

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 480**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2007 E 11187013 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2476436**

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

30 Prioridad:

11.08.2006 GB 0615966

25.05.2007 GB 0710081

13.06.2007 GB 0711403

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

05.03.2018

73 Titular/es:

**LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW
(50.0%)**

Herestraat 49, bus 913

3000 Leuven, BE y

KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (50.0%)

72 Inventor/es:

SAINT-REMY, JEAN-MARIE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 657 480 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos inmunogénicos y su uso en trastornos inmunitarios

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

10 El sistema inmunitario de los mamíferos es una red compleja que actúa para proteger a un sujeto de factores peligrosos externos e internos. Sin embargo, en algunas circunstancias, este mecanismo de protección complejo sostiene o se convierte en sí mismo en una causa de trastornos, principalmente con implicaciones crónicas, dentro del sujeto. Existen muchos trastornos inmunitarios tales, siendo dos importantes las enfermedades alérgicas y los trastornos autoinmunitarios. Las enfermedades alérgicas, convencionalmente descritas como enfermedades mediadas por tipo 1 o enfermedades mediadas por IgE, casi han duplicado su prevalencia durante los últimos 20 años. Las manifestaciones químicas de enfermedades alérgicas incluyen asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y reacciones anafilácticas a picaduras de insectos o fármacos. La carga económica relacionada con el cuidado de pacientes alérgicos está aumentando constantemente a lo largo de los años. Como un ejemplo, se anticipa que el coste ligado a la receta a de tratamiento para la alergia en los Estados Unidos alcance aproximadamente 10 mil millones de dólares americanos en 2006. No existe en la actualidad ninguna terapia curativa para dichas enfermedades, que se mantienen bajo un control por el desalojo del alérgeno siempre que sea posible, y/o por terapia sintomática usando broncodilatadores, antihistamínicos, corticosteroides e inmunomoduladores tales como ciclosporina. La desensibilización a alérgenos, que consiste en la administración regular de alérgenos a los que el paciente se sensibiliza, han mostrado eficacia en rinitis alérgica, pero sigue siendo controvertida en el asma y en la dermatitis atópica. Algunos síntomas clínicos, tales como los relacionados con alérgenos alimentarios, no pueden tratarse por desensibilización.

25 La autoinmunidad es la incapacidad de un organismo para reconocer sus propias partes constituyentes (hasta el nivel submolecular) como "propias", lo que da como resultado una respuesta inmunitaria contra sus propias células y tejidos. Cualquier enfermedad que resulte de dicha respuesta inmunitaria aberrante se denomina enfermedad inmunitaria. Son ejemplos prominentes el lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren y artritis reumatoide (AR). Las enfermedades autoinmunitarias se clasifican ampliamente en dos categorías, concretamente enfermedades sistémicas y enfermedades específicas de órganos. La etiología precisa de enfermedades autoinmunitarias sistémicas no se ha identificado. Por el contrario, las enfermedades autoinmunitarias específicas de órganos están relacionadas con una respuesta inmunitaria específica que incluye linfocitos B y T, que se dirige al órgano y de este modo induce y mantiene un estado crónico de inflamación local. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano incluyen diabetes de tipo 1, miastenia grave, tiroiditis, esclerosis múltiple, enfermedad celíaca, enfermedades inflamatorias del intestino, aterosclerosis, adrenalitis, síndromes poliendocrinos, gastritis, anemia perniciosa, enfermedades oculares tales como uveítis y enfermedades del oído interno tales como cocleítis.

40 Se dirigen de este modo reacciones autoinmunitarias a células o tejidos propios, más particularmente a "auto-antígenos" es decir antígenos (de proteínas) que están presentes de forma natural en el organismo mamífero. En este mecanismo, los autoantígenos son reconocidos por linfocitos B y/o T que activan el sistema inmunitario para atacar al tejido que comprende el autoantígeno. Está bien reconocido que la supresión del sistema inmunitario es beneficiosa y en algunos casos conduce a recuperación parcial o completa de la función orgánica en algunos casos. Este tipo de terapia sin embargo no es eficaz para todas las enfermedades autoinmunitarias específicas de órganos y hasta la fecha no se puede conseguir inmunosupresión de una manera específica de antígeno. La terapia actual hace uso de inmunosupresión no específica obtenida mediante el uso de corticosteroides y agentes inmunosupresores, que muestran todos efectos secundarios significativos relacionados con la falta de especificidad, limitando de este modo su uso y su eficacia general.

50 Resulta interesante que, por motivos que están lejos de ser entendidos, la incidencia de enfermedades autoinmunitarias se ha duplicado durante los últimos 20 años, muy en paralelo con el aumento observado de enfermedades alérgicas. De nuevo, el coste relacionado con el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias ha aumentado enormemente en años recientes, añadiendo un argumento adicional a la necesidad de una nueva forma de terapia.

55 En la técnica anterior, se han usado epítomos de linfocitos T de alérgenos para fines de desensibilización. Se usan péptidos derivados de alérgenos que contienen uno o varios epítomos de linfocitos T en experimentos animales y en seres humanos en un intento de inhibir la activación de linfocitos T específicos e inducen un estado de insensibilidad en linfocitos T, tal como se describe en la solicitud de patente WO93/08279. Una aplicación humana de este concepto es la administración de un péptido derivado de la secuencia de epítomos de linfocitos T presentes en que el alérgeno Fel d I, por inyecciones subcutáneas en individuos sensibles a los gatos (Wallner y Geffer (1994) Allergy 49, 302-308). También se ha usado en experimentos con animales un enfoque complementario, alternativo, de este

concepto. Los péptidos usados se modificaron de tal manera que se mantuviera la capacidad de unirse con determinantes del MHC de clase II en linfocitos B específicos, pero estos péptidos perdieron su capacidad para activar los linfocitos T correspondientes (O'Hehir y col. (1991) Int. Immunol. 3, 819-826).

5 La exploración del alérgeno Der p 2 del ácaro doméstico con un conjunto de péptidos solapantes de esta proteína muestra que un péptido específico p21-35 comprende un epítipo de linfocitos T que se comporta como un epítipo universal y podría ser un candidato adecuado para inducción de anergia de linfocitos T (Wu y col. (2003) J. Immunol. 169, 1430-2435, documento WO0170263). En una publicación relacionada se ha mostrado que este péptido y derivados del mismo tienen un efecto específico de epítipo en la apoptosis mediada por CD4+ CD25+ de linfocitos B presentadores de antígenos (Janssens y col. (2003) J. Immunol. 171, 4604-4612). La identificación de este péptido sin embargo requirió una exploración exhaustiva del alérgeno y no hubo ningún indicio de que para todas y cada una de las proteínas antigénicas pudiera identificarse dicho péptido con un efecto inductor de apoptosis.

15 Resulta evidente que existe la necesidad de nuevas estrategias o fármacos para la prevención o el tratamiento de enfermedades inmunitarias como enfermedades alérgicas o autoinmunitarias, que sean más eficaces, más específicos, tengan menos efectos secundarios, sean curativos en lugar de tratar únicamente síntomas de la enfermedad y sean fácilmente accesibles, más particularmente a bajo coste. Más particularmente, para enfermedades alérgicas, existe la necesidad de desarrollar nuevas formas de terapia que sean específicas para los alérgenos en cuestión, que sean seguras y produzcan efectos beneficiosos de larga duración.

Sumario de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a un péptido inmunogénico aislado que comprende:

- 20 - un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de una proteína de autoantígeno implicada en esclerosis múltiple; y
 - un motivo redox C-X(2)-[CT] o [CST]-X(2)-C, estando el motivo adyacente al epítipo o separado del epítipo por como máximo 7 aminoácidos.

En realizaciones del mismo, el motivo está separado del epítipo por como máximo 4 aminoácidos.

25 En realizaciones del mismo, el motivo es C-X(2)-C.

En realizaciones del mismo, la secuencia comprende además una secuencia de dirección endosómica tardía.

En realizaciones del mismo, el péptido tiene una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos.

En realizaciones del mismo, el péptido tiene una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos.

En realizaciones del mismo, la cisteína en el motivo está metilada.

30 En realizaciones del mismo, el autoantígeno es glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína básica de mielina (MBP) o proteína proteolipídica (PLP).

En realizaciones del mismo, el autoantígeno es glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG).

Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido que comprende:

- 35 - un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de un autoantígeno implicado en esclerosis múltiple; y
 - un motivo redox C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C, estando el motivo adyacente al epítipo o separado del epítipo por como máximo 7 aminoácidos, para tratar o prevenir la esclerosis múltiple.

En realizaciones del mismo, el motivo está separado del epítipo por como máximo 4 aminoácidos, para su uso en el tratamiento o la prevención de esclerosis múltiple.

40 En realizaciones del mismo, el motivo es C-(X)2-C, para su uso en el tratamiento o la prevención de esclerosis múltiple.

En realizaciones del mismo, el péptido tiene una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos, para su uso en el tratamiento o la prevención de esclerosis múltiple.

En realizaciones del mismo, el autoantígeno es glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), para su uso en el tratamiento o la prevención de esclerosis múltiple.

45 En realizaciones del mismo, el epítipo y el motivo están separados por hasta 4 aminoácidos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para preparar un péptido en el que el péptido es capaz de inducir actividad de linfocitos T CD4+ citotóxicos, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (a) proporcionar una secuencia peptídica que comprende un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de un

- (b) autoantígeno implicado en esclerosis múltiple, y unir con la secuencia peptídica una secuencia que comprende el motivo redox C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C, de modo que el motivo y el epítipo estén adyacentes entre sí o separados por como máximo 7 aminoácidos.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para obtener una población de linfocitos T citolíticos específicos de antígeno, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- proporcionar células sanguíneas periféricas,
- poner en contacto las células con un péptido inmunogénico que comprende:
- 10 - un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de una proteína autoantigénica derivada de un autoantígeno implicado en esclerosis múltiple; y
- un motivo redox C-X(2)-[CT] o [CST]-X(2)-C, estando el motivo adyacente al epítipo o separado del epítipo por como máximo 7 aminoácidos, y
- expandir las células en presencia de IL-2.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a una población de linfocitos T citolíticos específicos de antígeno, inducida por un péptido con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de un autoantígeno implicado en la diabetes de tipo 1, y un motivo C-X(2)-[CT] o [CST]-X(2)-C, estando el motivo adyacente al epítipo o separado del epítipo por como máximo 7 aminoácidos, y que puede obtenerse por el procedimiento descrito anteriormente.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a una población de linfocitos T citolíticos específicos de antígeno, inducida por un péptido con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de un autoantígeno implicado en la diabetes de tipo 1, y un motivo C-X(2)-[CT] o [CST]-X(2)-C, estando el motivo adyacente al epítipo, o separado del epítipo por como máximo 7 aminoácidos, y que puede obtenerse por el procedimiento anteriormente descrito, para su uso en el tratamiento y la prevención de esclerosis múltiple.

Breve descripción de los dibujos

25 La **Figura 1** muestra la capacidad de p21-35 de Der p 2 para reducir enlaces disulfuro en el ensayo de reducción de insulina (ensayo turbidimétrico) (línea discontinua: control; línea continua con triángulos: péptido B4; línea continua con cuadrados: Trx (tioredoxina).

30 La **Figura 2** muestra el aumento en la captación de p21-35 por células presentadoras de antígenos (ensayado mediante apoptosis de linfocitos B Wehi diana) mediante la adición de un epítipo de linfocitos T subdominante (línea gris con cuadrados: péptido T-B (p21-35 unido al epítipo T menor (p830-844) de la toxina del tétanos; línea negra con triángulos: péptido p21-35).

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

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

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

Panel B: cantidad de eosinófilos, linfocitos y células caliciformes expresados usando un sistema de puntuación de intensidad de 0 a 6.

45 Panel C: hiperreactividad de las vías respiratorias en grupo de control y experimental. La hiperreactividad se mide calculando el área bajo la curva (ABC) para valores de PenH obtenidos por exposición de ratones a concentraciones crecientes de metacolina.

La **Figura 5** muestra el efecto de p21-35 en el metabolismo oxidativo de linfocitos Treg afines medido por clasificación celular de células marcadas con carboxi-H2DCFDA. Panel A: PBS (control negativo); Panel B: péptido p21-35; Panel C; terc-butil hidroperóxido (control positivo).

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

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

Paneles A y B: línea de linfocitos T específica para Der p 1.

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

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

Los Paneles B y D muestran la proliferación de las líneas celulares después de incubación con un clon de Treg

citotóxico específico para el péptido p21-35.

La **Figura 8** muestra que los linfocitos Treg de la invención tienen un perfil fenotípico característico.

La Figura muestra la producción de citocinas de 4 clones de Treg específicos de péptido p21-35 derivados de ratones tratados con el péptido p21-35, péptido T-B como en la Figura 4 (panel izquierdo). Se analizaron los sobrenadantes de cultivo celular con respecto a contenido de citocinas después de cuatro días de estimulación con células presentadoras de antígenos (esplenocitos irradiados de ratones sin tratamiento previo, 10^5 células) y péptido p21-35 (2 $\mu\text{g/ml}$, 200 μl). Puede verse que los clones de Treg produjeron principalmente IFN-G y solamente cantidades traza de TNF- α e IL-10. El panel derecho muestra que en el análisis de ARNm de dichos linfocitos Treg, no se detectaron transcritos para el represor de la transcripción Foxp3, pero se expresaron fuertemente transcritos para T-bet, granzima A y granzima B.

La **Figura 9** muestra la expresión de diversos marcadores celulares de cuatro clones de linfocitos T específicos de p21-35 en reposo usando clasificación de células activadas por fluorescencia (Facs).

La **Figura 10** muestra una visión de conjunto esquemática de la generación de clones de linfocitos T con propiedades citotóxicas después de estimulación con un péptido de control (señal de dirección – epítipo de Der p 1) y un péptido experimental (señal de dirección – CFGS – epítipo de Der p 1) de acuerdo con una realización de la invención. “n” es el número total de clones de linfocitos T, “lítico” es el número de estos clones que tiene la capacidad de lisar células WEHI.

La **Figura 11** muestra la inducción de linfocitos T reguladores específicos de antígeno usando secuencias epitópicas con restos mutados de acuerdo con una realización de la invención.

Panel A: Inducción de apoptosis (indicada como expresión de Anexina-V en células seleccionadas CD19+ usando células Wehi precargadas con p21-35 (triángulo), p21-35met (péptido p21-35 con cisteína metilada) (cruz) o mp21-35 (péptido de fusión de un epítipo menor de toxoide del tétanos y p21-35) (cuadrado), y cocultivadas durante 24 horas con el clon de Treg citolítico G121. Resultados representativos de al menos 3 experimentos;

Panel B: Supresión de proliferación de linfocitos T CD4+ del bazo (medida como incorporación de ^3H timidina) inducida por proteína de Der p 2 completa (negro), p21-35met (péptido p21-35 con cisteína metilada) (blanco) o una mezcla de p830 (péptido p830-844 de toxoide del tétanos) y p21-35met (gris). Los histogramas son para cpm promedio \pm e.t.m. de 6 ratones ensayados individualmente por triplicado;

Panel C: Producción de citocinas por linfocitos T CD4+ del bazo pretratados con los péptidos indicados en el panel B. Las tres poblaciones celulares se estimularon con Der p 2 intacto. Los histogramas son para concentración promedio \pm e.t.m. de 6 ratones ensayados individualmente;

Panel D: Procesamiento y presentación de p21-35met, mp21-35 y Der p 2 evaluados usando esplenocitos adherentes como APC y un clon de linfocito T CD4+ específico de p21-35 efector (G221N). Las APC se pretrataron con los inhibidores indicados. La proliferación de linfocitos T se muestra como un índice de estimulación. Las barras representan valores de e.t.m. de cultivos por triplicado.

La **Figura 12** muestra la caracterización fenotípica de clones Treg citolíticos obtenidos con mp21-35Asn (péptido de fusión de péptido de toxoide del tétanos y p21-35 mutado (Ile28Asn)) de acuerdo con una realización de la invención. Los clones Treg en alumbre se ensayaron con respecto a expresión de marcador de superficie y CTLA-4 intracelular.

Panel A: Expresión de marcadores de superficie (Facs) de un clon Treg;

Panel B: detección intracelular de Foxp3, T-bet, granzima B (Grz-B), perforina y CD127 en superficie usando anticuerpos específicos marcados con fluorescencia (negro). También se muestra la tinción de control con un anticuerpo de isotipo coincidente (blanco).

Panel C: RT-PCR de transcrito de ARNm de Grz-A y Grz-B detectados 12 días después de la última estimulación en cuatro clones citolíticos. Los carriles 1, 3, 4 y 5 muestran clones de Treg y el carril 2 un clon de linfocito T efector CD4+ específico de p21-35 de control. Se usó beta-actina como un control.

Panel D: detección por ELISA de citocinas en 4 clones después de 3 días de estimulación con esplenocitos pobres en linfocitos T irradiados obtenidos de ratones sin tratamiento previo y cargados con mp21-35Asn.

La **Figura 13** muestra la inducción de apoptosis en células presentadoras de antígenos de acuerdo con una realización de la invención.

Parte A: Panel izquierdo: incubación (18 horas) de linfocitos B esplénicos precargados con p21-35 con clon de linfocito TR3CB7 (relación 2/1).

Panel derecho: incubación (18 horas) de linfocitos B esplénicos precargados con p21-35 con un clon de linfocito T efector CD4+ de control. Las áreas blancas con líneas discontinuas representan expresión de caspasa-3 en linfocitos B cultivados sin linfocitos T; las áreas grises con líneas continuas muestran la expresión de caspasa-3 en presencia del clon de Treg citolítico (panel izquierdo) o el clon efector CD4+ (panel derecho). Tinción con Ab contra caspasa 3 escindida. Los datos representan la evaluación de un mínimo de 3 experimentos independientes.

Parte B: panel izquierdo: Células dendríticas (células dendríticas CD11c+ activadas por LPS) Panel derecho: células WEHI.

Ambos tipos celulares se cargan con p21-35 y se cocultivan con Treg R3PB7 (áreas negras) o un clon no citolítico de control de la misma especificidad (G221N) (áreas blancas). La apoptosis se mide usando Ab contra caspasa 3 escindida. El recuento de células se refiere al número de células WEHI supervivientes después de 18 horas de incubación. Datos representativos de dos experimentos. El porcentaje de supresión indicado es el porcentaje de supresión de crecimiento de Wehi por R3TB7.

Parte C: Panel izquierdo: Incubación de células WEHI (cargadas con p21-35met e incubadas con Treg R3TB7

(relación 1/1)) con anticuerpo anti-FasL.

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

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

Panel derecho: como en el panel izquierdo, pero las CD y los linfocitos Treg se separan por una membrana semi-impermeable en un sistema de cultivo transwell. (El área blanca (oculta en el panel D) representa la unión de anexina V en CD sin linfocitos T citotóxicos). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

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

Figura 14: Supresión de linfocitos T testigos mediante linfocitos T citotóxicos de acuerdo con una realización de la invención.

Parte A: Análisis por FACS de células teñidas con CFSE de células del bazo CD4+CD25(-), incubadas con esplenocitos pobres en linfocitos T usados como APC, anticuerpo anti-CD3 1 µg/ml, p21-35 1 µg/ml y una línea de linfocitos Treg citolíticos. Se usó una relación 1/3 de Treg sobre linfocitos T CD4+CD25(-) en placas de cultivo de poliestireno no recubiertas con pocillos de fondo en V para optimizar el contacto celular.

Paneles izquierdos: línea de linfocitos Treg citolíticos G121

Paneles medios: línea de linfocitos Treg citolíticos R3TB7

Paneles derechos: cultivo celular de control en el que se reemplazan Treg citolíticos por esplenocitos CD4+CD25(-) no marcados (paneles derechos). El número de células, divisiones celulares y el tamaño celular se evaluaron mediante FACS después de clasificación de células vivas.

Paneles superiores: incubación durante 48 horas

Paneles inferiores: incubación durante 72 horas

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

Parte C: Experimento con los ajustes experimentales de los paneles inferiores de parte A, pero las divisiones de CFSE se evaluaron después de 72 horas de cocultivo (excepto para el panel izquierdo), sin EGTA y sin línea de linfocitos Treg citolíticos (panel izquierdo), en presencia de EGTA 2 mM (panel medio) o EGTA 4 mM (panel derecho).

Parte D: Marcaje de un clon de linfocito Th2 específico de Der p 1 con CFSE y cultivo durante 72 horas con esplenocitos pobres en linfocitos T cargados con péptido afín (aminoácidos 114 a 128 de Der p 1). La clasificación se realizó en células positivas para CFSE negativas para yoduro de propidio. El panel izquierdo muestra proliferación determinada en un desplazamiento de fluorescencia hacia la izquierda en presencia de los mismos linfocitos Th2 no marcados (relación 1/1). El segundo panel de la izquierda muestra los resultados obtenidos tras la adición de Treg G121 (relación 1/1 con el clon de Th2) más p21-35 (1 µg/ml) al cultivo, en presencia de un anticuerpo de control. Los siguientes 3 paneles (de izquierda a derecha) muestran los efectos obtenidos cuando se añadieron anticuerpos para FasL, GITR o Lag3 desde el inicio del cocultivo con el clon citolítico. Cada anticuerpo se usó a 10 µg/ml. Los porcentajes son para la proporción de células marcadas con CFSE PI negativas dentro de la población total de células CFSE.

Parte E: incubación de un clon de Th1 marcado con CFSE específico para p71-85 de Der p 2 durante 72 horas con un número igual del mismo clon no marcado (panel izquierdo). La proliferación se muestra como un desplazamiento de la fluorescencia hacia la izquierda. Este experimento se repitió pero reemplazando el clon no marcado por un Treg citolítico en un único pocillo (panel medio), o en dos pocillos separados por una membrana transwell (panel derecho). La relación celular fue de 1/1. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los histogramas representan células marcadas con CFSE PI negativas.

Parte F: incubación de esplenocitos pobres en linfocitos T con un clon de Th1 específico de p71-85 marcado con CFSE durante 18 horas. El péptido p71-85 se añadió para activar el clon en cada caso excepto para el control (panel más a la izquierda). A este cultivo, se añadió un clon celular de control p830-844 con su péptido específico (panel izquierdo) o un clon citolítico (R3TB7) con o sin el péptido p21-35 (paneles más a la derecha y derecho, respectivamente). La relación celular fue de 1/1. Se muestran las representaciones de densidad de puntos. Los resultados se expresan como un promedio de valores de FSC (valor superior, negro) y porcentajes de células CFSE que forman blastos (valor menor, gris). La formación de blastos se calculó a partir del tamaño celular en células CFSE positivas en la selección de linfocitos vivos (establecida a partir de representaciones de FSC/SSC). La selección de linfocitos en reposo se ajustó a la región que mostraba la mayor densidad en células no estimuladas (panel más a la izquierda). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos.

La **Figura 15** muestra la localización de Treg citolíticos a los pulmones en ratones expuestos a alérgenos y la inducción *in vivo* de apoptosis por linfocitos B presentadores de antígenos de acuerdo con una realización de la invención.

A: se transdujeron linfocitos B esplénicos aislados por perlas magnéticas de ratones BALB/c sin tratamiento previo con un vector retroviral que codificaba p21-35 y la proteína gp75. El panel izquierdo representa

linfocitos B incubados durante 18 horas con un clon de linfocito T citolítico (relación 2/1). El panel derecho representa el mismo ensayo pero llevado a cabo con una célula efectora CD4+ de control. Las curvas discontinuas representan la tinción anti caspasa 3 en linfocitos B cultivados sin linfocitos T.

B: se administraron 5×10^6 linfocitos B transducidos con p21-35 IV a cada ratón ($n = 6$), seguido 5 días después de 5×10^5 Tregs citolíticos. Dos semanas después, los ratones se sacrificaron y las células se prepararon a partir del bazo y los pulmones mediante purificación en gradiente de densidad y selección CD19+ usando perlas magnéticas. La presencia de ARNm que codifica la construcción retroviral usada para generar linfocitos B transgénicos se detectó mediante PCR. Un grupo de ratones ($n = 6$), que recibió los linfocitos B transducidos pero no linfocitos T citolíticos, se trató de forma similar. Se analizaron seis ratones en cada grupo y los resultados representativos se muestran en los carriles A para los bazos de 2 ratones tratados con los Tregs citolíticos y en los carriles B para 2 ratones del grupo de control.

C: se administraron 5×10^5 Tregs citolíticos V β 8.1+ o un clon de linfocito T de control V β 8.1+ IV a ratones BALB/c sin tratamiento previo, seguido 24 horas después de tres instilaciones nasales con 100 microgramos de Der p 2. Dos semanas después, los ratones se sacrificaron y los linfocitos pulmonares se prepararon mediante centrifugación en gradiente de densidad. La proporción de células que expresaban V β 8.1 se calculó mediante Facs dentro de la población de células CD4+. Los resultados se expresan como % promedio \pm e.t.m. de 6 ratones en cada grupo. El % de CD4 es el porcentaje de CD4 dentro de la población linfocítica total; el % de V β 8.1 es el porcentaje de células que expresan V β 8.1 dentro de la población de células CD4 totales.

La **Figura 16** muestra la prevención (a-f) y supresión (g-l) del asma experimental mediante clones de Treg citolíticos de acuerdo con una realización de la invención.

Los paneles A a F muestran datos de ratones tratados con Treg citolíticos específicos de mp21-35Asn (clones T1 y T3) antes de la sensibilización IP con Der p 2. (El "clon de linfocito T de control" es específico para el péptido 830-844 del toxoide del tétanos, el "modelo de Der P 2" se refiere a experimentos en los que no se administra ninguna célula a las células).

En los paneles G a L los ratones se trataron con las líneas celulares anteriores después de sensibilización IP con Der p 2.

Los paneles A y G muestran los números de células BALF totales;

los paneles B y H muestran recuentos de células BALF diferenciales;

los paneles C e I muestran citocinas BALF como se mide mediante ELISA;

los paneles D y J muestran una puntuación semicuantitativa para infiltración pulmonar por eosinófilos y linfocitos.

Los paneles E y K muestran recuento de células calciformes. Los resultados se expresan como la proporción (%) de células calciformes dentro de la población de células epiteliales después de tinción con PAS;

los paneles F y L muestran hiperreactividad de las vías respiratorias evaluada mediante inhalación de concentraciones crecientes de metacolina. Los valores de PenH se determinaron usando un pletismógrafo de cuerpo completo. Los resultados se muestran como "área bajo la curva" (ABC) para valores de PenH. Para comparación, se muestran los valores de ABC obtenidos en ratones sin tratamiento previo en un experimento independiente (sin tratamiento previo). Este grupo proporciona valores de fondo en ensayos tanto de prevención como de supresión.

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

La **Figura 17** muestra la inducción de apoptosis mediante línea de linfocitos T CD4 efectoras específica para epítipo de linfocitos T de Der p1 (114-128), marcado con CFSE e incubado con APC cargadas con el péptido correspondiente (114-128) (panel superior) de acuerdo con una realización de la invención. El panel inferior muestra la mortalidad de línea basal (40 %) cuando un número idéntico de células efectoras (no marcadas) reemplazó el clon de linfocito T regulador.

La **Figura 18A** muestra el recuento de células diferencial de BALF después de instilaciones nasales con 100 μ g de Der p1 (modelo) o NaCl (negativo). Se transfirieron de forma adoptiva a ratones linfocitos T citolíticos bien antes (prevención) o bien después (supresión) de la primera serie de instilación nasal con Der p 1. Las barras representan la media \pm ETM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo negativo.

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

La **Figura 19A** muestra la producción de TNF alfa (histogramas negros) e IFN-gamma (histogramas grises) de clon citolítico estimulado con APC sin usar péptido, usando péptido p21-35 de tipo silvestre (C-x-x-S) o p21-35 mutado con Ser24Cys (C-x-x-C) de acuerdo con una realización de la invención.

La **Figura 19B** muestra la detección por PCR semicuantitativa de transcritos de Granzima (carriles 1 a 3) y Fas-L (carriles 6 a 8). Se estimuló un clon citotóxico con APC cargadas con p21-35 de tipo silvestre (carriles 1, 6), p21-35 modificado con Ser24Cys (carriles 2, 7) o sin péptido (carriles 3, 8). Los carriles 4 y 5 son marcadores de peso molecular.

La **Figura 20** muestra la apoptosis de linfocitos T efectoras marcados con CFSE y cocultivados con células APC

de acuerdo con una realización de la invención. Las barras indican linfocitos T efectores no marcados y péptido MOG de tipo silvestre: T_{efect} wtMOG; linfocitos Tr y péptido MOG no modificado: Tr wtMOG; linfocitos Tr y péptido MOG modificado que contiene la secuencia de tiorredoxina: Tr CsMOG). Se obtuvieron linfocitos T CD4+ CD25+ de animales inmunizados con péptido MOG que contenía una secuencia consenso de tiorredoxina (CSMOG). Se obtuvieron células CD4+CD25- efectoras de animales EAE (T_{efect}).

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

La **Figura 22** muestra la puntuación clínica de ratones con y sin prevención por inyección de péptido MOG en un modelo para Esclerosis Múltiple.

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

Descripción detallada

Definiciones

El término “péptido” 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 en una realización particular comprender estructuras distintas de aminoácidos (como por ejemplo un compuesto orgánico de enlace). 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 de origen no natural incorporados por síntesis peptídica química o mediante modificación química o enzimática.

El término “**antígeno**” como se usa en el presente documento se refiere a una estructura de una macromolécula, típicamente proteína (con o sin polisacáridos) o hecha de composición proteica que comprende uno o más haptenos y que comprende epítopos de linfocitos T. La expresión “**proteína antigénica**” como se usa en el presente documento se refiere a una proteína que comprende uno o más epítopos de linfocitos T. Un autoantígeno o una proteína autoantigénica como se usa en el presente documento se refieren a una proteína humana o animal presente en el cuerpo, que induce una respuesta inmunitaria dentro del mismo cuerpo humano o animal.

La expresión “**proteína antigénica alimentaria o farmacéutica**” se refiere a una proteína antigénica presente de forma natural en un producto alimentario o farmacéutico, tal como en una vacuna.

El término “**epítipo**” se refiere a una o varias partes (que pueden definir un epítipo conformacional) de una proteína antigénica que se reconocen específicamente y a las que se une un anticuerpo o una parte del mismo (Fab¹, Fab², etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de un linfocito B o T, y que es capaz, por dicha unión, de inducir una respuesta inmunitaria.

La expresión “**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 es reconocida específicamente y a la que se une un receptor en la superficie celular de un linfocito T. Si un epítipo es dominante, subdominante o menor depende de la reacción inmunitaria inducida contra el epítipo. La dominancia depende de la frecuencia a la que dichos epítopos son reconocidos por linfocitos T y son capaces de activarlos, entre todos los epítopos posibles de linfocitos T de una proteína.

En realizaciones particulares, un epítipo de linfocitos T es un epítipo reconocido por moléculas del MHC de clase II, que consiste en una secuencia de +/- 9 aminoácidos que se ajustan en el surco de la molécula del MHC II. Dentro de una secuencia peptídica que representa un epítipo de linfocitos T, los aminoácidos en el epítipo se numeran de P1 a P9, los aminoácidos N terminales del epítipo se numeran P-1, P-2 y así sucesivamente, los aminoácidos C terminales del epítipo se numeran P+1, P+2 y así sucesivamente, como se ilustra en la Figura 3A.

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

El término “**derivado**” como se usa en el presente documento en referencia a los péptidos de la invención se refiere

a moléculas que contienen al menos la parte activa del péptido (es decir capaces de inducir actividad de linfocitos T CD4+ citolíticos) y, además de la misma, comprenden una parte complementaria que puede tener diferentes fines tales como estabilizar los péptidos o alterar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del péptido.

5 La expresión “**identidad de secuencia**” de dos secuencias como se usa en el presente documento se refiere al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia más corta, cuando las dos secuencias se alinean. En realizaciones particulares, dicha 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 %.

10 La expresión “**polinucleótido (o ácido nucleico) que codifica péptido**” como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa en un ambiente apropiado, da como resultado la generación de la secuencia peptídica relevante o un derivado u homólogo de la misma. Dichos 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. De acuerdo con una realización, el ácido nucleico que codifica los péptidos de acuerdo con la invención o fragmento del mismo es una secuencia que
15 codifica el péptido o fragmento del mismo que se origina de un mamífero o correspondiente a un mamífero, más particularmente un fragmento peptídico humano.

La expresión “**compuesto orgánico que tiene una actividad reductora**” se refiere en el contexto de la presente invención a compuestos, más en particular secuencias de aminoácidos, con una actividad reductora para enlaces disulfuro en proteínas. La expresión “**trastornos inmunitarios**” o “**enfermedades inmunitarias**” se refiere a
20 enfermedades en las que una reacción del sistema inmunitario es responsable de o sostiene una disfunción o situación no fisiológica en un organismo. Se incluyen en los trastornos inmunitarios, entre otros, trastornos alérgicos y enfermedades autoinmunitarias.

Las expresiones “**enfermedades alérgicas**” o “**trastornos alérgicos**” como se usan en el presente documento se refieren a enfermedades caracterizadas por reacciones de hipersensibilidad del sistema inmunitario a sustancias específicas denominadas alérgenos (tales como polen, picaduras, fármacos o alimentos). La alergia es el conjunto de señales y síntomas observados siempre que un paciente individual atópico se encuentre con un alérgeno al que se ha sensibilizado, lo que puede dar como resultado el desarrollo de diversas enfermedades, en particular enfermedades y síntomas respiratorios tales como asma bronquial. Existen diversos tipos de clasificaciones y la mayoría de trastornos alérgicos tienen diferentes nombres dependiendo de la parte del cuerpo del mamífero en que se produzca. La “**hipersensibilidad**” es una reacción indeseable (perjudicial, que produce incomodidad y en ocasiones es letal) producida en un individuo tras exposición a un antígeno al que se ha sensibilizado; la “**hipersensibilidad inmediata**” depende de la producción de anticuerpos IgE y es por lo tanto equivalente a la alergia.

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

Un “**alérgeno**” se define como una sustancia, habitualmente una macromolécula o una composición proteica que induce la producción de anticuerpos IgE en pacientes individuales predispuestos, particularmente genéticamente dispuestos (atópicos). Se presentan definiciones similares en Liebers y col. (1996) Clin. Exp. Allergy 26, 494-516.

La expresión “**cantidad terapéuticamente efectiva**” 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 un trastorno, es la cantidad que reduce en algún grado uno o más síntomas de la enfermedad o el trastorno, y más particularmente devuelve a la normalidad, parcial o completamente, los parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o causantes de la enfermedad o el trastorno. De acuerdo con una realización particular de la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo que conducirá a una mejora o una restauración de la situación fisiológica normal. Por ejemplo, cuando se usa para tratar terapéuticamente a un mamífero afectado por un trastorno inmunitario, es una cantidad diaria de péptido/kg de peso corporal de dicho mamífero. Como alternativa, cuando la administración es mediante terapia génica, la cantidad de ADN desnudo o vectores víricos se ajusta para asegurar la producción local de la dosificación relevante del péptido de la invención, derivado u homólogo del mismo.

El término “**natural**” cuando hace referencia a un péptido o a una secuencia en el presente documento se refiere al hecho de que la secuencia es idéntica a una secuencia de origen natural. A diferencia de este, el término “**artificial**” se refiere a una secuencia o un péptido que, como tal, no aparece en la naturaleza. Opcionalmente, una secuencia artificial se obtiene de una secuencia natural por modificaciones limitadas tales como cambio de uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de origen natural o añadiendo aminoácidos en el extremo N o C terminal de una secuencia de origen natural. Los aminoácidos se denominan en el presente documento por su nombre completo, su abreviatura de tres letras o su abreviatura de una letra.

- Los motivos de secuencias de aminoácidos se escriben en el presente documento de acuerdo con el formato de Prosite. El símbolo X se usa para una posición en la que se acepte cualquier aminoácido. Las alternativas se indican enumerando los aminoácidos aceptables para una posición dada, entre corchetes ('[]'). Por ejemplo: [CST] significa 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 en un motivo se separan entre sí por un guion -. 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, 4) corresponde a X-X o X-X-X o X-X-X-X, A (3) corresponde a A-A-A.
- La presente invención se basa en el hallazgo de que un péptido, que comprende un epítipo de linfocitos T y una secuencia peptídica, que tiene actividad reductora es capaz de generar una población de linfocitos T reguladores que tienen un efecto citotóxico en células presentadoras de antígenos.
- En consecuencia, 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 propio) con potencial para desencadenar una reacción inmunitaria, acoplado con un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora, tal como un motivo de secuencia de tiorreductasa. El epítipo de linfocitos T y el compuesto orgánico se separan opcionalmente por una secuencia de engarce. En realizaciones opcionales adicionales el péptido comprende adicionalmente una secuencia de dirección a endosoma y/o secuencias "flanqueantes" adicionales.
- Los péptidos de la invención pueden representarse de forma esquemática como A-L-B o B-L-A, en los que A representa un epítipo de linfocitos T de un antígeno (propio o no propio) con potencial para desencadenar una reacción inmunitaria, L representa un engarce y B representa un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora.
- La actividad reductora de un compuesto orgánico puede ensayarse con respecto a su capacidad para reducir un grupo sulfhidrilo tal como en el ensayo de solubilidad de insulina descrito en los ejemplos del presente documento en los que la solubilidad de insulina se altera tras la reducción, o con una insulina marcada con fluorescencia. El compuesto orgánico reductor puede acoplarse en el lado amino terminal del epítipo de linfocitos T o en el extremo carboxilo terminal del epítipo de linfocitos T.
- En general el compuesto orgánico con actividad reductora es una secuencia peptídica. Se encuentran fragmentos peptídicos con actividad reductora en tiorreductasa que son pequeñas enzimas reductoras de disulfuro que incluyen glutarredoxinas, nucleorredoxinas, tiorredoxinas y otras tiol/disulfuro oxidorreductoras (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 actividad reductora para enlaces disulfuro en proteínas (tales como enzimas) mediante cisteínas redox activas dentro de secuencias consenso de dominio activo conservadas: C-X(2)-C, C-X(2)-S, C-X(2)-T, S-X(2)-C, T-X(2)-C (Fomenko y col. (2003) Biochemistry 42, 11214-11225; Fomenko y col. (2002) Prot. Science 11: 2285-2296), en las que X significa cualquier aminoácido. Dichos dominios también se encuentran en proteínas mayores tales como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y fosfolipasa C específica de fosfoinositida (Tabla 1).

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

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

b: cadena beta ; a: hélice alfa

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

Como se explica en detalle posteriormente, los péptidos de la presente invención pueden prepararse por síntesis química, lo que permite la incorporación de aminoácidos no naturales. En consecuencia, en el motivo de compuestos reductores de acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, C representa cisteína u otros aminoácidos con un grupo tiol tales como mercaptovalina, homocisteína u otros aminoácidos naturales o no naturales con una función tiol. Para tener actividad reductora, las cisteínas presentes en el motivo no deberían aparecer como parte de un enlace disulfuro de cistina. No obstante, el motivo puede comprender cisteínas modificadas tales como cisteína metilada, que se convierte en cisteína con grupos tiol libres *in vivo*.

El aminoácido X en el motivo [CST]-X (2)-[CST] de realizaciones particulares de los compuestos reductores de la invención puede ser cualquier aminoácido natural, incluyendo S, C o T o puede ser un aminoácido no natural. En realizaciones particulares X es un aminoácido con una cadena lateral pequeña tal como Gly, Ala, Ser o Thr. En realizaciones particulares adicionales, X no es un aminoácido con una cadena lateral voluminosa tal como Tyr. En realizaciones particulares adicionales al menos una X en el motivo [CST]-X (2)-[CST] es His o Pro.

En los péptidos de la presente invención que comprenden el motivo descrito anteriormente como el compuesto reductor, el motivo se localiza de modo que, cuando el epítipo se ajuste al surco de MHC, el motivo permanezca fuera del surco de unión del MHC. El motivo se coloca bien inmediatamente adyacente a la secuencia de epítipo dentro del péptido, o bien separado del epítipo de linfocitos T por un engarce. Más particularmente, el engarce comprende una secuencia de aminoácidos de 7 aminoácidos o menos. Más particularmente, el engarce comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. Como alternativa, un engarce puede comprender 6, 8 o 10 aminoácidos. En las realizaciones particulares de los péptidos de la invención en las que la secuencia de motivo está adyacente a la secuencia de epítipo esta se indica como posición P-4 a P-1 o P+1 a P+4 en comparación con la secuencia de epítipo.

Aparte de un engarce peptídico pueden usarse otros compuestos orgánicos como engarce para unir las partes del péptido entre sí (por ejemplo el motivo con la secuencia de epítipo de linfocito T).

Los péptidos de la presente invención pueden comprender además secuencias de aminoácidos cortas adicionales en dirección N o C terminal de la secuencia (artificial) que comprende el epítipo de linfocito T y el compuesto reductor (motivo). Dicha secuencia de aminoácidos se denomina en general en el presente documento "secuencia flanqueante". Una secuencia flanqueante puede situarse entre el epítipo y una secuencia de dirección endosómica y/o entre el compuesto reductor (por ejemplo motivo) y una secuencia de dirección endosómica. En realizaciones adicionales, que no comprenden una secuencia de dirección endosómica, puede estar presente una secuencia de aminoácidos corta en dirección N y/o C terminal del compuesto reductor y/o secuencia de 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.

En realizaciones particulares de los péptidos de la invención, el motivo se localiza en dirección N terminal del epítipo.

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

En ciertas realizaciones de la presente invención, se proporcionan péptidos que comprenden una secuencia de epítipo y una secuencia de motivo. En realizaciones particulares adicionales, el motivo aparece varias veces (1, 2, 3, 4 o incluso más veces) en el péptido, por ejemplo, como repeticiones del motivo que pueden estar separadas entre sí por uno o más aminoácidos (por ejemplo CXXC X CXXC X CXXC), como repeticiones que están adyacentes entre sí (CXXC CXXC CXXC) o como repeticiones que solapan entre sí (CXXCXXCXXC o CXCCXCCXCC). Como alternativa, se proporcionan uno o más motivos tanto en el extremo N como en el extremo C terminal de la secuencia de epítipo de linfocitos T.

Otras variaciones previstas para los péptidos de la presente invención incluyen péptidos que contienen repeticiones de una secuencia de epítipo de linfocitos T en la que cada secuencia de epítipo está precedida por y/o seguida del motivo (por ejemplo repeticiones de "motivo-epítipo" o repeticiones de "motivo-epítipo-motivo"). En el presente documento todos los motivos pueden tener la misma secuencia pero esto no es obligatorio. Debe observarse que secuencias repetitivas de péptidos que comprenden un epítipo que en sí mismo comprende el motivo también darán como resultado una secuencia que comprende tanto el "epítipo" como un "motivo". En dichos péptidos, el motivo dentro de una secuencia de epítipo actúa como un motivo fuera de una segunda secuencia de epítipo.

En realizaciones particulares, sin embargo, los péptidos de la presente invención comprenden solamente un epítipo de linfocitos T.

En consecuencia, los péptidos de acuerdo con la presente invención comprenden, además de un compuesto reductor, un epítipo de linfocitos T derivado de un antígeno, típicamente un alérgeno o un autoantígeno, dependiendo de la aplicación. Como se describe posteriormente un epítipo de linfocitos T en una secuencia proteica puede identificarse por ensayos funcionales y/o uno o más ensayos de predicción por ordenador. 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 del MHC. En realizaciones particulares, el epítipo de linfocitos T presente dentro de los péptidos de la invención consiste en entre 8 y 25 aminoácidos, aún más particularmente entre 8 y 16 aminoácidos, aún más particularmente consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos. 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 del MHC de clase II. En realizaciones particulares de la presente invención, la secuencia de epítipo de linfocitos T es una secuencia de epítipo que se ajusta a la hendidura de una proteína del MHC II, más particularmente un ajuste nonapeptídico en la hendidura del MHC II.

El epítipo de linfocitos T de los péptidos de la presente invención puede corresponder 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 conserve su capacidad para unirse dentro de la hendidura del MHC, similar a la secuencia de epítipo de linfocitos T natural. El epítipo de linfocitos T modificado puede tener la misma afinidad de unión por la proteína del MHC que el epítipo natural, pero también puede tener una afinidad reducida. En realizaciones particulares la afinidad de unión del péptido modificado no es menor de 10 veces menos que el péptido original, más particularmente no menos de 5 veces menos. Es un hallazgo de la presente invención que los péptidos de la presente invención tienen un efecto estabilizador en complejos proteicos. En consecuencia, el efecto estabilizador del complejo de péptido-MHC compensa la afinidad reducida del epítipo modificado por la molécula del MHC. Un ejemplo del mismo es la sustitución Ile28Asn del péptido de Der p 2 p21-35, que a pesar de su menor afinidad por la hendidura del MHC II, es capaz de inducir la misma respuesta de linfocitos T que el péptido de Der p 2 natural p21-35.

En realizaciones particulares, la secuencia que comprende el epítipo de linfocitos T y el compuesto reductor dentro del péptido se une adicionalmente con una secuencia de aminoácidos (u otro compuesto orgánico) que facilita la captación del péptido en endosomas tardíos para procesamiento y presentación dentro de determinantes del MHC de clase II. La dirección a endosoma tardío está mediada por señales presentes en la cola citoplasmática de proteínas y corresponde a motivos peptídicos bien identificados tales como el motivo basado en dileucina [DE]XXXL[L] o DXXLL (por ejemplo DXXXLL), el motivo basado en tirosina YXXØ o el denominado motivo de grupo ácido. El símbolo Ø representa restos de aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas voluminosas tales como Phe, Tyr y Trp. Las secuencias de dirección a endosoma tardío permiten el procesamiento y la presentación eficaz del epítipo de linfocitos T derivado de antígeno por moléculas del MHC de clase II. Dichas secuencias de dirección endosómica están contenidas, por ejemplo, dentro de la proteína gp75 (Vijayasaradhi y col. (1995) J Cell Biol 130, 807-820), la proteína CD3 gamma humana, la HLA-BM β (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). Se desvelan otros ejemplos de péptidos que actúan como señales de clasificación al endosoma en la revisión de Bonifacio y Traub (2003) Annu. Rev. Biochem. 72, 395-447. Como alternativa, la secuencia puede ser la de un epítipo de linfocitos T subdominante o menor de una proteína, que facilita la captación en el endosoma tardío sin superar la respuesta de linfocitos T hacia el antígeno, es decir epítipo de linfocitos T derivado de alérgeno o autoantígeno.

La secuencia de dirección a endosoma tardío puede localizarse en el extremo amino terminal o en el extremo carboxilo terminal del péptido derivado de autoantígeno o alérgeno para captación y procesamiento eficaz y también puede acoplarse mediante una secuencia flanqueante, tal como una secuencia peptídica de hasta 10 aminoácidos. Cuando se usa un epítipo de linfocitos T menor para fines de dirección, este último se localiza típicamente en el extremo amino terminal del péptido derivado de autoantígeno o alérgeno.

En consecuencia, la presente invención prevé péptidos de proteínas antigénicas y su uso en la inducción de reacciones inmunitarias específicas. Los péptidos de la presente invención pueden corresponder a fragmentos de proteínas que comprenden, dentro de su secuencia, los elementos de la presente invención, es decir un compuesto reductor y un epítipo de linfocitos T separado por como máximo 10, preferentemente 7 aminoácidos o menos. Como alternativa, y para la mayoría de proteínas antigénicas, los péptidos de la invención se generan acoplando un compuesto reductor, más particularmente un motivo reductor como se describe en el presente documento, en dirección N terminal o C terminal de un epítipo de linfocitos T de la proteína antigénica (bien directamente adyacente al mismo o con un engarce de como máximo 10, más particularmente como máximo 7 aminoácidos) para obtener los elementos característicos de la invención. Además la secuencia de epítipo de linfocitos T de la proteína y/o el motivo puede modificarse y/o pueden introducirse (o modificarse) una o más secuencias flanqueantes y/o una secuencia de dirección, en comparación con la secuencia de origen natural. Por lo tanto, dependiendo de si los elementos de la presente invención pueden encontrarse o no dentro de la secuencia de la proteína antigénica de interés, los péptidos de la presente invención pueden comprender una secuencia que es "artificial" o "de origen natural".

La longitud de los péptidos de la presente invención puede variar sustancialmente. En realizaciones particulares, en las que el compuesto reductor corresponde al motivo como se describe en el presente documento, la longitud de los péptidos varía de 12-13 aminoácidos, es decir que consiste en un epítipo de 8-9 aminoácidos y adyacente al mismo el motivo como se describe en el presente documento de 4 aminoácidos, hasta 50 o más aminoácidos. Por ejemplo, un péptido de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de dirección endosómica de 40 aminoácidos, una secuencia flanqueante de aproximadamente 2 aminoácidos, un motivo como se describe en el presente documento de 4 aminoácidos, un engarce de 4 aminoácidos y un péptido de epítipo de linfocitos T de 9 aminoácidos.

En consecuencia, en realizaciones particulares, los péptidos completos consisten en entre 12 aminoácidos y 20 hasta 25, 30, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos. En realizaciones más particulares, los péptidos consisten en entre 10 y 20 aminoácidos. Más particularmente, cuando el compuesto reductor sea un motivo como se describe en el presente documento, la longitud de la secuencia (artificial o natural) que comprende el epítipo y motivo opcionalmente conectado por un engarce (denominado en el presente documento secuencia de "epítipo-motivo"), sin la secuencia de dirección endosómica, es crítica. El "epítipo-motivo" más particularmente tiene una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos, óptimamente de 18 aminoácidos o menos. Dichos péptidos de 12 o 13 a 18 aminoácidos pueden acoplarse opcionalmente con una señal de dirección endosómica de la que el tamaño es menos crítico.

Como se ha detallado anteriormente, en realizaciones particulares, los péptidos de la presente invención comprenden un motivo reductor como se describe en el presente documento ligado a una secuencia de epítipo de linfocitos T. De acuerdo con una realización particular los péptidos son péptidos de proteínas que no comprenden dentro de su secuencia natural nativa una secuencia de aminoácidos con propiedades redox cercanas (es decir dentro de una secuencia de 11 aminoácidos en dirección N o C terminal) del epítipo de interés, más específicamente que no comprenden en su secuencia natural nativa una secuencia consenso de tiorredoxina, glutarredoxina o tiorreductasas u homólogos de las mismas, cerca del epítipo de interés. Más particularmente, la invención abarca la generación de péptidos inmunogénicos de proteínas antigénicas que no comprenden una secuencia seleccionada de C-X(2)-S, S-X(2)-C, C-X(2)-C, S-X(2)-S, C-X(2)-T, T-X(2)-C, o cualquier otra secuencia consenso que sea típica de secuencias consenso de tiorredoxina, glutarredoxina o tiorreductasas cerca del epítipo de interés, es decir dentro de una secuencia de 11 aminoácidos en dirección N o C terminal de la secuencia de epítipo. En realizaciones particulares adicionales, la presente invención proporciona péptidos inmunogénicos de proteínas antigénicas que no comprenden las secuencias de aminoácidos anteriormente descritas con propiedades redox dentro de su secuencia. En realizaciones particulares adicionales, la proteína antigénica no comprende de forma natural la secuencia C-H-G-S dentro de una secuencia de 11 aminoácidos en dirección N o C terminal de la secuencia de epítipo. Más particularmente la presente invención reivindica péptidos distintos de péptidos que comprenden el epítipo EPCIIHRGKP [SEQ ID NO: 1] del péptido p21-35 de Der p 2 (CHGSEPCIIHRGKPF [SEQ ID NO: 2]) y el motivo C-H-G-S [SEQ ID. NO: 3], en particular los péptidos en los que este motivo se localiza en dirección N terminal de la secuencia de epítipo, ya que dichos péptidos corresponden a péptidos generados en la técnica anterior y usados para inducir una respuesta inmunitaria en el contexto del mapeo de epítopos de Der p 2 (Wu y col. 2002, J. Immunol. 169, 2430-2435).

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

Sin embargo, en realizaciones alternativas, el epítipo de linfocitos T puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos que asegure la unión del epítipo con la hendidura del MHC. Cuando un epítipo de interés de una proteína antigénica comprenda un motivo tal como se describe en el presente documento dentro de su secuencia de epítipo, los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la presente invención comprenden la secuencia de un motivo como se describe en el presente documento y/o de otra secuencia reductora acoplada en dirección N o C terminal con la secuencia de epítipo de modo que (a diferencia del motivo presente dentro del epítipo, que está internado dentro de la hendidura) el motivo unido puede asegurar la actividad reductora.

En realizaciones particulares, los péptidos de la presente invención no son péptidos naturales sino artificiales que contienen, además de un epítipo de linfocitos T, un motivo como se describe en el presente documento, por el que el motivo se separa opcionalmente del epítipo de linfocitos T por un engarce que consiste en hasta siete, más particularmente hasta cuatro aminoácidos.

En una realización particular, se proporcionan péptidos de acuerdo con la invención de la proteína Der p 2, que comprenden un motivo como se describe en el presente documento y un epítipo de Der p 2. Más particularmente se proporcionan péptidos que comprenden una o más copias del epítipo nonapeptídico EPCIIHRGKP [SEQ ID NO: 1] de Der p 2 cada una unida con un motivo reductor que consiste en el motivo C-X2-C. Como alternativa, se proporcionan péptidos de la proteína Der p 2 que comprenden un epítipo de linfocitos T distinto de una secuencia que comprende EPCIIHRGKP [SEQ ID NO: 1] ligada a un motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C. Los péptidos de la invención comprenden opcionalmente una secuencia de dirección endosómica. Más particularmente, se proporcionan péptidos inmunogénicos de Der p 2 que comprenden el motivo de C-X2-C.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a los procesos para generar péptidos inmunogénicos de la presente

invención descrita en el presente documento.

En una primera realización de procedimientos de acuerdo con la presente invención, se prepara un péptido de una proteína antigénica capaz de inducir actividad de linfocitos T CD4+ citolíticos proporcionando un péptido que consiste en un epítipo de linfocitos T de dicha proteína antigénica, y ligando a dicho epítipo un compuesto reductor.

5 Más particularmente los procedimientos de acuerdo con la invención abarcan la unión a dicho epítipo de linfocitos T una secuencia de aminoácidos correspondiente al motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C, de modo que dicho motivo y dicho epítipo estén adyacentes entre sí o separados por un engarce de como máximo 7 aminoácidos, más particularmente como máximo 4 aminoácidos. Más particularmente, el motivo corresponde a C-X2-C.

En realizaciones particulares de los procedimientos de la invención, el epítipo de linfocitos T de la proteína antigénica se selecciona de modo que la proteína antigénica no comprenda, en su secuencia natural, una secuencia correspondiente a la secuencia combinada del epítipo y un motivo de acuerdo con la presente invención dentro de una región de 11 aminoácidos en dirección N o C terminal de dicho epítipo. En realizaciones particulares adicionales, cuando el epítipo comprende la secuencia EPCIIHRGKP [SEQ ID. NO: 1] del péptido p21-35 de Der p 2, el motivo corresponde a [CT]-X2-C o C-X2-[CT], más particularmente a C-X2-C. Los procedimientos de la presente invención generan péptidos inmunogénicos que inducen una respuesta inmunitaria específica que no se genera, o no en ese grado, por los epítopos de linfocitos T generados de forma natural de la proteína antigénica. Este efecto se asegura por la combinación específica de epítipo de linfocitos T y compuesto reductor, más particularmente de epítipo de linfocitos T y motivo reductor.

En consecuencia, los procedimientos como se han descrito anteriormente son particularmente adecuados para la generación de péptidos inmunogénicos de alérgenos o autoantígenos de proteínas que no tienen un motivo tal como se describe en el presente documento en su secuencia o en el que un motivo como se describe en el presente documento está presente completa o parcialmente dentro de una secuencia de epítipo de interés o en el que un motivo está presente fuera, pero lejos (es decir a más de 4, 7, 10 aminoácidos) de una secuencia de epítipo de interés.

En realizaciones particulares de los procedimientos descritos anteriormente, se proporcionan una o más etapas adicionales por las que se introduce un engarce dentro del epítipo de linfocitos T y se añade en el compuesto reductor y/o secuencias adicionales (tal como una secuencia de dirección) y/o se introducen una o más secuencias flanqueantes y/o modificaciones en la secuencia de epítipo del péptido.

En realizaciones adicionales de procedimientos de acuerdo con la invención para obtener un péptido capaz de inducir actividad de linfocitos T CD4+ citolítica de una proteína antigénica, se proporcionan procedimientos que aseguran la identificación de un péptido inmunogénico adecuado dentro de una proteína antigénica. En estas realizaciones, los procedimientos de la presente invención abarcan determinar si la proteína antigénica comprende, dentro de su secuencia natural, un epítipo de linfocitos T por el que la proteína comprende adicionalmente dentro de una región de 11, más particularmente dentro de una región de 8 aminoácidos en dirección N o C terminal del epítipo de linfocitos T, un motivo reductor como se describe en el presente documento. En consecuencia, estas realizaciones comprenden la identificación dentro de la proteína antigénica de una secuencia adecuada para su uso como un péptido inmunogénico y la producción de un péptido correspondiente a la secuencia identificada. Más particularmente, los péptidos aislados generados de esta manera comprenden una longitud de entre 12 y 19 aminoácidos. Se describen posteriormente procedimientos para la producción de péptidos. Cuando estén presentes en la proteína sitios de escisión enzimática adecuados, se prevé adicionalmente que los péptidos de la presente invención puedan generarse también por escisión enzimática de la proteína nativa.

En realizaciones particulares de los diferentes procedimientos descritos anteriormente, se proporcionan una o más etapas adicionales por las que se añaden secuencias adicionales a los péptidos obtenidos, tal como una secuencia de dirección y/o se introducen una o más secuencias flanqueantes y/o modificaciones en el epítipo, engarce y/o motivo reductor del péptido. Estas modificaciones pueden potenciar adicionalmente las propiedades inmunogénicas del péptido o pueden mejorar otras características de los péptidos tales como facilidad de síntesis, solubilidad, etc.

Los procedimientos descritos anteriormente permitirán la generación de un péptido inmunogénico de acuerdo con la presente invención solamente para una selección de proteínas antigénicas que comprenden de forma natural, cerca de un epítipo de interés, un motivo C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C. En realizaciones particulares el epítipo de linfocitos T no comprende la secuencia EPCIIHRGKP [SEQ ID NO: 1] del péptido p21-35 de Der p 2. En realizaciones particulares, la proteína antigénica puede comprender de forma natural un motivo C-X(2)-[ST] o [ST]-X(2)-C dentro de una secuencia de como máximo 11 aminoácidos que flanquean el epítipo de interés y los procedimientos de la invención que generan un péptido aislado que comprende dicho motivo y dicha secuencia de epítipo y que modifican dicho motivo a C-X(2)-C para aumentar adicionalmente las propiedades inmunogénicas descritas en el presente documento.

La identificación de un epítipo de linfocitos T adecuado de una proteína antigénica para su uso en la generación de péptidos como se describe en los procedimientos anteriores se detalla posteriormente.

Se ha mostrado que tras la administración (es decir inyección) a un mamífero de un péptido de acuerdo con la

invención (o una composición que comprende dicho péptido), el péptido induce la activación de linfocitos T que reconocen el péptido de linfocitos T derivado de antígeno (es decir el alérgeno o autoantígeno) y proporciona una señal adicional al linfocito T mediante reducción del receptor de superficie. Esta activación supraóptima da como resultado linfocitos T que adquieren propiedades citotóxicas para la célula que presenta el epítipo de linfocitos T, así como propiedades supresoras en linfocitos T testigos. De esta manera, los péptidos o la composición que comprende los péptidos descritos en la presente invención, que contienen un epítipo de linfocitos T derivado de antígeno y, fuera del epítipo, un compuesto reductor puede usarse para inmunización directa de mamíferos, incluyendo seres humanos.

Un aspecto de la invención proporciona por lo tanto péptidos de la invención o derivados de los mismos, para su uso como una medicina. En consecuencia, la presente invención proporciona procedimientos terapéuticos que comprenden administrar uno o más péptidos de acuerdo con la presente invención a un paciente que lo necesite.

La presente invención ofrece procedimientos por los que pueden inducirse linfocitos T específicos de alérgeno/antígeno dotados de propiedades citotóxicas 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 (es decir alérgeno, autoantígeno) y (ii) una secuencia consenso con propiedades redox, y que también comprende opcionalmente además una secuencia para facilitar la captación del péptido en endosomas tardíos para presentación por MHC de clase II eficaz, inducen linfocitos T supresores.

Las propiedades inmunogénicas de los péptidos de la presente invención son particularmente interesantes en el tratamiento y la prevención de reacciones inmunitarias. En consecuencia, otro aspecto de la presente invención posibilita el uso de los péptidos descritos en el presente documento como un medicamento, más particularmente para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno inmunitario en un mamífero, más particularmente en un ser humano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere por lo tanto a un procedimiento de tratamiento o prevención de un trastorno inmunitario de un mamífero que necesite dicho tratamiento o prevención, usando los péptidos de la invención, homólogos o derivados de los mismos, comprendiendo los procedimientos la etapa de administrar a dicho mamífero que padece o está en riesgo de un trastorno inmunitario una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos de la invención, homólogos o derivados de los mismos tal como para reducir los síntomas del trastorno inmunitario. Se prevé el tratamiento tanto de seres humanos como de animales, tal como, pero sin limitación, mascotas y caballos.

Los trastornos inmunitarios indicados anteriormente se seleccionan en una realización particular de enfermedades alérgicas y enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades alérgicas se describen convencionalmente como enfermedades mediadas por tipo 1 o enfermedades mediadas por IgE. Las manifestaciones clínicas de enfermedades alérgicas incluyen asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y reacciones anafilácticas a picaduras de insectos o fármacos. Las enfermedades alérgicas están provocadas por reacciones de hipersensibilidad del sistema inmunitario a sustancias específicas denominadas alérgenos (tales como polen, picaduras, fármacos o alimentos). La forma más grave de un trastorno alérgico es el choque anafiláctico, que es una urgencia médica. Los alérgenos incluyen alérgenos portados por el aire, tales como los de ácaros del polvo domésticos, mascotas y pólenes. Los alérgenos también incluyen alérgenos ingeridos responsables de la hipersensibilidad alimentaria, incluyendo frutas, verduras y leche.

Para tratar las enfermedades anteriores, se generan péptidos de acuerdo con la invención a partir de las proteínas antigénicas o alérgenos conocidos o que se cree que son 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 alimentarios presentes en cacahuetes, pescado por ejemplo bacalao, clara de huevo, crustáceos por ejemplo gambas, leche por ejemplo leche de vaca, trigo, cereales, frutas de la familia de las rosáceas (manzana, ciruela, fresa), verduras de las familias de liliáceas, crucíferas, solanáceas y umbelíferas, frutos secos, sésamo, cacahuete, soja y otros alérgenos de la familia de las legumbres, especias, melón, aguacate, mango, higo, plátano, etc.
- alérgenos de ácaros del polvo domésticos obtenidos 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 del polen, especialmente pólenes de árboles, hierba y pasto,
- alérgenos de animales, especialmente en gatos, perros, caballos y roedores,
- alérgenos de hongos, especialmente de *Aspergillus*, *Alternaria* o *Cladosporium*, y
- alérgenos ocupacionales presentes en productos tales como látex, amilasa, etc.

El epítipo de linfocitos T correspondiente a una proteína antigénica (o inmunógeno) adecuado para su uso en el contexto de la presente invención es típicamente un epítipo de linfocitos T universal o promiscuo (es decir un epítipo de linfocitos T capaz de unirse con una mayoría de las moléculas del MHC de clase II), más particularmente presente en un alérgeno portado por el aire o un alérgeno portado por alimentos. En realizaciones particulares, dicho

alérgeno se selecciona del grupo que consiste en alérgenos de rinosinusitis, alérgenos de asma bronquial alérgica y alérgenos de dermatitis atópica.

5 Los alérgenos también pueden ser alérgenos principales presentes en mohos 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 también se conocen bien en la técnica y pueden encontrarse en Internet, por ejemplo en www.allergome.org.

10 Se clasifican ampliamente enfermedades autoinmunitarias en dos categorías, enfermedades específicas de órganos y sistémicas. No se ha identificado la etiología precisa de enfermedades autoinmunitarias sistémicas. Por el contrario, las enfermedades autoinmunitarias específicas de órganos están relacionadas con una respuesta inmunitaria específica incluyendo linfocitos B y T, que se dirige al órgano y de este modo induce y mantiene un estado crónico de inflamación local. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias específicas de órganos incluyen diabetes de tipo 1, miastenia grave, tiroiditis y esclerosis múltiple. En cada una de estas afecciones, se ha
15 identificado un único autoantígeno o un número pequeño de autoantígenos, incluyendo insulina, el receptor muscular de acetilcolina, peroxidasa tiroidea y proteína básica principal, respectivamente. Está bien reconocido que la supresión de esta respuesta inmunitaria específica de órgano es beneficiosa y conduce a recuperación parcial o completa de la función orgánica. No hay, sin embargo, ninguna terapia que suprima dicha respuesta inmunitaria de una manera específica de antígeno. La terapia actual hace uso en su lugar de la supresión no específica obtenida por el uso de corticosteroides y agentes inmunosupresores, que muestran todos efectos secundarios significativos
20 relacionados con su ausencia de especificidad, limitando de este modo su uso y su eficacia general. La Tabla 2 muestra una lista no limitante de ejemplos de autoantígenos conocidos que están ligados a trastornos autoinmunitarios específicos de órgano y que se prevén dentro del contexto de la presente invención.

Tabla 2. Autoantígenos representativos y enfermedades ligadas con los mismos

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

25 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan péptidos inmunogénicos que comprenden un epítipo de linfocitos T de un antígeno (propio o no propio) con potencial para desencadenar una reacción inmunitaria, tal como un alérgeno o un autoantígeno, tal como los descritos en la Tabla 2. En una realización particular, el epítipo de linfocitos T es un epítipo de linfocitos T dominante.

30 En consecuencia, en realizaciones particulares, los procedimientos de tratamiento y prevención de la presente invención comprenden la administración de un péptido inmunogénico como se describe en el presente documento, en el que el péptido comprende un epítipo de linfocitos T de una proteína antigénica que desempeña un papel en la enfermedad para tratar (por ejemplo tal como las descritas en la Tabla 2 anterior). En realizaciones particulares

adicionales, el epítipo usado es un epítipo dominante.

La identificación y selección de un epítipo de linfocitos T de dichas proteínas antigénicas, más en particular de alérgenos o autoantígenos, para uso en el contexto de la presente invención es conocida por un experto en la materia.

5 Para identificar un epítipo adecuado para su uso en el contexto de la presente invención, se ensayan secuencias peptídicas aisladas de una proteína antigénica, por ejemplo, mediante técnicas de biología de linfocitos T, para determinar si las secuencias peptídicas inducen una respuesta de linfocitos T. Las secuencias peptídicas que se ha descubierto que inducen una respuesta de linfocitos T se definen como poseedoras de actividad estimulante de linfocitos T.

10 La actividad estimulante de linfocitos T humanos puede ensayarse adicionalmente cultivando linfocitos T obtenidos de un individuo sensible a, por ejemplo, un alérgeno de ácaros (es decir un individuo que tiene una respuesta inmunitaria mediada por IgE a un alérgeno de ácaros) con un péptido/epítipo derivado del alérgeno y determinar si se produce proliferación de linfocitos T en respuesta al péptido/epítipo como se mide, por ejemplo, por captación celular de timidina tritiada. Los índices de estimulación para respuestas por linfocitos T a péptidos/epítipos pueden
15 calcularse como la CPM máxima en respuesta a un péptido/epítipo dividido por la CPM de control. Un índice de estimulación (I.E.) de linfocitos T igual a o mayor de dos veces el nivel de fondo se considera "positivo". Se usan resultados positivos para calcular el índice de estimulación medio para cada péptido/epítipo para el grupo de péptidos/epítipos ensayado.

20 Los epítipos de linfocitos T no naturales (o modificados) pueden opcionalmente ensayarse adicionalmente con respecto a su afinidad de unión por moléculas del MHC de clase II. Esto puede realizarse de diferentes maneras. Por ejemplo, se obtienen moléculas del HLA de clase II solubles mediante lisis de células homocigotas para una molécula de clase II dada. Esta última se purifica por cromatografía de afinidad. Se incuban moléculas de clase II solubles con un péptido de referencia marcado con biotina producido de acuerdo con su afinidad de unión fuerte por
25 esa molécula de clase II. Los péptidos para evaluar con respecto a unión a clase II se incuban después a diferentes concentraciones y su capacidad para desplazar el péptido de referencia de su unión a clase II se calcula por la adición de neutravidina. Pueden encontrarse procedimientos por ejemplo en Texier y col., (2000) J. Immunology 164, 3177-3184).

De acuerdo con la presente invención, las propiedades inmunogénicas de epítipos de linfocitos T se aumentan ligándolos a un compuesto reductor. Particularmente, los péptidos de la presente invención que comprenden al
30 menos un epítipo de linfocitos T y el compuesto reductor como se describe en el presente documento tienen un índice de estimulación de linfocitos T medio de más de o igual a 2,0. Un péptido que tiene un índice de estimulación de linfocitos T de más de o igual a 2,0 se considera útil como un agente terapéutico. Más particularmente, los péptidos de acuerdo con la invención 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 (I.P.) de al menos aproximadamente 100, al menos 150, al menos aproximadamente 200 o al menos
35 aproximadamente 250. El índice de positividad para un péptido se determina multiplicando el índice de estimulación de linfocitos T medio por el porcentaje de individuos, en una población de individuos sensibles a ácaros del polvo domésticos (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 (correspondiente por lo tanto al IE multiplicado por la naturaleza promiscua del péptido/epítipo). Por lo tanto, el índice de positividad representa tanto la fuerza de una respuesta de
40 linfocitos T a un péptido (I.E.) como la frecuencia de una respuesta de linfocitos T a un péptido en una población de individuos sensibles a ácaros del polvo domésticos.

Para determinar los epítipos de linfocitos T óptimos, por ejemplo, mediante técnicas de mapeo fino, un péptido que tiene actividad estimulante de linfocitos T y por lo tanto comprende al menos un epítipo de linfocitos T como se
45 determina por técnicas de biología de linfocitos T se modifica mediante la adición o supresión de restos de aminoácidos en el extremo amino o carboxilo terminal del péptido y se ensaya 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 nativa tienen actividad estimulante de linfocitos T humanos, como se determina por técnicas de biología de linfocitos T, pueden producirse péptidos adicionales que comprenden todos o
50 una parte de dichos péptidos y estos péptidos adicionales pueden ensayarse por un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, los péptidos se seleccionan y producen de forma recombinante o sintética. Los epítipos o péptidos de linfocitos T se seleccionan basándose en diversos factores, incluyendo la fuerza de la respuesta de linfocitos T al péptido/epítipo (por ejemplo, índice de estimulación) y la frecuencia de la respuesta de linfocitos T al péptido en una población de individuos.

55 Adicionalmente y/o como alternativa, pueden usarse uno o más algoritmos *in vitro* para identificar una secuencia de epítipo de linfocitos T dentro de una proteína antigénica. Los algoritmos adecuados incluyen, pero sin limitación, los hallados en los siguientes sitios web:

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

- [http://www.imtech.res.in/raghava/mhcbn/;](http://www.imtech.res.in/raghava/mhcbn/)
- <http://www.syfpeithi.de/home.htm;>
- <http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC;>
- <http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html;>
- [http://www.jenner.ac.uk/MHCPred/.](http://www.jenner.ac.uk/MHCPred/)

Más particularmente, dichos algoritmos permiten la predicción dentro de una proteína antigénica de una o más secuencias nonapeptídicas que se ajustarán al surco de una molécula del MHC II.

Los péptidos de la presente invención pueden generarse usando técnicas de ADN recombinante, en células de bacterias, levadura, insectos, células vegetales o células de mamífero. A la vista de la longitud limitada de los péptidos, estos pueden prepararse por síntesis química de péptidos, en la que los péptidos se preparan por acoplamiento de los diferentes aminoácidos entre sí. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión de, por ejemplo, D-aminoácidos, aminoácidos con cadenas laterales de origen no natural o aminoácidos naturales con cadenas laterales modificadas tales como cisteína metilada.

Están bien descritos procedimientos de síntesis química de péptidos y los péptidos pueden pedirse de compañías tales como Applied Biosystems y otras compañías.

Pueden realizarse síntesis de péptidos como síntesis de péptidos de fase sólida (SPPS) o por el contrario síntesis de péptidos en fase de solución. Los procedimientos de SPPS mejor conocidos son t-Boc y química de fase sólida de Fmoc:

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

Los péptidos pueden ligarse entre sí para formar péptidos más largos usando una estrategia de ligamiento (acoplamiento quimioselectivo de dos fragmentos peptídicos desprotegidos) como se ha descrito originalmente en Kent (Schmolzer y Kent (1992) Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180-193) y se revisa por ejemplo en Tam y col. (2001) Biopolymers 60, 194-205 que proporciona un enorme potencial de conseguir síntesis de proteínas que está más allá del alcance de SPPS. Se han sintetizado muchas proteínas con un tamaño de 100-300 restos con éxito por este procedimiento. Los péptidos sintéticos han continuado desempeñando un papel crucial cada vez mayor en los campos de investigación de bioquímica, farmacología, neurobiología, enzimología y biología molecular debido a los enormes avances en la SPPS.

Como alternativa, los péptidos pueden sintetizarse usando moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos de la presente invención en un vector de expresión apropiado que incluye las secuencias de nucleótidos codificantes. Dichas moléculas de ADN pueden prepararse fácilmente usando un sintetizador de ADN automático y la relación de codón-aminoácido bien conocida del código genético. Dicha molécula de ADN también puede obtenerse como ADN genómico o como ADNc usando sondas oligonucleotídicas y metodologías de hibridación convencionales. Dichas moléculas de ADN pueden incorporarse en vectores de expresión, incluyendo plásmidos, que se adaptan para la expresión del ADN y producción del polipéptido en un hospedador adecuado tal como 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/supresión de grupos funcionales) usando técnicas conocidas en este campo.

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

Sin embargo, tras la administración de los péptidos de acuerdo con la invención (que comprenden un epítomo de linfocitos T acoplado a una secuencia redox) o composiciones de los mismos, se cree que se producen los siguientes acontecimientos:

- activación de linfocitos T específicos de antígeno (es decir alérgeno o autoantígeno) resultante de la interacción

afín con el péptido derivado de antígeno (es decir alérgeno o autoantígeno) presentado por moléculas del MHC de clase II;

- la secuencia consenso de reductasa reduce proteínas de superficie de linfocitos T, tales como la molécula CD4 (y también CD3), cuyo segundo dominio contiene un enlace disulfuro restringido. Esto transduce una señal a linfocitos T. Entre una serie de consecuencias relacionadas con la ruta oxidativa aumentada, son acontecimientos importantes el aumento del flujo de entrada de calcio y la translocación del factor de transcripción NF-κB al núcleo. Esto último da como resultado el aumento de la transcripción de IFN gamma y granzimas, lo que permite que las células adquieran propiedades citotóxicas;
- la citotoxicidad afecta a células que presentan el péptido por un mecanismo, que implica secreción de granzima B, e interacciones Fas-FasL. La destrucción de las células diana presentadoras de antígenos evita la activación de otros linfocitos T específicos para epítopos localizados en el mismo antígeno, o para un antígeno no relacionado que se procesaría por la misma célula presentadora de antígenos;
- una consecuencia adicional de la activación de linfocitos T es suprimir la activación de linfocitos T testigos por un mecanismo dependiente del contacto célula-célula. En tal caso, los linfocitos T activados por un antígeno presentado por una célula presentadora de antígenos diferente también se suprimen siempre que los linfocitos T tanto citotóxicos como testigos estén en proximidad estrecha.

El mecanismo de acción anteriormente postulado está fundamentado en datos experimentales (véase ejemplos anteriores). Algunos experimentos también han sugerido, además, la implicación de la ruta de la perforina y/o la activación de la indoleamina oxidasa en células diana, lo que da como resultado aumento del catabolismo de triptófano, un aminoácido esencial para supervivencia celular, así como la producción de micropartículas por Treg activados.

Los experimentos en modelos *in vivo* descritos posteriormente han demostrado que la administración (es decir inyección) de un péptido de acuerdo con la invención o una composición del mismo puede prevenir o suprimir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Como ejemplo, en un modelo de ratón de asma debido a la sensibilización de un alérgeno, Der p 2, la preinmunización con un péptido de acuerdo con la invención descrito anteriormente evita la infiltración de células inflamatorias de pulmón, que es una característica del asma. La hiperreactividad de las vías respiratorias no específica, como se mide por inhalación de dosis creciente de metacolina, se previene esencialmente por el mismo protocolo experimental. También se previene completamente la migración de células al fluido broncoalveolar (véase ejemplo 4). Además, la transferencia adoptiva de clones de linfocitos T (derivados de animales inmunizados con la composición) previene y suprime completamente tanto la infiltración de células inflamatorias como la hiperreactividad de las vías respiratorias en receptores. Dichos clones de linfocitos T que son inducidos por la administración de los péptidos de acuerdo con la invención presentan varias características fenotípicas, que los hacen distintos de los Treg actualmente identificados, bien Treg naturales o bien Treg adaptativos. Por lo tanto, los Treg citotóxicos muestran aumento de la expresión de marcadores de superficie incluyendo CD103, CTLA-4, FasL e ICOS (tras la activación). Son CD25^{alto} incluso en reposo y CD127^{bajo} (IL7-R). La expresión del factor de transcripción incluye T bet pero no el represor de la transcripción Foxp3, considerado como un distintivo de los Treg naturales. Aparte de la alta producción de IFN gamma, dichos clones no secretan o secretan solamente cantidades traza de IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 o TGF beta. Las características anteriores no son exclusivas, sino que se proporcionan como una ilustración del hecho de que dichos Treg citotóxicos son distinguibles de otros Treg conocidos.

En consecuencia, en un aspecto adicional más, la presente invención proporciona procedimientos para generar Treg citotóxicos específicos de antígeno bien *in vivo* o bien *in vitro* e, independientemente de los mismos, procedimientos para diferenciar Treg citotóxicos de otros Treg basándose en los datos de expresión característicos anteriormente descritos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a procedimientos *in vivo* para la producción de los Treg específicos de antígeno de la invención. Una realización particular se refiere al procedimiento para producir o aislar dichos Treg inmunizando animales (incluyendo seres humanos) con los péptidos de la invención como se describe en el presente documento y después aislando los Treg de dichos animales inmunizados. Se describen procedimientos más detallados en la sección de Ejemplos del presente documento y son parte de la invención.

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

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

5 En una realización, se proporcionan procedimientos que comprenden el aislamiento de células sanguíneas periféricas, la estimulación de la población celular *in vitro* por un péptido inmunogénico de acuerdo con la invención y la expansión de la población celular estimulada, más particularmente en presencia de IL-2. Los procedimientos de acuerdo con la invención tienen la ventaja de que se producen números mayores de Treg y que pueden generarse los Treg que son específicos para la proteína antigénica (usando un péptido que comprende un epítipo específico de antígeno).

10 En una realización alternativa, los Treg pueden generarse *in vivo*, es decir, mediante la inyección de los péptidos inmunogénicos descritos en el presente documento a un sujeto, y la recogida de los Treg generados *in vivo*.

Los linfocitos T reguladores específicos de antígeno que pueden obtenerse por los procedimientos de la presente invención son particularmente interesantes para la administración a mamíferos para inmunoterapia, en la prevención de reacciones alérgicas y en el tratamiento de recaídas en enfermedades autoinmunitarias. Se prevén tanto el uso de células alogénicas como el uso de células autógenas.

15 En consecuencia, un aspecto de la presente invención proporciona poblaciones de Treg citotóxicas caracterizadas como se describe posteriormente en el presente documento. Más particularmente, las poblaciones de poblaciones de Treg de la presente invención se obtienen por los procedimientos descritos en el presente documento.

20 En consecuencia, la presente invención proporciona Treg específicos de antígeno con propiedades citotóxicas de acuerdo con la invención para su uso 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 autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple. La presente invención también se refiere al uso de dichos Treg aislados o poblaciones de linfocitos Treg generados como se describe en el presente documento, más particularmente poblaciones de linfocitos Treg específicos de antígeno generadas como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de trastornos inmunitarios. De forma similar, la invención se refiere a procedimientos de tratamiento mediante el uso de dichos Treg aislados o población de Treg generada.

30 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona procedimientos para diferenciar linfocitos Treg citotóxicos de otros linfocitos Treg basándose en características de expresión de las células. Más particularmente, los procedimientos de acuerdo con la invención comprenden determinar si la población de linfocitos Treg demuestra una o más de las siguientes características en comparación con una población de linfocitos Treg no citotóxicos:

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

40 Más particularmente, los procedimientos de la presente invención comprenden determinar que las células expresan CD4, que no expresan IL-10 o TGF-beta, que expresan Krox-20 y producen granzimas y ligando de Fas. Más particularmente estas células se seleccionan adicionalmente de forma funcional como células que no responden a la activación por reconocimiento de TCR. En realizaciones particulares adicionales, los procedimientos abarcan determinar todas las características descritas anteriormente.

45 Durante los últimos años se ha realizado un gran progreso en la caracterización de linfocitos T reguladores (Treg) en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Más particularmente, se ha analizado el potencial del uso de Treg para la terapia de algunas enfermedades. La presente invención se refiere al desarrollo de un subconjunto de nueva definición de Treg adoptivos específicos de antígeno que difiere de los Treg previamente indicados por el procedimiento usado para inducción *in vitro* o *in vivo* y por propiedades específicas. Los Treg pertenecen a dos categorías amplias, es decir Treg naturales y Treg inducidos (o adaptativos). Los Treg naturales se han descrito por primera vez en el ratón en 1995, y se definen como un subconjunto de linfocitos T CD4+ seleccionados de forma activa en el timo. Dichas células se caracterizan por la expresión de varios marcadores de superficie, incluyendo CD25 en células en reposo, GITR, CTLA-4 y LAG-3. Más recientemente, los Treg naturales se han definido adicionalmente por la falta de expresión de CD127 (IL-7R). El represor de la transcripción Foxp3 desempeña un papel determinante en la selección de Treg naturales. Las mutaciones de Foxp3 dan como resultado la ausencia de Treg naturales, con una desregulación inmunitaria ligada a X con poliendocrinopatía, enteropatía, manifestaciones atópicas e infecciones letales. Dichos Treg naturales suprimen diversos procesos inflamatorios incluyendo síndromes gastrointestinales. A nivel molecular, Foxp3 se combina con el factor de transcripción de NFAT en competición con AP1, y de este modo regula la transcripción de varias citocinas. El mecanismo de acción de Treg naturales se está sometiendo a un escrutinio intenso. *In vitro*, dichas células producen IL-10 y TGF-beta. *In vivo*, sin

embargo, la neutralización de IL-10 y/o TGF-b no supera la supresión, lo que indica que están actuando otros mecanismos. *In vitro*, los Treg naturales suprimen una respuesta adaptativa de una manera dependiente de contacto celular. Resulta interesante que los Treg naturales expresan granzimas proteasas tales como granzima A (GZ-A) y granzima B (GZ-B). Aunque aún es controvertido, un mecanismo adicional o alternativo de acción para Treg naturales parece basarse en su capacidad para lisar células diana por exocitosis de granzimas. Los Treg deficientes en GZ-B pierden parcialmente su capacidad para suprimir la respuesta inmunitaria. Los Treg adaptativos constituyen una familia heterogénea de linfocitos T que tienen en común que son específicos de antígeno, que ejercen una actividad supresora en linfocitos T testigos y que son inducidos en la periferia. Los linfocitos Th3 se producen principalmente por administración oral de antígeno y se encuentran en ganglios linfáticos mesentéricos. Dichas células ejercen su actividad supresora produciendo altos niveles de TGF-beta con cantidades variables de IL-4 e IL-10. Los linfocitos Tr1 producen altas concentraciones de IL-10 y cantidades variantes de TGF-beta. Estos se inducen *in vitro* por la exposición de linfocitos T CD4+ sin tratamiento previo a altas concentraciones de IL-10 o activación combinada mediante anticuerpos anti CD3 y anti CD46. No se ha establecido la relación precisa entre linfocitos Th3 y Tr1, en ausencia de marcadores fenotípicos específicos. No solamente parece existir un solapamiento entre estos dos Treg adaptativos, sino que también se definen probablemente subconjuntos adicionales en los próximos años. Los Treg adaptativos no expresan el factor represor Foxp3. Aparte de la producción de citocinas supresoras tales como IL-10 y/o TGF-beta, se ha indicado que pueden inducirse linfocitos T CD4+CD25(-) para expresar granzimas, principalmente GZ-B, por estimulación de anticuerpos anti CD3 y anti CD46. No resulta evidente si estos Treg inducidos *in vitro*, no específicos, ejercen una actividad citotóxica debido a la secreción de granzimas. Los péptidos de la invención inducirán, tras su administración a un animal vivo, típicamente un ser humano, linfocitos T específicos que ejercen una actividad supresora en linfocitos T testigos. Los péptidos activan aparentemente el metabolismo oxidativo de linfocitos T tras interacción afín y reducen el enlace disulfuro restringido del segundo dominio extracelular de la molécula CD4.

Este mecanismo también implica y los resultados experimentales muestran que los péptidos de la invención, aunque comprenden un epítipo de linfocitos T específico de un cierto antígeno, pueden usarse para la prevención o el tratamiento de trastornos inducidos por una reacción inmunitaria contra otros epítipos de linfocitos T del mismo antígeno o en ciertas circunstancias incluso para el tratamiento de trastornos inducidos por una reacción inmunitaria contra otros epítipos de linfocitos T de otros antígenos diferentes si se presentaran mediante el mismo mecanismo por moléculas del MHC de clase II cerca de linfocitos T activados por péptidos de la invención.

Un aspecto particular adicional de la presente invención se refiere por lo tanto a un tipo celular, que son linfocitos T, más en particular Treg o linfocitos T supresores, caracterizado porque expresan CD4, que no expresan IL-10 o TGF-beta (mientras que otros linfocitos T adaptativos producen IL-10 y/o TGF beta), que expresan Krox-20 y producen granzimas y ligando de Fas. Más particularmente estas células se seleccionan adicionalmente de forma funcional como células que no responden a la activación mediante reconocimiento por TCR. Más particularmente, se proporcionan en el presente documento poblaciones del tipo celular Treg que tienen las características descritas en el presente documento, por el que la respuesta anérgica es específica de antígeno.

En realizaciones particulares adicionales, los linfocitos Treg de la invención se caracterizan porque tienen:

- expresión de CD25, CD4, ICOS, CTLA-4, GITR, y no tienen expresión de CD127 (IL7-R), expresión del factor de transcripción T-bet y egr-2 (Krox-20) pero no de Foxp3,
- una expresión aumentada de marcadores incluyendo FasL y granzimas (B y C) tras su activación,
- una alta producción de IFN-gamma.

En una realización particular adicional la invención proporciona un tipo celular, que son linfocitos T, más en particular Treg o linfocitos T supresores, caracterizado porque tiene:

- expresión de CD25, CD4, ICOS, CTLA-4, GITR y no tiene expresión de CD127 (IL7-R), expresión del factor de transcripción T-bet y egr-2 (Krox-20) pero no de Foxp3,
- una expresión aumentada de marcadores incluyendo FasL y granzimas (B y C) tras su activación,
- una alta producción de IFN-gamma.

Más particularmente los linfocitos Treg o poblaciones celulares de la invención se caracterizan por que tienen:

- una expresión aumentada de marcadores de superficie incluyendo CD103, CTLA-4, FasL e ICOS tras su activación,
- alta expresión de CD25, mientras que otros linfocitos T adaptativos son CD25 negativos, expresión de CD4, ICOS, CTLA-4, GITR y expresión baja o nula de CD127 (IL7-R),
- expresión del factor de transcripción T-bet y egr-2 (Krox-20) pero no del represor de la transcripción Foxp3, mientras que otros linfocitos T adaptativos son Foxp3 positivos,
- una alta producción de IFN-gamma y ninguna cantidad o solamente cantidades traza de IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 o TGF-beta,
- una expresión aumentada de marcadores incluyendo FasL y granzimas (B y C) tras su activación.

Más particularmente, la presente invención proporciona poblaciones de células aisladas del tipo celular que tiene las

características descritas anteriormente, que, además, son específicas de antígeno, es decir, capaces de suprimir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. En consecuencia, la presente invención proporciona linfocitos Treg específicos de antígeno aislados, caracterizados como se ha descrito anteriormente. Más particularmente la presente invención proporciona linfocitos Treg específicos de antígeno distintos de los inducidos por Der p 2.

5 Los péptidos de acuerdo con la invención, 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 invención también incluye el uso de ácidos nucleicos que codifican o expresan péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención.

10 En consecuencia, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican los péptidos de la presente invención y procedimientos para su uso.

Dentro del contexto de la presente invención se prevén diferentes procedimientos para conseguir, por medio de terapia génica, niveles de péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención en un mamífero *in vivo*.

15 Pueden usarse moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican secuencias de proteínas como ADN desnudo o en liposomas u otros sistemas lipídicos para el suministro a células diana. Los expertos en la materia conocen bien otros procedimientos para la transferencia directa de ADN plasmídico a células para su uso en terapia génica humana e implican la dirección del ADN a receptores en células formando complejo del ADN plasmídico con proteínas. En su forma más sencilla, la transferencia génica puede realizarse simplemente inyectando cantidades mínimas de ADN al núcleo de una célula, mediante un proceso de microinyección. Una vez que se han introducido genes recombinantes en una célula, estos pueden ser reconocidos por los mecanismos normales de las células para transcripción y traducción, y se expresará un producto génico. También se han intentado otros procedimientos para introducir ADN en mayores números de células. Estos procedimientos incluyen: transfección, en la que se precipita el ADN con fosfato cálcico y se capta en células por pinocitosis; electroporación, en la que se exponen células a pulsos de alta tensión para introducir agujeros en la membrana; lipofección/fusión de liposomas, en la que se empaqueta ADN en vesículas lipófilas que se fusionan con una célula diana; y bombardeo de partículas usando ADN unido a proyectiles pequeños. Otro procedimiento para introducir ADN en células es acoplar el ADN a proteínas modificadas químicamente. Las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar endosomas y potenciar la captación de ADN en células. La mezcla de adenovirus con soluciones que contienen complejos de ADN, o la unión de ADN con polilisina unida covalentemente a adenovirus usando agentes de reticulación de proteínas mejora sustancialmente la captación y expresión del gen recombinante. También pueden usarse vectores de virus adenoasociados para el suministro génico a células vasculares. Como se usa en el presente documento, "transferencia génica" significa el proceso de introducir una molécula de ácido nucleico ajena en una célula, que se realiza habitualmente para permitir la expresión de un producto particular codificado por el gen. Dicho producto puede incluir una proteína, un polipéptido, ADN o ARN antisentido o ARN enzimáticamente activo. Puede realizarse transferencia génica en células cultivadas o mediante administración directa a mamíferos.

40 En otra realización, se proporciona un vector que comprende una secuencia de molécula de ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la invención. En realizaciones particulares, el vector se genera de modo que la secuencia de molécula de ácido nucleico se exprese solamente en un tejido específico. Se conocen bien en la técnica procedimientos para conseguir expresión génica específica de tejido. De acuerdo con una realización, esto se consigue 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.

45 Pueden usarse vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus de ARN o virus del papiloma bovino, para suministro de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, ADNc) que codifican péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención a los tejidos diana o la población celular. Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores víricos recombinantes que contienen dichas secuencias codificantes.

50 En consecuencia, la presente invención desvela el uso de un ácido nucleico que es capaz de expresar los péptidos de la invención, *in vivo*, para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades alérgicas y autoinmunitarias. De acuerdo con una realización, el ácido nucleico capaz de expresar un péptido de acuerdo con la invención *in vivo* es una secuencia que codifica dicho péptido, que está unida operativamente con un promotor. Dicha 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 puede insertarse en células, después de lo cual dichas células se cultivan *in vitro* y después se inyectan o infunden en el paciente. Como alternativa el ácido nucleico capaz de expresar un péptido de acuerdo con la invención *in vivo* es una secuencia que modifica la expresión endógena de las células. El procedimiento de terapia génica puede implicar el uso de un vector adenovírico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica 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 modificadas técnicamente que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la invención.

5 Cuando la administración de uno o más péptidos de acuerdo con la invención se asegura mediante transferencia génica (es decir la administración de un ácido nucleico que asegura la expresión de péptidos de acuerdo con la invención *in vivo* tras su administración), la dosificación apropiada del ácido nucleico puede determinarse basándose en la cantidad de péptido expresado como resultado del ácido nucleico, tal como por ejemplo determinando la concentración de péptido en la sangre después de la administración. Por lo tanto, en una realización particular, los péptidos de la invención se administran mediante el uso de polinucleótidos que codifican dichos péptidos, bien en un vector de expresión o no y por lo tanto la presente invención 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 la prevención de trastornos inmunitarios.

10 Otro aspecto más de la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más péptidos de acuerdo con la presente invención, que comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se ha detallado anteriormente, la presente invención también se refiere a las composiciones para su uso como una medicina o a procedimientos para tratar un trastorno inmunitario en un mamífero usando dicha composición y al uso de dichas composiciones para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de trastornos inmunitarios.

15 La composición farmacéutica podría ser por ejemplo una vacuna adecuada para tratar o prevenir trastornos inmunitarios, especialmente alergia portada por el aire y portada por alimentos, así como enfermedades de origen alérgico. Como ejemplo descrito adicionalmente en el presente documento de una composición farmacéutica, un péptido de acuerdo con la invención se adsorbe en un adyuvante adecuado para administración a mamíferos, tal como hidróxido de aluminio (alumbre). Típicamente, se inyectan 50 µg del péptido adsorbido en alumbre por la vía subcutánea en 3 ocasiones en un intervalo de 2 semanas. Debería ser evidente para los expertos en la materia 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 para tratar. Además, pueden usarse otros adyuvantes distintos de alumbre, siempre que faciliten la presentación de péptidos en presentación del MHC de clase II y la activación de linfocitos T. Por lo tanto, aunque es posible administrar los principios activos solos, estos se presentan típicamente como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, tanto para uso veterinario como para uso humano, de la presente invención comprenden al menos un principio activo, como se ha descrito anteriormente, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Una realización particular de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, que comprenden, como un principio activo, uno o más péptidos de acuerdo con la invención, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención debería comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo, tal como se indica posteriormente en el presente documento con respecto al procedimiento de tratamiento o prevención. Opcionalmente, la composición comprende además otros ingredientes terapéuticos. Los expertos en la materia conocen bien otros ingredientes terapéuticos adecuados, así como su dosificación habitual dependiendo de la clase a la que pertenezcan, y pueden seleccionarse de otros fármacos conocidos usados para tratar trastornos inmunitarios.

20 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa cualquier material o sustancia con el que un principio activo se formula para facilitar su aplicación o diseminación al lugar para tratar, por ejemplo disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición y/o para facilitar su almacenamiento, transporte o manipulación sin alterar su eficacia. Estos incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro sódico) y similares. Pueden incluirse ingredientes adicionales para controlar la duración de acción del principio activo del anticuerpo monoclonal en la composición. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que se ha comprimido para formar un líquido, es decir las composiciones de la presente invención pueden usarse convenientemente como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos finos, pulverizaciones, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, microgránulos o polvos. Los expertos en la materia conocen bien vehículos farmacéuticos adecuados para su uso en dichas composiciones farmacéuticas y su formulación, y no hay ninguna restricción particular para su selección dentro de la presente invención. También pueden incluir aditivos tales como agentes humectantes, agentes de dispersión, adherentes, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro sódico) y similares, siempre que estos sean coherentes con la práctica farmacéutica, es decir vehículos y aditivos que no creen daño permanente a los mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de cualquier manera conocida, por ejemplo mezclando de forma homogénea, revistiendo y/o moliendo los principios activos, en un procedimiento de una etapa o multietapa, con el material vehículo seleccionado y, cuando sea apropiado, los otros aditivos tales como agentes tensioactivos. También pueden prepararse por micronización, por ejemplo para obtenerlos en forma de microesferas que tengan habitualmente un diámetro de aproximadamente 1 a 10 µm, concretamente para la fabricación de microcápsulas para liberación controlada o sostenida de los principios activos.

50 Son agentes tensioactivos adecuados, también conocidos como emulgentes o emulsionantes, para usar en las composiciones farmacéuticas de la presente invención materiales no iónicos, catiónicos y/o aniónicos que tengan buenas propiedades emulsionantes, de dispersión y/o humectantes. Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen jabones solubles en agua y agentes tensioactivos sintéticos solubles en agua. Son jabones adecuados sales de

metales alcalinos o alcalinotérreos, sales de amonio no sustituidas o sustituidas de ácidos grasos superiores (C₁₀-C₂₂), por ejemplo las sales de sodio o potasio de ácido oleico o esteárico, o de mezclas de ácidos grasos naturales que pueden obtenerse de aceite de coco o aceite de sebo. Los tensioactivos sintéticos incluyen sales de sodio o calcio de ácidos poliacrílicos; sulfonatos y sulfatos grasos; derivados de bencimidazol sulfonado y alquilarilsulfonatos. Los sulfonatos o sulfatos grasos están habitualmente en forma de sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, sales de amonio no sustituidas o sales de amonio sustituidas con un radical de alquilo o acilo que tiene de 8 a 22 átomos de carbono, por ejemplo la sal de sodio o calcio de ácido lignosulfónico o ácido dodecilsulfónico o una mezcla de sulfatos de alcohol graso obtenidos de ácidos grasos naturales, sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de ésteres de ácido sulfúrico o sulfónico (tales como lauril sulfato sódico) y ácidos sulfónicos de aductos de óxido de etileno/alcohol graso. Los derivados de bencimidazol sulfonado adecuados típicamente contienen de 8 a 22 átomos de carbono. Son ejemplos de alquilarilsulfonatos las sales de sodio, calcio o alcanolamina de ácido dodecilsulfónico o ácido dibutilnaftalenosulfónico o un producto de condensación de ácido naftaleno 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. Son fosfolípidos adecuados para este fin los fosfolípidos naturales (que se originan de células animales o vegetales) o sintéticos del tipo cefalina o lecitina tales como por ejemplo fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, lisolecitina, cardiolipina, dioctanilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y sus mezclas.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen derivados polietoxilados y polipropoxilados de alquilfenoles, alcoholes grasos, ácidos grasos, aminas o amidas alifáticas que contienen al menos 12 átomos de carbono en la molécula, alquilarensulfonatos y dialquilsulfosuccinatos, tales como derivados de poliglicoléter de alcoholes alifáticos y cicloalifáticos, ácidos grasos saturados e insaturados y alquilfenoles, conteniendo dichos derivados típicamente de 3 a 10 grupos de glicol éter y de 8 a 20 átomos de carbono en el resto de hidrocarburo (alifático) y de 6 a 18 átomos de carbono en el resto de alquilo del alquilfenol. Son tensioactivos no iónicos adecuados adicionales aductos solubles en agua de óxido de polietileno con polipropilenglicol, etilendiaminopolipropilenglicol que contiene de 1 a 10 átomos de carbono en la cadena de alquilo, cuyos aductos contienen de 20 a 250 grupos de etilenglicoléter y/o de 10 a 100 grupos de propilenglicoléter. Dichos compuestos contienen habitualmente de 1 a 5 unidades de etilenglicol por unidad de propilenglicol. Son ejemplos representativos de tensioactivos no iónicos nonilfenol-polietoxietanol, éteres poliglicólicos de aceite de ricino, aductos de óxido de polipropileno/polietileno, tributilfenoxipolietoxietanol, polietilenglicol y octilfenoxipolietoxietanol. Los ésteres de ácidos grasos de polietilensorbitán (tales como polioxietilensorbitán trioleato), glicerol, sorbitán, sacarosa y pentaeritrol también son tensioactivos no iónicos adecuados. Los tensioactivos catiónicos adecuados incluyen sales de amonio cuaternario, particularmente haluros, que tienen 4 radicales de hidrocarburo opcionalmente sustituidos con halo, fenilo, fenilo sustituido o hidroxilo; por ejemplo sales de amonio cuaternario que contienen como sustituyente N al menos un radical de alquilo C₈C₂₂ (por ejemplo cetilo, laurilo, palmitilo, miristilo, oleilo y similares) y, como sustituyentes adicionales, alquilo inferior no sustituido o halogenado, bencilo y/o radicales de hidroxialquilo inferior.

Puede encontrarse una descripción más detallada de agentes tensioactivos adecuados para este fin por ejemplo en "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual" (MC Publishing Crop., Ridgewood, Nueva Jersey, 1981), "Tensid-Taschenbuch", 2ª ed. (Hanser Verlag, Viena, 1981) y "Encyclopaedia of Surfactants, (Chemical Publishing Co., Nueva York, 1981). Pueden administrarse péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención (y sus sales o composiciones farmacéuticas fisiológicamente aceptables todas incluidas en la expresión "principios activos") mediante cualquier vía apropiada para la afección para tratar y apropiada para los compuestos, aquí las proteínas y fragmentos para administrar. Las vías posibles incluyen regional, sistémica, oral (forma sólida o de inhalación), rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural). La vía preferida de administración puede variar según por ejemplo la afección del receptor o las enfermedades para tratar. Como se describe en el presente documento, el vehículo o los vehículos son óptimamente "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no deletéreos para el receptor de los mismos. Las formulaciones incluyen las 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 pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Dichos procedimientos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general las formulaciones se preparan poniendo de forma uniforme e íntimamente en asociación el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, moldeando el producto. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, obleas o comprimidos que contienen cada una una cantidad predeterminada del principio 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 principio activo también puede presentarse como una embolada, un electuario o una pasta. Puede prepararse un comprimido por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes adyuvantes. Pueden prepararse comprimidos en forma comprimida comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma que fluye libremente tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Pueden prepararse comprimidos moldeados moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecida con un diluyente

líquido inerte. Los comprimidos pueden estar opcionalmente revestidos o ranurados y pueden formularse de modo que proporcionen liberación lenta o controlada del principio activo en los mismos.

5 Para tratamientos locales por ejemplo en la piel, tal como de la articulación, las formulaciones se aplican opcionalmente como una pomada tópica o crema que contiene el principio o los principios activos en una cantidad de, por ejemplo, 0,075 a 20 % p/p (incluyendo principio o principios activos en un intervalo entre 0,1 % y 20 % en incrementos de 0,1 % p/p tales como 0,6 % p/p, 0,7 % p/p, etc.), particularmente de 0,2 a 15 % p/p y más particularmente de 0,5 a 10 % p/p. Cuando se formulan en una pomada, los principios activos pueden emplearse con una base de pomada parafínica o una miscible en agua. Como alternativa, los principios 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 30 % p/p de un alcohol polihídrico, 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 convenientemente un compuesto que potencie la absorción o penetración del principio activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados. La fase oleosa de las emulsiones de la presente invención puede constituirse a partir de ingredientes conocidos de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender únicamente un emulsionante (conocido de otro modo como un emulgente), convenientemente comprende una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como con un aceite. Opcionalmente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como un estabilizador, típicamente incluyendo tanto un aceite como una grasa. Juntos, el emulsionante o emulsionantes con o sin estabilizador o estabilizadores componen la denominada cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa componen la denominada base de pomada emulsionante que forma la fase dispersada oleosa de las formulaciones de crema.

La elección de aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en la consecución de las propiedades cosméticas deseadas, ya que la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de aceites probablemente usado en formulaciones de emulsiones farmacéuticas es muy baja. Por lo tanto la crema debería opcionalmente ser un producto no graso, que no manche y lavable con consistencia adecuada para evitar la fuga de tubos u otros recipientes. Pueden usarse alquilésteres mono o dibásicos de cadena sencilla o ramificada tales como diisoadipato, isocetil estearato, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, isopropil miristato, decil oleato, isopropil palmitato y particularmente butil estearato, 2-etilhexil palmitato o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocidos como Crodamol CAP. Estos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Como alternativa, pueden usarse lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales. Las formulaciones adecuadas para administración tópica al ojo también incluyen colirios en los que el principio activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el principio activo. El principio activo está opcionalmente presente en dichas formulaciones en una concentración de 0,5 a 20 %, provechosamente de 0,5 a 10 % particularmente aproximadamente de 1,5 % p/p. Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o de tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y colutorios que comprenden el principio activo en un vehículo 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 micrómetros (incluyendo tamaños de partículas en un intervalo entre 20 y 500 micrómetros en incrementos de 5 micrómetros tales como 30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.), que se administra de la misma manera en que se toma el rapé, es decir mediante inhalación rápida a través del orificio nasal de 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, una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo. Pueden prepararse formulaciones adecuadas para administración oral de acuerdo con procedimientos convencionales y pueden suministrarse con otros agentes terapéuticos. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverización que contienen además del principio activo vehículos tales como los que se conocen en la técnica que son apropiados. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas 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 (criodesecada) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito.

60 Son formulaciones de dosificación unitaria típicas las que contienen una dosis diaria o subdosis diaria unitaria, como se ha indicado anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de las mismas, de un principio activo. Debería entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en

cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo las adecuadas para administración oral pueden incluir agentes
 saporíferos. Pueden usarse péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención para
 proporcionar formulaciones farmacéuticas de liberación controlada que contienen como principio activo uno o más
 compuestos de la invención ("formulaciones de liberación controlada") en los que la liberación del principio activo
 5 puede controlarse y regularse para permitir dosificación de menor frecuencia o para mejorar el perfil de
 farmacocinética o toxicidad de un compuesto dado de la invención. Pueden prepararse formulaciones de liberación
 controlada adaptadas para administración oral en las que unidades discretas comprenden uno o más compuestos de
 la invención de acuerdo con procedimientos convencionales. Pueden incluirse ingredientes adicionales para
 controlar la duración de acción del principio activo en la composición. Pueden conseguirse de este modo
 10 composiciones de liberación controlada seleccionando vehículos poliméricos apropiados tales como por ejemplo
 poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, copolímeros de etileno-vinilacetato, metilcelulosa,
 carboximetilcelulosa, sulfato de protamina y similares. La tasa de liberación de fármaco y duración de acción también
 pueden controlarse incorporando el principio activo en partículas, por ejemplo microcápsulas, de una sustancia
 polimérica tal como hidrogeles, ácido poliláctico, hidroximetilcelulosa, polimetil metacrilato y los otros polímeros
 15 anteriormente descritos. Dichos procedimientos incluyen sistemas de suministro de fármacos coloidales como
 liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas y así sucesivamente. 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 la preparación extemporánea de las mismas. Los vehículos típicos para este fin incluyen por lo tanto tampones
 20 acuosos biocompatibles, etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares y mezclas de los mismos. A la vista
 del hecho de que, cuando se usan varios principios activos en combinación, no aportan necesariamente su efecto
 terapéutico conjunto directamente en el mismo momento en el mamífero para tratar, la composición correspondiente
 también puede estar en forma de un kit o envase médico que contenga los dos ingredientes en depósitos o
 compartimentos separados pero adyacentes. En este último contexto, cada principio activo puede formularse por lo
 25 tanto de una manera adecuada para una vía 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.

La parte experimental de la presente invención muestra un subconjunto de linfocitos T específicos de antígeno,
 inducidos *in vivo* y fáciles de expandir con propiedades reguladoras. Estos últimos incluyen: (1) inducción de
 apoptosis de APC después de activación afin dependiente del MHC de clase II, que afecta tanto a células
 dendríticas como a linfocitos B, y demostrada *in vitro* e *in vivo*, y; (2) supresión de linfocitos T testigos por
 mecanismo dependiente de contacto en ausencia de IL-10 y/o TGF- β . La presente invención desvela además
 procedimientos para distinguir Treg citolíticos inducidos de Treg tanto naturales como adaptativos. Basándose en la
 caracterización de 15 clones, el fenotipo de superficie se define como CD25^{hi}, CTLA-4^{hi}, GITR⁺ e ICOS⁺, pero
 35 CD127⁽⁻⁾. Dichos clones expresan bajos niveles de CD62L y CD103 pero no CCR7. La producción de citocinas se
 limitó a IFN-gamma, sin TGF-beta o IL-10. Todos los clones fueron Foxp3⁽⁻⁾ pero fuertemente positivos para T-bet y
 Egr-2, junto con altos niveles de transcrito para la granzima B. Los Treg naturales se definen por la expresión de
 Foxp3 y ausencia de CD127, producen altos niveles de IL-10, al menos *in vitro*, y son específicos para
 autoantígenos. Entre los numerosos linfocitos T adaptativos descritos hasta la fecha, la mayoría comparten la
 producción de IL-10 (y TGF-beta en algunos casos tales como en linfocitos Th3) y son Foxp3 y CD25 negativos. Es
 40 central para Treg citolíticos la fuerte expresión de T-bet. T-bet se induce por IFN- γ mediante una ruta dependiente de
 STAT1 y ejerce diferentes actividades, incluyendo supresión de la transcripción de IL-2, inducción de transcripción
 de granzima y es un factor de maduración para diferenciación de Th1.

No se descubrió ningún transcrito para IL-2 en los clones de linfocitos T de la presente invención y resulta
 interesante que IL-2 exógena no restauró la transcripción de IL-2, incluso después de ciclos de estimulación
 repetidos *in vitro*. Esto sugiere que los Treg citolíticos han experimentado una alteración epigenética, que
 mantendría su actividad reguladora tanto *in vitro* como *in vivo*. Aunque se requiere T-bet para la maduración del
 subconjunto de Th1, su expresión no clasifica necesariamente las células como pertenecientes a dicho linaje. La
 inducción de granzima B por T-bet se ha observado con linfocitos T citolíticos CD8⁺. Los Treg descritos en el
 50 presente documento son anérgicos en el sentido de que fueron incapaces de proliferar y/o producir IL-2 tras
 reticulación de su antígeno receptor. Resulta interesante que este estado anérgico podría superarse por la adición
 de IL-2. Se observó una alta expresión del factor de transcripción Egr-2 (Krox-20), que regula positivamente
 inhibidores del ciclo celular tales como p21^{cip1} y p27^{kip}. Se sabe que IL-2 puede invalidar la supresión mediada por
 Egr-2, posiblemente mediante activación de NF- κ B. Esta última regula positivamente la transcripción de granzima, lo
 55 que podría actuar de forma sinérgica con T-bet para la producción de granzima. Se debería ser consciente de que
 las propiedades reguladoras no se pierden cuando las células se estimulan mediante la adición de IL-2. En una
 realización particular, esta es una propiedad de los Treg citolíticos presentes, un subconjunto de células
 aparentemente estable que ejerce su actividad reguladora sobre la activación dependiente de IL-2. La inducción de
 la apoptosis es el mecanismo en la base de la actividad reguladora. Esto se demostró tanto a nivel de APC como al
 nivel de linfocitos T testigos por mostrar activación de caspasa 3 y/o unión de anexina V. Se ha mostrado que las
 60 dos rutas principales que conducen a la apoptosis se activaron en Treg citolíticos. Se indujo producción tanto de GrB
 como de perforina por la activación de Treg, con transcripción aumentada para GrB pero no granzima A. GrB, a
 diferencia de GrA, induce la apoptosis por al menos dos mecanismos, concretamente activación directa e indirecta
 de procaspasa 3, esta última mediante la liberación de citocromo C por mitocondrias y activación de caspasa 9. Los

inhibidores específicos de GrB mostraron reducción significativa de la inducción de apoptosis, y solamente a concentraciones cercanas a la citotoxicidad celular. Es dudoso que se requiera perforina para dicha actividad, ya que EGTA no bloqueó la apoptosis en ningún grado significativo. La segunda ruta por la que puede inducirse apoptosis es la ruta de Fas-FasL. Resulta interesante que FasL está presente en gránulos de exocitosis junto con granzimas, y se ancla a la membrana tras la activación celular, que constituye la principal ruta para expresión de FasL en linfocitos T. FasL señala a través de Fas lo que conduce a activación de caspasa 8, con una activación corriente abajo de caspasa 3 y caspasa 9 a través de liberación mitocondrial del citocromo C, actuando de este modo de forma sinérgica con GrB. Se obtuvo inhibición parcial de la apoptosis usando un anticuerpo específico de FasL. La participación relativa de las rutas de GrB y FasL está dictada por el grado de expresión de FasL. Por lo tanto, las células Wehi, que tienen una expresión constitutiva alta de Fas, se lisan fácilmente por Treg, en comparación por ejemplo con células dendríticas. No se ha establecido completamente si la acción combinada de GrB y FasL explica toda la actividad citolítica, ya que experimentos preliminares han mostrado que la combinación de los dos inhibidores no anuló la apoptosis de células diana. Se sabe que algunos Treg secretan Granzimas. Por lo tanto, la granzima B está implicada en el mecanismo por el que los Treg naturales controlan respuestas inmunitarias, tanto en ser humano como en el ratón. Los ratones GrB KO tienen un defecto de regulación. Es, sin embargo, difícil establecer en qué medida los Treg inducidos usan granzimas para ejercer su actividad reguladora. Un informe muestra que una proporción de Treg de tipo Tr1 activados por anticuerpos anti CD3 y anti CD46 expresan GrB. Una dificultad aún no resuelta con las granzimas es la falta de inhibidores específicos y eficaces. Los inhibidores químicos o peptídicos, tales como los usados en la presente invención (Ejemplo 11), requerían altas concentraciones para estar activos. El uso de la ruta de Fas-FasL no se ha indicado previamente en Treg adaptativos, y muy pocos datos indican que los Treg CD4+CD25+ podrían usar también Fas-L como mecanismo. Es notable que la inducción de apoptosis se observa con células dendríticas y con linfocitos B, lo que sugiere que pueden regularse las respuestas inmunitarias tanto primaria como secundaria. Además, los Treg que reconocen un único epítipo de linfocitos T de antígenos incluso complejos tienen la capacidad de suprimir la respuesta a la proteína completa eliminando la célula presentadora de antígenos. Esto se ilustra bien por los datos *in vivo*, en los que la respuesta hacia un alérgeno completo, Der p 2, se suprime después de la transferencia adoptiva de un único clon de Treg. Este efecto es reforzado por la supresión de linfocitos T testigos incluso cuando estos últimos se activan mediante interacción con una APC diferente, siempre que el contacto celular sea posible entre Treg y linfocitos T efectores. Resulta interesante que los Treg pueden regular linfocitos T efectores en diversos estadios de maduración, Th0, Th1 o Th2. Resulta importante que los Treg citolíticos inducen apoptosis en células diana y no en necrosis. La APC apoptótica puede desempeñar un papel en la supresión. Se ha demostrado de hecho que las células apoptóticas captadas por células presentadoras de antígenos inducen tolerancia, mientras que las células necróticas inducen más bien inflamación. *In vivo*, la supresión casi completa de inflamación dentro de los pulmones debería considerarse ciertamente una señal de apoptosis de células diana en lugar de necrosis. Un aspecto de la presente invención es la demostración de que también se produce apoptosis de linfocitos B *in vivo*. Por lo tanto, los ratones a los que se ha transferido de forma adoptiva linfocitos B transgénicos que expresan p21-35 seguido de Treg citolíticos de especificidad correspondiente muestran desaparición completa de linfocitos B, como se detecta en el bazo. Es poco probable que los linfocitos B transgénicos hayan migrado a otros sitios. No se ha descubierto ninguna prueba de dichas células en pulmones o en el hígado. Las propiedades funcionales de células transgénicas p21-35 son idénticas a las de linfocitos B incubados con el péptido en un ensayo de carga convencional. Se ha mostrado aquí que se induce la apoptosis de linfocitos B transgénicos *in vitro* mediante cocultivo con Treg citolíticos, lo que indica buenas pruebas de la relevancia *in vivo* de la citólisis de APC. Se ha prestado particular atención a la posible implicación de IL-10. Los Treg naturales así como la mayoría si no todos los subconjuntos descritos de Treg adaptativos producen IL-10 (Levings y col. (2002) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129, 263-276). Uno de estos subtipos se indujo después de exposición respiratoria a alérgeno y expresó Foxp3, GATA3 y no produjo nada de IFN- γ (Akbari y col. (2002) *Nature medicine* 8, 1024-1032). Otro tipo se indujo durante fuertes condiciones de polarización de Th1 (*Listeria monocytogenes* como adyuvante), expresó Foxp3, T-bet y produjo IFN- γ (Stock y col. (2004) *Nat. Immunol.* 5, 1149-1156). Ambos subconjuntos fueron capaces de inhibir la hiperreactividad de las vías respiratorias e inflamación mediante un mecanismo dependiente de IL-10. No hubo ninguna prueba de la producción de IL-10 por los Treg citolíticos negativos para Foxp3 ni activación de STAT3 o SP1. La observación de que la inducción de apoptosis requería contacto celular directo como se muestra en experimentos de transwell, y la supresión conocida de transcripción de IL-10 por IFN-gamma, produciéndose esta última a altos niveles por todos los Treg citolíticos, se tomaron como pruebas contra una implicación significativa de IL-10 en la actividad de Treg citolíticos. Notablemente, solo se requirió un adyuvante suave tal como alumbre. Resulta interesante que la inmunización con el péptido mp21-35 preparado en CFA/IFA fue aún más eficaz en la supresión de la inflamación de las vías respiratorias y la hiperreactividad, pero esto fue en perjuicio de la acumulación de grandes números de linfocitos Th1 en los pulmones. Además, esto muestra que la inmunización en CFA no consiguió inducir Treg citolíticos. La metilación de cisteína aumentó la presentación por MHC de clase II, pero esto es atribuible al aumento de la estabilidad del péptido y aumento de la captación por APC. Resulta interesante que no era posible inducir Treg citolíticos para un segundo epítipo de linfocitos T importante de Der p 2, p71-85. La sustitución de isoleucina 28 por asparagina redujo la afinidad de unión con moléculas del MHC de clase II, lo que se ha mostrado que no es perjudicial para la inducción de Treg citolíticos. Se ha indicado que péptidos alterados que portan epítopos de linfocitos T aumentan la afinidad de unión y/o el reconocimiento de TCR, o inducen tolerancia, un resultado con frecuencia difícil de predecir. En el presente caso, los Treg tanto efectores como citolíticos reconocieron el mismo epítipo, y pudieron expandirse *in vitro* con p21-35 en su secuencia de tipo silvestre o mutada.

Un aspecto interesante del presente estudio fue la demostración de que los Treg citolíticos migraron hacia el pulmón tras exposición de las vías respiratorias al alérgeno Der p 2, y esto sucede en ausencia de sensibilización de alérgenos periféricos. Las quimiocinas implicadas en la atracción de linfocitos T al pulmón no se han identificado con precisión. Los Treg citolíticos descritos aquí expresan CD103 pero no CCR7, lo que debería conferirles la capacidad de migrar a tejidos inflamados. No se han detectado otras quimiocinas tales como CCR5 y CCR3. Sin embargo, el sistema modelo usado aquí, en el que se someten ratones transferidos de forma adoptiva con Treg citolíticos a 2 series de 3 instilaciones nasales a intervalos de una semana, no induce una inflamación significativa en los pulmones, como se muestra en ratones de control sometidos solamente a inhalación de alérgeno. En un modelo experimental de asma, que incluye sensibilización periférica e inhalación de alérgeno, se ha mostrado que los Treg tienen la capacidad de prevenir y suprimir tanto la infiltración inflamatoria como la hiperreactividad de las vías respiratorias, que son los distintivos del asma bronquial. Se usó una forma recombinante sin LPS de un alérgeno principal, Der p 2, que está implicada en una gran proporción de pacientes que padecen asma alérgica. En estudios paralelos, se ha determinado que el péptido p21-35 activó linfocitos T efectores CD4+ de pacientes sensibilizados a Der p 2. Un clon de linfocitos T específico de p21-35 derivado de dicho paciente muestra propiedades comparables a las de Treg citolíticos de ratón, lo que sugiere que se generan Treg citolíticos como parte de una respuesta inmunitaria normal a un alérgeno tal como Der p 2.

Estas observaciones apoyan la utilidad de Treg citolíticos de acuerdo con la invención para tratar asma alérgica en la clínica. Los Treg citolíticos se activan y se expanden fácilmente mediante presentación de epítomos restringida al MHC de clase II, y no producen citocinas supresoras, lo que proporciona la especificidad requerida para su uso clínico. Además, dichos Treg se obtienen tras inmunización usando un adyuvante convencional, concretamente alumbre, sin necesidad de material derivado de bacterias tal como micobacteria o CFA. Es más prometedora la observación de que la hiperreactividad de las vías respiratorias a un estimulante no específico, concretamente metacolina, se redujo significativamente incluso después de la sensibilización a alérgeno. Esto era inesperado, ya que la inflamación y la hiperreactividad de las vías respiratorias no están necesariamente ligadas. De hecho, en el modelo de asma para Der p 2, los dos fenómenos están disociados entre sí.

La presente invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos que se proporcionan sin ninguna intención limitante. Además, todas las referencias descritas en el presente documento se incluyen explícitamente en el presente documento por referencia.

Ejemplos

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

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

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

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

Se usó la inducción de apoptosis de linfocitos B WEHI como una medida de la captación y presentación de antígenos. Se mezclaron linfocitos B WEHI (2×10^4) con un clon de Treg específico de péptido p21-35 (relación 1/1) y concentraciones decrecientes de péptido p21-35 (eje X), o el mismo péptido unido a un epítomo T menor de toxina del tétanos (p830-844; T-B). Después de 18 horas, las células se marcaron con anticuerpos anti CD19-PE (un marcador de células WEHI) y anexina V-FITC, un marcador de la apoptosis. Las muestras se analizaron después por citometría de flujo. Los resultados son representativos de la proporción de células WEHI positivas para Anexina V. Se observó un aumento de 100 veces en la capacidad de inducir apoptosis cuando el péptido p21-35 se ligó a un epítomo de linfocitos T menor, como se indica en la Figura 2.

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

El panel A de la Figura 3 muestra la localización del motivo de secuencia de tipo tiorredoxina dentro del péptido p21-35. La secuencia de CHGS [SEQ ID. NO: 3] está adyacente a la hendidura de unión del MHC de clase II. La sustitución de alanina del resto 21C o el resto S24 del motivo C-X(2)-S de tipo tiorredoxina no altera el reconocimiento de epítomos de linfocitos T como se mide por la proliferación (incorporación de ^3H -timidina) de un clon de Treg, y se indica en el panel B de la Figura 3. Se llevó a cabo proliferación usando 5×10^4 células WEHI incubadas durante 1 hora a 37 °C con péptido 6 μM . Después las células se lavaron y se cocultivaron durante 4 días con 5×10^4 linfocitos T. Se añadió ^3H -timidina 24 horas antes del final del cultivo. La radiactividad se contó en células adsorbidas en filtros de fibra de vidrio. La sustitución de los restos 21 y 24 anula la capacidad del clon de Treg para

lisar células presentadoras de antígenos en un ensayo de inducción de apoptosis (véase el panel C de la Figura 3) llevado a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

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

5 La capacidad del péptido T-B para prevenir asma inducida por Der p 2 se evaluó de la siguiente manera. Un grupo de 8 ratones BALB/c (indicado como Tbalum en la Figura 4) recibió 3 inyecciones en la almohadilla plantar (20 µg por inyección) llevadas a cabo a intervalos de 2 semanas con el péptido T-B adsorbido en alumbre. Dos semanas después de la última inyección, todos los ratones recibieron inyecciones IP de rDer p2 de longitud completa adsorbida en alumbre (40 µg por inyección) en 3 ocasiones con un intervalo de 2 semanas, seguido de instilaciones nasales de rDer p 2 en solución salina (100 µg de rDer p 2 en 50 µl de PBS por instilación). Los resultados se evaluaron por comparación con un grupo de ratones tratados con rDer p 2 (indicado como "modelo Der p 2" en la Figura 4) pero que no recibieron inyecciones de péptido. La figura indica que la preinmunización con el péptido reduce significativamente los recuentos de células BAL evaluados en citoespines (Figura 4 panel A), puntuaciones de histología pulmonar (Figura 4, panel B) e hiperreactividad de las vías respiratorias (Figura 4 panel C) evaluadas por reactividad a concentraciones aumentadas de metacolina.

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

15 Se incubó un clon de Treg (10^5 células) específico para p21-35 durante 90 minutos con PBS (Figura 5, panel A), péptido p21-35 (20 µg/ml en 200 µl de PBS; figura 5, panel B) o hidropéroxido de terc-butilo (100 µM en PBS; Figura 5, panel C), que es un inductor de especies de oxígeno reactivas (ROS). Las células se marcaron después durante 30 minutos con carboxi-H2DCFDA (12 µM) un marcador fluorogénico para ROS en células vivas, y después se analizó por citometría de flujo. La imagen muestra que el péptido p21-35 estimula el metabolismo oxidativo de linfocitos Treg afines e induce una duplicación de la intensidad de fluorescencia debida a aumento de ROS.

Ejemplo 6: Los clones de linfocitos TREG muestran propiedades citotóxicas en células presentadoras de antígenos.

25 Las propiedades citotóxicas de una línea Treg (G121) se ensayaron en la línea de linfocitos B WEHI usada como una célula presentadora de antígenos. La Figura 6 muestra el % de células lisadas durante un periodo de tiempo de 14 horas en presencia de la línea celular citotóxica sola (WEHI (10^4 células) + linfocitos T (10^4 células)), la línea de linfocitos T con la adición de péptido p21-35 (WEHI + linfocitos T + p21) o células WEHI precargadas con el péptido p21-35 (WEHIp21 + linfocito T). La lisis de células WEHI se midió usando el ensayo de JAM (un ensayo cuantitativo de fragmentación de ADN): se preincubaron 10^4 células WEHI con ^3H -timidina (4,5 µCi/ml, 1 ml) durante 10 horas a 30 37 °C y después se lavó antes del cocultivo con la línea de Treg. La liberación de ^3H -timidina en sobrenadantes se tomó como una medida de la lisis de células WEHI. Los datos muestran que la presencia del péptido es necesaria para activar la línea de linfocitos T.

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

35 Se marcaron líneas de linfocitos T (TCL; 10^5 células) específicas para Der p 1, un alérgeno no relacionado con Der p 2 o específico para un epítipo de linfocitos T importante alternativo (p71-85) localizado en Der p 2 con CFSE (que es un marcador para proteínas citoplasmáticas, haciendo posible evaluar el número de divisiones celulares basándose en la intensidad de tinción, que se reduce hasta el 50% cada vez que la célula se divide) (12,5 nM) (Figura 7). La proliferación de estos TCL específicos de Der p 1 marcados con CFSE (Panel A y B) o p71-85 TCL (panel C y D) se midió antes (panel A y C) o después (panel B y D) de la incubación con el clon de Treg citotóxico (relación 1/1). Las células presentadoras de antígenos se precargaron tanto con el alérgeno específico (Der p 1 o Der p 2; 0,5 ml que contenía 10 µg/ml en cada caso) como con el péptido 21-35 (0,5 ml que contenía 10 µg/ml). Después de 72 horas de incubación, las células se recogieron, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron en un citómetro de flujo. Los histogramas y porcentajes en las partes B y D de la Figura representan la proporción de células CFSE positivas vivas residuales (las células vivas se diferenciaron por ser negativas para yoduro de propidio). La Figura muestra que el clon de Treg citotóxico específico para el péptido 21-35 redujo fuertemente la proliferación de cada uno de los 45 2 linfocitos T testigos (divisiones de CFSE). La mayoría de las células teñidas con CFSE se hizo positiva para el marcador de apoptosis yoduro de propidio, lo que indica que se destruyeron linfocitos T testigos en el ensayo.

Ejemplo 8: Determinación del perfil fenotípico de linfocitos Treg.

50 La Figura 8 muestra producción de citocinas de cuatro clones de Treg específicos de p21-35 derivados de ratones tratados con la composición de péptido T-B como en el Ejemplo 4 (panel izquierdo). Se analizaron sobrenadantes del cultivo celular con respecto al contenido de citocinas después de cuatro días de estimulación con células presentadoras de antígenos (esplenocitos irradiados de ratones sin tratamiento previo, 10^5 células) y péptido p21-35 (2 µg/ml, 200 µl). Los clones de Treg produjeron principalmente IFN-γ (IFN-G) y solamente cantidades traza de TNF-α (TNF-a) e IL-10. El panel derecho muestra el análisis de ARNm de dichos linfocitos Treg. No se detectaron transcritos para el represor de transcripción Foxp3, pero T-bet, Granzima A y Granzima B muestran fuertes niveles de transcripción.

La Figura 9 muestra los niveles de expresión de diversos genes en un clon de linfocito T específico de péptido 21-35 en reposo por clasificación de células activadas por fluorescencia (Facs). En la Tabla 4, se proporciona la intensidad de fluorescencia media de cuatro clones diferentes (T1 a T4) (2×10^5 células). Se observaron altos niveles de CD25, ICOS, GITR, CD103 y CTLA-4 intracelular. CD28 no se expresaba o se expresaba escasamente. CD62-L y CD45RB se expresaron a niveles bajos. Todos los anticuerpos fueron de Becton-Dickinson (NJ, Estados Unidos).

Tabla 4: Fluorescencia media de clones de Treg marcados con anticuerpos fluorescentes

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

Ejemplo 9: Se inducen linfocitos Treg con propiedades citotóxicas por inmunización con un péptido hecho de un epítipo de linfocito T dominante del alérgeno Der p 1 ligado a una secuencia consenso de tipo glutarredoxina (Figura 10).

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

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

Ambos péptidos se unieron por una secuencia enlazadora SGGSGGSGG [SEQ ID. NO: 8] en el extremo amino terminal de la secuencia con el extremo amino terminal de la secuencia IITIAVAALLLVAAIFGVASCLIRSRSTKNEANQPLLTD [SEQ ID NO: 9], correspondiente al dominio transmembrana y la cola citosólica truncada de la proteína gp75, para dirigir el epítipo de linfocitos T al endosoma tardío (el motivo basado en dileucina está subrayado).

La secuencia completa del péptido que comprende secuencia de dirección, enlazador, motivo y secuencia de epítipo es:

CGFS SNYCQIYPPNANKIR SGGSGGSGG

IITIAVAALLLVAAIFGVASCLIRSRSTKNEANQPLLTD [SEQ ID. NO: 10],

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

SNYCQIYPPNANKIR SGGSGGSGG

IITIAVAALLLVAAIFGVASCLIRSRSTKNEANQPLLTD [SEQ ID. NO: 11]

Se inmunizaron grupos de ratones BALB/c por vía subcutánea (20 μ g) con el péptido experimental [SEQ ID NO: 10] o el péptido de control [SEQ ID NO: 11] adsorbido en hidróxido de aluminio. Se realizaron tres inyecciones a intervalos de 2 semanas. Diez días después de la última inmunización, se sacrificaron los ratones y se prepararon linfocitos T CD4+ del bazo usando perlas magnéticas. Después se estimularon linfocitos T CD4+ (2×10^6 células) *in vitro* por el epítipo de linfocitos T Der p 1 (20 μ g) presentado por células del bazo adherentes que actúan como células presentadoras de antígenos.

Diez días después de la estimulación se calculó el número de líneas de linfocitos T específicas obtenidas en cada grupo por análisis de dilución limitante. Cada línea celular se evaluó por su capacidad para lisar células WEHI, una línea de linfocitos B seleccionada por su eficacia en la presentación de antígenos por determinantes del MHC de clase II, como se describe en el Ejemplo 6. Solamente células obtenidas de animales inmunizados con el péptido que contenía la secuencia consenso de glutarredoxina habían adquirido la capacidad para lisar células WEHI, y la lisis se produce solamente en presencia del epítipo de linfocitos T Der p 1 afin.

La Figura 10 muestra que podrían obtenerse clones de linfocitos T con propiedades de Treg solamente de ratones que recibieron la construcción hecha del epítipo de Der p 1 ligado a un motivo redox de tipo glutarredoxina y gp75,

pero no de ratones que recibieron el péptido de control. Todos los clones de linfocitos T obtenidos después del tratamiento con la construcción y reestimulados *in vitro* fueron citotóxicos.

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

- 5 Puede inducirse esclerosis múltiple en modelos experimentales por inmunización con el péptido de Glucoproteína de Oligodendrocitos de Mielina (MOG) VGWYRSPFSRVHLYR [SEQ ID. NO: 12], que corresponde a los restos de aminoácidos 37-52 de la proteína MOG. Este péptido contiene un epítipo de linfocitos T dominante. La posición P1, es decir el primer aminoácido anclado en el surco del MHC de clase II es Y40 (la secuencia P1-P9 está subrayada).
 10 Los 3 aminoácidos del extremo amino terminal del péptido se reemplazan por la secuencia CGPS [SEQ ID. NO: 13], que corresponde a la secuencia de tioredoxina humana, los restos 21 a 24, dando como resultado el péptido CGPSYRSPFSRVHLYR [SEQ ID. NO: 14]. El péptido experimental [SEQ ID. NO: 14] y el péptido de control [SEQ ID. NO: 12] se unen por la secuencia enlazadora SGGSGGSGG [SEQ ID. NO: 8] en el extremo amino terminal de la secuencia VSVSAVRLGLGLIIFSLGVIS WRRAGHSSYTPLPGSNYSEGWHIS [SEQ ID. NO: 15] correspondiente al dominio transmembrana y la cola citosólica de la proteína HLA-DM β , para dirigir el epítipo de linfocitos T al endosoma tardío (el motivo de péptido basado en tirosina está subrayado).
 15

Las secuencias del péptido diana son:

VSVSAVTLGLGLIIFSLGVISWRRAGHSSYTPLPGSNYSEGWHIS SGGSGGSGG CGPS YRSPFSRVHLYR [SEQ ID. NO: 16] y

VSVSAVTLGLGLIIFSLGVISWRRAGHSSYTPLPGSNYSEGWHIS

SGGSGGSGG YRSPFSRVHLYR [SEQ ID. NO: 17]

- 20 Se transfiere a un grupo de ratones C57BL/6 de forma adoptiva un clon de linfocito T efector específico de MOG CD4+ siguiendo un protocolo que se pretende que induzca un síndrome de esclerosis múltiple. Esto implica la administración del péptido de MOG en adyuvante completo de Freund y 2 inyecciones de toxina de *Pertussis*. Este protocolo induce una expansión del clon de linfocito T efector, que da como resultado el desarrollo de señales compatibles con esclerosis múltiple en un periodo de 12 días después de la administración de péptido de MOG.
- 25 Se transfiere de forma adoptiva a un segundo grupo de ratones C57BL/6 un clon de linfocito T regulador específico de MOG (obtenido usando los péptidos [SEQ ID NO: 16 y 17] descritos anteriormente), seguido después de 1 día del protocolo completo de inducción de enfermedad.

Se observa que la puntuación clínica desarrollada por ratones pretratados con un clon de linfocito T citolítico se reduce significativamente en comparación con ratones que reciben solamente el clon de linfocito T efector.

30 Procedimientos y materiales

Ratones. Se obtuvieron ratones BALB/c de seis a ocho semanas de edad de instalaciones internas. Los estudios *in vivo* fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Leuven.

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

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

- Purificación celular.** Se obtuvieron linfocitos T CD4 esplénicos después de inmunización de péptidos. Después de purificación de gradiente de densidad de Ficoll (Nycomed Pharma), se enriquecieron por selección negativa usando el Kit de Aislamiento de linfocitos T CD4 (Miltenyi Biotec) y columnas de separación de LS. Se seleccionaron de forma positiva células dendríticas esplénicas usando Microperlas CD11c (Miltenyi Biotec) en columnas de separación LS. Se estimularon con 5 μ g/ml de LPS (Sigma) durante 5 horas, después se lavaron y se mantuvieron durante 18 horas en un incubador de CO₂; se recuperaron células vivas eliminando las células muertas y apoptóticas con microperlas de anexina V en columnas de LS y MidiMacs (todos de Miltenyi Biotec).
 50

Se prepararon linfocitos B a partir de células del bazo de ratones BALB/c sin tratamiento previo por selección positiva usando microperlas de CD19 (Miltenyi Biotec). Como células presentadoras de antígenos, se agotaron los

linfocitos T de esplenocitos por microperlas CD90 (Miltenyi Biotec) en columnas de agotamiento de LD. En algunos ensayos, se prepararon células adherentes esplénicas incubando esplenocitos durante 2 h a 37 °C en medio de cultivo. Se retiraron células no adherentes y las células restantes se recuperaron para ensayos.

5 Se prepararon linfocitos de pulmón por digestión con colagenasa (Sigma) y centrifugación por Percoll (Pharmacia) como se ha descrito previamente (Abraham y col. (1990) J. Immunol. 144, 2117-2122).

Cultivo celular. Se cultivaron células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B en medio RPMI 1640 que contenía FCS 5 %, 2-ME 50 µM, gentamicina 200 µg/ml (Invitrogen). Se obtuvieron células Wehi 231 de la colección Europea de cultivos celulares (ECACC).

10 El clon de linfocito T efector G221N es específico para el péptido p21-35. G121, R3TB7, T1 y T3 identifican clones de linfocitos T citotóxicos ensayados en ese estudio (en el Ejemplo 11).

15 **Ensayos de procesamiento de péptidos.** Se ensayó G221N, un clon de linfocito T efector específico para el péptido p21-35 en un ensayo de proliferación en el que se usaron células adherentes esplénicas como APC. Se pretrataron con leupeptina 0,2 µM, cloroquina 0,1 mM, colchicina 60 µM o se dejaron sin tratar durante 30 min. Después de 3 lavados con PBS, se cargaron APC durante 1 hora con el péptido p21-35, mp21-35 o Der p 2 a 37 °C. Después se lavaron dos veces con medio de cultivo y se añadieron al clon G221N (10⁵ cada uno) durante 72 h. Para bloquear la endocitosis las APC también se trataron con NaN₃/desoxiglucosa (2 mg/ml, 50 mM, respectivamente) durante todo el tiempo de incubación con los péptidos seguido de 3 lavados con PBS frío.

20 Se ensayó la proliferación por la adición de 1 pCi/pocillo de [³H]timidina (ICN) durante las últimas 18 h. Las células se recogieron y se contó el isótopo incorporado (cpm). Los datos se expresaron como índice de estimulación calculado dividiendo las cpm obtenidas para linfocitos T G221N estimulados con APC con péptido cargado por el valor obtenido con APC no cargadas.

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

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

35 **Ensayos de supresión de testigos.** Se marcaron clones T auxiliares y linfocitos T CD4⁺CD25⁻ diana con CFSE 125 nM (Molecular Probes) durante 15 minutos en PBS a 37 °C. La reacción se detuvo lavando las células con PBS que contenía FBS 30 %. Estas células (3 x 10⁵) se co-cultivaron con 10⁵ clones de linfocitos T CD4⁺ citotóxicos y esplenocitos pobres en linfocitos T con anticuerpo anti-CD3 1 µg/ml (eBioscience). Para la supresión de clones de T auxiliares, se co-cultivaron 10⁵ células con el mismo número de células citotóxicas y esplenocitos pobres en linfocitos T. Después de 48 h o 72 horas, las células se recogieron y se analizaron por citometría de flujo.

40 Para algunos cultivos, se usaron anticuerpos de bloqueo contra FAS-L, GITR, LAG-3 a 10 µg/ml (eBioscience). Se realizaron ensayos de Transwell en placas de 24 pocillos (Becton Dickinson).

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

Para inhibición de la actividad de GZ-B, se añadieron Z-AAD-CMK (Calbiochem) o 3,4-dicloroiso-cumarina (DCIC) (SIGMA) a concentraciones indicadas durante todo el periodo de co-cultivo.

50 **Detección de citocinas.** Se reestimularon un millón de linfocitos Treg con 3 millones de esplenocitos pobres en linfocitos T irradiados durante 72 horas. Los sobrenadantes se evaluaron con respecto a la presencia de diferentes citocinas. Se evaluaron IL-10 e IL-13 usando el kit de Elisa de ratón OptEIA (BD Biosciences). Se evaluaron TGF-β e IL-13 con los kits de ensayo anti TGF-β1 de ratón DuoSet o anti IL-13 de ratón DuoSet, respectivamente (R&D Systems). Se analizó la producción de IL-2, IL-4, IL-5, IFN-γ y TNF-α mediante citometría de flujo usando el kit de CBA de Citocinas Th1/Th2 (BD Biosciences).

55 Para estimulación de células CD4⁺ policlonales, se estimularon 10⁶ células con 5 x 10⁵ esplenocitos pobres en

linfocitos T irradiados (de ratones sin tratamiento previo) y Der p 2 10 µg/ml durante 72 h.

Proliferación de células CD4+ policlonales. Se estimularon 10⁵ células CD4 esplénicas de ratones tratados con péptidos con 10⁵ esplenocitos pobres en linfocitos T y mp21-35 10 µg/ml, péptido p380 5 µg/ml o Der p2 10 µg/ml. Se ensayó la incorporación de (³H)-timidina como ya se ha descrito. Los resultados se muestran como recuento promedio de isótopos (cpm) ± e.t.m. de 6 ratones ensayados individualmente por triplicado.

Hiperreactividad de las vías respiratorias. La hiperreactividad de las vías respiratorias (HRVR) en ratones libres usando un pletismógrafo de cuerpo completo (EMKA) de acuerdo con procedimientos publicados (Hamelmann y col. (1997) Am. J. Resp. Crit. Care Med. 156, 766-775). Se usó la pausa de pico potenciado (PenH) como un parámetro para broncoconstricción. Los animales se expusieron durante 1 minuto a dosis crecientes de metacolina aerosolizada (de 10 a 100 mg/ml), seguido de 3 minutos de reposo durante el que se evaluaron los parámetros de respiración. Los valores de PenH se expresaron como las medias de mediciones llevadas a cabo cada 30 segundos durante un periodo de 3 minutos después de cada exposición a metacolina. Se midió la distensibilidad pulmonar con el sistema FlexiVent (Scireq).

Recogido de líquido de lavado broncoalveolar (BALF). Tres días después de la exposición a metacolina, los ratones se sacrificaron, se aisló la tráquea y se insertó una cánula. Se recogió BALF lavando con 1 ml de solución salina que contenía BSA al 5 % (usado para detección de citocinas) y después se siguió de 2x1 ml de solución salina. Se estableció el recuento celular. Se prepararon citoespines por centrifugación a 1400rpm durante 6 min y se tiñeron (procedimiento de Diff-Quik). Se contaron cien células en 3 campos diferentes para identificación celular.

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

Todos los portaobjetos fueron examinados por dos personas, incluyendo un patólogo que desconocía los grupos a los que pertenecían los ratones.

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

Expresión dirigida de péptido en linfocitos B. El vector pMND-SN onco-retrovírico se obtuvo del Dr. D. Kohn, USC. Se preparó una construcción de fusión que contenía p21-35 (aminoácidos 21 a 35 de Der p 2) y el extremo carboxilo terminal de gp75 (aminoácidos 488 a 539) conectado con un enlazador Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly [SEQ ID. NO: 8], mediante PCR y se clonó en vector pMND. El vector resultante pMND-p21gp75 se usó junto con vectores que codificaban proteínas víricas para transfectar de forma transitoria células 293T y se obtuvieron células productoras onco-retrovíricas como se ha descrito previamente (Janssens W. y col., Human gene therapy 14, 263-276 (2003)). Se co-cultivaron linfocitos B esplénicos preactivados durante 24 horas con LPS bacteriano 50 µg/ml con sobrenadante que contenía vector vírico filtrado en presencia de polibreno (6 µg/ml) y LPS (50 µg/ml). Después se lavaron linfocitos B exhaustivamente antes de la transferencia adoptiva a ratones BALB/c sin tratamiento previo.

Análisis de ARNm. Se realizaron reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) como se ha descrito previamente (Janssens W. y col. (2003), Human gene therapy 14, 263-276. Para linfocitos T, se analizaron 10⁶ células el día 12 después de la reestimulación. Las secuencias de cebadores fueron: *Granzima A*, (directo) 5' ctctgtccccggggccatc 3' [SEQ ID. NO: 21] e (inverso) 5' tatgtagttagccccaagaa 3' [SEQ ID. NO: 22]; para *Granzima B*, (directo) 5' ctccacgtgcttcaccaa 3' [SEQ ID. NO: 23] e (inverso) 5' ggaaatagtacagagaggca 3' [SEQ ID. NO: 24]; para *β-actina*, (directo) 5' cattgtgatggactccggagacgg 3' [SEQ ID. NO: 25] e (inverso) 5' catctcctgctcgaagtctagagc 3' [SEQ ID. NO: 26]. La temperatura de hibridación fue de 55 °C durante 27 ciclos.

Detección de linfocitos B transducidos *in vivo*. Los ratones que recibieron linfocitos B transducidos con pMND-p21gp75 seguido de transferencia de clones de linfocitos T se sacrificaron y se purificaron linfocitos B esplénicos con microperlas de CD19 (Miltenyi Biotec). Se transcribieron de forma inversa cinco µg de ARN total para la preparación de ADNc. Se llevó a cabo PCR en ADNc usando cebadores específicos de vector retrovírico (directo) 5' ccctttatccagccctcactc 3' [SEQ ID. NO: 27] e (inverso) 5' cctggggacttccacacc 3' [SEQ ID. NO: 28]. La temperatura de hibridación fue de 56 °C durante 28 ciclos.

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

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

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

Esto podría deberse a presentación de péptido ineficaz debido por ejemplo a la rápida degradación y/o captación de endosoma tardío ineficaz. La capacidad *in vitro* de diversas formas de péptido se ensayó para inducir apoptosis de una línea de linfocitos B (células Wehi) usada como célula presentadora de antígenos (APC) por el clon de linfocito T regulador G121. La metilación de las dos cisteínas puede potenciar la estabilidad del péptido (p21-35met). Como alternativa, el acoplamiento de p21-35 a un péptido que porta un epítipo de linfocitos T subdominante conocido podría aumentar la captación de endosoma tardío. En el ratón de BALB/c, la secuencia que abarca los restos de aminoácidos 830 a 844 del toxoide de tétanos representa uno de estos epítipos menores (QYIKANSKFIGITEL, [SEQ ID. NO: 18]). Se produjo por lo tanto un péptido sintético que abarca los aminoácidos 830-844 del toxoide del tétanos, unidos por dos glicinas con p21-35 (QYIKANSKFIGITELGGCHGSEPCNIHRGKPF, [SEQ ID. NO: 20]), y por razones de estabilidad, las dos cisteínas también se metilaron (péptido modificado, mp21-35). mp21-35 fue 100 veces más eficaz en la inducción de apoptosis de células Wehi en presencia del Treg G121, en comparación con p21-35 (Figura 11a). La metilación de los 2 restos de cisteína de p21-35 (p21-35met) también aumentó la presentación del MCH de clase II, y este péptido estabilizado fue tan eficaz como mp21-35. Un péptido de control preparado invirtiendo el orden de los dos componentes de mp21-35 fue ineficaz en la inducción de apoptosis de células WEHI.

La forma metilada de p21-35 (p21-35met) o la variante acoplada (mp21-35) se ensayaron con respecto a inducción *in vivo* eficaz de linfocitos T citolíticos. Se inmunizaron ratones BALB/c con Der p 2 en alumbre. La reestimulación *in vitro* de linfocitos T CD4+ del bazo dio como resultado proliferación robusta cuando se usó Der p 2 para estimulación pero poca respuesta a la presentación de p21-35 (Figura 11b: grupo de control de solución salina). Posteriormente, se ensayó la capacidad de mp21-35 para prevenir la proliferación de linfocitos T CD4+ por pre-inmunización de ratones BALB/c con mp21-35 o una mezcla de p830-844 y p21-35met, concretamente los dos componentes peptídicos de mp21-35. Esto se siguió de la administración IP de Der p 2 en alumbre, como anteriormente. Se observó una reducción significativa de la proliferación inducida por Der p 2 solamente cuando se usó mp21-35 para pre-inmunización (Figura 11b). La producción de citocinas hechas por células del bazo CD4+ estimuladas con Der p 2 fue idéntica en el grupo de control y en el grupo pre-inmunizado con los dos componentes peptídicos separados (Figura 11c), que muestran una respuesta de tipo Th2. En el grupo pre-tratado con mp21-35, se redujo la producción de citocinas hasta concentraciones indetectables.

Debe observarse que la estimulación *in vitro* de esplenocitos CD4+ obtenidos de ratones pre-tratados con mp21-35 o la mezcla de péptidos no indujo proliferación a p830-844 (Figura 11b), o producción de citocinas, lo que indica que el péptido derivado de toxoide del tétanos no interfirió con la generación de Treg.

mp21-35 tuvo que procesarse para presentación eficaz, como se muestra evaluando la activación de un linfocito T efector p21-35 (G221N) en presencia de diversos inhibidores (Figura 11d). Esto muestra que p21-35met, mp21-35 y Der p 2 requirieron internalización en células presentadoras de antígenos (inhibidas por NaN₃/desoxiglucosa), fusión con y acidificación de los endosomas tardío (inhibidos por colchicina y cloroquina, respectivamente). No se requirió procesamiento de péptidos para p21-35met, como se muestra por ausencia de inhibición por adición de leupeptina, un inhibidor de serina/cisteína proteasa, que refleja la capacidad de las moléculas del MHC de clase II para acomodar secuencias de hasta 15 aminoácidos.

Tomados juntos, estos datos indican que mp21-35 se procesó eficazmente *in vivo*, por contraste con una mezcla de sus dos componentes, y que la pre-inmunización con mp21-35 evitó la activación de linfocitos T específicos de alérgeno. Basándose en hallazgos que muestran que la regulación puede conseguirse más fácilmente con análogos de epítipos de linfocitos T, se determinó la capacidad de diversos mutantes de aminoácidos individuales p21-35 para inducir linfocito T CD4+ después de inmunización IP en alumbre. En particular, un péptido mutante con una mutación Ile28Asn, una posición que se sabe que corresponde al resto de anclaje del MHC de clase II P4, mostró una capacidad reducida solo ligeramente para inducir proliferación de linfocitos T. La forma mutada de mp21-35 (mp21-35Asn) se usó por lo tanto en el resto de los experimentos de este Ejemplo.

Derivatización y caracterización fenotípica de clones de Treg

Se obtuvieron clones de linfocitos T para análisis fenotípico del bazo de ratones a los que se inyectó mp21-35Asn en alumbre, mp21-35Asn en CFA/IFA (adyuvante completo e incompleto de Freund), Der p 2 o solución salina como un control. Se obtuvo un total de 17 clones, cuya expansión dependió completamente de la adición de IL-2. Estos clones se mantuvieron en reposo durante 10 días antes de evaluar la expresión de CD25. Los clones positivos se exploraron después con respecto a su capacidad para inducir apoptosis de células Wehi cargadas con p21-35 usando unión de anexina V como lectura. Se mostró que todos los clones de linfocitos T CD4+CD25+ (8/8)

obtenidos de ratones inmunizados con mp21-35Asn eran citolíticos, mientras que no se obtuvo ninguno de dichos clones con mp21-35Asn en CFA/IFA (0/5) o de ratones inmunizados con Der p 2 (0/4). Resulta interesante que se obtuvo un número pequeño de linfocitos T efectores CD4+ de ratones no inmunizados (véase posteriormente) pero ninguno fue citolítico.

- 5 Se caracterizó el fenotipo de Treg citolíticos. Se obtuvieron resultados similares para un total de 15 clones obtenidos de inmunizaciones separadas. Se muestran resultados de Facs representativos para marcadores de superficie en la Figura 12a (un clon representativo) y en la Tabla 5 (4 clones), que indican niveles de expresión homogéneos.

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

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

10 Todos los clones expresaron altos niveles de CTLA-4, GITR e ICOS, con expresión significativa, aunque baja, de CD62L y CD103, y expresión apenas detectable del receptor de quimiocina CCR7. Se expresó de forma uniforme T-bet pero no Foxp3, mientras que CD127 solamente era tenue (Figura 12b). Además, los clones de Treg expresan altos niveles de Granzima B y perforina. Los experimentos de RT-PCR muestran niveles detectables de ARNm de Granzima A, pero a un nivel mucho menor que Granzima B (Figura 12c). El patrón de secreción de citocinas mostró casi exclusivamente IFN-gamma, pero no mostró o mostró muy poco de IL-10 y no mostró TGF- β (Figura 12d). No se detectó TGF- β unido a superficie.

15 Todos los Treg citolíticos fueron anérgicos ya que no respondieron a activación por antígeno en ausencia de IL-2 añadida. Esto último invirtió la anergia sin restaurar la transcripción de IL-2 y sin pérdida de propiedades reguladoras, como se muestra después de ciclos de reestimulación. Esto sugiere una alteración epigenética, posiblemente relacionada con la hiperexpresión de T-bet. Además, estos clones expresaron altos niveles de egr-2, que se sabe que activan la transcripción de reguladores negativos del ciclo celular. Estas células expresaron altos niveles de CD44, pero mostraron baja expresión de CD45RB (y CD62L como se ha mencionado anteriormente), identificándolos como células de memoria. La ausencia de producción de citocinas supresoras sugiere que su mecanismo de acción requiere contacto célula-célula. La expresión de granzimas y perforina clasificó dichos clones entre los linfocitos T con un potencial citolítico. Finalmente, se determinó el uso de V β de Treg citolíticos, lo que indica una predominancia de V β 8.1, con algunos clones pertenecientes a la familia V β 7. Se secuenció la cadena beta de varios clones, mostrando diferencias significativas en CDR3, lo que indica que la respuesta hacia el péptido p21-35 fue oligoclonal. Se evaluaron por lo tanto clones de Treg funcionalmente para determinar tanto el mecanismo de lisis de células diana como su capacidad para inducir supresión de linfocitos T testigos.

Inducción de la apoptosis en células presentadoras de antígenos

Se obtuvo lisis de células presentadoras de antígeno tanto con linfocitos B como con células dendríticas. Se indujo que linfocitos B esplénicos de ratones de BABL/c sin tratamiento previo, precargados con p21-35 indujeran activación de caspasa 3 solamente cuando se incubó con el clon de linfocito T citolítico R3TB7 (es decir, otro clon de linfocito T con la actividad citolítica, obtenido de una manera similar) (Figura 13a: panel izquierdo), pero no cuando se añadió un linfocito T específico de p21-35 efector CD4+ de control (Figura 13a: panel derecho). Los mismos experimentos se repitieron usando Anexina V como un marcador de apoptosis, proporcionando los mismos resultados.

Se llevaron a cabo experimentos con células dendríticas CD11c+ cargadas con p21-35 (Figura 13b: panel izquierdo) o WEHI (Figura 13b: panel derecho). Tras la incubación con R3TB7, se indujo la apoptosis de prácticamente todas las células dendríticas (CD) o células Wehi como se mide por activación de caspasa 3. Los mismos experimentos se llevaron a cabo con Anexina V y mostraron resultados idénticos.

Puede inducirse apoptosis por la ruta de Fas-FasL o por secreción de gránulos citotóxicos que contienen granzimas. Se realizaron intentos de inhibir cada una de estas rutas. La adición de concentraciones crecientes de un anticuerpo hacia FasL, o de inhibidores de granzima B, a un cultivo celular que contenía células WEHI cargadas con p21-35 y un clon de linfocito T citolítico, aumentó el número de células WEHI supervivientes de una manera dependiente de dosis (Figura 13c) En varios experimentos se ha mostrado que el anticuerpo anti FasL restauró hasta el 80 % de la supervivencia de células WEHI. Solamente se obtuvo restauración parcial de la supervivencia con inhibidores de granzima B y solamente cuando se usaron altas dosis, cercanas a la citotoxicidad celular, lo que indica que la

granzima B no representó muchas de la citólisis celular. En experimentos adicionales, se usó EGTA como un inhibidor de la exocitosis de gránulos, que también mostró solamente restauración parcial de la supervivencia de células Wehi.

5 Se evaluó adicionalmente si la lisis de células diana requería contacto entre células. Para este fin, se usaron CD CD11+ cargadas con p21-35 (o mp21-35Asn en experimentos paralelos). Cuando se incubaron células CD cargadas con el clon de linfocito T citolítico G121, se observó lisis en el 89 % de las células como se midió por expresión de anexina V (Figura 13d, panel izquierdo). Cuando se llevaron a cabo los mismos experimentos en un sistema de transwell, la lisis de CD se limitó al 15 %, lo que indica que la lisis requería contacto directo entre células (Figura 13d, panel derecho).

10 Para determinar adicionalmente que la lisis de APC requería contacto directo con linfocitos T citolíticos a través de presentación en el MHC de clase II de p21-35, se llevó a cabo un experimento en el que se cargaron dos poblaciones idénticas de células Wehi con p21-35 o con un péptido irrelevante (p71-85). Estas dos poblaciones pudieron distinguirse por marcaje de CFSE diferencial. Puede verse a partir de la Figura 13e que, aunque las células WEHI que presentan p21-35 estaban completamente lisadas, solamente el 40 % de las células cargadas con p71-85 fueron afectadas.

En conjunto, se concluye que los clones de linfocitos T citolíticos indujeron apoptosis de CD y linfocitos B por un mecanismo que requería la formación de una sinapsis inmunitaria por presentación de péptidos dependiente del MHC de clase II. Se ha demostrado la participación significativa de Fas-FasL, pero solamente la implicación limitada de granzima B.

20 **Supresión de linfocitos T testigos**

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

25 En primer lugar, se ensayó la capacidad de los Treg para suprimir la proliferación de linfocitos T CD4+CD25(-) después de activación anti CD3 en presencia de células presentadoras de antígenos. Los resultados obtenidos para dos clones de linfocitos T citolíticos (G121 y R3TB7) se muestran en la Figura 14a. El número de linfocitos T CD4+ CD25(-) detectables, así como el número de divisiones observadas se redujo drásticamente en un periodo de incubación de 48 horas cuando se añadió uno de los dos clones citolíticos (paneles superior izquierdo y medio). Este efecto fue aún más pronunciado a las 72 horas para el segundo clon de linfocito T (panel medio inferior). Resulta interesante que solamente se lisaron linfocitos T CD4+CD25(-) activados, como puede verse a partir del eje vertical que representa la formación de blastos. El experimento de control en el que se reemplazó Treg por un número idéntico de linfocitos T CD4+CD25(-) no marcados (paneles derechos) eliminó un posible artefacto relacionado con números variables de células totales en el medio de cultivo.

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

40 Dicho efecto rápido sugiere la implicación de rutas secretoras similares a las usadas por linfocitos T citotóxicos CD8+. Los experimentos se repitieron por lo tanto para verificar si la inhibición de exocitosis de gránulos por adición de EGTA al cultivo inhibiría la supresión. Básicamente no se examinó inhibición de la supresión de linfocitos T testigos a las 72 horas con 2 concentraciones de EGTA (Figura 14c).

45 A continuación, se evaluó si los clones de linfocitos T de especificidad definida y fenotipos diferentes podrían suprimirse por linfocitos T citolíticos cuando se activaron por reconocimiento afín de antígenos correspondientes, en lugar de activación anti CD3 no específica. Para este fin, se derivatizaron tres clones de ratones BALB/c, concretamente un linfocito Th2 específico de un segundo alérgeno no relacionado de la misma fuente (Der p 1), un linfocito Th1 específico para un segundo epítipo de linfocito T importante de Der p 2 (aminoácidos 71-85) y un clon de Th0 específico para el epítipo de linfocitos T subdominante 830-844 del toxoide del tétanos. Cada uno de estos 3 clones se usó en todos los sistemas de ensayo indicados en el presente documento. Los resultados se muestran para un único clon en cada ensayo, pero los resultados se confirmaron en todas las posibles combinaciones de ensayos y clones.

50 En un primer conjunto de ensayos, la proliferación de un clon de linfocito T se midió usando células marcadas con CFSE después de presentación del antígeno correspondiente por esplenocitos pobres en linfocitos T. Para eliminar un artefacto debido a la competición por los nutrientes en el medio de cultivo, se añadió una cantidad igual del clon de Th2 no marcado al clon de Th2 marcado con CFSE. Un clon de Th2 específico para Der p 1 proliferó fácilmente como se midió durante un periodo de tiempo de 72 horas (Figura 14d). En ensayos paralelos, también se cargaron APC con p21-35 y un clon de linfocito T citolítico se añadió a una relación 1/1 al clon de Th2 específico de Der p 1. La Figura muestra que solamente el 5 % del clon de Th2 sobrevivió después de 72 horas de incubación. La Figura también muestra que la adición de anticuerpos específicos a FasL durante el periodo de incubación completo dio como resultado una inhibición parcial de la supresión (36 % de clon de Th2 residual), mientras que un anticuerpo anti GITR o anti Lag3 no tuvo ningún efecto. Se obtuvieron resultados idénticos con un clon de Th1 para Der p 2 y con un clon de Th0 para toxoide del tétanos. Los clones fueron por lo tanto susceptibles a la supresión por linfocitos T

citolíticos independientemente de su estado de maduración, siempre que se produjera activación mediante interacción afín con el MHC de clase II.

La cuestión de si es necesaria la interacción de contacto entre los linfocitos T citolíticos y linfocitos T testigos se examinó en un sistema de cultivo transwell. Los resultados se muestran en la Figura 14e. Esplenocitos pobres en linfocitos T cargados tanto con p21-35 como con p71-85 sostuvieron la proliferación de un clon de Th1 específico de p71-85. La adición de un Treg citolítico p21-35 suprimió la proliferación (panel medio). Cuando se separaron APC cargadas con péptido en un sistema de cultivo transwell y la línea celular citolítica se añadió a un compartimento, con el clon de Th1 específico de 71-85 en el segundo compartimento, no se observó supresión (panel derecho). Podría concluirse por lo tanto que la supresión no estaba mediada por factores solubles. Estos experimentos se confirmaron usando el clon de linfocito Th2 para Der p 1.

Las Treg citolíticas evitaban eficazmente la formación de blastos de linfocitos T testigos. El tamaño celular promedio de linfocitos T testigos solamente aumenta marginalmente cuando se cocultivan en presencia de Treg citolítico activado (R3TB7) como se muestra en la Figura 14f. Esto se vio acompañado de un aumento de la proporción de muerte celular como se mide con las células testigos marcadas con CFSE. El porcentaje de muerte celular fue del 26 % para células testigos solamente, 36 % con el clon p830-844 de control usado en lugar del clon citolítico, 34 % con el clon citolítico sin activación y 51 % con el clon citolítico en presencia del péptido activador.

Para excluir que la supresión de testigos pudiera deberse parcialmente a artefactos, debido a la lisis de APC, se llevaron a cabo ensayos adicionales en los que se incubó cada una de dos poblaciones distintas de APC (linfocitos B Wehi-231) con p21-35 o con un péptido de lectura (el epítipo de linfocitos T derivado de Der p 1 o p830-844 de toxoide del tétanos). Las dos APC se cultivaron en el mismo pocillo y tanto un clon de linfocito T citolítico como una célula efectora marcada con CFSE. Se observó que se suprimió el clon de linfocito T marcado. Se reemplazó la presentación por APC de p21-35, requerida para activar Treg citolíticos, por una combinación de anticuerpos anti CD3 y anti CD28. En dichas circunstancias también se suprimió la proliferación de células efectoras activadas por reconocimiento afín. Tomado junto con experimentos presentados en la Figura 14e, esto muestra que los clones de linfocitos T citolíticos suprimieron linfocitos T testigos en ausencia de inducción de la apoptosis de APC.

Treg citolíticos lisan linfocitos B cargados con p21-35 in vivo

Los Treg citolíticos inducen la apoptosis de APC *in vitro*. Para determinar si esta actividad era relevante en una situación *in vivo*, se usaron linfocitos B transgénicos que expresaban p21-35 en el contexto de determinantes del MHC de clase II. Dichos linfocitos B transgénicos persisten durante al menos 3 meses en el bazo después de transferencia adoptiva. En primer lugar, se verificó si los Treg citolíticos podrían inducir apoptosis de linfocitos B transgénicos *in vitro*. Se indujo la apoptosis del 52 % de linfocitos B después de 18 horas de incubación con un clon de linfocito T citolítico (Figura 15a). Se muestra en la Figura 15b la expresión de la construcción en bazos de ratones de control (carriles B), pero no en bazos de ratones a los que se han transferido tanto linfocitos B transgénicos como Treg (carriles A). No se detectó ninguna construcción vírica en células de pulmón, en ausencia de exposición a alérgeno. Estos datos indicaron que los linfocitos T citolíticos mantenían su capacidad para lisar linfocitos B presentando el antígeno afín después de transferencia *in vivo*.

Los Treg citolíticos se acumulan en los pulmones tras exposición a alérgeno

El fenotipo de memoria de los Treg, combinado con la ausencia de CCR7 y bajos niveles de CD103, sugiere que pueden migrar a los pulmones, donde pueden ejercer su actividad supresora.

Se marcaron dos líneas de linfocitos T citolíticos diferentes con CFSE o SNARF (ambos marcadores para proteínas citoplasmáticas, que emiten a longitudes de onda diferentes) y se usaron en experimentos separados. Se descubrió acumulación de células marcadas con CFSE en áreas de pulmón perivasculares y peribronquiales (datos no mostrados). Los ratones de control que recibían Treg marcados pero no instilaciones de alérgenos no mostraron prácticamente ninguna fluorescencia pulmonar.

Para establecer si los Treg representan una proporción significativa de acumulación de linfocitos en los pulmones, y para descartar un posible artefacto relacionado con la toxicidad inherente del marcaje de fluorescencia, se transfirieron de forma adoptiva Treg no marcados a ratones BALB/c. En estos experimentos, se hizo uso del hecho de que las células citolíticas expresaban V β 8.1 y se contó la proporción de células positivas sobre la población de CD4+ completa que se acumulaba en los pulmones después de instilación nasal con alérgeno. En dichas condiciones, se sabe que muy pocos linfocitos son atraídos a los pulmones en el modelo de Der p 2 de asma. En el grupo de ratones a los que se transfirió el clon de linfocito T citolítico, más del 90 % de células CD4+ expresaban V β 8.1, mientras que solamente el 25 y el 20 % de dichas células se detectaron en el grupo tratado con la línea celular V β 8.1+ de control, y en un grupo de control de ratones que recibieron Der p 2 por inhalación pero no linfocitos T, respectivamente (Figura 15c).

Se concluye por lo tanto que se acumularon Treg citolíticos en los pulmones tras exposición a alérgeno por instilación nasal.

Los clones de Treg citolíticos previenen y suprimen el asma experimental

Los experimentos anteriormente descritos han sugerido que los clones de linfocitos T citolíticos podrían ser valiosos

para el control de respuestas inmunitarias específicas *in vivo*. El requisito de la interacción afín del MHC de clase II y la inducción de apoptosis de APC podría proporcionar una oportunidad para suprimir la respuesta completa hacia antígenos individuales. Además, su acumulación en el tejido pulmonar podría favorecer su actividad reguladora en algunas de las características asociadas con el asma.

- 5 Esto se ensayó mediante transferencia adoptiva de linfocitos T citolíticos específicos para p21-35 en una situación tanto preventiva como supresora. El modelo de asma experimental para Der p 2 se usó como se ha descrito anteriormente. Se usaron dos líneas de linfocitos T citolíticos, como se obtuvo a partir de ratones BALB/c inmunizados con mp21-35Asn.

- 10 Los resultados de los experimentos de prevención se muestran en la Figura 16 (a-f). Puede verse que la transferencia de linfocitos T citolíticos antes de la inducción de sensibilización de Der p 2 redujo el número de células recuperadas de BALF a valores observados en animales sin tratamiento previo (no mostrado en la Figura 16a), prácticamente sin ninguna célula excepto macrófagos. La línea celular de control no tuvo ningún efecto en la recuperación de células BALF en comparación con el grupo de control positivo. Los dos clones de células citolíticas produjeron esencialmente el mismo efecto. La producción de TGF- β en BALF fue indetectable con los dos Treg, mientras que la producción de IL-10 se suprimió con el segundo clon. Se observó reducción significativa de la infiltración de eosinófilos de pulmón e hiperplasia de células caliciformes. Además, la hiperreactividad de las vías respiratorias medida por inhalación de dosis crecientes de metacolina se redujo prácticamente a niveles observados en ratones sin tratamiento previo (sin tratamiento previo).

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

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

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

- 30 Los aminoácidos de Der p 1 que residen en la hendidura son S114 (o N115) a P122 (o P123) (donde están implicados haplotipos del MHC de clase II que se unen con 9 aminoácidos en la hendidura). La secuencia de SNYC que está presente en el Der p 1 no es por lo tanto accesible y no puede interactuar con otras proteínas y realizar su actividad reductora.

- 35 Después de 3 inyecciones, los ratones se sacrificaron y se purificaron linfocitos T CD4+ del bazo y se clonaron por dilución limitante. Los clones de linfocitos T obtenidos de ratones inmunizados con el péptido SNYCQIYPPNANKIR [SEQ ID NO: 5] produjeron linfocitos T CD4+ efectoras caracterizados por proliferación y secreción de citocinas después de interacción afín con presentación de péptido en MHC de clase II. Los ratones inmunizados con el péptido CGFS SNYCQIYPPNANKIR [SEQ I. NO: 7] produjeron clones de linfocitos T con propiedades citolíticas, como se determina en un ensayo similar al descrito en el Ejemplo 10.

- 40 Para determinar si los linfocitos T con propiedades citolíticas (como se muestra en el Ejemplo 10) tenían la capacidad de inducir apoptosis de linfocitos T efectoras, se prepararon células presentadoras de antígenos (APC) de células esplénicas adherentes. Se incubaron APC con el alérgeno de Der p 1 para presentación en determinantes del MHC de clase II.

- 45 Como se muestra en la Figura 17, las células efectoras CD4 proliferaron fácilmente cuando se añadieron a APC cargadas con antígeno. La adición de linfocitos T citolíticos indujo muerte de células efectoras CD4 (tinción positiva para 7-AAD (FL3-H)). La Figura 17 muestra apoptosis en el 73 % de las células efectoras y la fuerte anulación de la proliferación de células efectoras CD4.

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

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

Se transfirieron de forma adoptiva a dos grupos adicionales de ratones clones de linfocitos T citolíticos obtenidos como se describe en el Ejemplo 11 usando el péptido de Der p 1 con el motivo, bien antes o bien después de la primera serie de instilaciones nasales.

- 55 Se llevaron a cabo recuentos de células diferenciales de BALF 4 días después de la última serie de instilaciones nasales (6 BALB/c por grupo). Se obtuvieron células por lavado broncoalveolar de pulmones y se identificaron en citoespinos como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos o linfocitos. Los ratones recibieron 2 series de 3 instilaciones

nasales con 100 µg de Der p 1 (modelo) o NaCl (negativo). Las Figuras 18A y B muestran que cuando se administran linfocitos T citolíticos antes o después de la primera serie de instilación nasal, esto daba como resultado la abolición completa de la infiltración de eosinófilos en los bronquios. Como puede verse, el número total de células recuperadas en el líquido de lavado está dentro del intervalo de lo que se obtiene de animales sin tratamiento previo.

- 5 Se ensayaron líquidos de lavado broncoalveolar con respecto a la presencia de citocinas (Tabla 6). Los ratones que recibieron un clon citotóxico mostraron muy baja recuperación de citocinas, incluyendo la concentración de IL-10 que aumenta significativamente en el modelo.

Tabla 6: Determinación de citocinas de BAL de ratones tratados con péptido modificado de Der p 1 [SEQ ID NO: 7] (tres días después de la última instilación nasal).

	TNF-alfa	IFN-gamma	IL-5	IL-4	IL-2	IL-10	IL-13	TGF-beta
Prevención	0,7	0	0,3	0	0,7	10	0,2	5,8
Supresión	0	0	0,5	0,7	0,8	2	0,3	0
Modelo	0	0	0	0	0	44	4	1
Neg.	6	1	0,5	2	0	0	0	0

10

Los resultados representan las concentraciones promedio obtenidas de 6 BALB/c (pg/ml).

Ejemplo 14: Efecto del aumento de la potencia redox de péptidos modificados sobre la capacidad para activar linfocitos T reguladores citolíticos.

- 15 Se cargó en células presentadoras de antígenos p21-35 en su configuración nativa [SEQ ID NO: 2] o p21-35 en el que la serina en la posición 24 se sustituye por cisteína CHGCEPCIHRGKPF [SEQ ID NO: 29]. Esta sustitución crea un resto redox del tipo C-x-x-C.

- 20 Se incubaron varios clones de linfocitos T reguladores con actividad citolítica con APC. La Figura 19 muestra que el péptido que porta la secuencia redox C-x-x-C induce un mayor grado de activación de linfocitos T, evaluado por la producción de citocinas, que su homólogo C-x-x-S. También se muestra que la secuencia de C-x-x-C induce la transcripción de ARNm tanto para FasL como para granzimas, más que sus homólogos C-x-x-S. Las granzimas son dos de los elementos clave en la inducción de la apoptosis de células diana.

Ejemplo 15: Prevención y supresión de alergia a la beta-lactoglobulina.

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

- 30 Se inmunizaron ratones BALB/c por 2 inyecciones SC con 20 µg del péptido de la secuencia CHGC AQKKIAEK [SEQ ID. NO: 30] en alumbre. Esto se sigue 15 días después de sensibilización intraperitoneal a BLG (5 µg en alumbre), en 2 ocasiones a un intervalo de quince días. Como alternativa, se proporciona administración de péptido 15 días después de sensibilización IP a BLG.

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

- 35 Los ratones a los que se inyectó el epítipo peptídico modificado antes de o después de la sensibilización han perdido completamente la capacidad de reaccionar a instilación nasal de BLG. Esto se muestra por la falta de eosinófilos en el líquido de lavado broncoalveolar y la ausencia de hiperreactividad tras exposición a dosis crecientes de metacolina, en comparación con el grupo de control, en el que se observan tanto eosinófilos como hiperreactividad.

40 **Ejemplo 16: Prevención y supresión de esclerosis múltiple.**

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

usando perlas magnéticas. Después se estimulan linfocitos T CD4+ *in vitro* por el epítipo de linfocitos T MOG (20 µg/ml) presentado por células del bazo adherentes (2×10^6 células).

5 Después de cuatro reestimulaciones, se ensaya una línea de linfocitos T en un ensayo de supresión de testigos con, como células diana, células CD4+CD25- policlonales obtenidas de animales en los que era eficaz la EAE (encefalomiелitis autoinmunitaria experimental). Solamente las células obtenidas de los animales inmunizados con el péptido que contiene el motivo de secuencia CX(2)-S tienen la capacidad de inducir muerte en células diana, en comparación con el control que consiste en CD4+CD25- efector de animales EAE, como se muestra en la Figura 20.

10 Se transfiere a un grupo de ratones C57BL/6 de forma adoptiva un clon de linfocito T regulador específico de CD4+ MOG- seguido después de 1 día de un protocolo que se pretende que induzca un síndrome de tipo esclerosis múltiple. Esto implica la administración del péptido de MOG en adyuvante completo de Freund y 2 inyecciones de toxina de pertussis. Este protocolo induce una expansión del clon de linfocito T efector, que da como resultado el desarrollo de señales compatibles con esclerosis múltiple en un periodo de 12 días después de la administración del péptido de MOG. Se ha observado que la puntuación clínica desarrollada por ratones pretratados con el clon de linfocito T citolítico se reduce significativamente en comparación con los ratones que reciben solo el protocolo completo de inducción de la enfermedad (Figura 21).

15 Se ha observado que la puntuación clínica desarrollada por ratones pretratados con el clon de linfocito T citolítico se reduce significativamente en comparación con ratones que han recibido solamente el clon de linfocito T efector, como se muestra en la Figura 21.

Ejemplo 17: Prevención de esclerosis múltiple por inmunización con péptido.

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

25 En el grupo de prevención, se inmunizan 5 ratones C57BL/6 por 5 inyecciones con 20 µg de péptido de CSMOG (CHGS YRSPFSRVVHLYR [SEQ ID NO: 32]), que contiene motivo de secuencia CX(2)-S, en IFA a intervalo de 14 días antes de la inducción de enfermedad como en el grupo modelo. Se realizan experimentos de control con el péptido [SEQ ID NO: 33] que carece del motivo en su extremo N terminal.

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

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

Ejemplo 18: prevención y supresión de diabetes insulino-dependiente espontánea con péptidos derivados de GAD65.

Los ratones con diabetes no obesos (NOD) constituyen un modelo animal adecuado para diabetes insulino-dependiente espontánea.

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

40 La región carboxilo terminal de GAD65, y en particular el fragmento 524-543 SRLSK₅₂₈VAPVIKARMMMEYGTT [SEQ ID NO: 34], es reconocida por linfocitos T específicos. Algunos de dichos linfocitos T son patógenos, tales como los que reconocen el fragmento 530-543, mientras que otros no inducen la enfermedad, tales como los que reconocen el fragmento 524-538.

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

Se inducen linfocitos Treg con propiedades citotóxicas por inmunización con el péptido modificado anteriormente que comprende el epítipo de linfocito T de la proteína GAD65. Se expanden linfocitos T obtenidos del bazo de ratones NOD de 20 semanas de edad, en un momento en el que está presente insulinitis así como diabetes manifiesta *in vitro* con el péptido 524-543 para generar clones de linfocitos T patógenos.

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

55 Las células policlonales purificadas a partir de ratones inmunizados con la secuencia consenso de tiorredoxina inducen apoptosis en células CD4 policlonales obtenidas de ratones NOD inmunizados por el péptido 524-543 cuando se estimulan por células presentadoras de antígenos cargadas con el péptido 524-543 (véase Figura 23). La tabla en la Figura 23 representa el porcentaje de células dobles positivas (células muertas) después de la resta de los valores de fondo obtenidos sin la población reguladora.

Se muestra que la transferencia adoptiva de Treg a la edad de 2 semanas en ratones NOD, concretamente antes de la aparición de insulinitis (3 semanas de edad) previene completamente la aparición de diabetes.

Se muestra que la inmunización directa de ratones NOD con el péptido CRLC KVAPVIKARMM [SEQ ID NO: 35] desde la edad de 2 semanas previene completamente la diabetes y lesiones de insulinitis.

- 5 En una situación supresora, se muestra que la transferencia adoptiva de Treg a diferentes edades entre 6 y 20 semanas suprime la diabetes y la insulinitis en ratones NOD. Se muestra que la inmunización con el péptido CRLC KVAPVIKARMM [SEQ ID NO: 35] después de la edad a la que la insulinitis ya es prominente (15 semanas de edad) suprime diabetes e insulinitis.

10 **Ejemplo 19: Prevención y supresión de diabetes insulino dependiente espontánea con péptidos derivados de insulina.**

Se inducen Treg con propiedades citolíticas inmunizando ratones NOD con el epítipo de linfocitos T de insulina unido al motivo C-X(2)-C con y sin un engarce de glicina.

Los péptidos que se sintetizan son:

- 15 EALYVCGERG CGPC [SEQ ID NO: 36]
 EALYVCGERG G CGPC [SEQ ID NO: 37]
 EALYVCGERG GG CGPC [SEQ ID NO: 38]
 EALYVCGERG GGG CGPC [SEQ ID. NO: 39]
 EALYVCGERG GGGG CGPC [SEQ ID NO: 40]

- 20 Los linfocitos Treg obtenidos con estos péptidos inducen apoptosis de linfocitos T patógenos específicos de insulina en un sistema *in vitro* en el que se activan células tanto patógenas como reguladoras por la presentación de insulina. Previenen o suprimen adicionalmente la aparición de diabetes e insulinitis después de transferencia adoptiva de Treg antes (2 semanas de edad) o después (6 semanas de edad) de la aparición espontánea de insulinitis, respectivamente.

- 25 Los linfocitos Treg obtenidos con estos péptidos también previenen o suprimen la aparición de diabetes e insulinitis cuando se inducen *in vivo* tras inmunización con péptido de secuencia que contiene la secuencia consenso de tiorredoxina, comenzando a la edad de 2 semanas para prevención o 15 semanas para supresión, respectivamente.

Ejemplo 20: Prevención y supresión de tiroiditis autoinmunitaria con péptidos derivados de tiroperoxidasa.

- 30 La tiroiditis autoinmunitaria en el hombre está asociada con la producción de anticuerpos para peroxidasa de tiroides. Los anticuerpos y linfocitos T específicos para TPO dan como resultado la destrucción de células tiroideas por una combinación de mecanismos citotóxicos y citolíticos, que conducen a hipotiroidismo. La inmunización a propósito de ratones C57Bl/6 con TPO induce un estado de enfermedad idéntico a la patología humana y se considera por lo tanto un modelo adecuado para tiroiditis autoinmunitaria.

- 35 El fragmento 540-559 (QGQLM₅₄₄NEELTERLFVLSNV [SEQ ID NO: 41] de TPO abarca un epítipo de linfocito T dominante de TPO reconocido por ratones C57Bl/6.

- El uso de diferentes algoritmos identificó el resto Met544 como el primer resto de anclaje en determinantes del MHC de clase II. Se reemplazan los aminoácidos P-4 a P-1 por la secuencia de D-isómero CGPC [SEQ ID NO: 42], que genera la secuencia (CGPC)_{D-isómero} MNEELTERL [SEQ ID NO: 43].

- 40 Se inmunizan ratones C57Bl/6 dos veces con el péptido experimental [SEQ ID NO: 43] o el péptido de control [SEQ ID NO: 41] o QGQLM₅₄₄NEELTERL [SEQ ID NO 48] en CFA/IFA. Diez días después de la última inmunización, los ratones se sacrifican y se preparan linfocitos T del bazo. Se expanden linfocitos T CD4+ *in vitro* usando células presentadoras de antígenos cargadas con la secuencia 540-559. Se obtienen clones de linfocitos T por dilución limitante.

- 45 La capacidad de los clones de linfocitos T generados con el péptido experimental (CGPC)_{D-isómero} MNEELTERL [SEQ ID NO: 43] para suprimir la activación de linfocitos T efector obtenidos por inmunización con péptido de secuencia 540-559 se ensaya *in vitro*.

En el presente documento, se cargan células presentadoras de antígenos con el péptido 540-559. La adición del clon de linfocito T efector da como resultado la activación y proliferación de dichas células, como se mide por incorporación de timidina. Cuando se añade un clon de linfocito T con actividad reguladora al sistema, junto con el clon efector, se inhibe completamente la activación y proliferación de este último.

- 50 La transferencia adoptiva de linfocitos T reguladores a ratones C57Bl/6 antes o después de la inmunización con el péptido 540-559 previno o suprimió, respectivamente, la inducción de tiroiditis, como se evaluó valorando la infiltración linfocítica del tiroides.

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

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

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

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

- 10 La capacidad de los clones de linfocitos T generados con el péptido CGPS AALTWVQTH [SEQ ID NO: 45] para suprimir la activación de linfocitos T efectores obtenidos por inmunización con el péptido de la secuencia 2340-2359 se ensaya *in vitro*. Por lo tanto, se cargaron células presentadoras de antígenos con el péptido 2340-2359. La adición del clon de linfocito T efector dio como resultado la activación y proliferación de dichas células, como se mide por incorporación de timidina. Cuando se añade al sistema un clon de linfocito T con actividad reguladora, junto con el clon efector, se inhibe completamente la activación y proliferación de este último.

- 15 La transferencia adoptiva de linfocitos T reguladores a ratones AKR/j antes o después de la inmunización con el péptido 2340-2359 previene o suprime, respectivamente, la inducción de tiroiditis, como se evalúa valorando la infiltración linfocítica del tiroides.

Ejemplo 22: Prevención y supresión de la alergia al polen con péptidos derivados de alérgenos del polen de abedul.

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

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

- 30 Este péptido se adsorbe en hidróxido de aluminio usando 50 µg de péptido por cada 1 mg de alumbre. Se llevaron a cabo tres inyecciones SC de 50 µg de péptido a intervalos de 2 semanas. Dos semanas después de la última inyección, se extrajo sangre de una vena periférica y se purificaron linfocitos T CD4+ por clasificación celular en perlas magnéticas. Se añadieron linfocitos T CD4+ al medio de cultivo en el que se incubaron células dendríticas histocompatibles, usadas como células presentadoras de antígeno, con el antígeno de Bet v 1, o con toxoide del tétanos como un control, durante 2 horas a temperatura ambiente. Después las células se lavaron y se añadieron linfocitos T CD4+ purificados al medio de cultivo. Dichos linfocitos T CD4+ indujeron apoptosis de células dendríticas que presentaban el antígeno de Bet v 1, pero no de células dendríticas que presentaban la proteína de toxoide del tétanos. La incubación de linfocitos T CD4+ con células dendríticas cargadas con el antígeno de Mal d 1 dio como resultado apoptosis de células dendríticas.

Los pacientes que presentaban síntomas alérgicos tras exposición a polen de abedul junto con una alergia orofaríngea a ingesta de manzana y tratados por 3 inyecciones SC de péptido CGPC LRAVESYLLAH [SEQ ID NO: 47] no consiguieron reaccionar a exposición a polen o contacto con manzana en la mucosa orofaríngea.

- 45 La vacunación con un péptido que contiene un epítipo de linfocito T del alérgeno Bet v 1 de polen de abedul modificado para contener un resto redox induce linfocitos T reguladores citolíticos que eliminan síntomas relacionados con exposición a polen de abedul y los resultantes de la ingesta de frutas que portan una epítipo de linfocitos T homólogo.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> D. Collen Research Foundation vzw. Saint-Remy, Jean-Marie

<120> PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS Y SU USO EN TRASTORNOS INMUNITARIOS

<130> K4262-PCT

55

<150> GB 0615966.9

<151> 11-08-2006

<150> GB 0710081.1
 <151> 25-05-2007

5

<150> GB 0711403.6
 <151> 13-06-2007

<160> 49

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Péptido

20

<400> 1

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

25

<210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Péptido

<400> 2

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

35

<210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Péptido

<400> 3

Cys His Gly Ser
1

45

<210> 4
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Péptido

55

<400> 4

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

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

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

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

Pro Phe
65

5 <210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 5

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

15 <210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido
 <400> 6

Cys Gly Phe Ser
1

25 <210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido
 <400> 7

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

Lys Ile Arg

5 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido

10 <400> 8

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

15 <210> 9
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido

20 <400> 9

Ile Ile Thr Ile Ala Val Val Ala Ala Leu Leu Leu Val Ala Ala Ile
 1 5 10 15

Phe Gly Val Ala Ser Cys Leu Ile Arg Ser Arg Ser Thr Lys Asn Glu
 20 25 30

Ala Asn Gln Pro Leu Leu Thr Asp Ser
 35 40

25 <210> 10
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido

<400> 10

ES 2 657 480 T3

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

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

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

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

Leu Leu Thr Asp
 65

5 <210> 11
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 11

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

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

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

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

Leu Leu Thr Asp
 65

15 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido
 <400> 12

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

5 <210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 13

Cys Gly Pro Ser
1

15 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido
 <400> 14

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

25 **Arg**
 <210> 15
 <211> 45
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido
 35 <400> 15

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

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

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

40 <210> 16
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido

ES 2 657 480 T3

<400> 16

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

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

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

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Cys Gly Pro Ser Tyr Arg Ser Pro Phe Ser
50 55 60

Arg Val Val His Leu Tyr Arg
65 70

5 <210> 17
<211> 67
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido

<400> 17

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

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

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

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

Leu Tyr Arg
65

15 <210> 18
<211> 15
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido

25 <400> 18

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

5 <210> 19
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido

<400> 19

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

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

15 <210> 20
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido

25 <400> 20

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

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

30 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador

<400> 21
 ctctggtccc cggggccatc 20

40 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 22
 tatgtagtga gcccgaagaa 20

50 <210> 23

ES 2 657 480 T3

	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador	
10	<400> 23 ctccacgtgc ttcaccaaa	20
15	<210> 24 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
25	<400> 24 ggaaaatagt acagagaggc a <210> 25	21
30	<211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
40	<400> 25 cattgtgatg gactccggag acgg	24
45	<210> 26 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador	
55	<400> 26 catctctgc tcgaagtcta gagc	24
60	<210> 27 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador	
70	<400> 27 cccttatcc agccctcact c	21
75	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
80	<220> <223> Cebador	
85	<400> 28 cctggggact ttccacacc	20
90	<210> 29	

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

5

<220>
 <223> Péptido

<400> 29

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

10

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

15

<220>
 <223> Péptido

20

<400> 30

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

25

<210> 31
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Péptido

<400> 31

Cys His Gly Cys
1

35

<210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Péptido

<400> 32

45

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

Arg

50

<210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Péptido

<400> 33

Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr Arg
1 5 10

5 <210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 34

Ser Arg Leu Ser Lys Val Ala Pro Val Ile Lys Ala Arg Met Met Glu
1 5 10 15

Tyr Gly Thr Thr
20

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

20 <220>
 <223> Péptido
 <400> 35

Cys Arg Leu Cys Lys Val Ala Pro Val Ile Lys Ala Arg Met Met
1 5 10 15

25 <210> 36
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido
 <400> 36

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

40 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido
 <400> 37

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

50 <210> 38
 <211> 16

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Péptido

<400> 38

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

10 <210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Péptido

<400> 39

20 **Glu Ala Leu Tyr Val Cys Gly Glu Arg Gly Gly Gly Gly Cys Gly Pro**
1 5 10 15

Cys

25 <210> 40
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Péptido

<400> 40

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

Pro Cys

35 <210> 41
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Péptido

<400> 41

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

45 **Ser Asn Val**

<210> 42
<211> 4

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido

<400> 42

Cys Gly Pro Cys

10

<210> 43
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Péptido

<400> 43

20

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

<210> 44
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Péptido

30

<400> 44

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

Gly Asp Pro Arg
 20

35

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

40

<220>
 <223> Péptido

<400> 45

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

45

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

50

<220>
 <223> Péptido

55

<400> 46

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

5 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 47

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

15 <210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <400> 48

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

25 <210> 49
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido
 <400> 49

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

35

REIVINDICACIONES

1. Un péptido inmunogénico aislado que comprende:
 - un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de una proteína autoantigénica implicada en esclerosis múltiple; y
 - un motivo redox C-X(2)-[CT] o [CST]-X(2)-C, estando dicho motivo adyacente a dicho epítipo o separado de dicho epítipo por un máximo de 7 aminoácidos.
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho motivo está separado de dicho epítipo por un máximo de 4 aminoácidos.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el motivo es C-X(2)-C.
4. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha secuencia comprende además una secuencia de dirección endosómica tardía.
5. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho péptido tiene una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos.
6. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho péptido tiene una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos.
7. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cisteína en dicho motivo está metilada.
8. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el autoantígeno es glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína básica de mielina (MBP) o proteína proteolipídica (PLP).
9. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el autoantígeno es glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG).
10. Un péptido que comprende:
 - un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de un autoantígeno implicado en la esclerosis múltiple; y
 - un motivo redox C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C, estando dicho motivo adyacente a dicho epítipo, o separado de dicho epítipo por un máximo de 7 aminoácidos, para tratar o prevenir esclerosis múltiple.
11. El péptido de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho motivo está separado de dicho epítipo por un máximo de 4 aminoácidos, para su uso en el tratamiento o la prevención de esclerosis múltiple.
12. El péptido de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que el motivo es C-(X)2-C, para su uso en el tratamiento o la prevención de esclerosis múltiple.
13. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que dicho péptido tiene una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos, para su uso en el tratamiento o la prevención de esclerosis múltiple.
14. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el autoantígeno es glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), para su uso en el tratamiento o la prevención de esclerosis múltiple.
15. Un procedimiento para preparar un péptido, en el que el péptido es capaz de inducir actividad de linfocitos T CD4+ citotóxicos comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - (a) proporcionar una secuencia peptídica que comprende un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de un autoantígeno implicado en esclerosis múltiple y
 - (b) unir a dicha secuencia peptídica una secuencia que comprende el motivo redox C-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-C, de modo que dicho motivo y dicho epítipo estén adyacentes entre sí o separados por un máximo de 7 aminoácidos.
16. Un procedimiento *in vitro* para obtener una población de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - proporcionar células de sangre periférica,
 - poner en contacto dichas células con un péptido inmunogénico que comprende:
 - un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de una proteína autoantigénica derivada de un autoantígeno implicado en esclerosis múltiple; y
 - un motivo redox C-X(2)-[CT] o [CST]-X(2)-C, estando dicho motivo adyacente a dicho epítipo, o separado de dicho epítipo por un máximo de 7 aminoácidos, y
 - expandir dichas células en presencia de IL-2.

- 5 17. Una población de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno, inducida por un péptido con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de un autoantígeno implicado en esclerosis múltiple, y un motivo C-X(2)-[CT] o [CST]-X(2)-C, estando dicho motivo adyacente a dicho epítipo, o separado de dicho epítipo por un máximo de 7 aminoácidos, y que puede obtenerse por el procedimiento de la reivindicación 16.
- 10 18. Una población de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno, inducida por un péptido con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II de un autoantígeno implicado en esclerosis múltiple, y un motivo C-X(2)-[CT] o [CST]-X(2)-C, estando dicho motivo adyacente a dicho epítipo, o separado de dicho epítipo por un máximo de 7 aminoácidos, y que puede obtenerse por el procedimiento de la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento y la prevención de esclerosis múltiple.

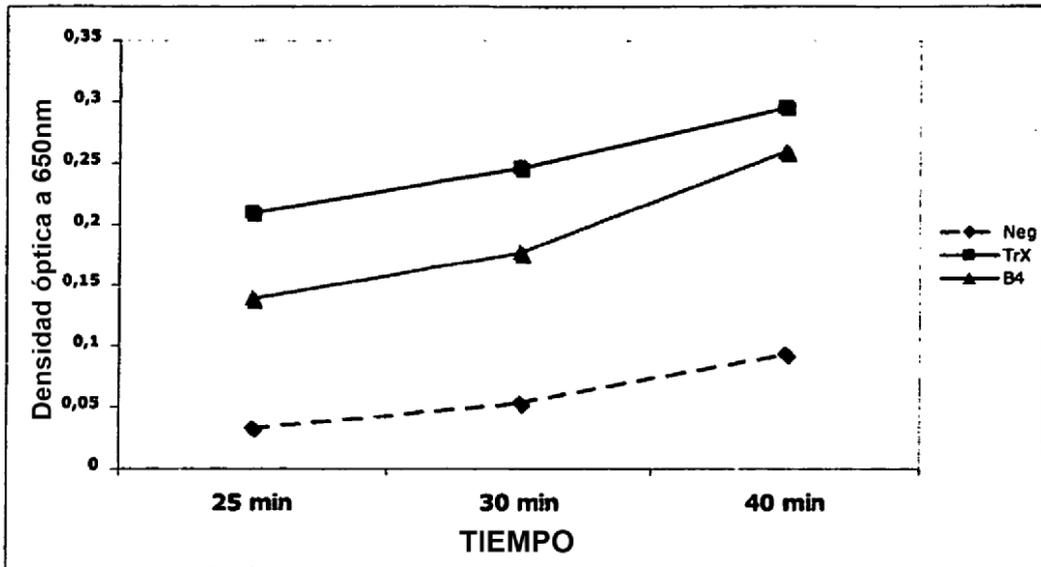


Figura 1

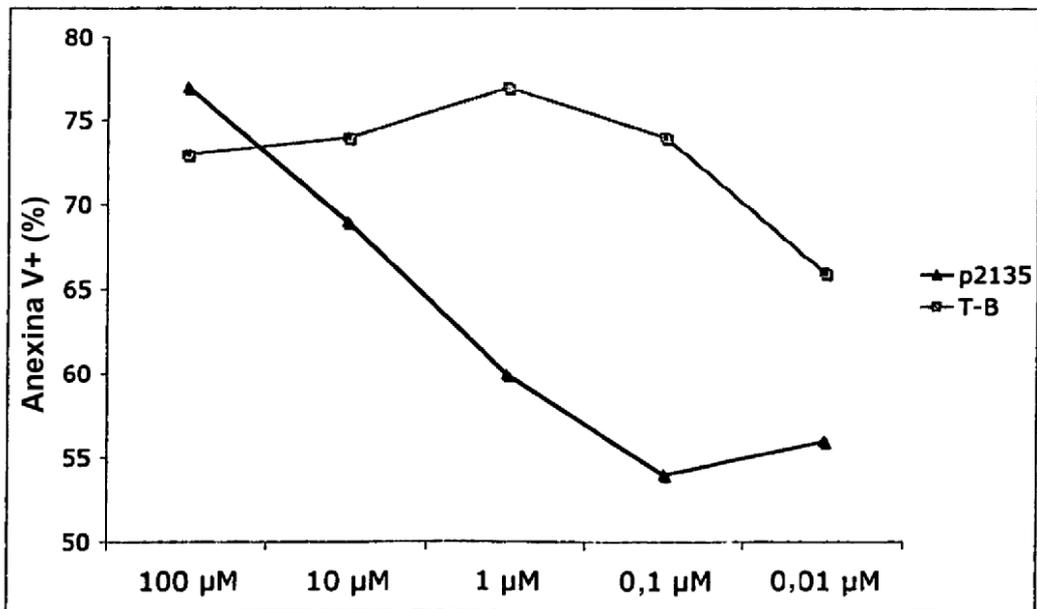


Figura 2

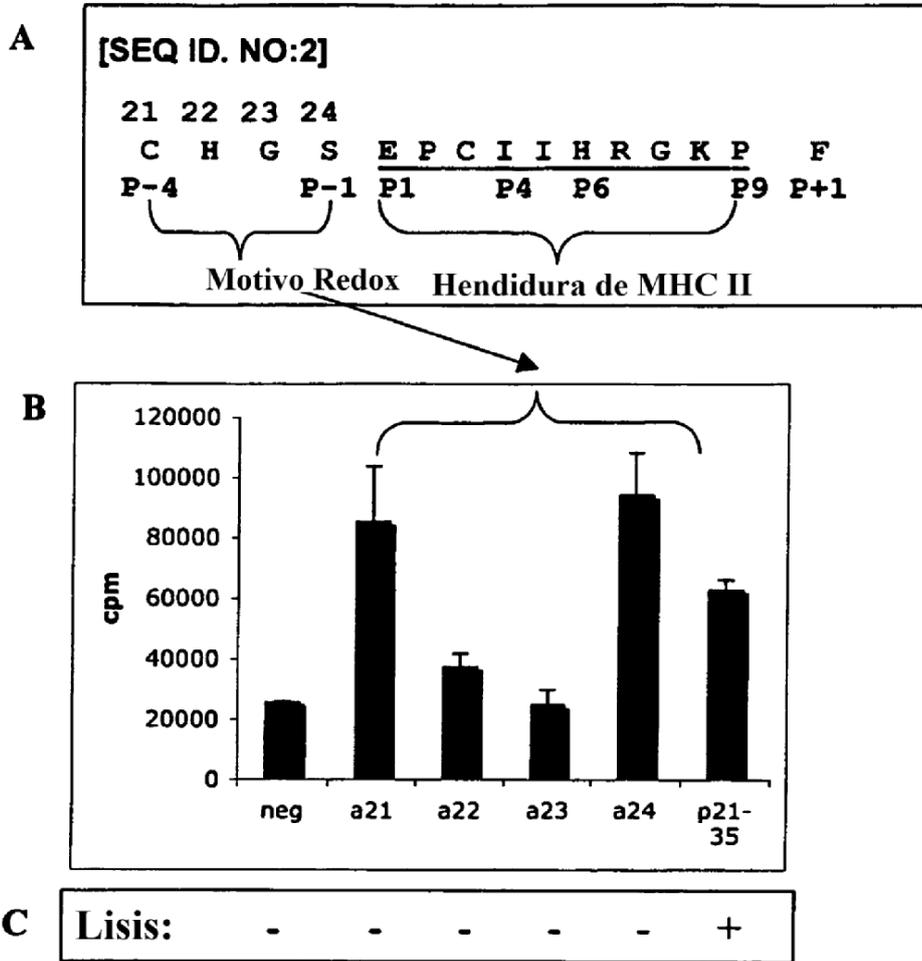


Figura 3

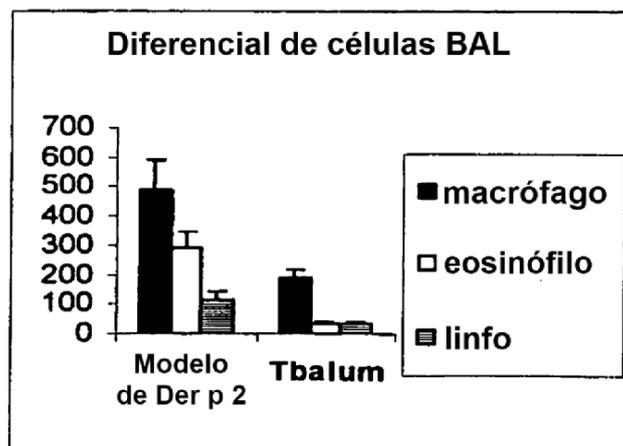
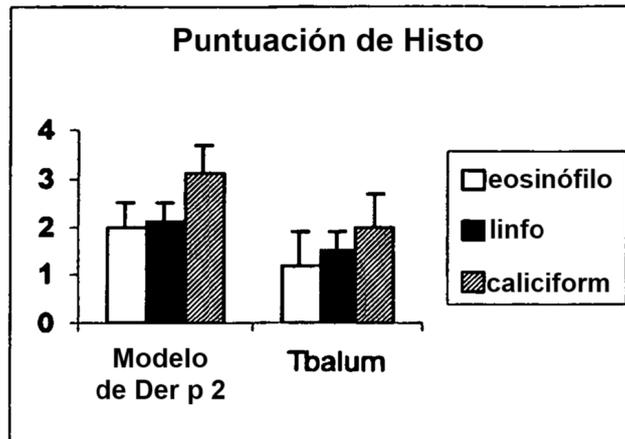
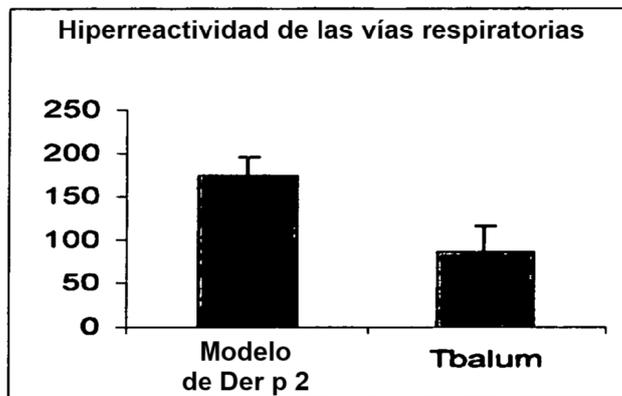


Figura 4A



B



C

Figura 4 (continuación)

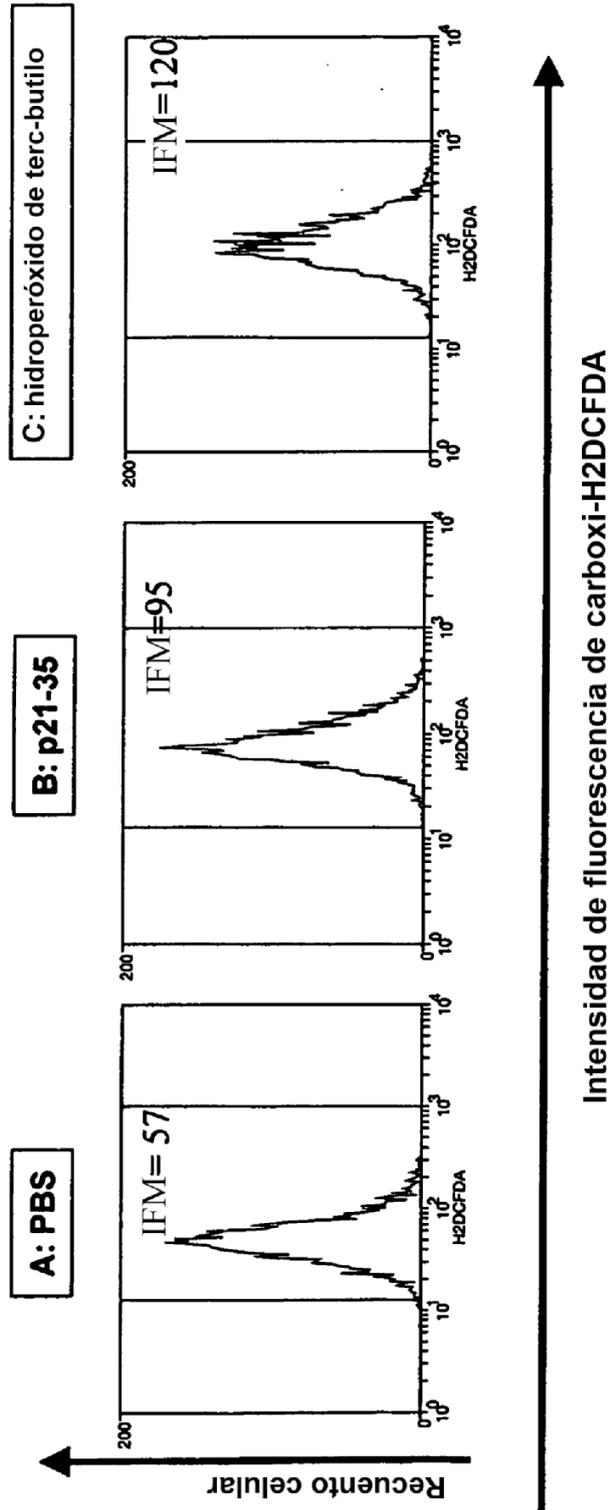


Figura 5

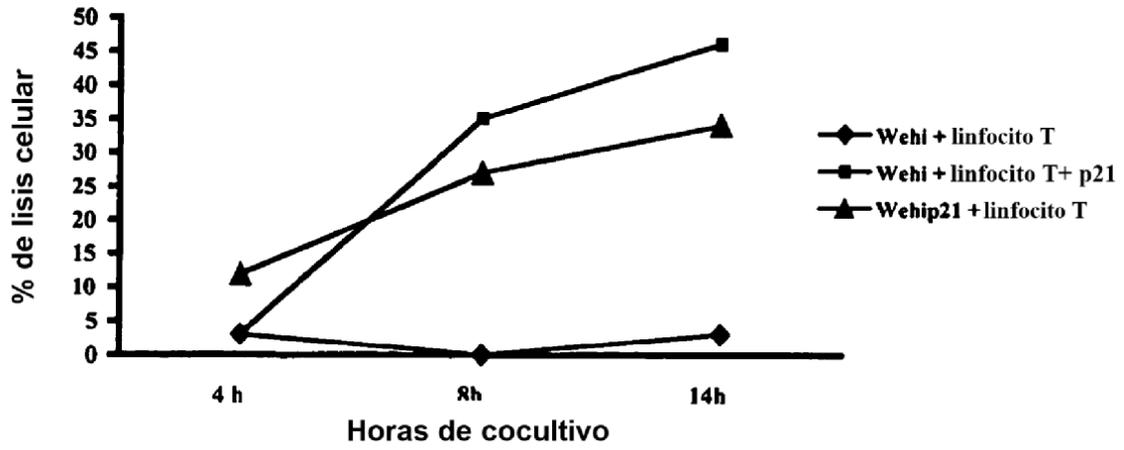


Figura 6

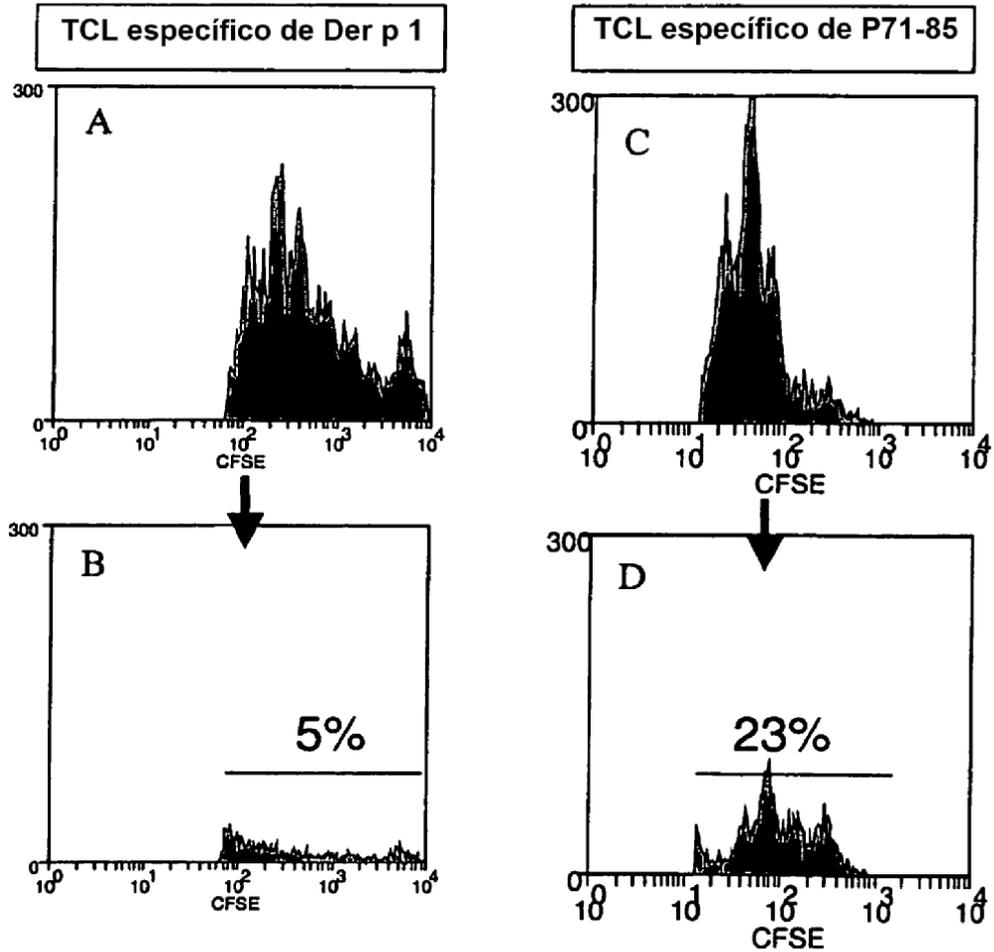


Figura 7

Sobrenadantes en día 3

Análisis de ARNm en linfocitos T en reposo

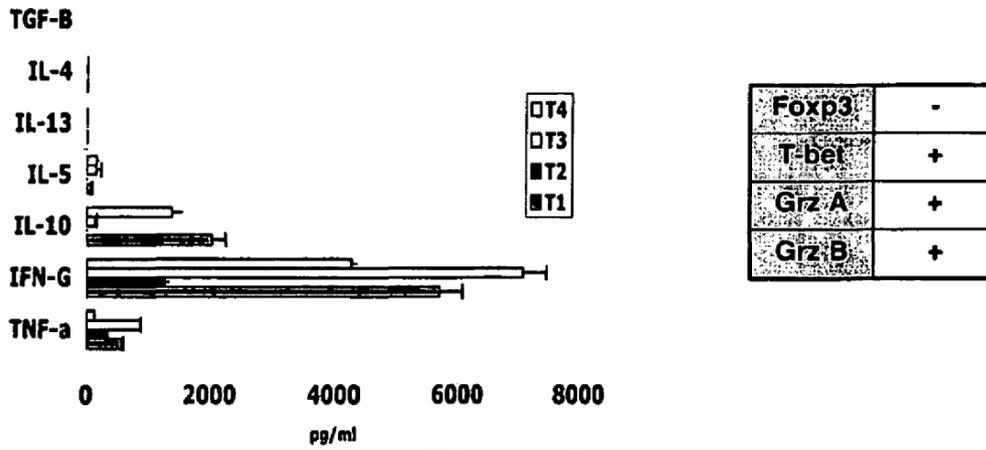


Figura 8

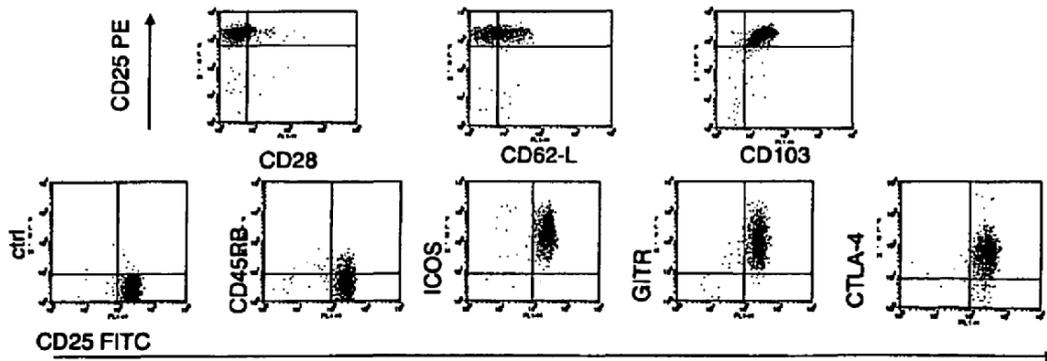


Figura 9

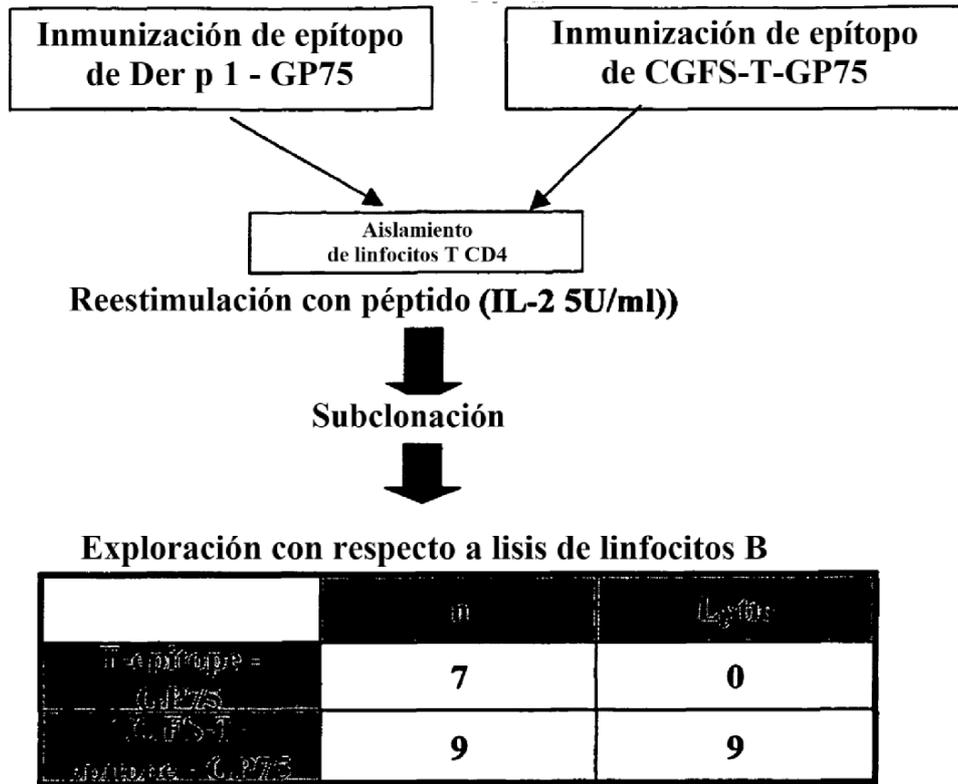


Figura 10

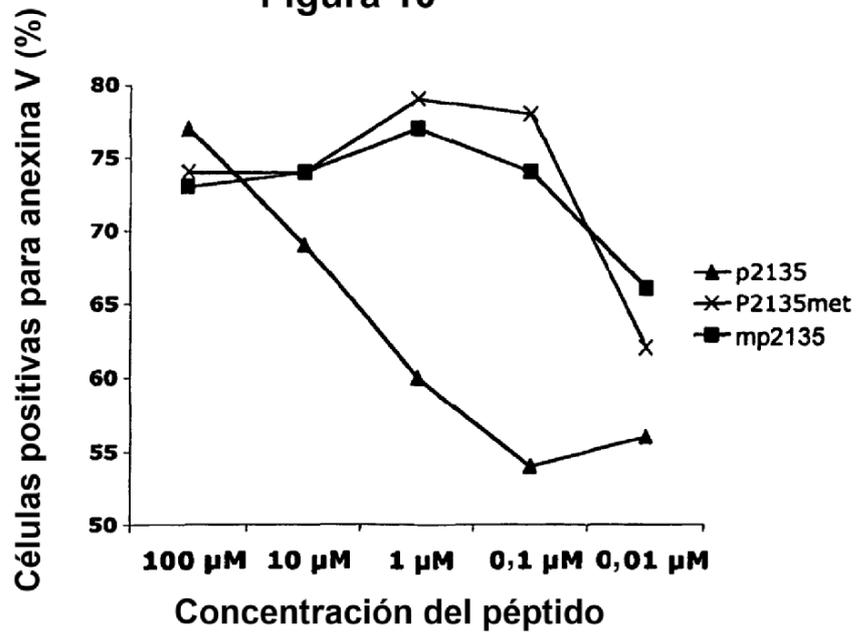


Figura 11A

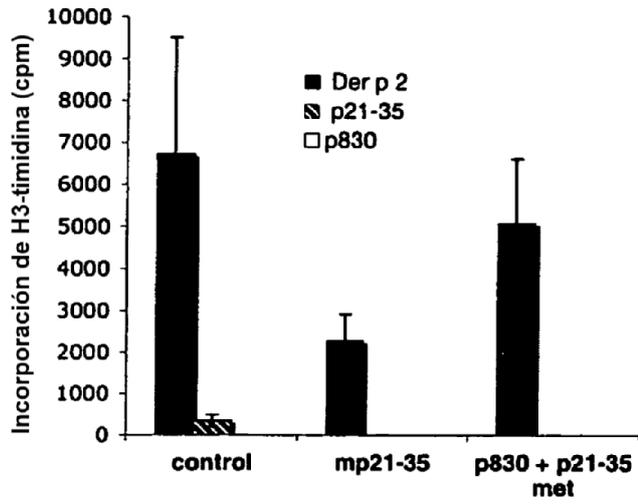


Figura 11B

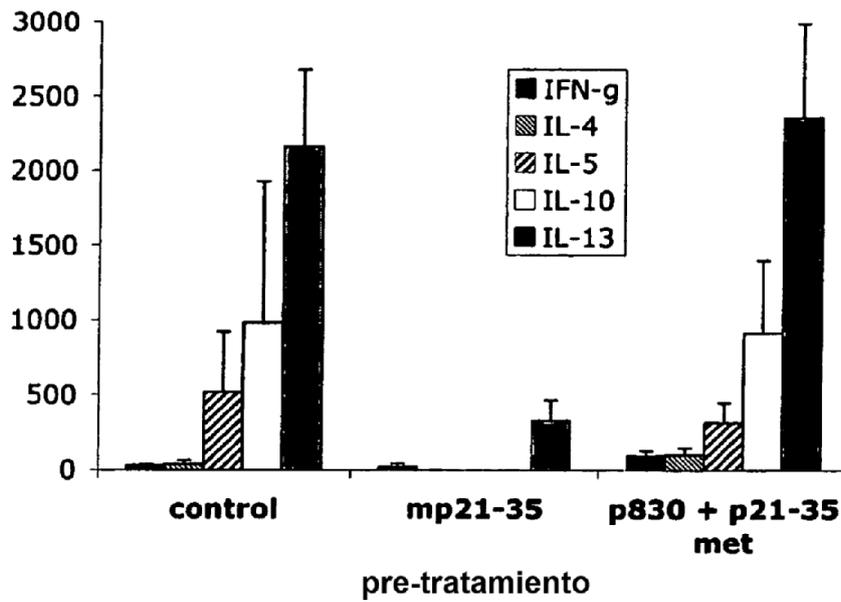


Figura 11C

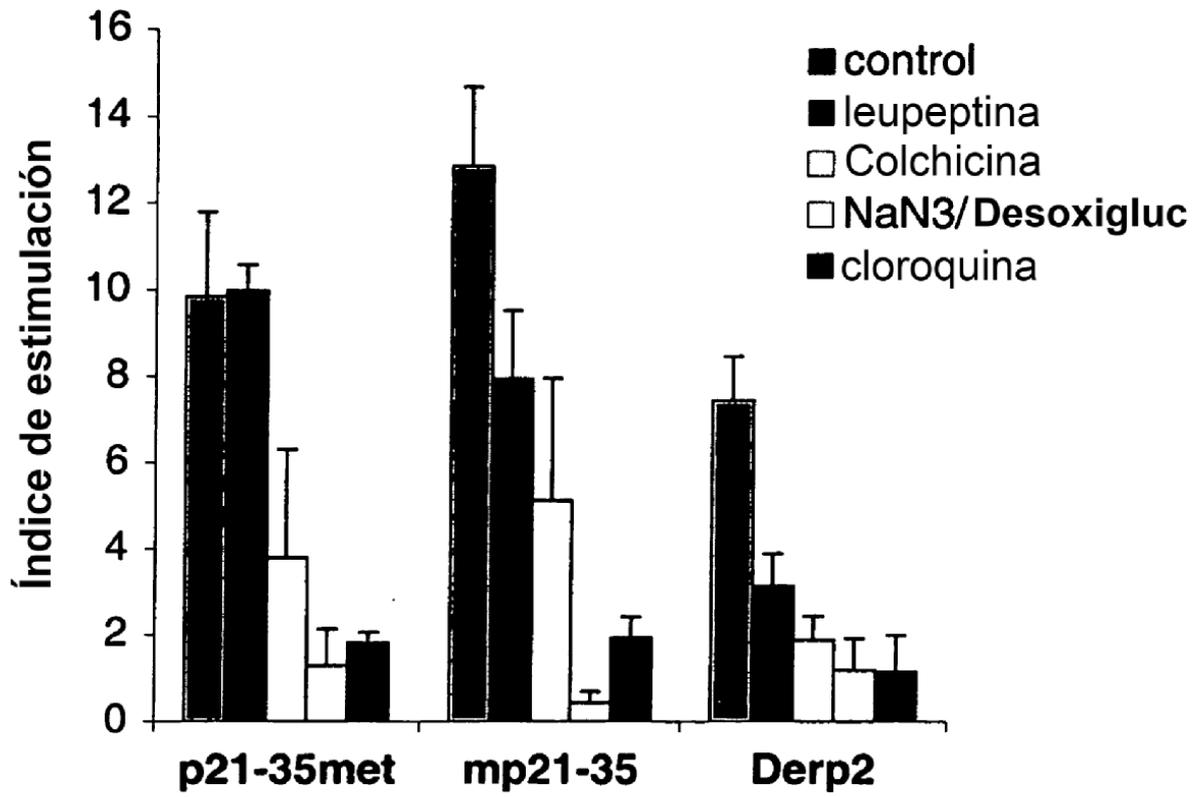


Figura 11D

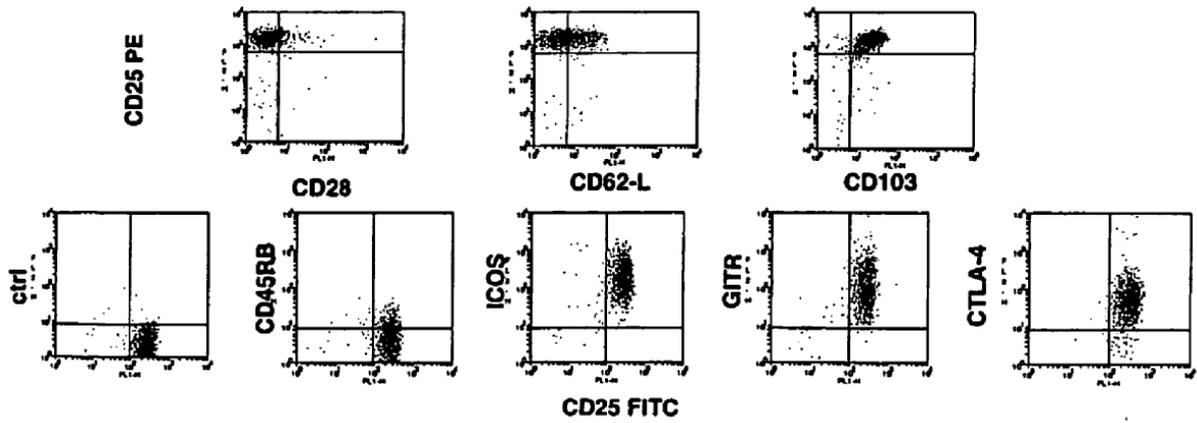


Figura 12A

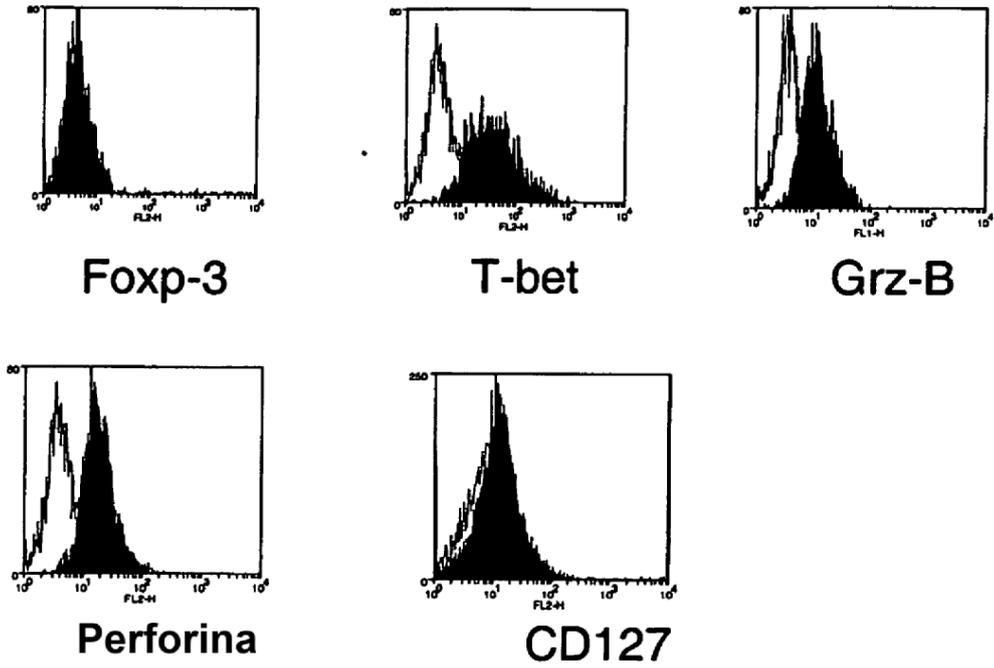


Figura 12B

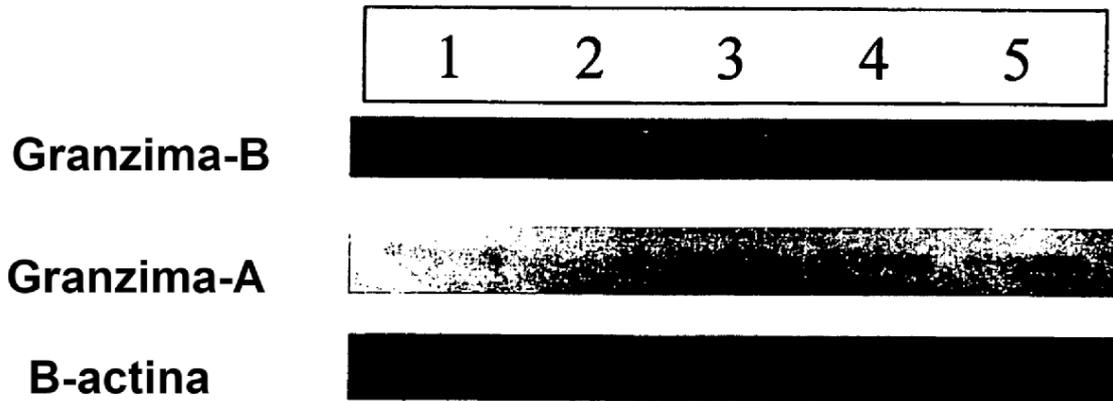


Figura 12C

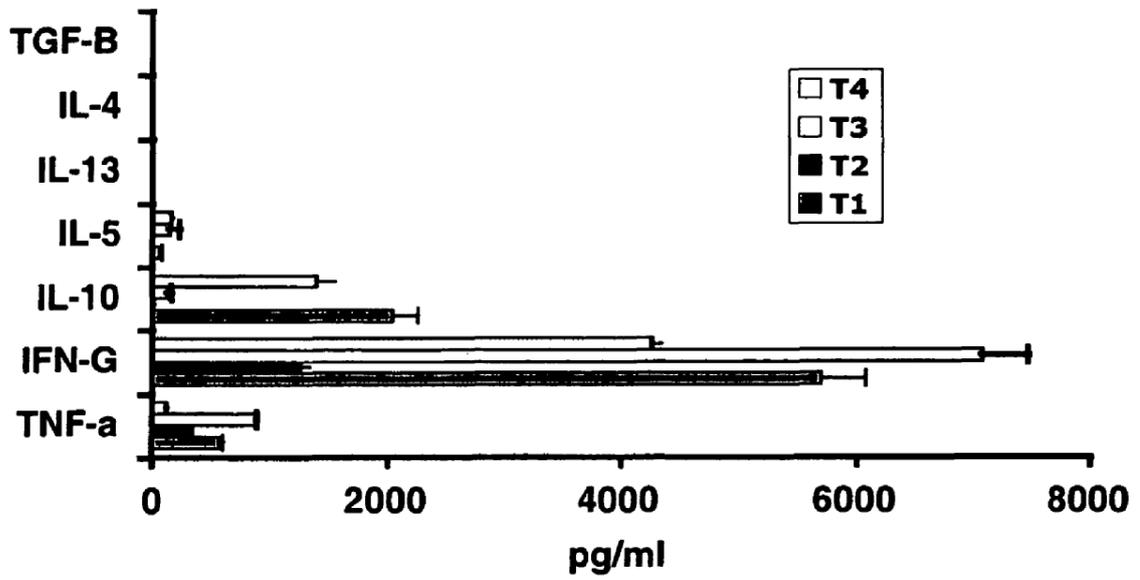


Figura 12D

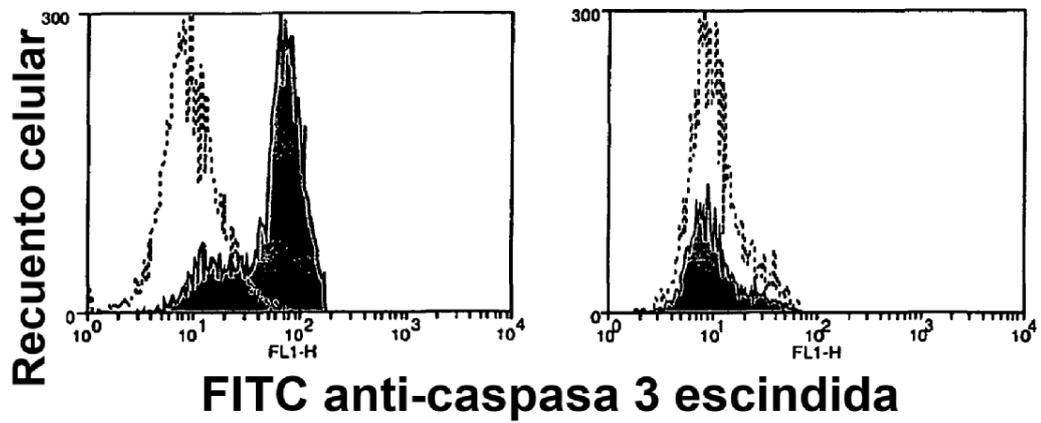


Figura 13A

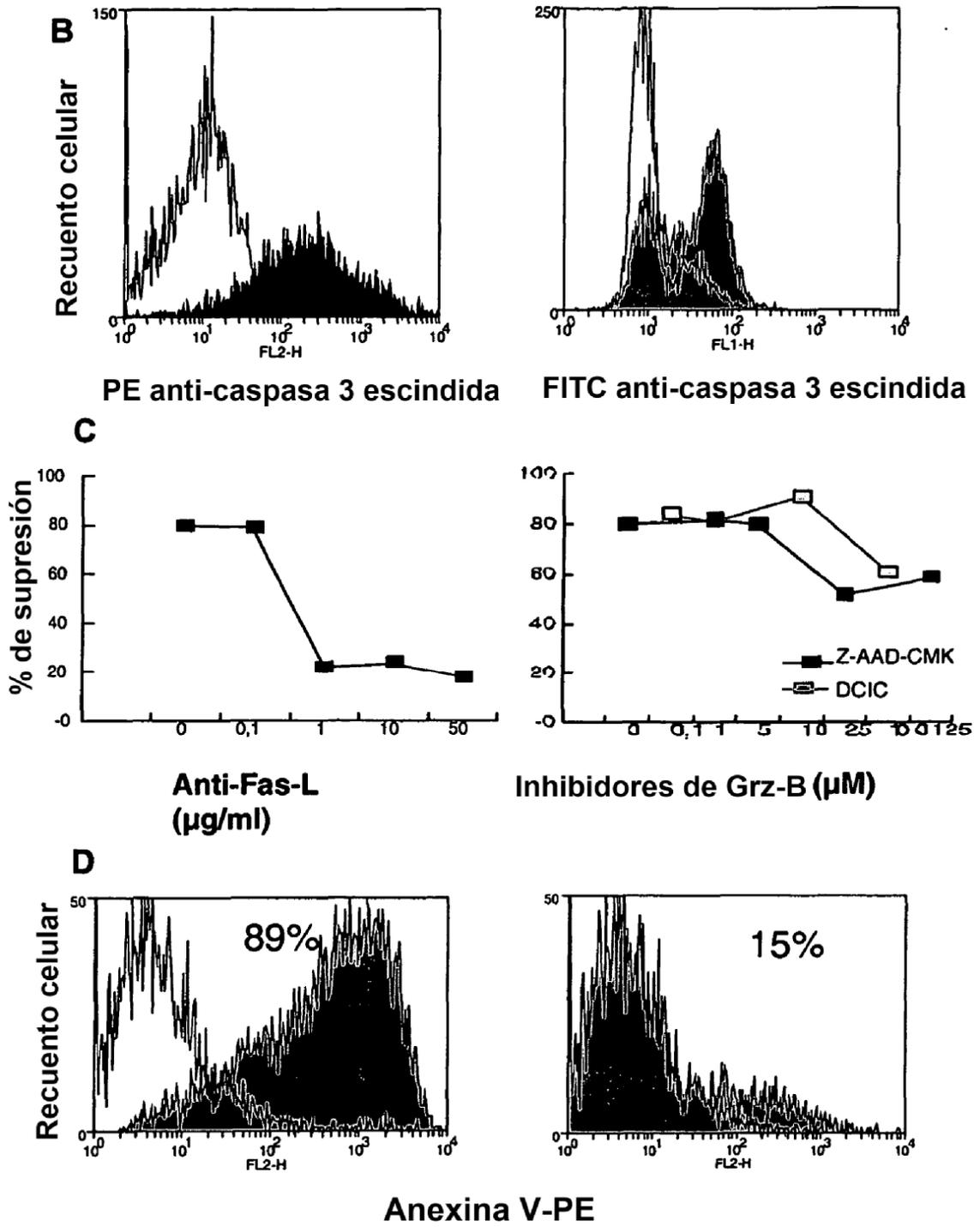


Figura 13 (continuación)

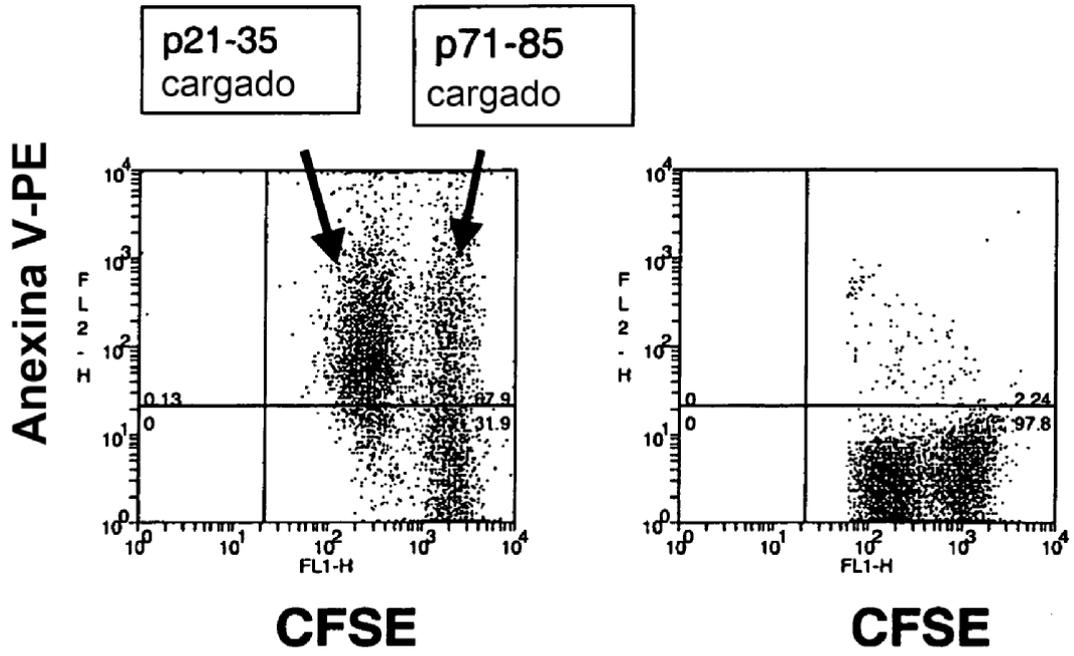


Figura 13E

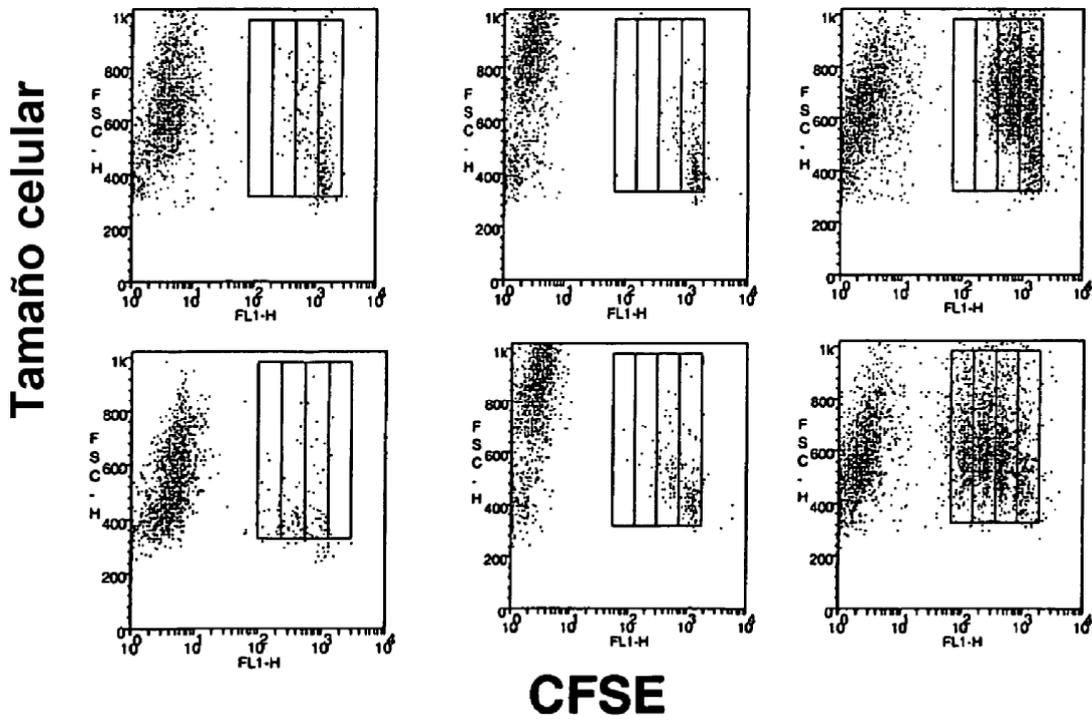


Figura 14A

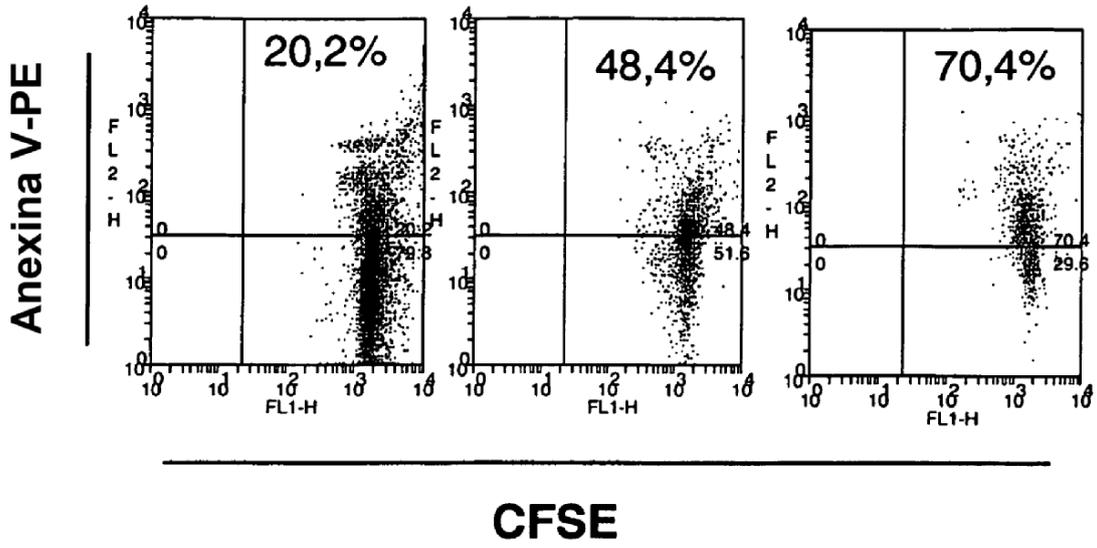


Figura 14B

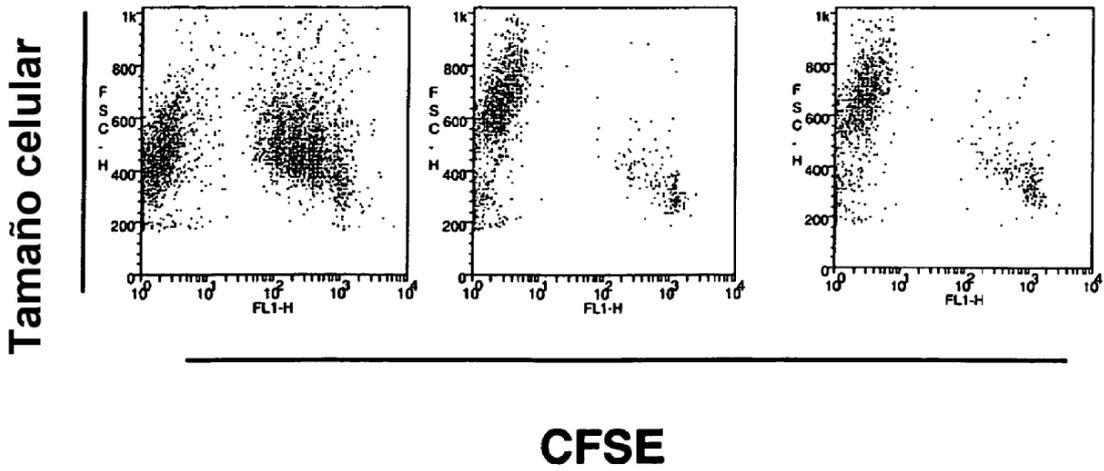
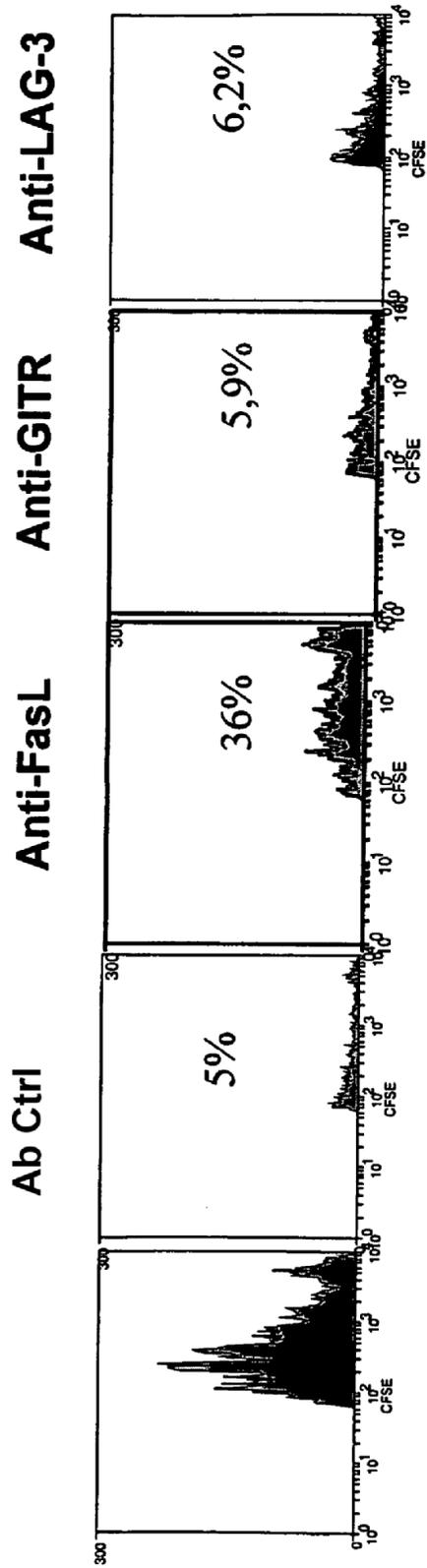
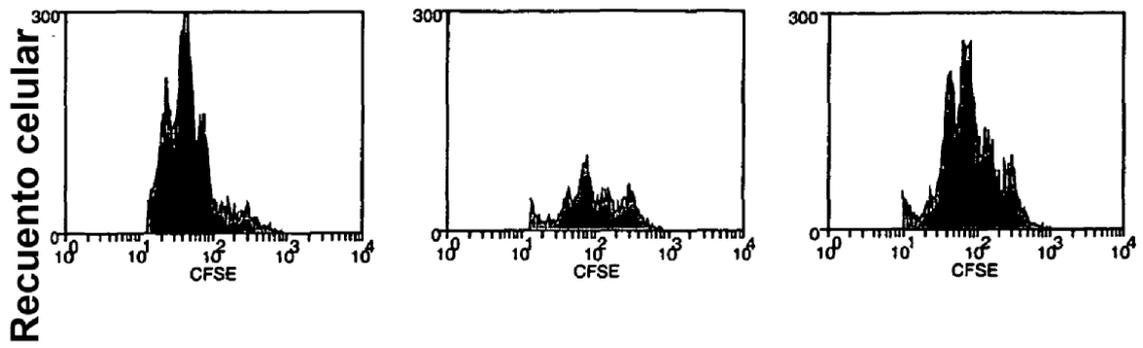


Figura 14C



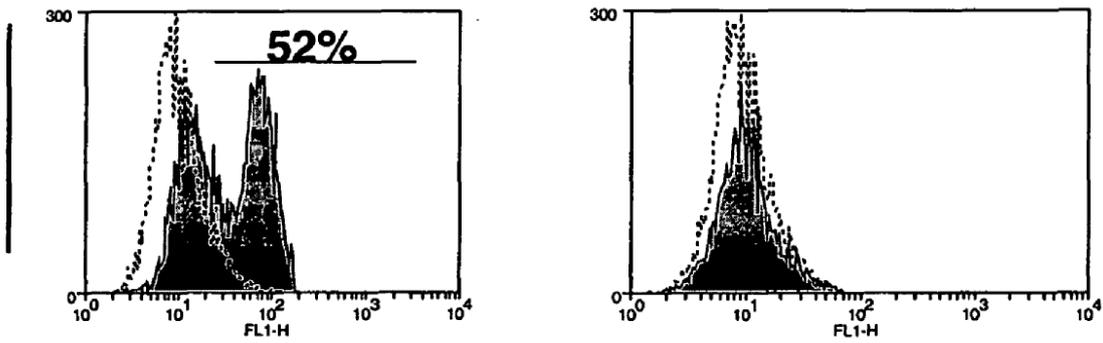
CFSE

Figura 14D



CFSE

Figura 14E



FITC anti-caspasa 3 escindida

Figura 15A

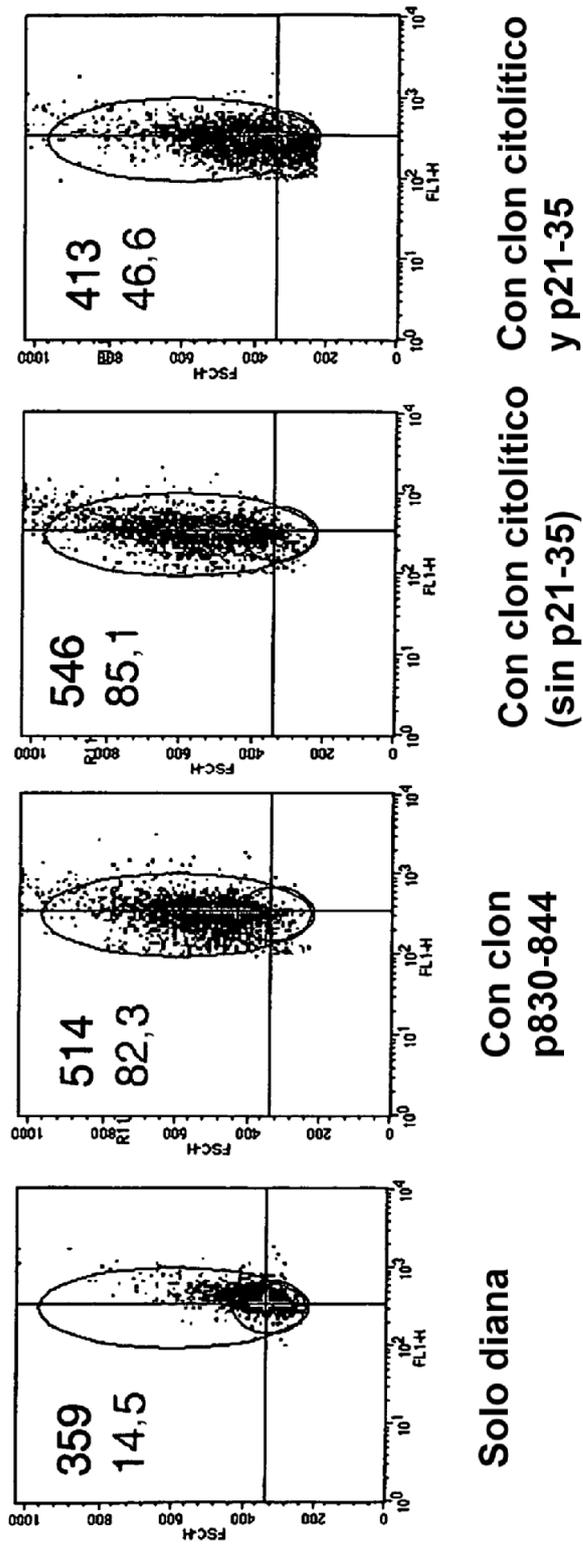


Figura 14F

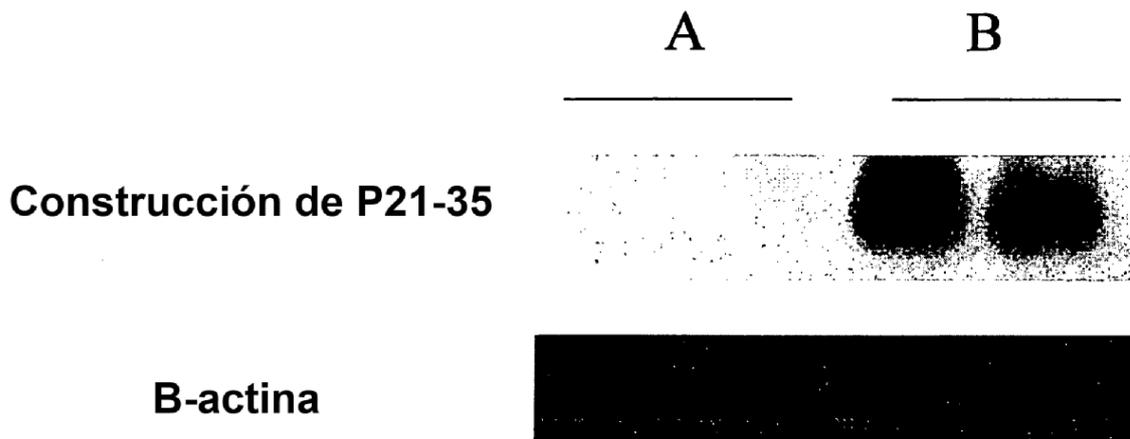


Figura 15B

Células CD4 de pulmón	Treg	T de control	Sin linfocitos T
% CD4	91,9 +/- 0,815	27,4 +/- 1,503	25,3 +/- 1,428
% Vβ8.1+ (en CD4)	92,5 +/- 1,087	26,5 +/- 1,544	19,2 +/- 1,138

Figura 15C

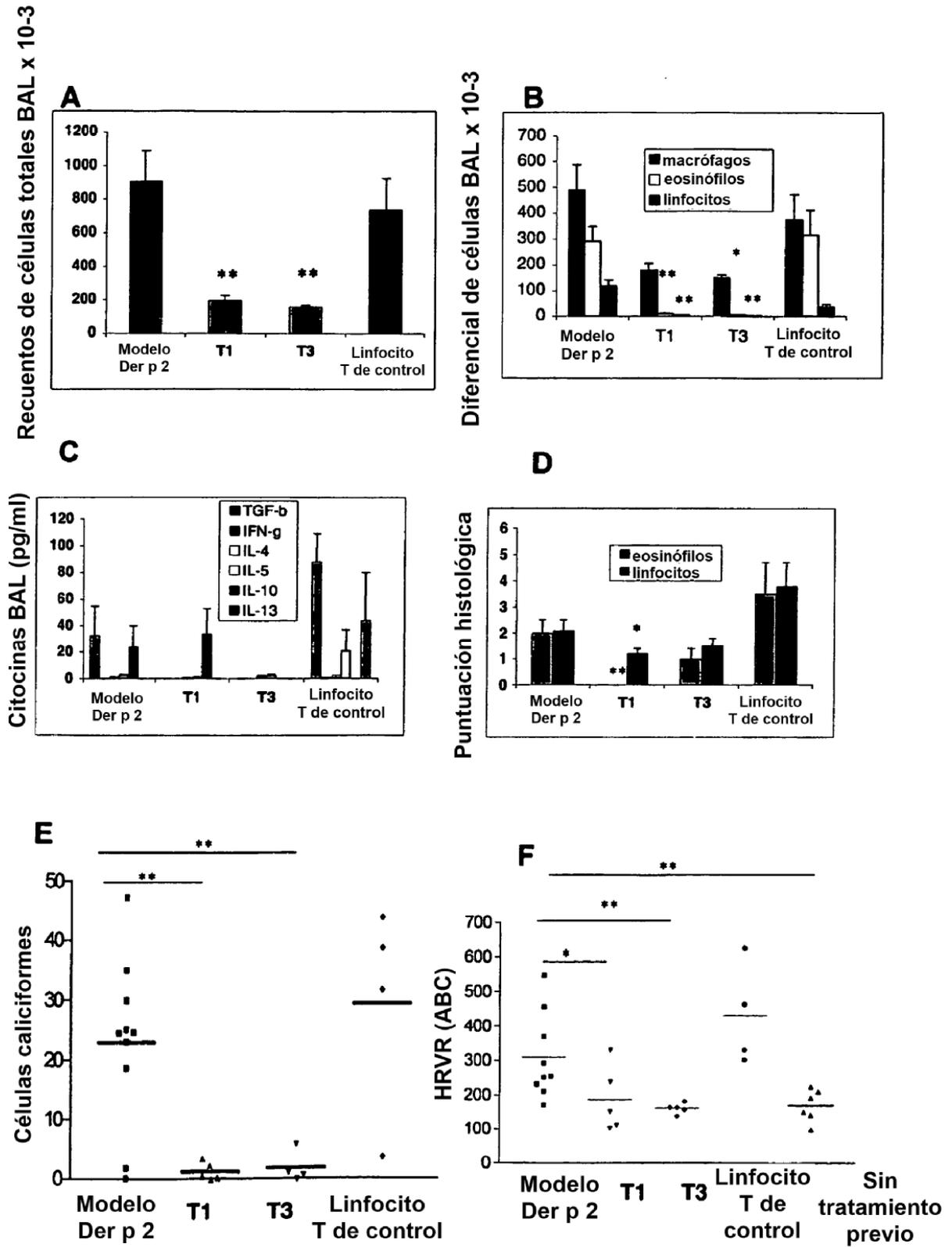


Figura 16

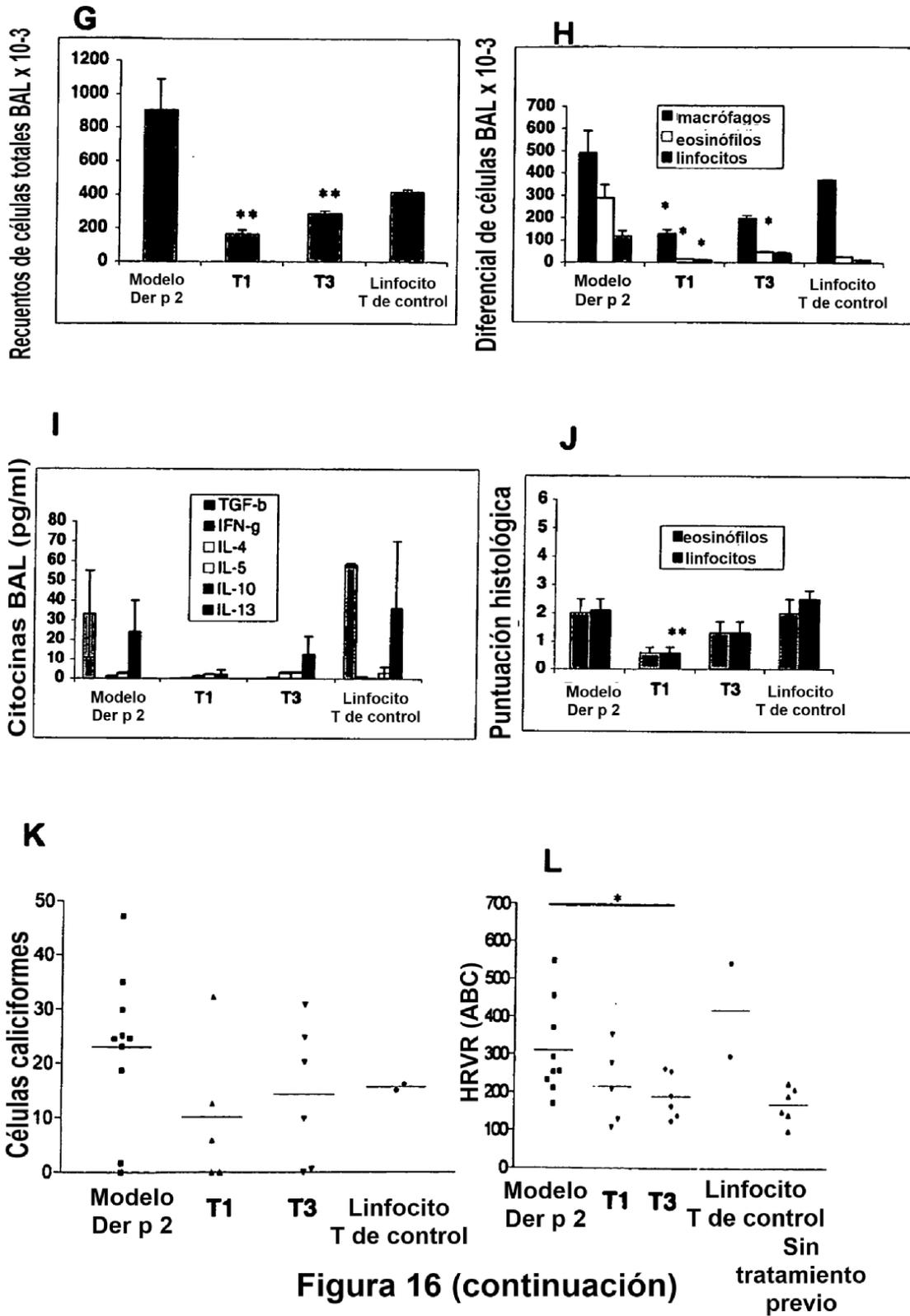


Figura 16 (continuación)

Sin tratamiento previo

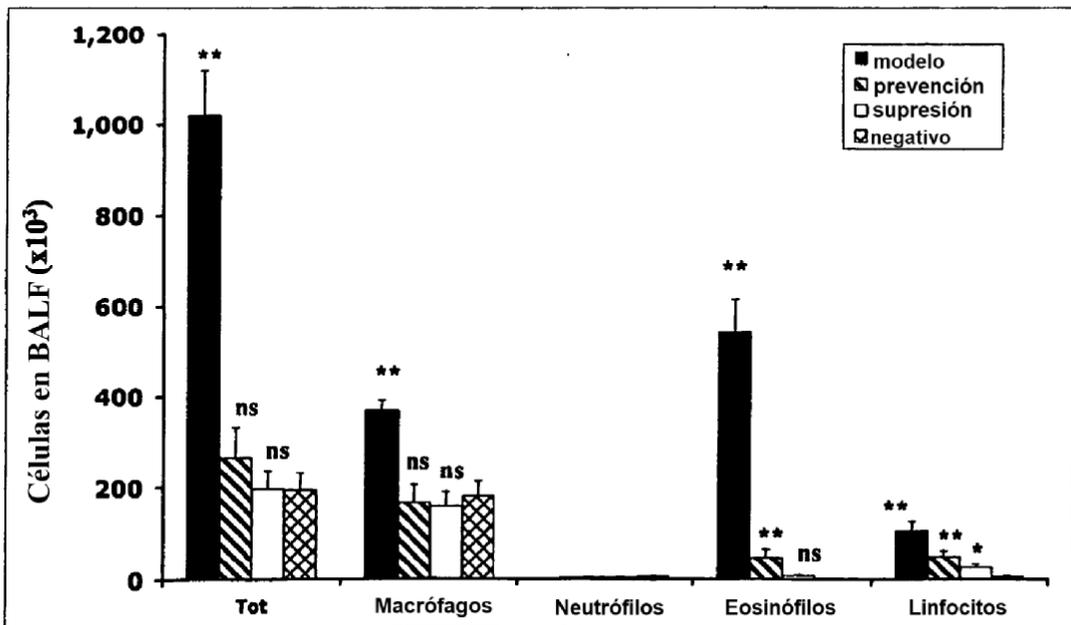
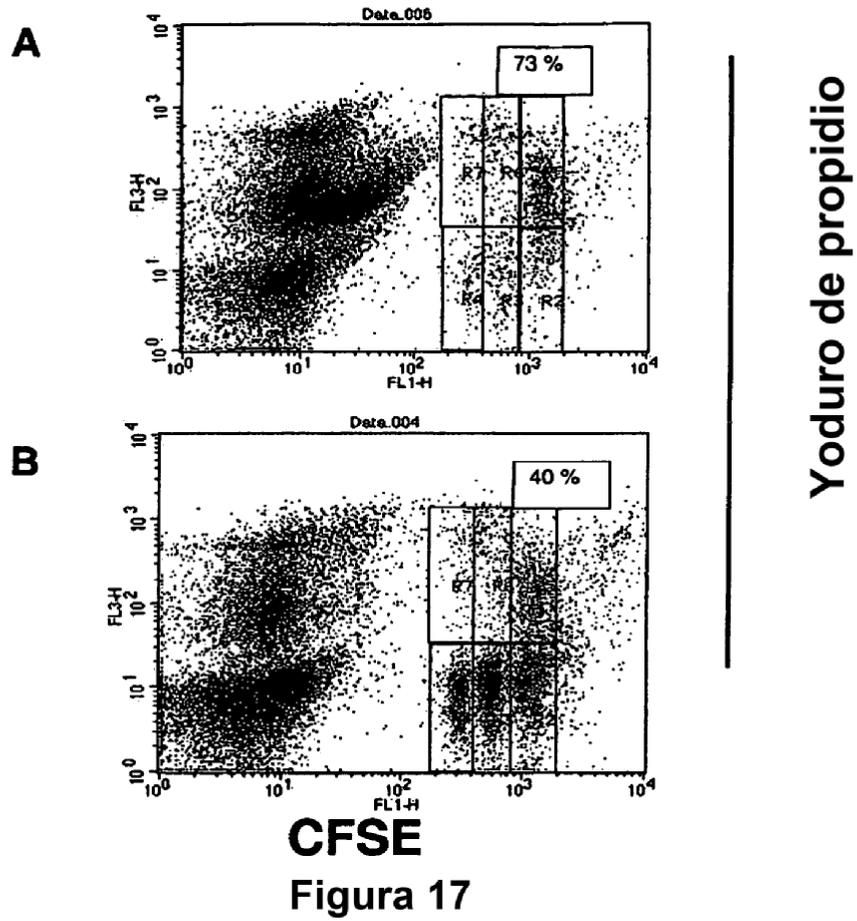


Figura 18A

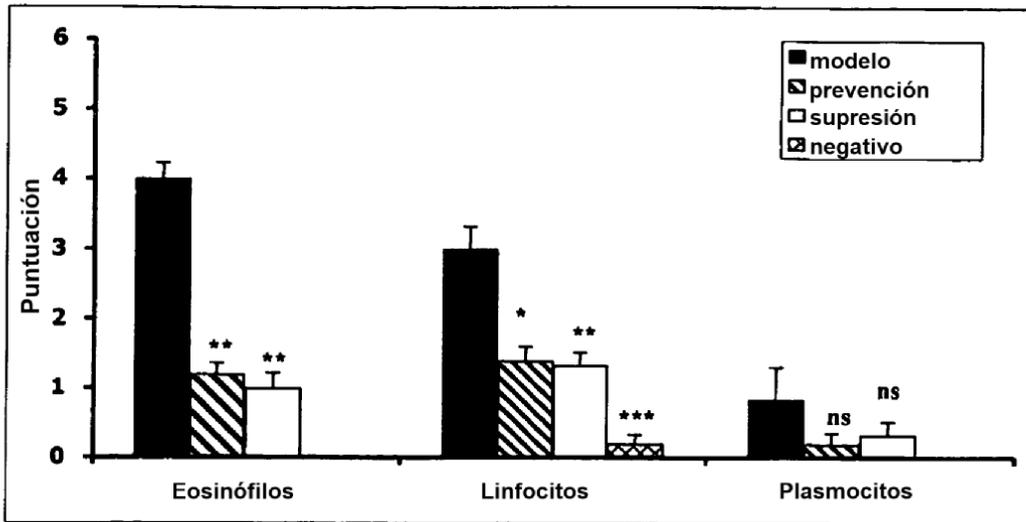
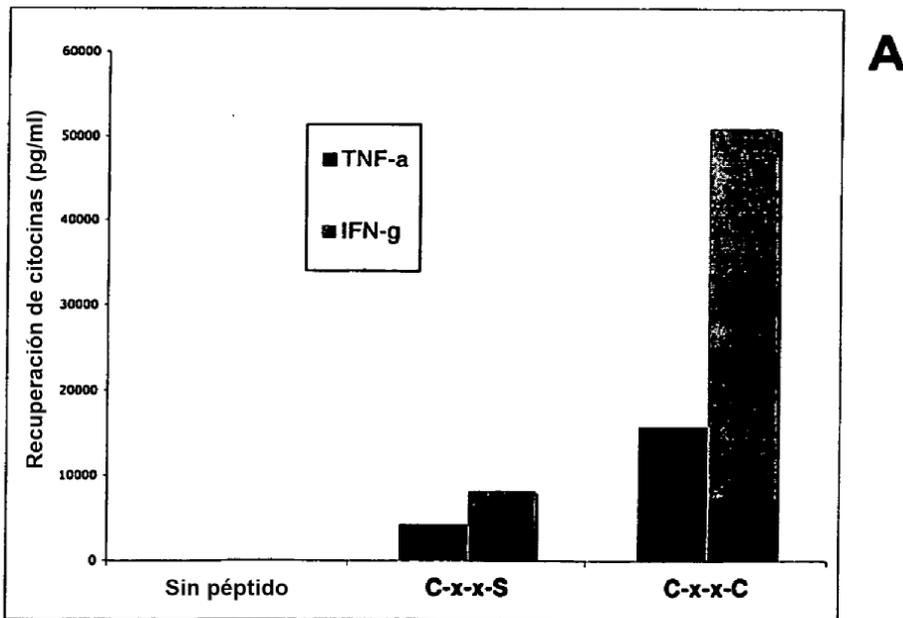


Figura 18B



A

B



Figura 19

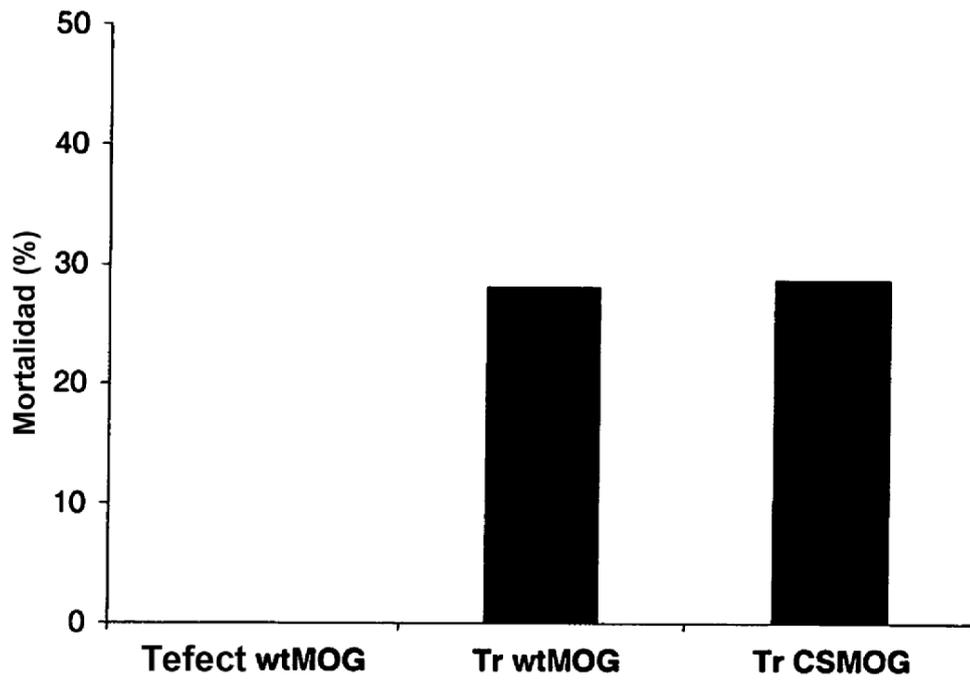


Figura 20

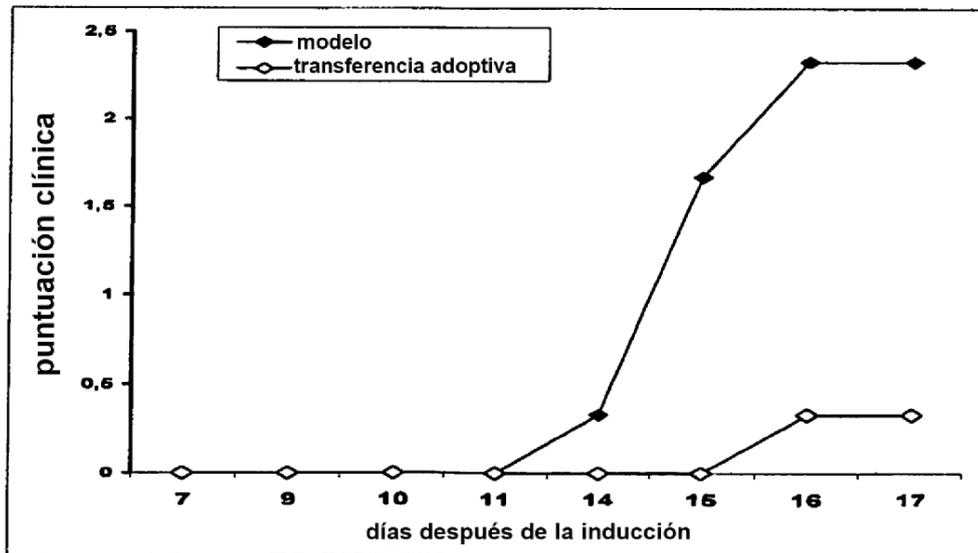


Figura 21

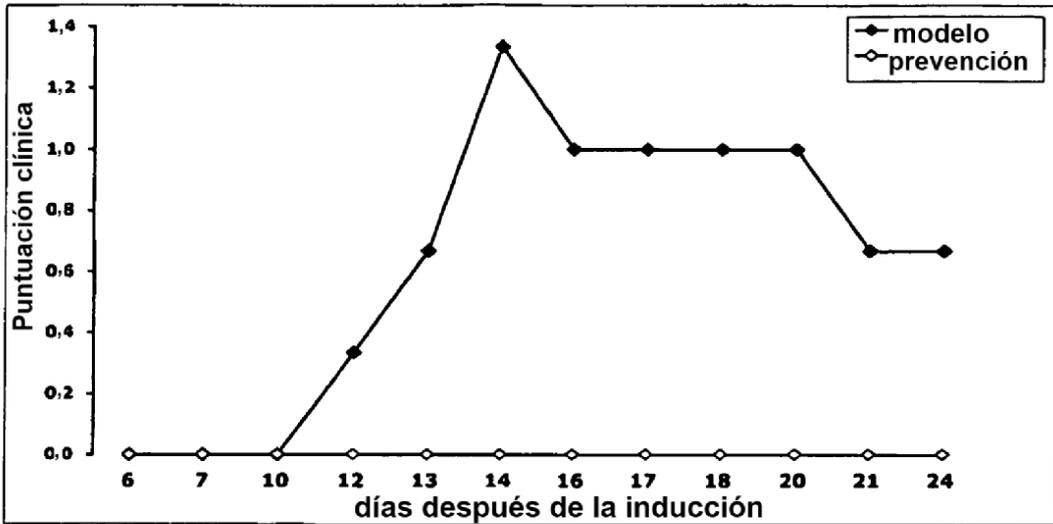
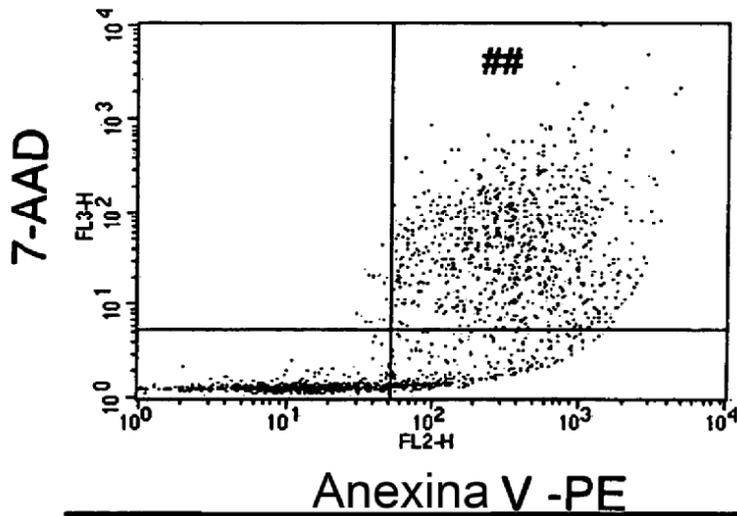


Figura 22



	## % 7-AAD / AnnV positivo
Ratón 1	5,6 %
Ratón 2	2,5 %

Figura 23