquido adecuado. Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende por ejemplo manteca de cacao o un salicilato. Las formulaciones adecuadas para administración nasal en las que el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula por ejemplo en el intervalo de 20 a 500 micras (incluyendo tamaños de partícula en un intervalo entre 20 y 500 micras en incrementos de 5 micras, 35 micrómetros, etc.), que se administra de la manera en que se toma el tabaco, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para administración como por ejemplo un pulverizador nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para la administración de aerosoles pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales y pueden administrarse con otros agentes terapéuticos. Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de aspersion que contienen además del ingrediente activo vehículos tales como son conocidos en la técnica como apropiados. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo anteriormente descrito.

Las formulaciones de dosificación unitarias típicas son aquellas que contienen una dosis diaria o unidad de dosis secundaria diaria, según se ha indicado anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo. Debe entenderse que, además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo los adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes. Se pueden usar péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención para proporcionar formulaciones farmacéuticas de liberación controlada que contienen como ingrediente activo uno o más compuestos de la invención ("formulaciones de liberación controlada") en las que la liberación del ingrediente activo puede ser controlada y regulada para permitir una dosificación menos frecuente o para mejorar el perfil farmacocinético o de toxicidad de un compuesto de la invención dado. Las formulaciones de liberación controlada adaptadas para la administración oral en las que se pueden preparar unidades discretas que comprenden uno o más compuestos de la invención según métodos convencionales. Pueden incluirse ingredientes adicionales para controlar la duración de acción del ingrediente activo en la composición. Las composiciones de liberación controlada pueden así conseguirse seleccionando vehículos poliméricos apropiados tales como por ejemplo poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina y similares. La velocidad de liberación del fármaco y la duración de la acción también pueden controlarse incorporando el ingrediente activo en partículas, por ejemplo, microcápsulas, de una sustancia polimérica tal como hidrogeles, ácido poliláctico, hidroximetilcelulosa, metacrilato de polimetilo y los otros polímeros descritos anteriormente. Tales procedimientos incluyen sistemas de suministro de fármacos en coloides como liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas, etc., dependiendo de la vía de administración, la

composición farmacéutica puede requerir revestimientos protectores. Las formas farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para su preparación extemporánea. Por lo tanto, los vehículos típicos para este propósito incluyen amortiguadores acuosos biocompatibles, etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares y mezclas de los mismos. En vista de que, cuando se usan varios ingredientes activos en combinación, no necesariamente destacan su efecto terapéutico conjunto directamente al mismo tiempo en el mamífero a tratar, la composición correspondiente también puede estar en forma de un kit médico o envase que contenga los dos ingredientes en depósitos o compartimientos separados pero adyacentes. En este último contexto, cada ingrediente activo puede por lo tanto ser formulado de una manera adecuada para una ruta de administración diferente de la del otro ingrediente, por ejemplo, uno de ellos puede estar en forma de una formulación oral o parenteral mientras que el otro está en forma de una ampolla para inyección intravenosa o un aerosol.

Los linfocitos T CD4+ citolíticos obtenidos en la presente invención inducen la apoptosis de APC después de la activación cognada dependiente de MHC de clase II, que afecta a las células dendríticas y linfocitos B, como se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*, y (2) suprime los linfocitos T espectadores por un contacto dependiente en ausencia de IL-10 y/o TGF-beta. Los linfocitos T CD4+ citolíticos se pueden distinguir de los Treg naturales y adaptables, como se describe en detalle en el documento WO2008/017517.

La presente invención se ilustrará a continuación por medio de los siguientes ejemplos que se proporcionan sin ninguna intención limitativa.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: metodología para evaluar la actividad reductora de los péptidos

La actividad de reductasa de los péptidos se determina usando un fluorescente descrito en Tomazzoli y col. (2006) Anal. Biochem. 350, 105-112. Dos péptidos con una etiqueta FITC se auto-inactivan cuando se unen covalentemente entre sí a través de un puente disulfuro. Tras la reducción por un péptido de acuerdo con la presente invención, los péptidos individuales reducidos vuelven a ser fluorescentes.

25 Los experimentos de control se realizaron con un péptido con un péptido reductor "normal", es decir un péptido con un motivo redox pero sin histidina adicional y con un péptido que no contenía ningún motivo redox.

Ejemplo 2: determinación de la activación de células

30 Las células citolíticas específicas de antígeno obtenidas por los péptidos de la presente invención son capaces de llevar células presentadoras de antígeno a apoptosis. Para evaluar la activación e impedir la eventual sobreactivación de las células citolíticas que las impulsarían a sí mismas a la apoptosis, el estado de fosforilación de Akt y Shp permite establecer una correlación entre la activación de una célula (capaz de apoptosis) y la sobreactivación de una (auto-apoptosis).

Ejemplo 3: diseño de péptidos derivados de MOG.

35 Un ejemplo de los péptidos de la presente divulgación es el péptido con la secuencia HCPYCSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 1]. Este péptido comprende el fragmento SRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 2] de la proteína MOG (glicoproteína oligodendrocítica de mielina) humana (número de registro uniprot Q16653), que contiene la secuencia de epítomos de linfocitos T de MHC de clase II de nonapéptido VVHLYRNGK [SEQ ID NO: 3]. De acuerdo con las definiciones mencionadas en la solicitud, este péptido de 17 AA comprende:

- 40 - un motivo redox modificado H-C-X(2)-C [SEQ ID NO: 80], con Pro y Tyr como x,
- un enlazador de 2 aminoácidos (Ser, Arg) entre el motivo y la secuencia de epítomo de linfocitos T,
- un epítomo de linfocitos T de clase MHC de nueve aminoácidos con la secuencia VVHLYRNGK [SEQ ID NO: 3],
- una secuencia flanqueante de un aminoácido (Asp) C terminal del epítomo.

En comparación con la secuencia del fragmento de péptido MOG YRPPFSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 4], YRPPF [SEQ ID NO: 5] en la secuencia ha sido reemplazada por la secuencia HCPYC [SEQ ID NO: 6].

45 Los péptidos de control son:

YRPPFSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 4], es decir el fragmento anterior de MOG.
 CPYCSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 7], con un motivo C(X)2C [SEQ ID NO: 71] pero carente de la histidina adicional.
 SRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 2], careciendo también del motivo C(X)2C [SEQ ID NO: 71].

50 Se han preparado péptidos por síntesis de péptidos con un C-terminalar modificado con CONH₂ y se ensayan su pureza mediante espectrometría de masas y HPLC.

Ejemplo 4: expansión *in vitro* de líneas celulares

La respuesta de líneas de linfocitos T CD4+ humanos sin exposición previa hacia péptidos con un epítipo de linfocitos T de MOG y un motivo redox sin (barras derechas de la figura 1) y con Histidina adicional (barras izquierdas de la figura 1) [SEQ ID NO: 1].

- 5 Se añadieron cantidades iguales de ambos péptidos a diferentes líneas de linfocitos T CD4+ humanas. Los resultados representan el número de células (como % de células iniciales sembradas) al final de un procedimiento de escala clínica que lleva a la producción de linfocitos T diferenciados con propiedades citolíticas.

Este aumento significativo de la conversión celular *in vitro* se obtiene así cuando se añade la histidina añadida, pero solo para líneas celulares de personas que presentan el haplotipo DR2, y no para otros haplotipos.

- 10 El uso de tales péptidos es particularmente interesante para la población de DR2+ (de nuevo el 70 % de la población de MS), parece que existe una ventaja definida (e inesperada) de usar péptidos que contienen his.

Ejemplo 5 Uso de un epítipo de linfocitos T de la proteína MOG en un modelo *in vivo* para esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple puede inducirse en modelos experimentales mediante inmunización con el péptido de la glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) con un epítipo de linfocitos T.

- 15 Un grupo de ratones C57BL/6 se transfiere adoptivamente con un clon de linfocitos T CD4+ efectores específicos de MOG tras un protocolo destinado a inducir un síndrome de esclerosis múltiple. Esto implica la administración del péptido MOG en adyuvante de Freund completo y 2 inyecciones de toxina de pertussis o tos ferina. Este protocolo provoca una expansión del clon de linfocitos T efectores, lo que da como resultado el desarrollo de signos compatibles con esclerosis múltiple dentro de los 12 días después de la administración del péptido MOG. Un
20 segundo grupo de ratones C57BL/6 es primero transferido adoptivamente con un clon de linfocitos T citolíticos específicos de MOG (obtenido usando el péptido con [SEQ ID NO: 1]), seguido después de 1 día por el protocolo completo de inducción de la enfermedad.

Los péptidos con SEQ ID NO: 2, 4 y 7 se usan como controles.

Ejemplo 6: prevención y supresión de esclerosis múltiple.

- 25 Los grupos de ratones C57BL/6 se inmunizan subcutáneamente (20 µg) con el péptido del ejemplo 1 que contiene el motivo de secuencia modificado [SEQ ID NO: 1] o el péptido de control [SEQ ID NO: 2, 4 o 7] adsorbido sobre hidróxido de aluminio. Tres inyecciones se realizan a intervalos de 2 semanas. Diez días después de la última inmunización, los ratones se sacrifican y se preparan linfocitos T CD4+ (2 x 10⁶ células) a partir del bazo usando perlas magnéticas. Los linfocitos T CD4+ son entonces estimulados *in vitro* por el epítipo de linfocitos T MOG (20
30 µg/ml) presentado por células de bazo adherentes (2 x 10⁶ células).

- Después de cuatro re-estimulaciones, se ensaya una línea de linfocitos T en un ensayo de supresión de espectador con, como células diana, células policlonales CD4⁺ CD25⁻ obtenidas de animales en los que es efectiva la EAE (encefalomielitis autoinmune experimental). Solo las células obtenidas a partir de animales inmunizados con el péptido con SEQ ID NO: 1 y 7 que contienen el motivo de secuencia HC(X)2C [SEQ ID NO: 80] o C(X)2C [SEQ ID
35 NO: 71] tienen la capacidad para inducir la muerte en células diana, en comparación con el control que consiste en efector CD4⁺ CD25⁻ de animales EAE.

- Un grupo de ratones C57BL/6 se transfiere adoptivamente con un clon de linfocitos T CD4+ CD4+ específico de CD4+ seguido después de 1 día por un protocolo destinado a inducir un síndrome de esclerosis múltiple. Esto implica la administración del péptido MOG en adyuvante de Freund completo y 2 inyecciones de toxina de pertussis.
40 Este protocolo provoca una expansión del clon de linfocitos T efectores, lo que da como resultado el desarrollo de signos compatibles con esclerosis múltiple dentro de los 12 días después de la administración del péptido MOG. La puntuación clínica desarrollada por ratones pre-tratados con un clon citolítico de linfocitos T se compara con los ratones que reciben únicamente el protocolo completo de inducción de la enfermedad.

Ejemplo 7: prevención de esclerosis múltiple por inmunización con péptidos.

- 45 En el grupo modelo, los ratones C57BL6 recibieron, al día 0, una inyección SC de 100 µg de péptido MOG/400 µg de Mycobacterium butyricum en CFA e inyección ip de 300 ng de Bortetella pertussis en NaCl. En el día +2, se da una segunda inyección de B. pertussis. En el grupo de prevención, los ratones C57BL/6 se inmunizan mediante 5 inyecciones con 20 µg del péptido con SEQ ID NO: 1, que contiene el motivo de secuencia HC(X)2C [SEQ ID NO:
50 80], en IFA a intervalo de 14 días antes de la inducción de la enfermedad como en el grupo modelo. Los experimentos de control se realizan con los péptidos con SEQ ID NO: 2, 4 y 7. Las puntuaciones se establecen como 0: ninguna enfermedad, 1: cola floja, 2: cola floja y pérdida de peso superior al 10 %, 3: parálisis parcial de las extremidades posteriores.

Ejemplo 9

Evaluación de la actividad reductasa sobre un péptido sintético

Se sintetizó un péptido FITC-NH-Gly-Cys-Asp-COOH (Eurogentec, Bélgica) y se auto-inactivó por solubilización en DMSO ((FITC-Gly-Cys-Asp)_{ox}). Se siguió la reducción de 2,5 µM (FITC-Gly-Cys-Asp)_{ox} en una placa de 96 pocillos durante 40 minutos (25°C) después de la incubación en PBS con péptido (25 µM) como se indica en la tabla adjunta o con ditiotreitól (DTT) 2 mM. La reducción se midió como una función del aumento de la fluorescencia leída a 530 nm después de la excitación a 494 nm, usando un lector de placas múltiples CytoFluor® (Applied Biosystems). Los resultados se muestran en la tabla del ejemplo 10 bajo el encabezamiento "actividad reductasa".

Ejemplo 10

Polimerización de CD4 recombinante humano

Se incubó CD4 recombinante humano (300 ng) en tampón Hepes con 50 µM de un péptido como se indica en la Tabla durante 15 minutos a 68°C. Cincuenta µM de DTT se usan como un control positivo en las mismas condiciones. A continuación se añade tampón de muestra LDS (7,5 µl, no reductor) a 15 µl de la mezcla de péptido/CD4. La mezcla se somete luego a PAGE no reductora. Después de la tinción con Coomassie Blue, se analizan las bandas de proteínas para determinar la presencia de recCD4 monomérico, dimérico o multimérico, tal como se identifica por la disminución de las capacidades migratorias en el gel. La Tabla indica si se ha producido o no una polimerización (+).

| Seq id no: | N-term. | motivo | enlazador | epítipo | C-term. | Actividad reductasa (%) | polimerización de CD4 |
|------------|---------|--------|-----------|------------|---------|-------------------------|-----------------------|
| 108 | H | CPYC | VRSLQP | LALEGLSLQK | RG | 68 | + |
| 109 | HAA | CPYC | VRSLQP | LALEGLSLQK | RG | 0 | + |
| 110 | AHA | CPYC | VRSLQP | LALEGLSLQK | RG | 13 | + |
| 111 | AA Ae | CPYC | VRSLQP | LALEGLSLQK | RG | 6 | + |
| 112 | AAA | CHPC | VRSLQP | LALEGLSLQK | RG | 75 | + |
| 113 | AAH | CHPC | VRSLQP | LALEGLSLQK | RG | 64 | + |
| 114 | AAA | CHGC | VRSLQP | LALEGLSLQK | RG | 22 | baja |

La Tabla proporciona varias combinaciones de secuencias de aminoácidos añadidas en el extremo amino-terminal de un epítipo restringido de clase II de proinsulina humana. Estas secuencias están constituidas por una secuencia amino terminal (N-term) delante de la primera cisteína del motivo que contiene tiorreductasa, el propio motivo, un enlazador, el epítipo y el C-terminal (C-term). La actividad reductasa se expresa en % como se describe en el Ejemplo 1. La polimerización de CD4 recombinante humano se mide de acuerdo con el Ejemplo 2.

Péptidos desvelados en la solicitud.

En las siguientes secuencias 1-70, en las que x se produce, x no es cisteína o no es histidina.

Visión general de las secuencias de péptidos reveladas.

- 25 HCPYCSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO:1]
- SRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO:2]
- VVHLYRNGK [SEQ ID NO:3]
- YRPPFSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO:4]
- YRPPF [SEQ ID NO:5]
- 30 HCPYC [SEQ ID NO:6]
- CPYCSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO:7]
- HCPYCSRVVHLYRNGK [SEQ ID NO:8]
- CGFSSNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID NO:9]
- HCGFSSNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID NO:10]
- 35 HCGFCSNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID NO:11]
- CHGSEPCIIHRGKPF [SEQ ID NO:12]
- HCHGSEPCIIHRGKPF [SEQ ID NO:13]
- HCHGCEPCIIHRGKPF [SEQ ID NO:14]
- HCxGSEPCIIHRGKPF [SEQ ID NO:15]
- 40 HCxGCEPCIIHRGKPF [SEQ ID NO:16]
- CHGCAQKKIIAEK [SEQ ID NO:17]
- HCHGCAQKKIIAEK [SEQ ID NO:18]

HCxGCAQKKIAEK [SEQ ID NO:19]
 CGPCMNEELTERL [SEQ ID NO:20]
 HCGPCMNEELTERL [SEQ ID NO:21]
 5 CGPSAALTWVQTH [SEQ ID NO:22]
 HCGPSAALTWVQTH [SEQ ID NO:23]
 CHGCPTLLYVLFV [SEQ ID NO:24]
 HCHGCPTLLYVLFV [SEQ ID NO:25]
 HCxGCPTLLYVLFV [SEQ ID NO:26]
 10 CGPCGGYVPFHIQVP [SEQ ID NO:27]
 HCGPCGGYVPFHIQVP [SEQ ID NO:28]
 CGHCDKHIEQYLK [SEQ ID NO:29]
 HCGHCDKHIEQYLK [SEQ ID NO:30]
 HCGxCDKHIEQYLK [SEQ ID NO:31]
 CGHCEKKICKMEK [SEQ ID NO:32]
 15 HCGHCEKKICKMEK [SEQ ID NO:33]
 HCGxCEKKICKMEK [SEQ ID NO:34]
 CGHCKYVKQNTLK [SEQ ID NO:35]
 HCGHCKYVKQNTLK [SEQ ID NO:36]
 HCGxCKYVKQNTLK [SEQ ID NO:37]
 20 CGHCEHPIVVSGS [SEQ ID NO:38]
 HCGHCEHPIVVSGS [SEQ ID NO:39]
 HCGxCEHPIVVSGS [SEQ ID NO:40]
 CGHCRAMYAPPPIA [SEQ ID NO:41]
 HCGHCRAMYAPPPIA [SEQ ID NO:42]
 25 HCGxCRAMYAPPPIA [SEQ ID NO:43]
 CHGCYCAVPDDPDA [SEQ ID NO:44]
 HCHGCYCAVPDDPDA [SEQ ID NO:45]
 HCxGCYCAVPDDPDA [SEQ ID NO:46]
 CGHCGGIRLHPHYSIR [SEQ ID NO:47]
 30 HCGHCGGIRLHPHYSIR [SEQ ID NO:48]
 HCGxCGGIRLHPHYSIR [SEQ ID NO:49]
 CHGCYRQVPGSDP [SEQ ID NO:50]
 HCHGCYRQVPGSDP [SEQ ID NO:51]
 HCxGCYRQVPGSDP [SEQ ID NO:52]
 35 CHGCFVALCATDV [SEQ ID NO:53]
 HCHGCFVALCATDV [SEQ ID NO:54]
 HCxGCFVALCATDV [SEQ ID NO:55]
 CHGCFKELEGWEP [SEQ ID NO:56]
 HCHGCFKELEGWEP [SEQ ID NO:57]
 40 HCxGCFKELEGWEP [SEQ ID NO:58]
 CHGCVASSYAAAQ [SEQ ID NO:59]
 HCHGCVASSYAAAQ [SEQ ID NO:60]
 HCxGCVASSYAAAQ [SEQ ID NO:61]
 CHGCFNSNRANSS [SEQ ID NO:62]
 45 HCHGCFNSNRANSS [SEQ ID NO:63]
 HCxGCFNSNRANSS [SEQ ID NO:64]
 CGHCLVLAPTREL [SEQ ID NO:65]
 HCGHCLVLAPTREL [SEQ ID NO:66]
 HCGxCLVLAPTREL [SEQ ID NO:67]
 50 CGHCPEFLEQKRA [SEQ ID NO:68]
 HCGHCPEFLEQKRA [SEQ ID NO:69]
 HCGxCPPEFLEQKRA [SEQ ID NO:70]
 CXXC [SEQ ID NO:71]
 CXXS [SEQ ID NO:72]
 55 CXXT [SEQ ID NO:73]
 SXXC [SEQ ID NO:74]
 TXXC [SEQ ID NO:75]
 XXXC [SEQ ID NO:76]
 CXXX [SEQ ID NO:77]
 60 HCXXX [SEQ ID NO:78]
 XXXCH [SEQ ID NO:79]
 HCXXC [SEQ ID NO:80]
 HCXXS [SEQ ID NO:81]
 HCXXT [SEQ ID NO:82]
 65 CXXCH [SEQ ID NO:83]
 SXXCH [SEQ ID NO:84]

TXXCH [SEQ ID NO:85]
 HCXXCH [SEQ ID NO:86]
 XXXXLX [SEQ ID NO:87]
 5 DXXLL [SEQ ID NO:88]
 YXXX [SEQ ID NO:89]

 HX(0,2)CXX[CST]:

 H CXX[CST] [SEQ ID NO:78]
 HX CXX[CST] [SEQ ID NO:90]
 10 HXXCXX[CST] [SEQ ID NO:91]
 [CST]xxC(0,2)H:

 [CST]XXCH [SEQ ID NO:79]
 [CST]XxCXH [SEQ ID NO:92]
 [CST]XxCXXH [SEQ ID NO:93]

 CXXCX(0,2)H:

 15 CXXC H [SEQ ID NO:83]
 CXXCX H [SEQ ID NO:94]
 CXXCXXH [SEQ ID NO:95]

 H(0,2)CXXC:

 20 H CXXC [SEQ ID NO:83]
 H XCXXC [SEQ ID NO:96]
 HXXCXXC [SEQ ID NO:97]

 HX(0,2)XCXXS:

 25 H CXXS [SEQ ID NO:81]
 H XCXXS [SEQ ID NO:98]
 HXXCXXS [SEQ ID NO:99]

 HX(0,2)XCXXT:

 H CXXT [SEQ ID NO:82]
 H XCXXT [SEQ ID NO:100]

 30 HXXCXXT [SEQ ID NO:101]
 SXXCX (0,2)H

 SXXC H [SEQ ID NO:84]
 SXXCX H [SEQ ID NO:102]
 SXXCXXH [SEQ ID NO:103]

 TXXCX(0,2)H:

 35 TXXC H [SEQ ID NO: 85]
 TXXCX H [SEQ ID NO:104]
 TXXCXXH [SEQ ID NO:105]
 HCHXC [SEQ ID NO:106]
 CXXHCH [SEQ ID NO:107]

 40 H CPYCVRS LQPLALEGSLQKRG [SEQ ID NO:108]
 HAACP YCVRS LQPLALEGSLQKRG [SEQ ID NO:109]
 AHACP YCVRS LQPLALEGSLQKRG [SEQ ID NO:110]
 AAACP YCVRS LQPLALEGSLQKRG [SEQ ID NO:111]
 AAACHPCVRS LQPLALEGSLQKRG [SEQ ID NO:112]
 45 AAACHGCVRS LQPLALEGSLQKRG [SEQ ID NO:113]
 AAACHGCVRS LQPLALEGSLQKRG [SEQ ID NO:114]
 HX CPYCSR VVHLYRNGKD [SEQ ID NO:115]
 HXXCPYCSR VVHLYRNGKD [SEQ ID NO:116]

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> ImCyse S.A. Saint-Remy, Jean-Marie Vander Elst, Luc Carlier, Vincent Burkhart, David J.

<120> Nuevos péptidos inmunógenos
 <130> IMC2637PCT
 <150> GB1418433.7
 <151> 17-10-2014
 5 <160> 116
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 1
 His Cys Pro Tyr Cys Ser Arg Val Val His Leu Tyr Arg Asn Gly Lys
 1 5 10 15

 Asp
 15 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 20 <223> péptido sintético
 <400> 2

 Ser Arg Val Val His Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Asp
 1 5 10

 <210> 3
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 3

 Val Val His Leu Tyr Arg Asn Gly Lys
 1 5
 30
 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 4

ES 2 751 605 T3

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

Asp

5 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 5

Tyr Arg Pro Pro Phe
 1 5

10 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 6

His Cys Pro Tyr Cys
 1 5

20 <210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 7

25 Cys Pro Tyr Cys Ser Arg Val Val His Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 8

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

35 <210> 9
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> péptido sintético

ES 2 751 605 T3

<400> 9

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

Lys Ile Arg

<210> 10
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 10

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

Asn Lys Ile Arg
 20

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

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 11

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

Asn Lys Ile Arg
 20

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 13

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

<210> 14
 <211> 16

ES 2 751 605 T3

<212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

5 <400> 14

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

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

10 <220>
 <223> péptido sintético

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa no es His o Cys

15 <400> 15

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

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> péptido sintético

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa no es His o Cys

25 <400> 16

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

30 <210> 17
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 17

Cys His Gly Cys Ala Gln Lys Lys Ile Ile Ala Glu Lys
 1 5 10

<210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> péptido sintético

ES 2 751 605 T3

<400> 23

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

<210> 24

<211> 14

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 24

Cys His Gly Cys Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val
1 5 10

10

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> péptido sintético

<400> 25

His Cys His Gly Cys Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val
1 5 10 15

20

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido sintético

25

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa no es His o Cys

<400> 26

His Cys Xaa Gly Cys Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val
1 5 10 15

30

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

35

<220>

<223> péptido sintético

<400> 27

Cys Gly Pro Cys Gly Gly Tyr Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro
1 5 10 15

40

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220>

ES 2 751 605 T3

<223> péptido sintético

<400> 28

His Cys Gly Pro Cys Gly Gly Tyr Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

10 <400> 29

Cys Gly His Cys Asp Lys His Ile Glu Gln Tyr Leu Lys
 1 5 10

<210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 30

His Cys Gly His Cys Asp Lys His Ile Glu Gln Tyr Leu Lys
 1 5 10

20 <210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>

25 <223> péptido sintético

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa no es His o Cys

30 <400> 31

His Cys Gly Xaa Cys Asp Lys His Ile Glu Gln Tyr Leu Lys
 1 5 10

<210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 32

Cys Gly His Cys Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys
 1 5 10

40 <210> 33
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 751 605 T3

<220>

<223> péptido sintético

<400> 33

His Cys Gly His Cys Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys
1 5 10

5 <210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> péptido sintético

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa no es His o Cys

15 <400> 34

His Cys Gly Xaa Cys Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys
1 5 10

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

20 <213> artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 35

Cys Gly His Cys Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys
1 5 10

25 <210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

30 <223> péptido sintético

<400> 36

His Cys Gly His Cys Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys
1 5 10

<210> 37

<211> 14

35 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido sintético

<220>

40 <221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa no es His o Cys

<400> 37

His Cys Gly Xaa Cys Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys
1 5 10

ES 2 751 605 T3

<210> 43
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> péptido sintético

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 10 <223> Xaa no es His o Cys

<400> 43

His Cys Gly Xaa Cys Arg Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ala
 1 5 10

<210> 44
 <211> 14
 15 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 44

Cys His Gly Cys Tyr Cys Ala Val Pro Asp Asp Pro Asp Ala
 1 5 10

20

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

25 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 45

His Cys His Gly Cys Tyr Cys Ala Val Pro Asp Asp Pro Asp Ala
 1 5 10 15

30

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa no es His o Cys

<400> 46

His Cys Xaa Gly Cys Tyr Cys Ala Val Pro Asp Asp Pro Asp Ala
 1 5 10 15

ES 2 751 605 T3

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 47
 Cys Gly His Cys Gly Gly Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile
 1 5 10 15
 Arg
 10 <210> 48
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 15 <400> 48
 His Cys Gly His Cys Gly Gly Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser
 1 5 10 15
 Ile Arg
 20 <210> 49
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa no es His o Cys
 <400> 49
 His Cys Gly Xaa Cys Gly Gly Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser
 1 5 10 15
 Ile Arg
 30 <210> 50
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 35 <400> 50
 Cys His Gly Cys Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro
 1 5 10
 <210> 51

ES 2 751 605 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa no es His o Cys

<400> 55

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | His | Cys | Xaa | Gly | Cys | Phe | Val | Ala | Leu | Cys | Ala | Thr | Asp | Val |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | |

10

<210> 56
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

15

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 56

| | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Cys | His | Gly | Cys | Phe | Lys | Glu | Leu | Glu | Gly | Trp | Glu | Pro |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | |

20

<210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

25

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 57

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | His | Cys | His | Gly | Cys | Phe | Lys | Glu | Leu | Glu | Gly | Trp | Glu | Pro |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | |

30

<210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> péptido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa no es His o Cys

<400> 58

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | His | Cys | Xaa | Gly | Cys | Phe | Lys | Glu | Leu | Glu | Gly | Trp | Glu | Pro |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | |

45

<210> 59
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 751 605 T3

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 59

Cys His Gly Cys Val Ala Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Gln
 1 5 10

5 <210> 60
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

10 <400> 60

His Cys His Gly Cys Val Ala Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Gln
 1 5 10

<210> 61
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa no es His o Cys

25

<400> 61

His Cys Xaa Gly Cys Val Ala Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Gln
 1 5 10

<210> 62
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

30

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 62

Cys His Gly Cys Phe Asn Ser Asn Arg Ala Asn Ser Ser
 1 5 10

<210> 63
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

40

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 63

His Cys His Gly Cys Phe Asn Ser Asn Arg Ala Asn Ser Ser
 1 5 10

- <210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial
- 5 <220>
 <223> péptido sintético
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa no es His o Cys
- 15 <400> 64
- | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Cys | Xaa | Gly | Cys | Phe | Asn | Ser | Asn | Arg | Ala | Asn | Ser | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | |
- <210> 65
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial
- 20 <220>
 <223> péptido sintético
- <400> 65
- | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Gly | His | Cys | Leu | Val | Leu | Ala | Pro | Thr | Arg | Glu | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | |
- 25 <210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial
- 30 <220>
 <223> péptido sintético
- <400> 66
- | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Cys | Gly | His | Cys | Leu | Val | Leu | Ala | Pro | Thr | Arg | Glu | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | |
- <210> 67
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial
- 35 <220>
 <223> péptido sintético
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa no es His o Cys
- 40 <400> 67
- | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Cys | Gly | Xaa | Cys | Leu | Val | Leu | Ala | Pro | Thr | Arg | Glu | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | |
- 45 <210> 68

ES 2 751 605 T3

<211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> péptido sintético

 <400> 68
 Cys Gly His Cys Pro Glu Phe Leu Glu Gln Lys Arg Ala
 1 5 10

 <210> 69
 <211> 14
 10 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 69
 His Cys Gly His Cys Pro Glu Phe Leu Glu Gln Lys Arg Ala
 1 5 10
 15

 <210> 70
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> péptido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 70
 His Cys Gly Xaa Cys Pro Glu Phe Leu Glu Gln Lys Arg Ala
 1 5 10

 <210> 71
 <211> 4
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> motivo redox

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 35 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido

 <400> 71

 Cys Xaa Xaa Cys
 1

 40 <210> 72
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> motivo redox

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

5 <400> 72

Cys Xaa Xaa Ser
1

<210> 73
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> motivo redox

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

15 <400> 73

Cys Xaa Xaa Thr
1

<210> 74
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> motivo redox

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

25 <400> 74

Ser Xaa Xaa Cys
1

30 <210> 75
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> motivo redox

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

40 <400> 75

Thr Xaa Xaa Cys
1

- <210> 76
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> motivo redox
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 10 <223> Xaa puede ser Cys, Ser o Thr
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 15 <400> 76
- Xaa Xaa Xaa Cys**
1
- <210> 77
 <211> 4
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> motivo redox
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 30 <223> Xaa puede ser Cys, Ser o Thr
- <400> 77
- Cys Xaa Xaa Xaa**
1
- <210> 78
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> motivo redox modificado
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(4)
 40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 45 <223> Xaa puede ser Cys, Ser o Thr
- <400> 78

ES 2 751 605 T3

| | | |
|----|---|----------------------------|
| | | His Cys Xaa Xaa Xaa |
| | | 1 5 |
| 5 | <210> 79 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> motivo redox modificado | |
| 10 | <220> <221> VARIANTE <222> (1)..(1) <223> Xaa puede ser Cys, Ser o Thr | |
| 15 | <220> <221> VARIANTE <222> (2)..(3) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido | |
| | <400> 79 | |
| | | Xaa Xaa Xaa Cys His |
| | | 1 5 |
| 20 | <210> 80 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> motivo redox modificado | |
| 25 | <220> <221> VARIANTE <222> (3)..(4) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido | |
| | <400> 80 | |
| | | His Cys Xaa Xaa Cys |
| | | 1 5 |
| 30 | <210> 81 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> <223> motivo redox modificado | |
| | <220> <221> VARIANTE <222> (3)..(4) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido | |
| 40 | <400> 81 | |
| | | His Cys Xaa Xaa Ser |
| | | 1 5 |
| | <210> 82 <211> 5 <212> PRT | |

ES 2 751 605 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo redox modificado

5 <220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 82

His Cys Xaa Xaa Thr

1 5

10 <210> 83

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> motivo redox modificado

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

20 <400> 83

Cys Xaa Xaa Cys His

1 5

<210> 84

<211> 5

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo redox modificado

<220>

30 <221> VARIANTE

<222> (2)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 84

Ser Xaa Xaa Cys His

1 5

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo redox modificado

40 <220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 85

Thr Xaa Xaa Cys His

1 5

45

ES 2 751 605 T3

- <210> 86
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 5 <220>
<223> Motivo redox modificado
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(4)
10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- <400> 86
- His Cys Xaa Xaa Cys His**
1 5
- <210> 87
<211> 6
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> secuencia de orientación de endosoma tardío
- <220>
20 <221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser Asp o Glu
- <220>
25 <221> VARIANTE
<222> (2)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- <220>
30 <221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser Ile o Leu
- <400> 87
- Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa**
1 5
- <210> 88
<211> 5
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> secuencia de orientación de endosoma tardío
- <220>
40 <221> VARIANTE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- <400> 88
- Asp Xaa Xaa Leu Leu**
1 5
- 45 <210> 89
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 751 605 T3

<220>
<223> motivo de orientación de endosoma tardío

5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser Phe, Tyr o Trp
<400> 89

Tyr Xaa Xaa Xaa
1

15 <210> 90
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> motivo redox modificado

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser Cys, Ser o Thr
<400> 90

His Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1 5

35 <210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> motivo redox modificado

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser Cys, Ser o Thr

ES 2 751 605 T3

<400> 91

His Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1 5

5 <210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> motivo redox modificado

10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser Cys, Ser o Thr

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 92

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa His
1 5

25 <210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Motivo redox modificado

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser Cys, Ser o Thre

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 93

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His

1

5

45 <210> 94
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo redox modificado
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 10 <400> 94
 Cys Xaa Xaa Cys Xaa His
 1 5
 <210> 95
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> motivo redox modificado
 <220>
 <221> VARIANTE
 20 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(6)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 <400> 95
 Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His
 1 5
 <210> 96
 <211> 6
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> motivo redox modificado
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(5)
 40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 <400> 96
 <210> 97
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> motivo redox modificado
 <220>

ES 2 751 605 T3

<221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 97

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| His | Xaa | Xaa | Cys | Xaa | Xaa | Cys |
| 1 | | | | 5 | | |

10

<210> 98
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> motivo redox modificado

<220>

<221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 98

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| His | Xaa | Cys | Xaa | Xaa | Ser |
| 1 | | | | 5 | |

25

<210> 99
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> motivo redox modificado

<220>

<221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40

<400> 99

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| His | Xaa | Xaa | Cys | Xaa | Xaa | Ser |
| 1 | | | | 5 | | |

<210> 100

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

45

<220>
 <223> motivo redox modificado

<220>

<221> misc_feature

ES 2 751 605 T3

<222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 100

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| His | Xaa | Xaa | Cys | Xaa | Thr |
| 1 | | | | 5 | |

<210> 101
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> motivo redox modificado

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 101

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| His | Xaa | Xaa | Cys | Xaa | Xaa | Thr |
| 1 | | | | 5 | | |

25 <210> 102
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> motivo redox modificado

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 102

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ser | Xaa | Xaa | Cys | Xaa | His |
| 1 | | | | 5 | |

40 <210> 103
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> motivo redox modificado

<220>
 <221> misc_feature

<223> motivo redox modificado

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 106

His Cys His Xaa Cys
 1 5

<210> 107
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> motivo redox modificado

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)

15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 107

Cys Xaa Xaa His Cys His
 1 5

20 <210> 108
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> proinsulina

<400> 108

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

Ser Leu Gln Lys Arg Gly
 20

<210> 109
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> proinsulina

<400> 109

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

Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
 20

35 <210> 110
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>

ES 2 751 605 T3

<223> proinsulina

<400> 110

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

Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
 20

5 <210> 111
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proinsulina

10 <400> 111

Ala Ala Ala Cys Pro Tyr Cys Val Arg Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
 20

15 <210> 112
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proinsulina

<400> 112

Ala Ala Ala Cys His Pro Cys Val Arg Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
 20

20 <210> 113
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> proinsulina

<400> 113

Ala Ala His Cys His Pro Cys Val Arg Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
 20

30 <210> 114
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proinsulina

ES 2 751 605 T3

<400> 114

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

Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
20

<210> 115

<211> 18

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> peptide mog

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 115

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

Lys Asp

15 <210> 116

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> peptide moq

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <400> 116

His Xaa Xaa Cys Pro Tyr Cys Ser Arg Val Val His Leu Tyr Arg Asn
1 5 10 15

Gly Lys Asp

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido inmunógeno aislado de entre 13 y 100 aminoácidos, que comprende un epítipo de linfocitos T de MHC de clase II de un antígeno e inmediatamente adyacente o separado por un máximo de 7 aminoácidos a partir del epítipo, una secuencia de motivos redox H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] ([SEQ ID NO: 78], [SEQ ID NO: 90] o [SEQ ID NO: 91]) o una [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H [SEQ ID NO: 79], [SEQ ID NO: 92] o [SEQ ID NO: 93] para su uso como un medicamento.
2. El péptido para su uso de acuerdo con con la reivindicación 1, con la condición de que el antígeno no contenga en su secuencia el motivo dentro de una distancia de 10 aminoácidos de dicho epítipo, preferentemente con la condición de que dicho antígeno no contenga en su secuencia dicho motivo.
- 10 3. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el motivo es la secuencia de motivo redox H-X-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO:90] o [CST]-X(2)-C-X-H [SEQ ID NO:92]; o en el que el motivo es la secuencia de motivo redox H-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO:78] o [CST]-X(2)-C-H [SEQ ID NO:79];
- 15 en el que el motive es H-X(0,2)-C-X(2)-C ([SEQ ID NO:80], [SEQ ID NO:96] o [SEQ ID NO:97]), o C-X(2)-C-X(0,2)-H ([SEQ ID NO:83], [SEQ ID NO:94] o [SEQ ID NO:95]); o en el que el motive es H-C-X(2)-C [SEQ ID NO:80] o CX(2)-C-H [SEQ ID NO:83].
4. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido tiene una longitud de entre 13 y 75 aminoácidos, preferentemente en el que dicho péptido tiene una longitud de entre 13 y 50 aminoácidos, más preferentemente en el que dicho péptido tiene una longitud de entre 13 y 30 aminoácidos.
- 20 5. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el epítipo de linfocitos T de MHC clase II, se separa de dicho motivo por una secuencia de como máximo 4 aminoácidos, preferentemente en el que el epítipo de linfocitos T de MHC de clase LL se epara de dicho motivo por una secuencia de 2 aminoácidos.
- 25 6. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que X dentro del motivo redox es Gly o Pro; o en el que X dentro del motivo redox no es Cys; o en el que X fuera del motivo redox no es Cys, Ser o Thr.
7. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su en la prevención o tratamiento de la esclerosis múltiple (MS).
- 30 8. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el antígeno es un auto-antígeno implicado en esclerosis múltiple.
9. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que el auto-antígeno es MOG.
10. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 9, en el que el péptido comprende la secuencia de epítipos VVHLYRNGK [SEQ ID NO: 3].
- 35 11. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 10, en el que el péptido tiene la secuencia HCPYCSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 1], HCPYCSRVVHLYRNGK [SEQ ID NO:8], HxCPYCSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 115], o HxxCPYCSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 116].
12. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en la prevención o tratamiento de la diabetes.
- 40 13. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el antígeno es proinsulina.
14. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que dicho péptido comprende la secuencia del epítipo LALEGLSLQK.
- 45 15. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el péptido tiene la secuencia HCPYCVRSRLQPLALEGLSLQKRG [SEQ ID NO:108], o AAHCHPCVRSRLQPLALEGLSLQKRG [SEQ ID NO:113].
16. Un péptido inmunógeno aislado de entre 13 y 100 aminoácidos que comprende un epítipo de linfocitos T de MHC de clase II de un antígeno, e inmediatamente adyacente o separado por un máximo de 7 aminoácidos de dicho epítipo, una secuencia de motivo redox H-X(0,2)-CX(2)-[CST] ([SEQ ID NO:78] o [SEQ ID NO:90] o [SEQ ID NO:91]) o [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H ([SEQ ID NO:79], [SEQ ID NO:92] o [SEQ ID NO:93], con la condición de que dicho antígeno no contiene en su secuencia dicho motivo dentro de una distancia de 10 aminoácidos de dicho epítipo.
- 50 17. El péptido de acuerdo con la reivindicación 16, con la condición de que dicho antígeno no contiene en su secuencia dicho motivo.

18. El péptido de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en el que el motivo es la secuencia del motivo redox H-X-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO:90] o [CST]-X(2)-C-XH [SEQ ID NO:92]; o en el que el motivo es la secuencia del motivo redox H-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO:78] o [CST]-X(2)-C-H [SEQ ID NO:79].
- 5
19. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que:
- si dicho motivo es H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] [SEQ ID NO:78, 90 o 91], el motivo se localiza en N-terminal del epítipo de los linfocitos T dentro del péptido, y en el que,
 - si dicho motivo es [CST]-X(2)-C-X(0,2)-H [SEQ ID NO:79, 92 o 93], el motivo se localiza en C-terminal del epítipo de los linfocitos T; o
- 10
- en el que el motivo es H-X(0,2)-C-X(2)-C ([SEQ ID NO: 80], [SEQ ID NO:96] o [SEQ ID NO:97]), o C-X(2)-C-X(0,2)-H ([SEQ ID NO:83], [SEQ ID NO:94] o [SEQ ID NO:95]); o en el que el motivo es H-C-X(2)-C [SEQ ID NO:80] o CX(2)-C-H [SEQ ID NO:83].
20. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que dicho motivo se localiza en N-terminal del epítipo de linfocitos T.
- 15
21. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que dicho péptido tiene una longitud de entre 13 y 75 aminoácidos, preferentemente en el que dicho péptido tiene una longitud de entre 13 y 50 aminoácidos; más preferentemente en el que dicho péptido tiene una longitud de entre 13 y 30 aminoácidos.
22. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en el que el epítipo de linfocitos T de MHC de clase II está separado de dicho motivo por una secuencia de un máximo de 4 aminoácidos, preferentemente en el que el epítipo de linfocitos T de MHC de clase II está separado de dicho motivo por una secuencia de 2 aminoácidos.
- 20
23. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que X dentro del motivo redox es Gly o Pro; o en el que X dentro del motivo redox no es Cys; o en el que X fuera del motivo redox no es Cys, Ser o Thr.
- 25
24. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que el autoantígeno es MOG.
25. El péptido de acuerdo con la reivindicación 24, en el que dicho péptido comprende la secuencia del epítipo VVHLYRNGK [SEQ ID NO:3].
- 30
26. El péptido de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, en el que el péptido tiene la secuencia HCPYCSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO:1], HCPYCSRVVHLYRNGK [SEQ ID NO:8], HxCPYCSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 115], o HxxCPYCSRVVHLYRNGKD [SEQ ID NO: 116].
27. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que el antígeno es proinsulina.
- 35
28. El péptido de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dicho péptido comprende la secuencia del epítipo LALEGLQK.
29. El péptido de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, en el que el péptido tiene la secuencia HCPYCVRSLLQPLALEGLQKRG [SEQ ID NO:108], o AAHCHPCVRSLLQPLALEGLQKRG [SEQ ID NO:113].
- 40
30. El uso *in vitro* de un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 29 para la generación de linfocitos T CD4+ citolíticos específicos de antígeno.
31. Un procedimiento de obtención de una población de linfocitos T CD4+ que son citolíticos frente a antígenos celulares, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- proporcionar células de sangre periférica;
 - poner en contacto dichas células *in vitro* con un péptido inmunógeno de entre 13 y 100 aminoácidos que comprende un epítipo de linfocitos T de MHC de clase II de un antígeno, e inmediatamente adyacente o separado por un máximo de 7 aminoácidos de dicho epítipo, una secuencia de motivo redox H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] ([SEQ ID NO:78], [SEQ ID NO:90] o [SEQ ID NO:91]) o [CST]-X(2)-CX(0,2)-H ([SEQ ID NO:79], [SEQ ID NO:92] o [SEQ ID NO:93]); y
 - expandir dichas células en presencia de IL-2.
- 45
- 50
32. Una población de células que se puede obtener mediante el procedimiento de la reivindicación 31 para su uso como un medicamento.

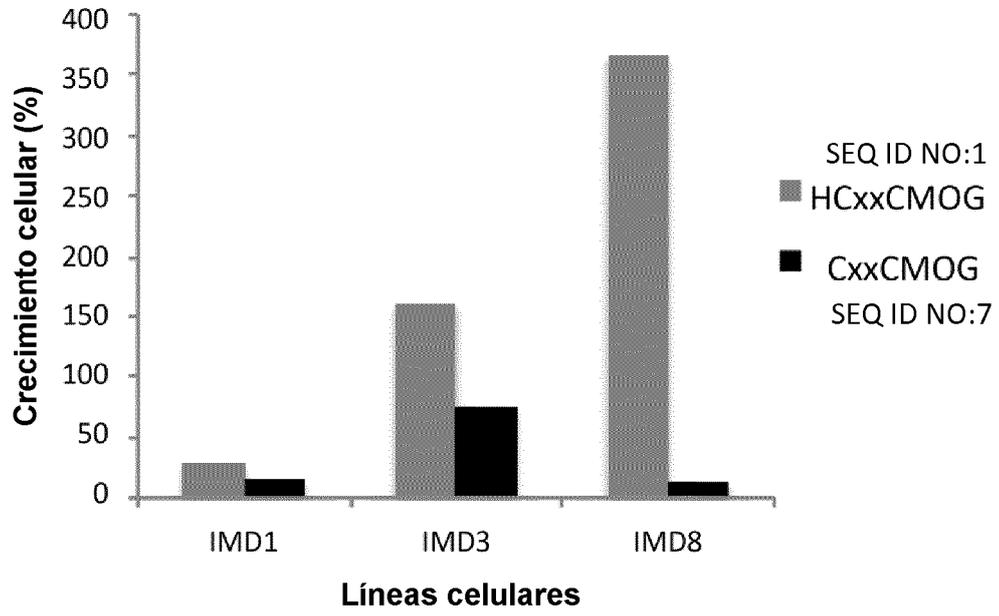


Figura 1