



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 276 481**

⑤1 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/775 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **98959681 .2**

⑧6 Fecha de presentación : **11.12.1998**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1036174**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2000**

⑤4 Título: **Péptido apoEp1.B novedoso, composiciones y sus usos.**

③0 Prioridad: **12.12.1997 US 69531 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

⑦3 Titular/es: **The University of Western Ontario
Office of Research Services
Stevenson-Lawson Building, Room 319
London, Ontario N6A 5B8, CA**

⑦2 Inventor/es: **Singh, Bhagirath y
Rider, Beverley**

⑦4 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

DESCRIPCIÓN

Péptido apoEp1.B novedoso, composiciones y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para modulación inmune.

Antecedentes de la invención

10

El sistema inmune es un sistema de defensa complejo, multifactorial que protege el cuerpo de un amplio intervalo de enfermedades infecciosas que incluyen virus, bacterias, parásitos y hongos. Aunque crítico para nuestra supervivencia, en ciertos casos, tal como enfermedad autoinmune, rechazo de transplante, alergias e inflamación, el sistema inmune puede ser la causa de enfermedad. En tales casos es deseable suprimir o tolerar la respuesta inmune.

15

El sistema inmune está constituido por una gran diversidad de células derivadas de células del tronco hematopoyético e incluye fagocitos (tales como polimorfos neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas) y linfocitos tales como células T y células B y células destructoras naturales.

20

Las células dendríticas son células inmunes interesantes ya que, dependiendo de las circunstancias, pueden o bien activar o suprimir una respuesta inmune. Con relación a la activación inmune, las células dendríticas (DC) son potentes estimuladores de linfocitos y extremadamente células presentadoras de antígeno eficaces. Recientemente, se ha generado considerable interés en el uso potencial de células dendríticas para la terapia de cáncer y enfermedades infecciosas. Las DC pulsadas con péptidos tumorales generan inmunidad protectora y antitumoral en ratones (Mayor-dama y col., 1995). Los pacientes con linfomas de células B se han vacunado con éxito con DC pulsadas por antígeno antígenos aisladas a partir de la sangre (Hsu y col., 1996). El ligando Flt3, que induce la maduración de DC, da como resultado la regresión de tumores y respuesta inmune antitumoral en ratones (Lynch y col., 1997). Desafortunadamente, los avances en el tratamiento de tumores con DC se han limitado a su nivel de pequeña cantidad *in vivo*. Los esfuerzos en esta área se dirigen a incrementar números de DC y nivel de activación. Con relación a la tolerancia, las células dendríticas se han mostrado recientemente que están implicadas en la inducción de tolerancia central así como periférica y pueden ser útiles en el tratamiento de autoinmunidad, alergias y rechazo de transplante.

30

35

Hunt y col (Science (1992) 256 (50650, 1817-20) describen un procedimiento de secuenciación de diversos fragmentos de péptidos que están asociados con la molécula I - A^d de Clase II MHC. Las secuencias de los péptidos se determinaron mediante HPLC de fase inversa y la combinación de HPLC microcapilaridad - ionización por electropulverización - espectrometría de masas de tandem.

Sumario de la invención

40

Los presentes inventores han preparado un péptido derivado de apolipoproteína E denominado apoEp1.B que incluye los aminoácidos 239-252 de la apolipoproteína E. Los inventores han encontrado que sorprendentemente, ApoEp1.B es un modulador inmune potente que actúa sobre una diversidad de células inmunes. De manera interesante, la apoEp1.B es un modulador dual, capaz de tanto inducir como suprimir una respuesta inmune. En particular, el apoEp1.B se ha mostrado que induce la diferenciación de células inmaduras en células dendríticas, para inducir diferenciación y activación de células tumorales, para inhibir la inflamación y para inhibir enfermedad autoinmune.

45

50

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un péptido apoEp1.B que comprende los aminoácidos 239-252 de la proteína apolipoproteína E. En una realización preferida, la presente invención proporciona un péptido apoEp1.B aislado que tiene la secuencia de aminoácidos TQQIRLQAEIFQAR (murino) o AQQIRLQAEAFQAR (humano). La invención también incluye análogos, fragmentos, alargamientos y derivados de un péptido de la invención. Los análogos y derivados de los péptidos incluyen péptidos que tienen las siguientes secuencias: TAQIRLQAEIFQAR; TQAIRLQAEIFQAR; TQQARLQAEIFQAR y TQQIALQAEIFQAR. Los fragmentos y alargamientos de los péptidos incluyen péptidos que tienen las siguientes secuencias: QTQQIRLQAEIFQAR y QQIRLQAEIFQAR. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido apoEp1.B, o un análogo, fragmento o derivado del mismo.

55

La presente invención además proporciona un procedimiento de modulación inmune que comprende la administración de una cantidad eficaz de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B a una célula o animal en necesidad del mismo.

60

De acuerdo con una realización, el péptido puede inducir tolerancia inmune. En particular, los presentes inventores han demostrado que el péptido apoEp1.B puede activar monocitos para diferenciarse en células dendríticas tolerogénicas. La inducción de células dendríticas tolerogénicas pueden tener una amplia diversidad de aplicaciones terapéuticas que incluyen inflamación, enfermedad autoinmune y transplante.

65

En otra realización, el péptido apoEp1.B es útil en la inhibición de inflamación. En una realización preferida, el péptido puede inhibir la formación de placa aterosclerótica *in vivo*.

En una realización adicional, el péptido apoEp1.B se puede usar para prevenir o tratar una reacción o enfermedad autoinmune. Los presentes inventores también han demostrado que el péptido apoEp1.B puede proteger a los ratones NOD de desarrollar diabetes. En una realización preferida, la enfermedad autoinmune es diabetes.

En un aspecto adicional, el péptido apoEp1.B se puede usar para inducir una respuesta inmune activando las células inmunes. En una realización, el péptido, en combinación con otras citoquinas tales como IL-4, GM-CSF, TNF α y ligando Flt3 pueden inducir que las células dendríticas inmaduras se diferencien en células dendríticas inmunogénicas maduras. Las células dendríticas maduras se pueden usar en una amplia variedad de aplicaciones incluyendo inmunoterapia tumoral.

En otro aspecto, el apoEp1.B se puede usar para tratar tumores de origen inmune induciendo su diferenciación. En particular, los presentes inventores han demostrado que el péptido apoEp1.B puede inducir la diferenciación y activación de de leucemia monocítica, monoblástica y células tumorales de linfoma.

Otras características y ventajas de la presente invención se hará aparente a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos aunque indicando las realizaciones preferidas de la invención se proporcionan a modo de ilustración solamente, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora en relación a los dibujos en los que:

La figura 1A y B son fotografías de células del bazo incubadas con apoEp1.B (B) o un péptido de control (A) durante 48 horas.

La figura 1C y D son fotografías de células PU5-1.8 incubadas con apoEp1.B (D) o un péptido de control © durante 48 horas.

La figura 2 (A-D) es un análisis FACS de células J77A incubadas con apoEp1.B (B y D) o con un péptido de control (A y C) durante 48 horas.

La figura 3 es un análisis FACS de células PU5-1.8 inducidas con apoEp1.B o apoEp1.D y teñidas con diversos marcadores.

La figura 4 muestra un análisis FACS o esplenocitos Balb/c incubados con apoEp1.B o apoEp1.D.

La figura 5 muestra un análisis FACS que ilustra que la expresión de la molécula de superficie de DC de apoEp1.B o apoEp1.D depende de la dosis.

La figura 6 muestra un análisis FACS que demuestra que apoEp1.B no es específico de la especie.

La Figura 7 son gráficos de barras que demuestran la producción de quimioquina a partir de las células PU5-1.8 incubadas con apoEp1.B, apoep1 y control.

La figura 8A muestra un análisis FACS que muestra los perfiles de SCC y FSC de células PEC cebadas con apoEp1.D y apoEp1.B.

La figura 8B muestra la expresión del marcador de superficie de células PEC cebados con apoEp1.D (pico no marcado) y apoEp1.B (pico marcado).

La figura 9 es un gráfico de barras que muestra la activación de células esplénicas en la presencia de apoEp1.B y/o ConA.

La figura 10 muestra una sección de arterias iliofemorales: (A) no tratadas, sin cirugía; (B) no tratadas, cirugía y (C) tratadas con apoEp1.B y cirugía (mostrada la sección arterial).

La figura 11 muestra histogramas que ilustran la inducción de las células Th2 mediante inmunización con apoEp1.B.

La figura 12 muestra un histograma que ilustra las capacidades aloestimuladoras de las células apoEp1.B.

La figura 13A es un gráfico que ilustra la protección de apoEp1.B de ratones NOD a partir de diabetes espontánea.

La figura 13B es un gráfico que ilustra la protección de apoEp1.D de ratones NOD a partir de diabetes adoptivamente transferida.

La figura 14 es un gráfico que muestra el porcentaje de ratones protegidos de diabetes contra tiempo, en presencia y ausencia de apoEp1.B.

La figura 15A - D ilustran el efecto de diferentes concentraciones de apoEp1.B sobre la proliferación de células U-937.

La figura 16 muestra un análisis FACS que ilustra que las supresiones o alargamientos de aminoácidos individuales disminuyen la actividad de apoEp1.B.

Descripción detallada de la invención

Como se ha mencionado anteriormente en esta memoria descriptiva, los presentes inventores han preparado un péptido a partir de tanto la apolipoproteína E humana y murina denominada apoEp1.B (239-252) que es un potente modulador inmune y se puede usar en una amplia diversidad de aplicaciones.

I. Péptidos de la invención

Como se ha establecido de manera amplia, la presente invención proporciona un péptido apoEp1.B que comprende los aminoácidos 239-252 de una proteína alolipoproteína E o un análogo, fragmento, alargamiento o derivado de la misma.

En un aspecto, la presente invención proporciona un péptido apoEp1.B aislado que tiene la secuencia de aminoácidos TQQIRLQAEIFQAR (murino) (SEQ ID N° 1) o AQQIRLQAEAFQAR (humano) (SEQ ID N° 2) o un análogo, fragmento o derivado del mismo. La invención también incluye una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido apoEp1.B, o un análogo, fragmento, alargamiento o derivado del mismo.

El término “análogo” incluye cualquier péptido que tiene una secuencia de restos de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de apoEp1.B humano o de ratón mostrada específicamente en esta memoria descriptiva en la que uno o más restos se han sustituido de manera conservadora con un resto funcionalmente similar y que muestra la capacidad de imitar apoEp1.B como se describe en esta memoria descriptiva. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto no polar (hidrófobo) por otro tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina, la sustitución de un resto básico tal como lisina, arginina p histidina por otro, o la sustitución de un resto ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro. La frase “sustitución conservadora” también incluye el uso de un resto derivatizado en lugar de un resto no derivatizado con tal que tal polipéptido muestre la actividad requerida.

Los análogos de los péptidos incluyen los péptidos que tienen las siguientes secuencias: TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); y TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6).

“Derivado” se refiere a un péptido que tiene uno o m’s residuos químicamente derivatizados mediante reacción de un grupo secundario funcional. Tales moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, las moléculas en las que los grupos amino libres se han derivatizado para formar clorhidratos de amina, grupos p-tolueno sulfonilos, grupos carbobenzoxi, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxycarbonil, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxi libres se pueden derivatizar para formar sales, metil y etil ésteres u otros tipos de ésteres de hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres se pueden derivatizar para formar derivados O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno imidazol de histidina se puede derivatizar para formar N-im-bencilhistidina. También incluidos como derivados son aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo: 4-hidroxi prolina puede estar sustituido por prolina; 5-hidroxilisina puede estar sustituido por lisina; 3-metilhistidina puede estar sustituido por histidina; homoserina puede estar sustituido por serina; y ornitina puede estar sustituida por serina; y ornitina puede estar sustituida por lisina. Los polipéptidos de la presente invención también incluyen cualquier polipéptido que tiene uno o más adiciones y uno o más supresiones o residuos relacionados con la secuencia de un polipéptido cuya secuencia se conoce en esta memoria descriptiva, mientras que la actividad requerida se mantiene.

El término “fragmento” se refiere a cualquier péptido sujeto que tiene una secuencia de aminoácidos más corta que la de un péptido cuya secuencia de resto de aminoácido se muestra en esta memoria descriptiva.

El término “alargamiento” se refiere a cualquier péptido sujeto que tiene una secuencia de aminoácidos más larga que uno o dos aminoácidos (o bien en el extremo carboxi o amino) que la de un péptido de la presente invención. Preferiblemente, el alargamiento se produce en el extremo terminal amino.

Los fragmentos y alargamientos de los péptidos incluyen los que tienen las siguientes secuencias: QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

El término “apoEp1.B” o “péptido de la invención” como se usa en esta memoria descriptiva incluye un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 239 a 252 de una proteína apolipoproteína E e incluye todos los análogos, fragmentos, alargamientos o derivados del péptido apoEp1.B que incluye las secuencias proporcionadas anteriormente

en las SEQ ID números 1-8. Preferiblemente, la apoEp1.B es al secuencia de apoEp1.B murina TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1) o la secuencia de apoEp1.B AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2).

El péptido apoEp1.B se puede modificar para hacerlo más terapéuticamente eficaz o adecuado. Por ejemplo, puede estar ciclado ya que la ciclación permite que el péptido asuma una conformación más favorable. la ciclación del péptido apoEp1.B se puede lograr usando técnicas conocidas en la técnica. En particular, se pueden formar enlaces disulfuro entre dos componentes espaciados apropiadamente que tienen tres grupos sulfhidrilo. Los enlaces se pueden formar entre cadenas laterales de aminoácido, componentes no aminoácidos o una combinación de los dos. Además, el péptido apoEp1.B de la presente invención se puede convertir en sales farmacéuticamente aceptables haciendo reaccionar con ácidos inorgánicos que incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, etc., los ácidos orgánicos que incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido bencenosulfónico y ácidos tolueno sulfónico.

Las proteínas apoEp1.B de la invención también se pueden preparar mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, los péptidos se pueden sintetizar mediante síntesis química que usan técnicas bien conocidas en la química de proteínas tales como síntesis de fase sólida o en solución (véase por ejemplo J. M. Stewart, y J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª edición Ed., Pierce Chemical Co., Rockford Ill. (1984 y G. Barany y R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis Synthesis, Biology* editors E. Gross y J. Meienhofer Vol. 2 Academic Press, Nueva York, 1980, p. 3-254 para las técnicas de síntesis de fase sólida; y M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer - Verlag, Berlin 1984, y E. Gross y J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, antes, Vol 1, para síntesis de solución clásica, y Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Assoc. 85: 2149-2154) o síntesis en solución homogénea (Houbenwey, 1987, *Methods of Organic Chemistry*, ed E. Wansch, Vol 15 I y II, Thieme, Stuttgart).

Los péptidos apoEp1.B de la invención también se pueden producir mediante tecnología de ADN recombinante. Para preparar los péptidos de la invención mediante técnicas de ADN recombinante, se debe preparar una secuencia de ADN que codifica el péptido apoEp1.B. Por consiguiente, la presente invención también proporciona ácido nucleico purificado y aislado que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido apoEp1.B que comprende una secuencia de aminoácidos TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1) o una secuencia de aminoácidos AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2).

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de ADN que codifica un péptido apoEp1.B adaptado para la transfección o transformación de una célula hospedadora.

De acuerdo con lo anterior, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden incorporar de una manera conocida en un vector de expresión apropiado que asegura la expresión de la proteína. Los vectores de expresión posibles incluyen pero no se limitan a, plásmidos, o virus modificados (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus asociados a adeno). El vector debe ser compatible con la célula hospedadora usada. Los vectores de expresión son "adecuados para transformación de una célula hospedadora", que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras seleccionadas entre las bases de las células hospedadoras a usar para expresión, que se une de manera operativa a la molécula de ácido nucleico. Unido de manera operativa pretende significar que el ácido nucleico está unido para regular las secuencias de una manera que permite la expresión de ácido nucleico.

Por lo tanto la invención contempla un vector de expresión recombinante de la invención que contiene una molécula de ácido nucleico de la invención, o un fragmento del mismo, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteína insertada.

Las secuencias reguladoras adecuadas se pueden derivar de una diversidad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamífero, o de insecto (por ejemplo, véase las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, *Gene Expression Technology; Methods in Enzymology* 185, Academia Press, San Diego, CA (1990). La selección de secuencias reguladoras apropiadas depende de la célula hospedadora elegida como se describe más adelante, y se puede llevar a cabo fácilmente por los expertos en la técnica. Los ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen: un promotor y potenciador de transcripción o secuencia de unión a polimerasa, una secuencia de unión a ribosomas, incluyendo una señal de inicio de la traducción. De manera adicional, dependiendo de la célula hospedadora elegida y el vector empleado, otras secuencias, tales como un origen de la replicación, sitios adicionales de restricción de ADN, potenciadores, y secuencias que confieren la inducibilidad de transcripción se puede incorporar en el vector de expresión.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención también pueden contener un gen marcador seleccionable que facilita la selección de células hospedadoras transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables que codifican una proteína tal como G418 e higromicina que confieren resistencia a ciertos fármacos, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa de luciérnaga, o una inmunoglobulina o porción del mismo tal como la porción Fc de una inmunoglobulina IgG.

Los vectores de expresión recombinantes se pueden introducir en las células hospedadoras para producir una célula hospedadora transformante. El término "célula hospedadora transformante" pretende incluir células procarióticas y eucarióticas que se han transformado o transfectado con un vector de expresión recombinante de la invención. Los

términos “transformado con”, “transfectado con”, “transformación” y “transfección” pretenden abarcar la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula mediante una de las posibles técnicas conocidas en la técnica. Las células procarióticas se pueden transformar con ácido nucleico mediante, por ejemplo, electroporación o transformación mediada por cloruro cálcico. El ácido nucleico se puede introducir en las células de mamífero mediante técnicas convencionales tal como coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE - dextrano, lipofectina, electroporación o microinyección. Los procedimientos adecuados para transformar y transfectar células hospedadoras se pueden encontrar en Sambrook y col., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), y otros libros de texto de laboratorio.

Las células hospedadoras adecuadas incluyen una amplia diversidad de células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, las proteínas de la invención se pueden expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (usando baculovirus), células de levaduras de células de mamíferos: Las células hospedadoras de levaduras y hongos adecuados para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no se limitan a *Saccharomyces cerevisiae*, el género *Pichia* o *Kluyveromyces* y varias especies del género *Aspergillus*. Las células de mamífero adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen, entre otras: células COS (por ejemplo, ATCC N° CRL 1650 ó 1651), BHK (por ejemplo, ATCC N° CRL 61), HeLa (por ejemplo, ATCC N° CCL 2), 293 (ATCC N° 1573) y NS-1. Otras células hospedadoras adecuadas se pueden encontrar en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991).

Otro aspecto de la invención proporciona una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B de la invención. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN son conocidas por los expertos en la técnica, o se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1 6.3.6. Por ejemplo, se puede emplear 6,0 x cloruro sódico/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de lavado de 2,0 x SSC a 50°C. La rigurosidad se puede seleccionar en base a las condiciones usadas en la etapa de lavado. A modo de ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar entre una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede ser en condiciones de alta rigurosidad, aproximadamente 65°C.

II. Utilidad de los péptidos

A. Procedimientos terapéuticos

Los inventores se han encontrado sorprendentemente que el péptido apoEp1.B de la invención es un potente modulador inmune que actúa sobre una diversidad de células inmunes. De manera interesante, el apoEp1.B es un modulador dual, capaz de tanto inducir y suprimir una respuesta inmune. Como se ha mencionado anteriormente, el péptido apoEp1.B comprende los aminoácidos 239-252 de longitud apropiada de apolipoproteína E (apoE) que incluye fragmentos, alargamientos, análogos y derivados del péptido. Los inventores han mostrado que el apoEp1.B pero no apoE o un péptido que comprende los aminoácidos 237-250 de apoE puede inducir la activación y diferenciación de células inmunes.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de modulación inmune que comprende la administración de una cantidad eficaz del un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B a una célula o animal en necesidad del mismo.

El péptido apoEp1.B se puede usar para inducir la tolerancia inmune. En particular, los presentes inventores han demostrado que el péptido apoEp1.B puede activar células inmaduras en células dendríticas tolerogénicas. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de inducción de tolerancia inmune que comprende la administración de una cantidad eficaz de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B a una célula o animal en necesidad del mismo. La inducción de células dendríticas tolerogénicas pueden tener una amplia diversidad de aplicaciones terapéuticas que incluyen inflamación, enfermedad autoinmune y trasplante. Las células dendríticas tolerogénicas se pueden inducir *in vitro* y después transferirse a un receptor que requiere las células. Como alternativa, las células tolerogénicas se pueden inducir directamente *in vivo*.

Los inventores han mostrado que el péptido apoEp1.B es útil en la inhibición de inflamación. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento para inhibir la inflamación que comprende la administración de una cantidad eficaz de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B a una célula o un animal en necesidad del mismo. En una realización preferida, el péptido puede inhibir la formación de la placa aterosclerótica *in vivo*. Otras enfermedades inflamatorias que se pueden tratar usando el péptido apoEp1.B o ácido nucleico que codifica el péptido apoEp1.B incluye, artritis, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), síndrome de Sjogren, aterosclerosis, reestenosis, rechazo de trasplante, vasculopatía de trasplante, asma, síndrome de insuficiencia respiratoria, alergia, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus sistémico, glomerulonefritis aguda, trauma de la médula espinal, y otros.

En una realización adicional, el péptido apoEp1.B se puede usar para prevenir una reacción o enfermedad autoinmune. Los presentes inventores han demostrado que el péptido apoEp1.B pueden proteger a los ratones NOD de desarrollar diabetes. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune que comprende la administración de una cantidad eficaz de un péptido apoEp1.B o

un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B a un animal en necesidad del mismo. En una realización preferida, la enfermedad autoinmune es diabetes. Otras enfermedades autoinmunes que se pueden tratar usando el péptido apoEp1.B o ácido nucleico que codifica el péptido apoEp1.B incluyen esclerosis múltiple, EAE que es el modelo de ratón de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, lupus (SLE), enfermedad de tiroides autoinmune y otras.

En un aspecto adicional, el péptido apoEp1.B se puede usar para inducir una respuesta inmune mediante activación de células inmunes. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de inducción de respuesta inmune que comprende la administración de una cantidad eficaz de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B a un animal en necesidad del mismo. En una realización el péptido, en combinación con otras citoquinas tales como IL-4, GM-CSF, TNA α y ligando Flt3 inducen células dendríticas inmaduras para diferenciarse en células inmunogénicas maduras. Las células dendríticas maduras se pueden usar en una amplia diversidad de aplicaciones incluyendo inmunoterapia tumoral.

En otro aspecto, el péptido apoEp1.B se puede usar para tratar tumores de origen inmune induciendo su diferenciación. En particular, los presentes inventores han demostrado que el péptido apoEp1.B puede inducir la diferenciación y activación de leucemia monocítica, monoblástica y células tumorales de linfoma. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un tumor que comprende la administración de una cantidad eficaz de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B a un animal en necesidad del mismo.

El péptido apoEp1.B o el ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B también se puede usar para tratar o provenir otras enfermedades o afecciones que requieren activación inmune (que incluye enfermedades infecciosas tales como infecciones virales) y tolerancia inmune (incluyendo transplante de órganos de tejidos, alergias y las enfermedades inflamatorias y autoinmunes indicadas anteriormente).

La administración de una "cantidad eficaz" del péptido apoEp1.B o ácido nucleico de la presente invención se define como una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. La cantidad eficaz de un compuesto de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado patológico, edad, sexo, y peso del animal. El régimen de dosificaciones se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. El término "animal" como se usa en esta memoria descriptiva todos los miembros del reino animal incluyendo seres humanos.

En todos los procedimientos descritos anteriormente, el péptido apoEp1.B se puede administrar *in vivo* o *ex vivo*. En las aplicaciones *ex vivo*, el péptido apoEp1.B se puede administrar a las células que se han retirado del paciente en un cultivo *in vitro*. Después de incubar las células y péptidos durante un período de tiempo suficiente para el efecto deseado, las células se pueden volver a introducir en el cuerpo del paciente. En un ejemplo, los monocitos se pueden retirar de un paciente y cultivarse con apoEp1.B para permitirles que maduren. Además, los antígenos tumorales o autoantígenos se pueden añadir cuando se trata cáncer o enfermedades autoinmunes, respectivamente. Los monocitos maduros que expresan antígeno se pueden volver a introducir en el paciente e inducirá una respuesta inmune al tumor o autoantígeno.

B. Composiciones farmacéuticas

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas que contienen el péptido apoEp1.B o ácido nucleico o sustancias que modulan los efectos de APOEp1.B para uso en los procedimientos descritos para modular la respuesta inmune.

Tales composiciones farmacéuticas pueden ser para uso intralesional, intravenosa, tópica, parenteral, local, inhaladora o subcutánea, intradérmica, intramuscular, intratecal, transperitoneal, oral, e intracerebral. La composición puede estar en forma líquida, sólida o semisólida, por ejemplo, píldoras, compilidos, cremas, cápsulas de gelatina, cápsulas, supositorios, cápsulas de gelatina blandas, membranas, comprimidos, soluciones o suspensiones. El péptido apoEp1.B se inyecta preferiblemente en una solución salina o bien por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

Están disponibles varios modos de administración cuando se usa una composición que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína apoEp1.B. Se pueden introducir directamente en las células o tejidos *in vivo* moléculas recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína apoEp1.B, o fragmento de la misma usando vehículos de administración tales como vectores retrovirales, vectores de adenovirus y vectores de virus de ADN. También se pueden introducir en células *in vivo* o *in vitro* usando técnicas físicas tales como microinyección y electroporación o procedimientos químicos tales como co-precipitación e incorporación de ADN en los liposomas. Las moléculas recombinantes también se pueden distribuirán la forma de un aerosol o mediante lavado. Las moléculas de ácido nucleico de la invención también se pueden aplicar extracelularmente tal como mediante inyección directa en las células.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pretenden para administración a seres humanos o animales. Las dosificaciones a administrar dependen de las necesidades individuales, sobre el efecto deseado y sobre la vía elegida de administración.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante procedimientos conocidos *per se* para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se pueden administrar a pacientes, y de tal modo que una cantidad eficaz de la sustancia activa se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., Estados Unidos 1985).

En base esto, las composiciones farmacéuticas incluyen, aunque no exclusivamente, el compuesto o sustancia activo junto con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y contenidos en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isotónico con los fluidos fisiológicos. Las composiciones farmacéuticas pueden de manera adicional contener otros agentes que potencian la eficacia del péptido apoEp1.B o ácido nucleico.

C. Miméticos de péptidos

La presente invención también incluyen miméticos de péptidos o los péptidos apoEp1.B de la invención. Por ejemplo, un derivado de péptido a partir de un dominio de unión de apoEp1.B interactuará directamente o indirectamente con una molécula asociada de tal manera que imite el dominio de unión nativo. Tales péptidos pueden incluir inhibidores competitivos, potenciadores, miméticos de péptido, y similares. Todos estos péptidos así como moléculas sustancialmente homólogas, complementarios o de otra manera funcionalmente o estructuralmente equivalentes a estos péptidos se pueden usar para propósitos de la presente invención.

"Miméticos de péptidos" son estructuras que sirven como sustitutos para péptidos en interacciones entre moléculas (Véase Morgan y col., (1989), Ann. Reports Med. Chem. 24: 243 - 252 para una revisión). Los miméticos de péptidos incluyen estructuras sintéticas que pueden o no pueden contener aminoácidos y/o enlaces peptídicos pero mantienen la estructura y características funcionales de un péptido, o potenciador o inhibidor de la invención. Los miméticos de péptidos también incluyen peptoides, oligopeptoides (Simon y col., (1972) Proc. Natl. Acad. Sci Estados Unidos 89: 9367); y bibliotecas de péptidos que contienen péptidos de una longitud diseñada que representan todas las secuencias posibles de aminoácidos que corresponden a un péptido de la invención. Los miméticos de péptidos se pueden diseñar basándose en la información obtenida mediante reemplazo sistemático de aminoácidos L por aminoácidos D, reemplazo de cadenas laterales con grupos que tienen diferentes propiedades electrónicas, y mediante reemplazo sistemático de enlaces de péptidos con reemplazos de enlaces amida. Las restricciones de configuración locales también se pueden introducir para determinar los requerimientos de configuración para actividad de un mimético de péptido candidato. Los miméticos pueden incluir enlaces amida isostéricos o aminoácidos D para estabilizar o promover conformaciones a su vez inversas y ayudar a estabilizar la molécula. Los análogos de aminoácidos cíclicos se pueden usar para limitar los residuos de aminoácidos a estados de configuración particulares. Los miméticos también pueden incluir miméticos de estructuras secundarias de péptidos inhibidoras. Estas estructuras pueden modelar la orientación en tres dimensiones de restos de aminoácidos en conformaciones secundarias conocidas de proteínas. Los peptoides que también se pueden usar son oligómeros de aminoácidos N-sustituídos y se pueden usar como motivos para la generación de bibliotecas químicamente diversas de moléculas novedosas.

Los péptidos de la invención también se pueden usar para identificar compuestos de plomo para el desarrollo de fármacos. La estructura de los péptidos descritos en esta memoria descriptiva se pueden determinar fácilmente mediante un número de procedimientos tales como RMN o cristalografía de Rayos X. Una comparación de las estructuras de péptidos similares en secuencia, pero que difieren en las actividades biológicas que inducen en moléculas diana porque pueden proporcionar información sobre la relación de la actividad de la estructura de la diana. La información obtenida a partir del examen de relaciones estructura - actividad se puede usar para diseñar o bien péptidos modificados, u otras pequeñas moléculas o compuestos de plomo que se pueden ensayar para las propiedades predichas según se relaciona con la molécula diana. La actividad de los compuestos de plomo se pueden evaluar usando ensayos similares a los descritos en esta memoria descriptiva.

La información sobre las relaciones estructura - actividad también se puede obtener a partir de estudios de co-cristalización. En estos estudios, un péptido con una actividad deseada se cristaliza en asociación con una molécula diana, y se determina la estructura de rayos X de los complejos. Después la estructura se puede comparar con la estructura de la molécula diana en su estado nativo, y la información a partir de tal comparación se puede usar para diseñar los compuestos esperados que posean las actividades deseadas.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención:

Ejemplos

Ejemplo 1

El ApoEp1.B induce células dendríticas y diferenciación de células tumorales

Materiales y procedimientos

Reactivos

Se disolvió forbol, 12-miristato, 13-acetato (PMA) (Calbiochem, La Jolla, CA) en etanol y se almacenó a -80°C.

Ratones

Los ratones C57BL/6J (B6) (H2b), inactivación de apo E (H2b), y BALB/c (H2d) entre 8 y 18 semanas usados en este estudio se compraron a Jackson laboratorios, Bar Harbor, ME. Los ratones se alimentaron con pienso (n1 5012),
 5 bajo en grasa (4,5% p/p) y colesterol (0,022% p/p) (Ralston, Purina, San Luis, MO).

Células y medio de cultivo

Líneas celulares transformadas PU5-1.8 y J77A1.4 monocíticas murinas, células THP-1 y U-937 de leucemia mo-
 10 noblastica humanas y linfoma A20 de células B murinas se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco Laboratorios, Grand Island, NY) que contienen 5 x 10⁵ M 2ME, HEPES 10 mM, glutamina 2 mM, 5,0 IU/ml de penicilina estreptomomicina (Gibco) y suero bovino fetal al 10% inactivado con calor (FBS) (Hyclone Laboratorios Inc., Logan, UT) (cRPMI).

15 *Síntesis y purificación de péptidos y proteínas*

Los péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos Beckman 990C como se ha descrito previamente (mac-
 Neil y col., 1993). Después los péptidos se purificaron mediante HPLC en una columna de fase inversa C18 con
 20 gradiente de agua acetonitrilo. Los péptidos se disolvieron a 2 mg/ml en agua destilada y se filtró de manera estéril a través de un filtro de 0,22 μ m y se diluyó adicionalmente o bien en cRPMI 1640 antes de uso en ensayos de proliferación, o se emulsionaron en CFA o IFA para inmunización de ratones. Se usó apoE (Calbiochem) purificado por VLDL de plasma humano como apoE nativo.

25 *Preparación de la suspensión de células individuales*

Se sacrificaron ratones en una cámara de CO₂ y o bien bazos o ganglios linfáticos se retiraron de manera aséptica
 y se sumergieron en PBS enfriado con hielo. Las células se separaron troceando los tejidos a través de un malla
 fina. Después las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos y se desecho el
 sobrenadante. Los eritrocitos en las preparaciones de bazo se lisaron usando tampón de lisis ACK (NH₄Cl 0,15 M,
 30 KHCO₃ 1,0 M, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,3) durante 2 minutos a temperatura ambiente y después se volvieron a suspender en PBS y se sedimentaron otra vez dos veces para lavar las células.

Ensayo de proliferación de células T

Ratones BALB/c se inyectaron bajo anestesia con volúmenes de 50 μ l que contienen 0, 1, 10 ó 100 μ g/ml de
 péptido ApoE emulsionado en IFA o CFA en la almohadilla de la pata posterior. Después de 10 días de drenaje (se
 retiraron ganglios linfáticos (popliteal) y las células T se purificaron mediante pase a través de lana de nylon. 5 x 10⁵
 de células T purificadas y 2 x 10⁵ de de APC de bazo antólogo irradiado con gamma ⁶⁰Co, 2500 rads (Atomic Energy,
 Canadá) se incubaron con 0, 1, 10 ó 100 μ g/ml de péptido ApoE en placas de microvaloración de fondo plano de
 40 96 pocillos en CO₂ al 5%, 37°C durante 3 días. PPD (20 μ g/ml) servía como control positivo en el que CFA [³H]-
 TdR (0,5 μ Ci/pocillo) se añadió durante 18 horas adicionales y las células se recogieron después (Tomtec, Orange,
 CONN). La incorporación de [³H]-TdR se midió en un contador de centelleo Líquido Microbeta (Wallac, Turku,
 Finlandia).

45 *Ensayos de proliferación*

Células de exudado de bazo o peritoneal no cebadas (PCE) se incubaron con 0, 1, 10 o 100 μ g/ml de apoEp1.B
 o control negativo en placas de microvaloración de fondo plano de 96 pocillos en CO₂ al 5%, 37°C durante 2 días.
 Se añadieron 50 μ l de [³H]-TdR (0,5 μ Ci/pocillo) se añadió durante 18 horas adicionales y las células se recogieron
 50 después (Tomtec, Orange, CONN). La incorporación de [³H]-TdR se midió en un contador de centelleo Líquido
 Microbeta (Wallac, Turku, Finlandia). Las líneas celulares PU5-1.8, J77A1.4, A20, y U-937 se trataron de manera
 similar, pero se incubaron con péptido durante 12 horas antes de la adición de [³H]-TdR durante 18 horas adicionales.
 Los resultados de las líneas celulares U-937 se presentan en la figura 15. Los sobrenadantes de las células se recogieron
 a partir de la mayoría de los cultivos de células antes de la adición de radiosótopos y se ensayaron para evaluar el
 55 contenido de citoquina.

Ensayos de reacción de leucocitos mixtos

MLR alogénico primario se estableció con esplenocitos NOD como estimuladores y células T vírgenes de BALB/c
 60 enriquecidas en lana de nylon. Las células estimuladoras se preincubaron durante 3 días con diferentes combinaciones
 de apoEp1.B, GM - CSF, y sobrenadante de PU5-1.8 que contiene TNF. Las células estimuladoras se trataron después
 con mitomicina C (50 μ g/ml, 20 min a 37°C; Sigma) y se co-cultivó con 4 x 10⁴ de respondedor durante 3 días tiempo
 en el que las células se pulsaron con 50 μ l de [³H]-TdR (0,5 μ Ci/pocillo) durante 24 horas. Las células se recogieron
 (Tomtec) y la incorporación de [³H]-TdR se midió en un contador de centelleo Líquido Microbeta (Wallac). Cada
 65 barra representa la media de cpm a partir de cultivos por triplicado.

Análisis de citoquinas

Se ensayaron sobrenadantes de cultivos para determinar la concentración de IL-2, IL-4 e IFN γ usando ensayos de ELISA de sándwich. Se siguieron los protocolos del fabricante (Pharmingen). Se revistieron las placas ELISA de microvaloración de 96 pocillos con 50 μ l, 1 μ g/ml de α -IL-2, α -IL-4 o α -IFN γ mAB en tampón de revestimiento (0,1 M de NaHCO₃, pH 8,2) durante toda una noche a 4°C. Las placas se lavaron dos veces con PBS-T (PBS, Tween-20 (Sigma, San Luis, MO) y las placas se bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente con 100 μ l de tampón de bloqueo (PBS, BSA al 5%). Las placas se lavaron dos veces y se añadieron muestras de 50 μ l por triplicado durante toda una noche., 4°C de incubación. Las placas se lavaron después 5 veces y después de 2 horas a temperatura ambiente de período de incubación con 50 μ l, 1 μ g/ml de α -IL-2, α -IL-4 o α -IFN γ de mAB (Pharmingen), las placas se lavaron 8 veces. 50 μ l, 1 μ g/ml de estreptavidina - fosfatasa alcalina (Pharmingen) se añadió durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 8 lavados, se añadieron 50 μ l de sustrato de p-nitrofenil fosfato (pNPP) (Sigma)) y se determinó la absorbancia a D. O. de 405 nm usando un lector de microplacas (Biorad, Hercules, CA) después de desarrollar el color.

Inmunofluorescencia y citometría de flujo

Se lavaron 1 x 10⁶ células con PBS enfriado con hielo y se volvieron a suspender en 25 μ l de PBS y se incubaron con 10 μ l anticuerpos monoclonales de suero de ratón normal y CD11a, CD11b, CD14, MHC de clase II, CD95, CD62L, CD62E, B7-1, B7-2 e ICAM anti-ratón conjugado con fluorocromo (Pharmingen, Mississauga, Canadá) (mAb's) durante 45 minutos sobre hielo. Se trataron de manera similar los marcadores de células dendríticas anticuerpos no conjugados (DEC-205, 33D11, CD11c (N418), sin embargo, después de la incubación del anticuerpo primario las células se lavaron 3 veces y se añadió después un anticuerpo conjugado a fluorocromo anti- rata de cabra secundario durante 45 minutos sobre hielo. Después las células se lavaron tres veces. Todas las muestras se volvieron a suspender en 300 μ l de PBS y se analizó la fluorescencia de las células teñidas en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) y los datos recogidos se analizaron usando software Lysis (Becton-Dickinson).

Análisis de ciclo celular

Se lavaron 1 x 10⁶ células y se volvieron a suspender en solución de tinción de yoduro de propidio hipotónico (PI) (0,1% [p/v] de citrato de sodio, 0,1 [v/v] de triton X-100, 0,05 μ g/ml de yoduro de propidio) y se dejó teñir en la oscuridad durante toda una noche a 4°C. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACScan y el porcentaje de células en cada fase del ciclo se cuantificó usando el software ModFit (Becton Dickinson). Se excluyeron los agregados del análisis con el uso del módulo de discriminación de doblete y posteriormente controlando sobre el área de fluorescencia roja lineal (FL2) y parámetros de anchura.

Inyección intraperitoneal

Se inyectaron ratones BALB/c i. p. con 300 μ g de péptido apoE y 48 horas después se recogieron post-mortem mediante lavado peritoneal usando solución salina enfriada con hielo.

Estudios de transferencia adoptiva

Esplenocitos diabetogénicos agotados de RBC de ratones NOD hembras de 17-20 semanas de edad se volvieron a suspender en solución salina. Se inyectaron ratones NOD.SCID de 8 a 10 semanas de edad i. p. con 0,2 μ l de solución salina que contenía 10⁷ de los esplenocitos diabetogénicos. Estos mismos ratones después se inmunizaron con o bien 200 μ g/ml de apoEp1.B o 200 μ g/ml de apoEp2 mediante la almohadilla de la pata. Se controlaron los niveles de glucosa bisemanalmente usando tiras de ensayo enzimático de glucosa (Eli Lilly, Toronto, Ont). Una vez la orina ensayada positiva, se ensayaron los niveles de glucosa en sangre (BGL) usando Glucometrter Encore (Miles/Bayer). Los ratones que muestran BLG > 11,1 mmol/l (200 mg/dl) durante dos semanas consecutivas se consideraron diabéticos.

*Resultados**El péptido apoEp1.B induce la morfología de células de tipo dendrítico*

Esplenocitos no cebados, monocitos de bazo enriquecidos y líneas celulares PU5-1 y J77A4.1 monocíticas de ratones BALB/c se incubaron con 0, 1, 10, ó 100 μ g/ml de apoEp1.B (239-252) o péptido apoEp1.D (236-249) de control negativo para determinar la actividad. Después de 2 horas, células incubadas de apoEp1.B, pero no apoEp1.D comenzaron a desprenderse de las placas de plástico y se agregaron en suspensión de manera óptima a 100 gg/ml. Después de 24 horas, morfológicamente estas células parecían menos redondas, más granulares. Se tomaron fotografías después de 24 horas, los resultados se muestran en la figura 1 (magnificación 400 x). A las 48 horas mostraban procedimientos de tipo dendrítico. El análisis de FACS confirmó un incremento en el tamaño celular y granulación (Figura 2).

El péptido apoEp1.B induce la expresión del marcador de tipo DC

Células tratadas con apoEp1.B morfológicamente parecían similares a DC. Esto se confirmó por análisis de FACS. Esplenocitos de BALB/c no cebados y células PU5-1.8 se incubaron durante 24 horas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de péptido apoEp1.B o control apoEp1.D y se tiñeron para análisis de FACS. La expresión de superficie de CD14, CD11a, CD11b, CD11c, B7-1, B7-2, DEC-205, 33D1, MHC clase II, fas, CD40, CD62L (selección L) y CD43 (leucosialina) se incrementaron por encima del fondo sobre células PU-1.8 incubadas con apoEp1.B después de 24 horas de incubación (las figuras 3 y 4). Con experimentación repetida, la expresión de Mac-3 y CD54 (ICAM-1) se encontró que eran relativamente variables.

Para determinar si apoEp1.B si los cambios fenotípicos inducidos por apoEp1.B son dependientes de las dosis, 10^5 células PU-5 se incubaron durante 20 horas con 0 (medio) 1, 10 ó 100 $\mu\text{g/ml}$ de apoEp1.B en placas de 24 pocillos y se tiñeron para análisis de FACS. Se recogieron 10.000 casos. Se muestra el marcador B7. Los resultados, mostrados en la figura 5 ilustran que 100 $\mu\text{g/ml}$ de apoEp1.B se encontró que era óptima, 1 $\mu\text{g/ml}$ dio como resultado ligeros cambios fenotípicos.

La superficie de expresión de B7-1, B7-2, MHC Clase II, CD28, CD11a, CD11c, y 33D1 se incrementaron por encima del fondo sobre los esplenocitos incubados de apoEp1.B después de 24 horas de incubación (véase la figura 4). También existía un incremento en CD40 y una disminución de la selectina L (datos no mostrados) sobre esplenocitos tratados con apoep1. No existía ningún cambio en la expresión de CD 16/32 en ningún momento.

Diferenciación inducida por el péptido apoEp1.B y activación no es específica de la cepa o de la especie

Esplenocitos no cebados de B6 y NOD se incubaron con 100 $\mu\text{g/ml}$ de apoEp1.B o apoEp1.D para determinar si apoEp1.B era específico de la cepa. Después de 48 horas en cultivo, las células se tiñeron para análisis de FACS. Los esplenocitos B6 y NOD respondían a apoEp1.B con un incremento de expresión de marcados similar al de esplenocitos de BALB/c (datos no mostrados). Células de bazo vírgenes de ratones deficientes en (apo E K. O.) también se ensayaron para determinar si la producción *in vivo* de apoE tenía una influencia en este efecto. Los esplenocitos Apo E K. O. también respondían con un incremento de expresión marcadora similar al de BALB/c (datos no mostrados). Ya que el péptido apoEp1.B humano (HapoEp1.B) (239-252) tiene un alto grado de homología a apoEp1.B murino (^{239}T a ^{239}a y ^{248}T a ^{248}a), se ensayó la reactividad cruzada de especie. La línea celular humana monocítica humana U-937 respondía dentro de 24 horas a 100 $\mu\text{g/ml}$ de apoEp1.B con similar, pero menos cambios morfológicos y fenotípicos profundos al de las células PU5-1.8 (figura 5). Para determinar si HapoEp1.B tenía un efecto similar sobre las células murinas 10^5 células PU5-1 se incubaron con 100 $\mu\text{g/ml}$ de HapoEp1.B o apoEp1.B murino durante 24 horas. Después las células se tiñeron para análisis de de FACS. HapoEp1.B inducía la formación de racimos de células y un incremento en marcadores similares al de apoEp1.B murino, pero hasta un grado menor (expresión del marcador B7-1 mostrado en la figura 6).

ApoEp1.B induce células del tipo Dc cuando se inyecta intraperitonealmente

Para determinar si apoEp1.B podría inducir células de tipo DC *in vivo*, ratones BALB/c se inyectaron i. p. con 300 $\mu\text{g/ml}$ de apoEp1.B o apoEp1.D. Después de 48 horas las PEC se tiñeron para análisis de FACS. ApoEp1.B inducía un incremento en el tamaño celular y granulación (Figura 8A) y un incremento en la expresión de superficie de DEC-205, 33D1, CD11c, B7-1 y B7-2 (Figura 8B). Losa picos no marcados corresponden a apoEp1.D. La intensidad fluorescente media se muestra en paréntesis. Los resultados demuestran que apoEp1.B induce la diferenciación y activación de PCE *in vivo* similar al sistema *in vitro*.

Para determinar la activación funcional de células tratadas apoEp1.B, esplenocitos de ratones BALB/c se incubaron con o sin apoEp1.B (100 $\mu\text{g/ml}$) *in vitro* durante 24 horas. Las células (lavadas y no lavadas) se estimularon con ConA durante 12 horas y se añadió ^3H durante 12 horas adicionales. Después las células se recogieron y se contó la radiactividad captada. Los resultados se presentan como la media de los pocillos por triplicado (cpm+/- SEM. Como se muestra en la figura 9, células tratadas con apoEp1.B responden a mitógeno 3 veces más que las células no tratadas.

Citoquinas producidas después de inmunización de apoEp1.B

Células de ganglios linfáticos de NOD inmunizados con apoEp1.B o apoEp1.D se cultivaron durante 48 horas en ausencia de antígeno de exposición o citoquina exógena. Se recogieron los sobrenadantes celulares y se ensayaron para evaluar contenido en citoquinas y determinar si apoEp1.B inducía una respuesta Th1 o Th2. Células cebadas con apoEp1.B secretaban niveles más altos de IL-4 y niveles inferiores de IL-2 que las células cebadas con apoEp1.D (Figura 11). No había cambio en IFN γ .

Actividad aloestimuladora de células T de DC inducida por apoEp1.B

Para medir la aloestimulación de células T o capacidad inhibidora de estas DC, 4×10^4 células T vírgenes de BALB/c enriquecidas se co-cultivaron con 40, 400, 4000 y 40.000 esplenocitos de NOD tratados con mitomicina C que se han incubado con diversos estimulantes durante 3 días. La proliferación de células T se midió después de 3 días de co-cultivo mediante incorporación de [^3H]-TdR. Los resultados se muestran en la figura 12. Las barras representan el significado de pocillos por triplicado (cpm +/- S. D.). "Y" representa $p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente en

ANOVA de 2 colas comparado con controles del medio solo (nil). La aloestimulación de APS apoEp1.B era similar a la de las APC no tratadas a 4×10^3 y 4×10^2 APC. Existía un notable incremento en la aloestimulación cuando las APC se preincubaron con GM-CSF, particularmente a 4×10^3 APC por pocillo. Este incremento estaba ligeramente, pero significativamente reducido cuando las APC se preincubaron con GM-CSF más apoEp1.B. Las APC (4×10^3) en todas las varras (excepto "T sola") se han no tratado (nil) o preincubado con $100 \mu\text{g/ml}$ de apoEp1.B, apoEp1.B + GM-CSF solos durante 3 días antes de co-cultivar. Tras combinar células T respondedoras con APC, se añadieron diversos factores exógenos, incluyendo $20 \mu\text{g/ml}$ de Con A y $5 \mu\text{g/ml}$ de apoEp1.B. Se ha detectado muy poca proliferación en pocillos que contienen células T solas. Las células T proliferaban bien en respuesta a Con A, sin embargo, cuando se añadió apoEp1.B, la aloestimulación de células T estaba completamente revocada.

Descripción

Se sabe que las células monocíticas se pueden diferenciar en DC, sin embargo, GM-CSF se ha pensado durante mucho tiempo que es esencial para este efecto (Scheicher y col., 1992). Se ha mostrado que un auto péptido novedosos, apoEp1.B, solo induce las DC *in vitro* a partir de tanto células vírgenes como línea celular murina. Estas DC poseen la morfología y marcadores de superficie celular de DC clásicas. El apoEp1.B también induce DC *in vivo* tras la inmunización con apoEp1.B. Estas DC pueden favorecer una respuesta de Th2 como se muestra por un incremento en IL-4 y una disminución en la producción de IL-2, y pueden por lo tanto, estar implicadas en la tolerancia de división.

El apoEp1.B inducía la morfología de DC de esplenocitos de BALB/c vírgenes. monocitos de bazo enriquecidos (datos no mostrados), las líneas celulares monocíticas PU5-1.8 (Figura 1) y J77A4 *in vitro* (datos no mostrados). Después de solamente 2 horas de incubación, células tratadas con apoEp1.B comenzaron a desprenderse de las placas de plástico y se agregaron en suspensión, un procedimiento característico de DC. Ya que existía incremento en la muerte celular, los ensayos de proliferación no mostraron un incremento global en el número de células (datos no mostrados). Esto es consistente con la pérdida de proliferación característica de diferenciación celular.

El tratamiento con apoEp1.B de células PUC-1.8 inducía un incremento de los marcadores específicos de DC, DEC-205, 33D1 y CD11c. Otros marcadores que incrementaban de manera consistente eran CD11a, B7-1, MHC clase II, fas, CD40 y L-selectina.

La estimulación de apoEp1.B de esplenocitos inducía un incremento en la expresión de CD40, CD11a, CD11c, 33D1, B7-1, B7-2, MHC clase II, fas y fas L a las 24 horas. Se registró un perfil similar después de 72 horas después de tratamiento con apoEp1.B (datos no mostrados). Estos cambios no eran tan espectaculares como cambios en el marcador de superficie de PU5-1.8 inducidos por apoEp1.B. Esto no resta mérito de los resultados obtenidos con PU5-1.8 ya que estas células se transforman y son capaces de un crecimiento rápido, división celular y síntesis de proteínas.

Los cambios en las moléculas coestimuladoras de B7 inevitablemente alterarían las respuestas de células T. Además un incremento en MHC clase II permite a las DC presentar péptidos a una densidad más alta que les hace más eficaces a o bien activación o tolerancia de células T. Un incremento en la expresión de moléculas de adhesión tal como LFA-1 puede permitir la migración de DC desde diversos tejidos a órganos linfoides cuando presentan Ag capturado.

Al contrario que los esplenocitos, la expresión de L-selectina en células PUC-1.8 se incrementa con la incubación de apoEp1.B (datos no mostrados). La L-selectina rápidamente se regula hacia abajo sobre células activadas y de esta manera los datos celulares sugieren que el apoEp1.B activa estas células. Estos resultados opuestos no son extraordinarios cuando se considera que PUC-1.8 se transforman también como una población homogénea. Las interacciones célula - célula heterogéneas así como factores estimuladores e inhibidores de paracrina que afectan a las respuestas inmunes pueden explicar algo de las diferencias entre células de bazo y PU5-1.8. Además, células PU5-1.8 transformadas pueden carecer de los mecanismos necesarios para la regulación hacia debajo de L-selectina, tal como proteasas específicas para la escisión de L-selectina. La expresión de CD28 sobre los esplenocitos también se incrementa ligeramente con el tratamiento de apoEp1.B.

Un ligero incremento en marcadores de diferenciación de macrófagos CD14 y Mac-3, indica que la maduración de macrófagos también se puede producir en cultivos tratados con apoEp1.B. Si después estas células se pueden desarrollar en las DC, apoptosis o permanecen como macrófagos no se conoce.

Después de la inyección i. p., apoEp1.B inducía un incremento en el tamaño de PEC y la granulación y un incremento en los marcadores específicos de DC, DEC-205, 33D1 y CD11 así como B-7 y B7-2. Por lo tanto, la inyección de apoEp1.B i. p. induce que las PEC expresen un fenotipo de tipo Dc similar comparado con los experimentos *in vitro*. El incremento en la expresión de marcador DC no se pronuncia tanto como lo era *in vitro*, probablemente debido a la dilución y/o eliminación del péptido apoEp1.B *in vivo*. Sin embargo, ya que las DC son eficaces en la estimulación de células T, incluso un modesto incremento en el número puede tener un profundo efecto en una respuesta inmune.

El tratamiento de ratones NOD con apoEp1.B estimulaba un incremento en la secreción de IL-4, presumiblemente por las células de tipo Th2 y una disminución en la IL-2. La inmunización de ratones con apoEp1.B también inducía un incremento en Dc.

Si el apoEp1.B es un producto escindido naturalmente de apoE no está claro sino ambiguo. El apoEp1.B se une a I-A^d con una afinidad similar a la del péptido apoEp1.B original (que no induce las DC), incluso no se eluía en experimentos de elución, es por lo tanto probable que no se escinda de manera natural a altos niveles.

En este documento los inventores muestran que apoEp1.B estimula la activación mo/ma. además, apoEp1.B induce DC que puede favorecer una respuesta de tipo Th2, Estas DC pueden estar parcialmente activadas o no completamente maduras, totalmente activadas o inducidas hasta la total madurez mediante señales inflamatorias.

Ejemplo 2

El apoEp1.B inhibe el desarrollo de placa aterosclerótica

Para investigar el papel del péptido apoEp1.B en la inflamación, particularmente en respuesta a lesión arterial, se usó un modelo de lesión de angioplastia de globo que se ha caracterizado bien por el Dr. Alex Lucas (Lucas y col., 1996 Circ. 94: 2898-900). 300 µg/ml de péptido apoEp1 o apoEp1.B se infundieron intra-arterialmente inmediatamente antes de angioplastia en el sitio de la lesión en la arteria iliofemoral de la rata. El SERP-1 de control positivo y solución salina de control negativo solo también se usaron. Las ratas se controlaron cuidadosamente y se sacrificaron 6 semanas después del tratamiento y las arterias iliofemorales se evaluaron para el desarrollo de placa mediante histoquímica. La medición cuidadosa del espesor arterial y el tamaño de lumen mostró que el péptido apoEp1.B (500 µg) reducía el tamaño de la lesión en este modelo. De hecho, en muchas de las ratas tratadas con apoEp1.B, no se detectó ninguna placa. No se observaron ningún efecto adverso en ratas tratadas con apoEp1.B. Los resultados se presentan en la tabla e y figura 10.

Ejemplo 3

La inmunización por ApoEp1.B protege ratones de diabetes

Ratones NOD, hembras de 8 semanas de edad se inmunizaron con 250 µg de péptido apoEp1.B emulsionado en IFA en una almohadilla de la pata. 6 ratones control negativo se inmunizaron con solución salina en IFA. Los ratones se controlaron durante un período posterior de 4 meses y se ensayó su glucosa en orina para determinar el desarrollo de la diabetes. En la fecha final de 8 meses, los 8 ratones inmunizados con apoEp1.B permanecen todavía sin diabetes. 4 de los 6 ratones tratados con solución salina en IFA mueren debido a diabetes. Los resultados, mostrados en la figura 14, muestran que la inmunización por apoEp1.B protege a los ratones propensos a diabetes.

Ejemplo 4

La inmunización por apoEp1.B induce las células de tipo Th2

Ratones NOD se inmunizaron mediante la almohadilla de la pata con µg/ml de péptido apoEp1.B o apoEp1.D en IFA. El drenaje de ganglios linfáticos se retiró después de 7 días y las células se cultivaron en placas de microvaloración de 96 pocillos en ausencia de estimulación adicional. Los sobrenadantes del cultivo celular se recogieron 48 horas después y se ensayaron para contenido en citoquina. Los resultados, mostrados en la figura 11, demostraron que la inmunización por apoEp1.B induce células de tipo Th2. (Los resultados de IL-2, IL-4 e IFNγ se presentan como la media de los pocillos por triplicado (D. O. +/- SEM). * representa p < 0,001 en ANOVA de dos colas comparado con controles tratados con apoEp1.D.)

Para determinar si la respuesta de Th2 inducida por una inmunización de apoEp1.B influenciaba la incidencia de IDDM, 10 ratones NOD de 8 semanas de edad se inmunizaron con 200 µg/ml de apoEp1.B y 10 ratones con apoEp2 de control negativo emulsionado en IFA en una almohadilla de la pata. Los ratones se controlaron durante los siguientes 8 meses y su glucosa en orina y sangre se ensayó para evaluar la aparición de la enfermedad. A los 10 meses, 7 de 10 ratones inmunizados con apoEp1.B permanece sin diabetes, mientras que 1 de 10 ratones tratados con apoEp2 permanece sin diabetes. (Figura 13A).

Ejemplo 5

La inmunización por apoEp1.B protege a los ratones NOD/SCID de la diabetes transferida de manera adoptiva

Para determinar el efecto protector de apoEp1.B en un modelo alternativo de IDDM, 10⁷ esplenocitos diabetogénicos se transfirieron de manera adoptiva a 20 ratones NOD.SCID. 10 de estos ratones se inmunizaron con 200 µg/ml de apoEp1.B, los otros con 200 µg/ml de apoEp2, los otros con 200 µg/ml de apoE2. Los 10 controles negativos han sucumbido a la muerte después de 5 semanas. 5 de los 10 ratones apoEp1.B permanecen sin diabetes a las 9 semanas (Figura 13B).

Descripción de los resultados de los ejemplos 3, 4 y 5

Ya que una respuesta de Th2 puede ser protectora en el modelo NOD de IDDM y ya que la inmunización con apoEp1.B de ratones NOD favorece una respuesta de tipo Th2 (véase la figura 11), el apoEp1.B se ensayó para protección de la enfermedad en estos ratones. La inmunización con apoEp1.B/IFA retrasaba de manera significativamente la

aparición de la enfermedad en ratones NOD y en ratones NOD.Scid transferidos de manera adoptiva. Los ratones protegidos por apoEp1.B tenían ligeramente menos infiltración de islotes cuando se compara con ratones no protegidos (datos no mostrados), indicando que la protección por apoEp1.B puede implicar la inducción de células reguladoras en lugar de la supresión de células efectoras destructoras.

Las APC de ratones NOD se cree que tienen defectos funcionales y/o de diferenciación (Serreze y col., 1988). Ya que las células de Th2 de NOD son más dependientes son más dependientes de la coestimación de B7 que las células Th1 (Rulifson y col., 1997), una respuesta Th1 proinflamatoria puede predominar en estos ratones por defecto. Consistentes con esto son los estudios que demuestran que la hiposensibilidad de las células Th2 intrínseca a los ratones NOD (Zipris 1991a y 1991b) es reversible o bien mediante la administración de IL-4 (Rapoport y col., 1993, Mueller y col., 1996, Cameron y col., 1997) o CD28 (Arreaza y col., 1997) *in vivo*. El tratamiento con anti-CD28 se cree que promueve la supervivencia y expansión de Th2. Además, los ratones deficientes en coestimulación (CED28 -/-) muestran IDDM más severa (Rulifson y col., 1997).

No está claro qué papel de las DC juegue en IDDM, sin embargo, la importancia de las DC en la enfermedad se resalta por el ratón DC K.O (Rel. -/-). Estos ratones juegan infiltración e inflamación de órganos múltiples agresiva. Otro grupo reseña que las Dc pancreáticas pueden inducir la protección contra la enfermedad tras la transferencia (Clare-Salzler y col., 1992). Estos hallazgos sugieren que las DC pueden jugar un papel protector en IDDM. Además, Voorbij y col., (1999) mostraron que las DC eran las primeras células que se acumulan alrededor de los islotes pancreáticos en el modelo de rata BB diabético espontáneamente, seguido de linfocitos.

Si la inducción de las DC tras la inyección de apoEp1.B tiene un efecto directo en la protección de enfermedad no se conoce, sin embargo, la respuesta de Th2 resultante puede ser una protección intermedia. Se propone que la inmunización por apoEp1.B estimula la diferenciación DC con un incremento en las moléculas coestimuladoras de B7. Estas APC más eficaces, capaces de una coestimulación más fuerte, rescata la sensibilidad de células Th2 que producen IL-4 en ratones propensos a diabetes. Esto a su vez reduce la incidencia de la enfermedad. Como alternativa o de manera adicional, el apoEp1.B puede actuar directamente sobre las células T, incrementando la expresión de CD28 y/o reduciendo el umbral de la estimulación. Ya que las células Th1 están ya estimuladas en los ratones NOD, la estimulación de células Th2 o Th3 protectora se puede reestablecer preferentemente. Consistente con este establecimiento son los datos que no muestran ningún cambio en la producción de IFN, incluso un incremento en IL-4.

Ya que la carencia de la insensibilidad de las células Th2 intrínseca a ratones NOD (Zipris 1991a y 1991b) es reversible, se propone que la inmunización por apoEp1.B rescate la sensibilidad de Th2 en ratones propensos a diabetes, que a su vez reduce la incidencia de la enfermedad. Ya que las células T requieren las APC para estimulación, los inventores especulan que apoEp1.B estimula una APC que induce Th2, posible del fenotipo DC. Independientemente del mecanismo, apoEp1.B puede ofrecer una terapia potencial auto péptido para diabetes así como otras enfermedades autoinmunes mediadas por Th1.

Ejemplo 6

Modificaciones a la secuencia de ApoEp1.B

Se realizaron diversas sustituciones y alargamientos de aminoácidos al péptido apoEp1.B como se ilustra en las tablas 1 y 2. Los péptidos modificados se incubaron a 100 µg/ml con 10⁵ células PU5-1.8 durante 20 horas. Las células se tiñeron con B7-1 para análisis de FACS. Los resultados demuestran que alguno, pero no todas, las sustituciones alargamientos o supresiones de a. a. pueden disminuir o revocar los efectos de apoEp1.B (véase la tabla 1 y 2 y la figura 16. Esto apoya la idea de que exista un receptor para el que apoEp1.B se une y ciertos cambios de a. a. disminuyen la afinidad de receptores de péptidos. La supresión de 239^T da como resultado un efecto reducido en gran medida sobre cambios de marcador de superficie. Sin embargo, la sustitución de este mismo a. a. con una alanina (como en la secuencia de HapoEp1.B) tiene solamente un efecto ligeramente reducido comparado con apoEp1.B. Por lo tanto, la longitud de es probablemente importante en la unión de receptor. También el péptido es probablemente importante en la unión de receptor. También parece que la integridad estructural reside en la región terminal carboxi del péptido apoEp1.B como incluso los cambios ligeros en esa región disminuyen o suprimen la actividad del péptido.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a la que actualmente se considera que es los ejemplos preferidos, se ha de entender que la invención no se limita a la descripción de los ejemplos. Por el contrario, la invención pretende cubrir diversas modificaciones y las disposiciones equivalentes incluidas dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones anexas.

TABLA 1

Alargamientos y truncamientos de ApoEp1.B

Nombre	Secuencia	Residuos	Cambios de marcador de DC
apoEp1	EEQ TQQ IRL QAE FQ AR	236-252	ligero
apoEp1.Ba	EQ TQQ IRL QAE FQ AR	237-252	-
apoEp1.Bb	Q TQQ IRL QAE FQ AR	238-252	++
apoEp1.B	TQQ IRL QAE FQ AR	239-252	+++++
apoEp1.Bc	QQ IRL QAE FQ AR	240-252	++
apoEp1.B	Q IRL QAE FQ AR	241-252	-

TABLA 2

Sustituciones de aminoácidos de ApoEp1.B

Nombre	Secuencia	Residuos	Cambios de marcador de DC
apoEp1.B A ²⁴⁰	T <u>A</u> Q IRL QAE IFQ AR	239-252	+++
apoEp1.B A ²⁴¹	T <u>Q</u> A IRL QAE IFQ AR	239-252	+++++
apoEp1.B A ²⁴²	TQQ A <u>R</u> L QAE IFQ AR	239-252	++
apoEp1.B A ²⁴³	TQQ I <u>A</u> L QAE IFQ AR	239-252	+++
apoEp1.B A ²⁴⁴	TQQ IRL Q <u>A</u> E IFQ AR	239-252	-
apoEp1.B A ²⁴⁵	TQQ IRL QAE I <u>F</u> Q AR	239-252	-
apoEp1.B A ²⁴⁷	TQQ IRL QAA I <u>F</u> Q AR	239-252	-
apoEp1.B A ²⁴⁸	TQQ IRL QAE A <u>F</u> Q AR	239-252	-
apoEp1.B A ²⁴⁹	TQQ IRL QAE I <u>A</u> Q AR	239-252	-
apoEp1.B A ²⁵⁰	TQQ IRL QAE IFA <u>A</u> AR	239-252	-
apoEp1.B A ^{239,240}	<u>AA</u> Q IRL QAE IFQ AR	239-252	-
apoEp1.B A ^{240,241}	T <u>AA</u> IRL QAE IFQ AR	239-252	-
apoEp1.B A ²³⁹⁻²⁴¹	<u>AAA</u> IRL QAE IFQ AR	239-252	-
human apoEp1.B	AQQ IRL QAE A <u>F</u> Q AR	239-252	++++

TABLA 3

	Área de lumen (media $\pm$ S.E.)	Espesor de placa (media $\pm$ S.E.)	Área de placa (media $\pm$ S.E.)
solución salina	0,027 $\pm$ 0,012	0,139 $\pm$ 0,028	0,059 $\pm$ 0,010
apoEp1.B	0,156 $\pm$ 0,020	0,003 $\pm$ 0,003	0,002 $\pm$ 0,002
valor P	<,0001	<,0001	<,0001

Citas completas para las referencias mencionadas en la memoria descriptiva

Arreaza, G.A., Cameron, J.J., Jaramillo, A., Gill, B.M., Hardy, D., Laupland, K.B., Rapoport, M.J., Zucker, P., Chakrabarti, S., Chensue, S.W., Qin, H.Y., Singh, B., Delovitch, T.L. (1997) Neonatal activation of CD28 signaling overcomes T cell energy and prevents autoimmune diabetes by an IL-4-dependent mechanism. *J. Clin Invest.* Nov 1, 100(9): 2243-53.

Cameron, M.J., Arreaza, G.A., Zucker, P., Chensue, S.W., Strieter, R.M., Chakrabarti, S., Delovitch, T.L. (1997) IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J. Immunol.* Nov. 15, 159(10):4686-92.

- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1992).** GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258-261.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994).** Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 180, 1263-1272.
- Christianson, S.W., Shultz, L.D., and Leiter, E.H. (1993).** Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice - relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-la donors. *Diabetes* 42 44-55.
- Clare-Salzler, M.J., Brooks, J., Chai, A., Van Herle, K., and Anderson, C. (1992).** Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer. *J. Clin. Invest.* 90, 741-748.
- Daniel, D., Gill, R.G., Schloot, N., and Wegmann, D. (1995).** Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol.* 25,1056-1062.
- Delovitch, T.L., and Singh, B. (1997).** The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes immune dysregulation get the NOD. *Immunity* 7, 727-738.
- Dyer, C.A., Smith, R.S., and Curtiss, L.K. (1991).** Only multimers of a synthetic peptide of apolipoprotein E are biologically active. *J. Biol. Chem.* 266, 15009-15015.
- Fitch, F.W. McKisic, MD., Lancki, D.W., and Gajewski, T.F. (1993).** Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol.* 11, 29-48.
- Finkelman, F.D., Lees A., Bimbaum, R., Gause, W.C., and Morris, S.C. (1996).** Dendritic cells can present antigen *in vivo* in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J. Immunol.* 157, 1406-1414.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. (1995).** Human B, T, natural killer and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3, 459-473.
- Gao, J.-X., Madrenas, J., Zeng, W., Zhong, R., and Grant, D. (1997).** Generation of dendritic cell-like antigen-presenting cells in long-term mixed leucocyte culture: phenotypic and functional studies. *Immunology.* 91 135-144.
- Grosjean, I., Caux, C., Bella, C., Berger, I., Wild, F., Banchereau, J., and Kaiserlian. (1997).** Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 186, 801 812.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries J.E., and Roncarolo, M. (1996).** Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J. Exp. Med* 184: 19-29.
- Haskins, K., and McDuffie, M. (1990).** Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science* 249, 1433-1436.
- Hsieh, C.-S., Heimberger, A.B., Gold, J.S., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1992).** Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in alpha beta T cell-receptor transgenic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6065-6069.
- Hsu, F.J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T.M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E.G., and R Levy. 1996.** Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 2:52-8.
- Hunt, D., H. Michel, J.S. Dickinson, J. Shabanowitz, A.L. Cox, K. Sakaguchi, E. Appella, H.M. Grey, and A. Sette. 1992.** Peptides presented to the immune system by murine class II major histocompatibility complex IAd. *Science* 256:1817-1820.
- Kalinski, P., Hilkens, C.M.U., Snijders, F., Snijdwint, F.G.M., and Kapsenberg, M.L. (1997).** IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol.* 159, 28-35.
- Katz, J.D., Benoist, C., and Mathis, D. (1995).** T helper subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 268, 1185-1188.
- Kelly, M.E., M.A. Clay, M.J. Mistry, H.M. HsiehLi, and J.A.K. Harmony. 1994,** Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogenactivated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol.* 159: 124-139.
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N., and Glimcher, L. (1995).** B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80, 707-718.

Liblau, R.S., Singer, S.M., and McDevitt, H.O. (1995). Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16, 34-38.

Lynch, D.H., Andreasen, A., Maraskovsky, E., Whitmore, J., Miller, R., and Schuh, C.L. (1997). Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses *in vivo*. *Nat Med.* 3, 625-631.

MacNeil, D., Fraga, E., and B. Singh. 1993. Characterization of murine T cell responses to peptides of the variable region of self T cell receptor chains. *J. Immunol.* 151:4045.

Mahley, R.W. 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622.

Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., and H.J. McKenna. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 184:1953-1962.

Mayordama, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., Deleo, A.B., et. al 1995. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat. Med.* 12:1297-302.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.

Mueller, R., Krah, T., and Sarvetnick, N. (1996). Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.* 184, 1093-1099.

Pennline, K.J., Roque-Gaffney, E., and Monahan, M. (1994). Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 71, 169-175.

Pepe, M., and L. Curtiss. 1986. Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDLIn. *J. Immunol.* 136:3716.

Peters, J.H., Gieseler, R., Thiele, B., and Steinbach, F. 1996. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol. Today.* 6:273-278.

Powrie, F., and Coffman, R.L. (1993). Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol. Today* 14, 270-274.

Rapoport, M.J., Zipris, D., Lazarus, A.H., Jaramillo, A., Speck, E., and Delovitch, T.L. (1993), IL-4 reverses thymic T cell proliferative unresponsiveness and prevents diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.* 178,87-99.

Rider B.J., Fraga, E., Yu Q. and Singh B. (1996). Immune responses to self-peptides naturally presented by murine class II major histocompatibility complex molecules. *Mol. Immunol.* 33, 625-633.

Romagnani, S. (1992). Human Th1 and Th2 subsets: regulation of differentiation and the role in protection and immunopathology. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 98, 279-285.

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., and Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180, 83-93.

Rosenfield, M.E., Butler, S., Ord, V.A., Lipton, B.A., Dyer, C.A., Curtiss, L.K., Palinski, W., and Witztum, J.L. (1993). Abundant expression of apoprotein E by macrophages in human and rabbit atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb.* 13, 1382-1389.

Rossini, A.A., Greiner, D.L., Friedman, H.P., and Mordes, J.P. (1993). Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Rev.* 1, 43-75.

Rulifson, I.C., Sperling, A., Fields, P.E., Fitch, F.W., Bluestone, J.A. (1997) CD28 costimulation promotes the production of the Th2 cytokines. *J. Immunol., Jan.* 15, 158(2):658-65.

Salomon, B., Cohen, J.L., Masurier, C., and Klatzmann, D. (1998). Three populations of mouse lymph node dendritic cells with different origins and dynamics. *J. Immunol.* 160, 708-717.

Santiago-Schwarz, F., Belilos, E., Diamond, B., and Carsons, S.E. (1992). TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 52, 274-281.

- Scheicher, C., Mehlig, M., Zecher, R., and Reske, K. (1992).** Dendritic cells from mouse bone marrow: *in vitro* differentiation using low doses of recombinant granulocyte/macrophage CSF. *J. Immunol. Methods* 154, 253-264.
- Schuler, G., Thumer, B., and Romani, N. (1997).** Dendritic cells: from ignored cells to major players in T-cell-mediated immunity. *Int Arch Allergy Immunol.* 112, 317-322.
- Seder, R.A., Paul, W.E., Davis, M.M., Fazekas, de St. Groth, B. (1992).** The presence of interleukin-4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 176, 1091-1098.
- Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W.E. (1993).** IL-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for IFN γ production and diminishes IL-4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10188-10192.
- Serreze, D.V., Leiter, E.H. (1988)** Defective activation of T suppressor cell function in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 140:3801-3807.
- Serreze, D.V., Gaskins, H.R., Leiter, E.H. (1993)** Defects in the differentiation and function of antigen-presenting cells in NOD/LT mice. *J. Immunol.* 150:2534-2543.
- Steinman, R.M., Pack, M., and Inaba, K. (1997).** Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Imm. Reviews* 156, 25-37.
- Steinbrink, K., Wolff, M., Jonuleit, H., Knop, Jürgen and Enk, A. (1997).** Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* 159, 4772-4780.
- Steinman, R.M. 1991.** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Ann. Rev. Immunol.* 9:271-96.
- Steptoe, R.J., and Thompson, A.W. (1996).** Dendritic cells and tolerance induction. *Clin. Exp. Immunol.* 105, 397-402.
- Stewart, T.A., Hultgren, B., Huang, X., Pitts-Meek, S., Hully, J., and MacLachlan, N.J. (1993).** Induction of type 1 diabetes by interferon- α in transgenic mice. *Science* 260, 1942-1946.
- Thompson, C.B. (1995).** Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell* 81, 979-982.
- Trembleau, S., Penna, G., Bosi, E., Mortara, A., Gately, M.K., and Adorini, L. (1995).** Interleukin-12 administration induces T helper type 1 and accelerates disease in NOD mice. *J. Exp. Med.* 181, 817-821.
- Trinchieri, G. (1995).** Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 251-276.
- Vogel, T., Guo, N.H., Guy, R., Drezlich, N., Krutzsch, H.C., Blake, D.A., Panet, A., and Roberts, D.D. (1994).** Apolipoprotein E: a potent inhibitor of endothelial and tumour cell proliferation. *J Cell Biochem.* 54, 299-308.
- Wilson, S.B., Kent, S.C., Patton, K.T., Orban, T., Jackson, R.A., Exley, M., Porcelli, S., Schatz, D.A., Atkinson, M.A., Balk, S.P., Strominger, J.L., and Hafler, D.A. (1998)** Extreme Th1 bias of invariant V- α -24J- α -Q T cells in type 1 diabetes (Letter to Nature). *Nature* 391:177-##.
- Wong, B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Sauter, B., Li, H.-L., Steinman, R.M., and Choi, Y. (1997).** TRANCE (tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.* 186, 2075-2080.
- Zipris, D., Crow, A., and Delovitch, T.L. (1991a).** Altered thymic and peripheral T lymphocyte repertoire precedes the onset of diabetes in NOD mice. *Diabetes* 40, 429-435.
- Zipris, D., Lazarus, A.H., Crow, A., Hadzija, M., and Delovitch, T.L. (1991b).** Defective thymic T cells activation by Concanavalin A and anti-CD3 in autoimmune nonobese diabetic mice. Evidence for thymic T cell anergy that correlates with the onset of insulinitis. *J. Immunol.* 146,3763-3771.

REIVINDICACIONES

1. Un uso de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B para la fabricación de un medicamento para la inducción de la diferenciación celular, en el que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

2. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la diferenciación es la diferenciación de un monocito a una célula dendrítica.

3. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la célula es una célula tumoral y el medicamento es para el tratamiento del tumor.

4. Un uso de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B para la fabricación de un medicamento para inducción de una tolerancia inmune, en la que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

5. Un uso de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B para la fabricación de un medicamento para la inhibición o prevención de inflamación, en la que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

6. Un uso de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B para la fabricación de un medicamento para la inhibición del desarrollo de placa aterosclerótica, en la que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

7. Un uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el medicamento es para inhibir la formación de placa aterosclerótica.

8. Un uso de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una respuesta autoinmune, en la que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

9. Un uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que la enfermedad autoinmune es diabetes.

10. Un uso de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B para la fabricación de un medicamento para la inducción de células dendríticas tolerogénicas, en la que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

11. Un uso de un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor, en la que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

12. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1).

13. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2).

ES 2 276 481 T3

14. Un uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3).

15. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4).

16. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5).

17. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6).

18. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7).

19. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

20. Una composición farmacéutica para uso como un compuesto farmacéutico que comprende un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado, en la que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

21. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, en la que la composición farmacéutica es para el tratamiento de enfermedad autoinmune.

22. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 21, en la que la enfermedad autoinmune es diabetes.

23. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, en la que la composición farmacéutica es para el tratamiento de inflamación.

24. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, en la que la composición farmacéutica es para el tratamiento de aterosclerosis.

25. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, en la que la composición farmacéutica es para el tratamiento de un tumor.

26. Un péptido apoEp1.B que tiene la secuencia de aminoácidos AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2)

27. Un péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3).

28. Un péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4).

29. Un péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5).

30. Un péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6).

31. Un péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7).

32. Un péptido apoEp1.B tiene la secuencia de aminoácidos QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

33. Un péptido apoEp1.B o un ácido nucleico que codifica un péptido apoEp1.B para uso como un compuesto farmacéutico, en el que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

34. Un procedimiento para fabricar un medicamento para la inducción de diferenciación celular, que comprende la formulación de un péptido apoEp1.B en tal medicamento en el que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

35. Un procedimiento para fabricar un medicamento para la inducción de tolerancia inmune, que comprende la formulación de un péptido apoEp1.B en tal medicamento en el que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

36. Un procedimiento para fabricar un medicamento para la inhibición o prevención de inflamación que comprende la formulación de un péptido apoEp1.B en tal medicamento en el que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

37. Un procedimiento para fabricar un medicamento para la inhibición del desarrollo de la placa aterosclerótica que comprende la formulación de un péptido apoEp1.B en tal medicamento en el que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

38. Un procedimiento para fabricar un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmune que comprende la formulación de un péptido apoEp1.B en tal medicamento en el que el péptido apoEp1.B tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: TQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID N° 1); AQQIRLQAEAFQAR (SEQ ID N° 2); TAQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 3); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 4); TQQARLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 5); TQQIALQAEIFQAR (SEQ ID. N° 6); QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 7) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ ID. N° 8).

39. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 38, en el que la enfermedad autoinmune es diabetes.

FIGURA 1

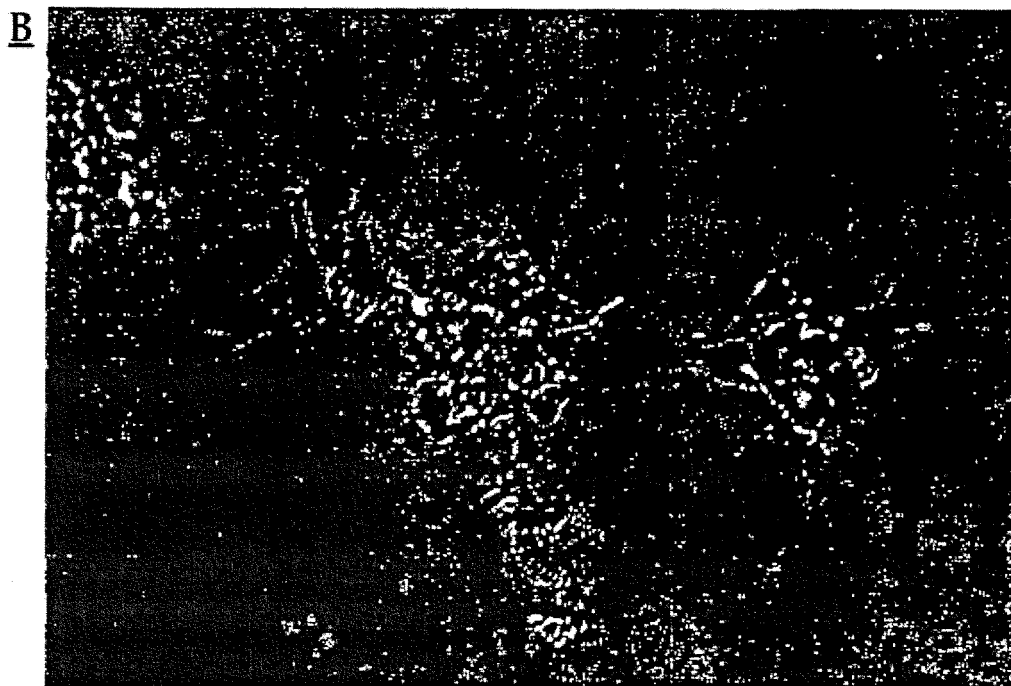
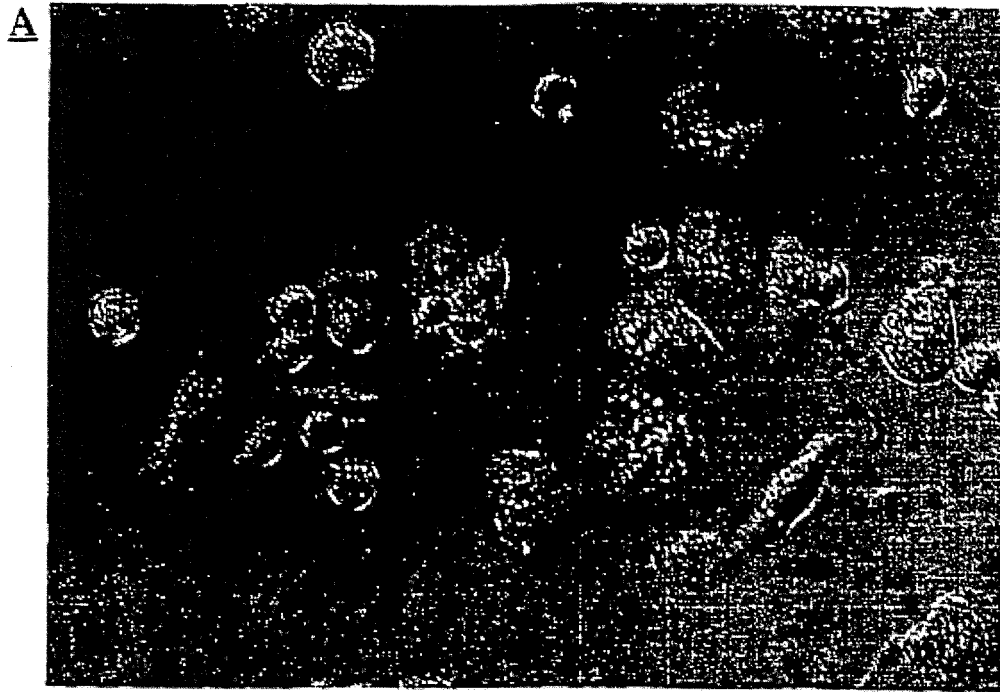


FIGURA 1 CONTINUACIÓN

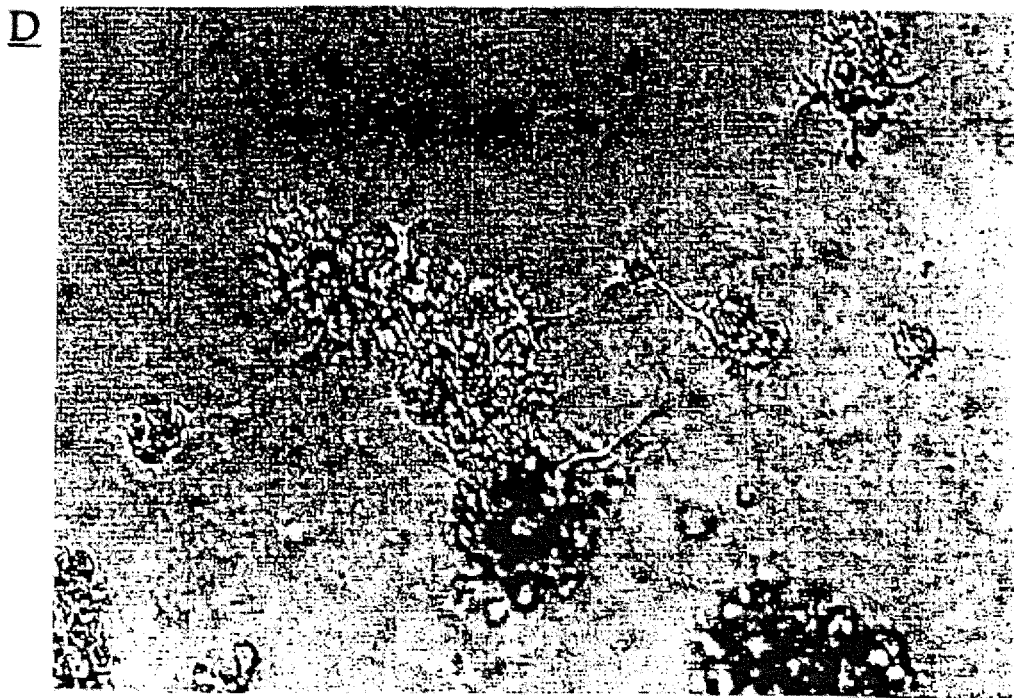


FIGURA 2

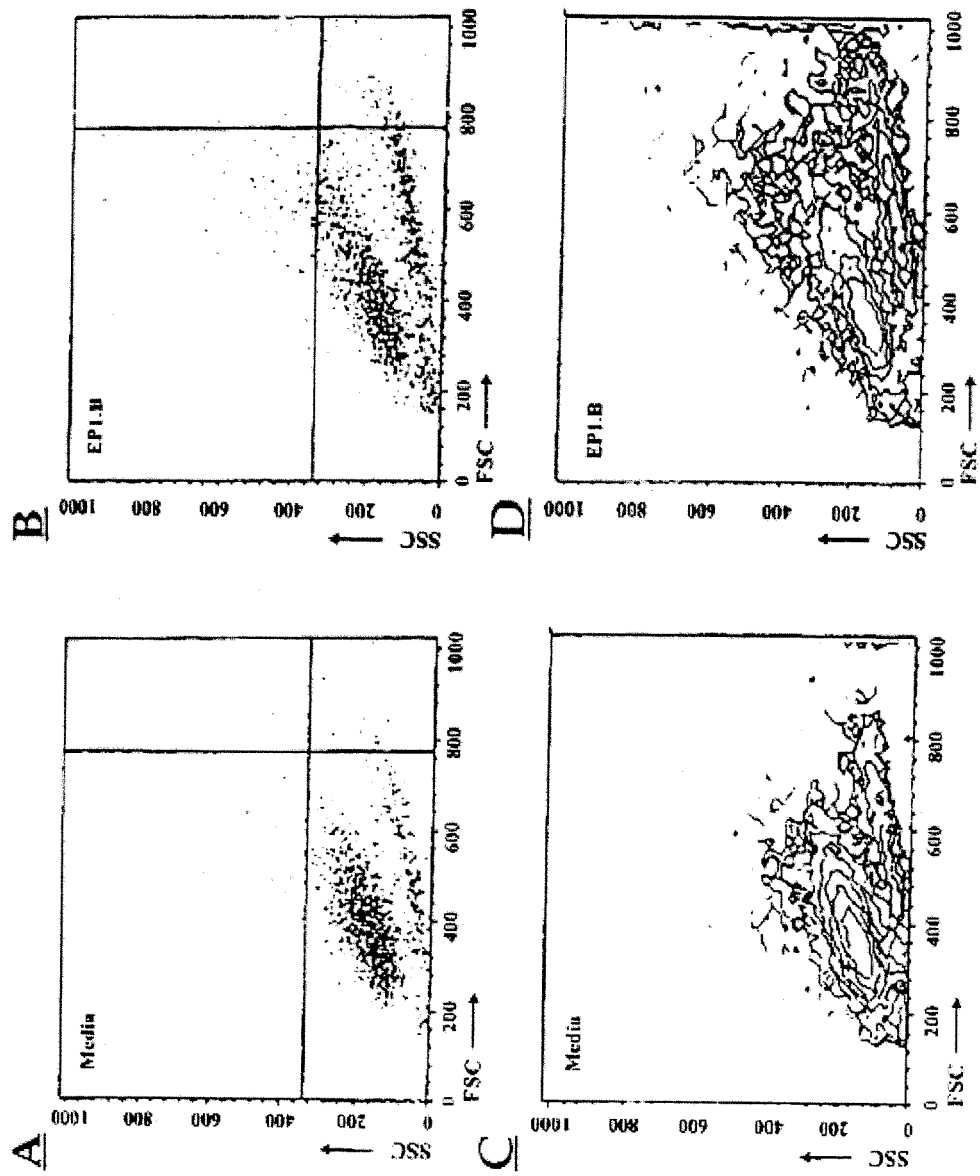


FIGURA 3

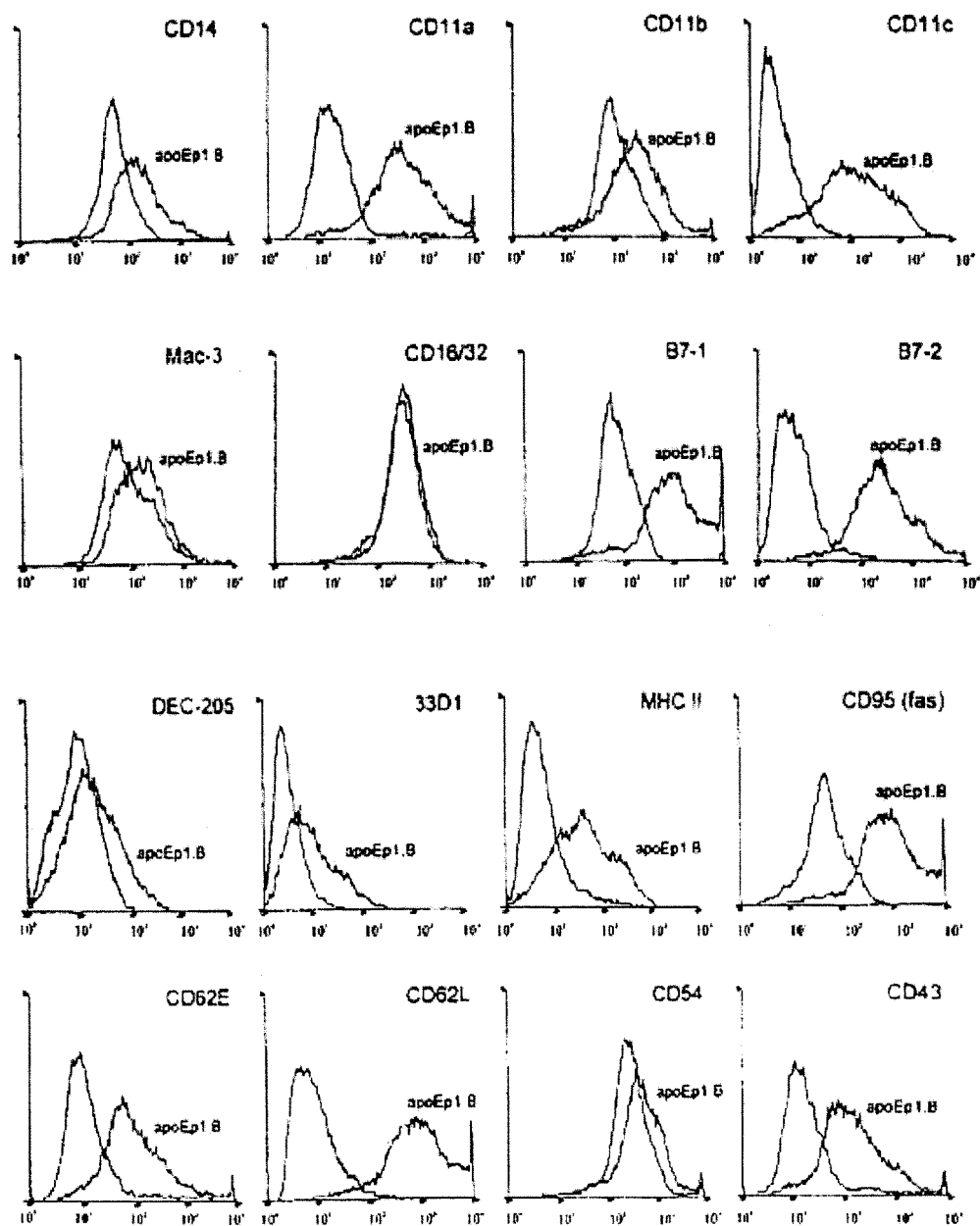


FIGURA 4

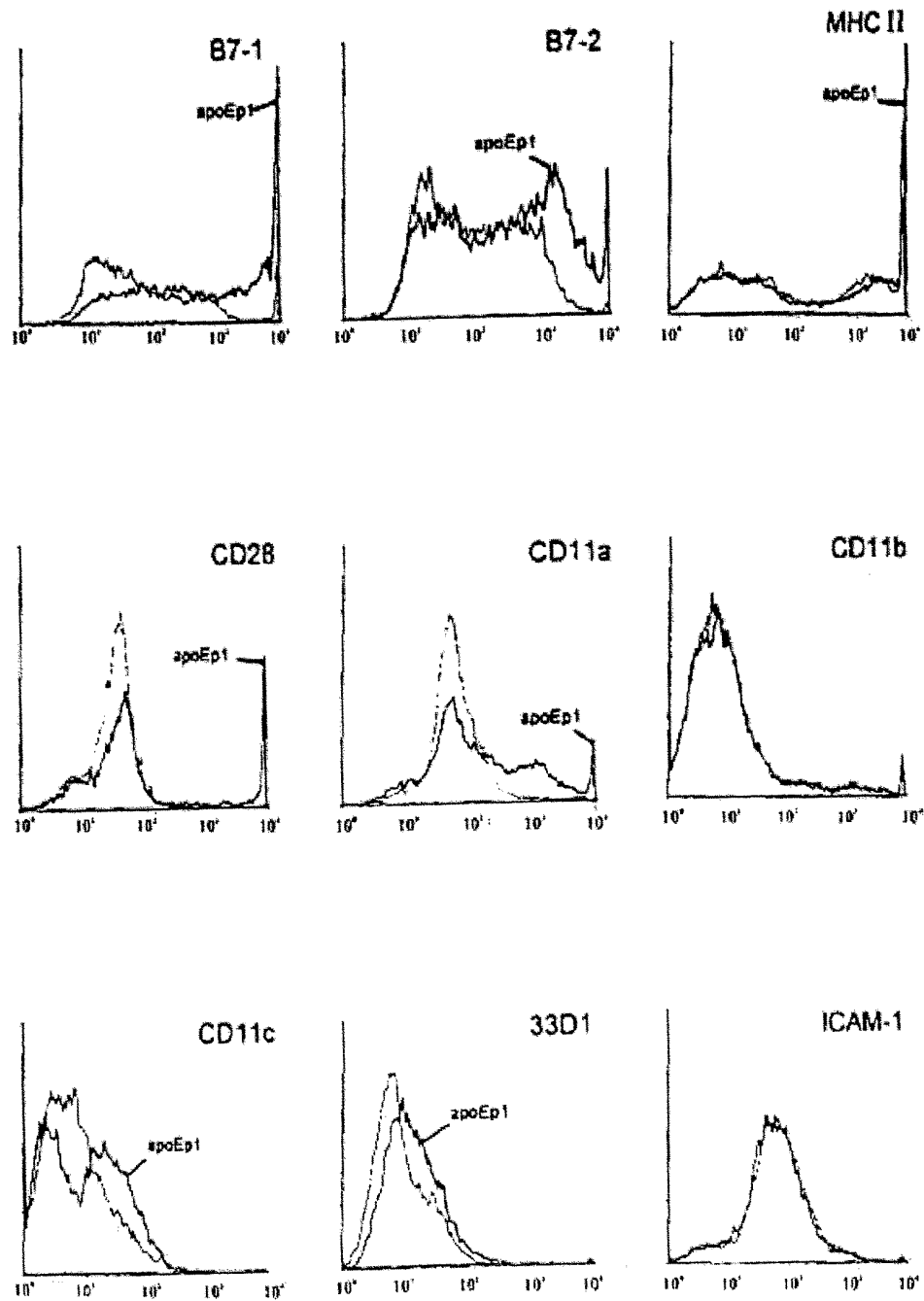


FIGURA 5

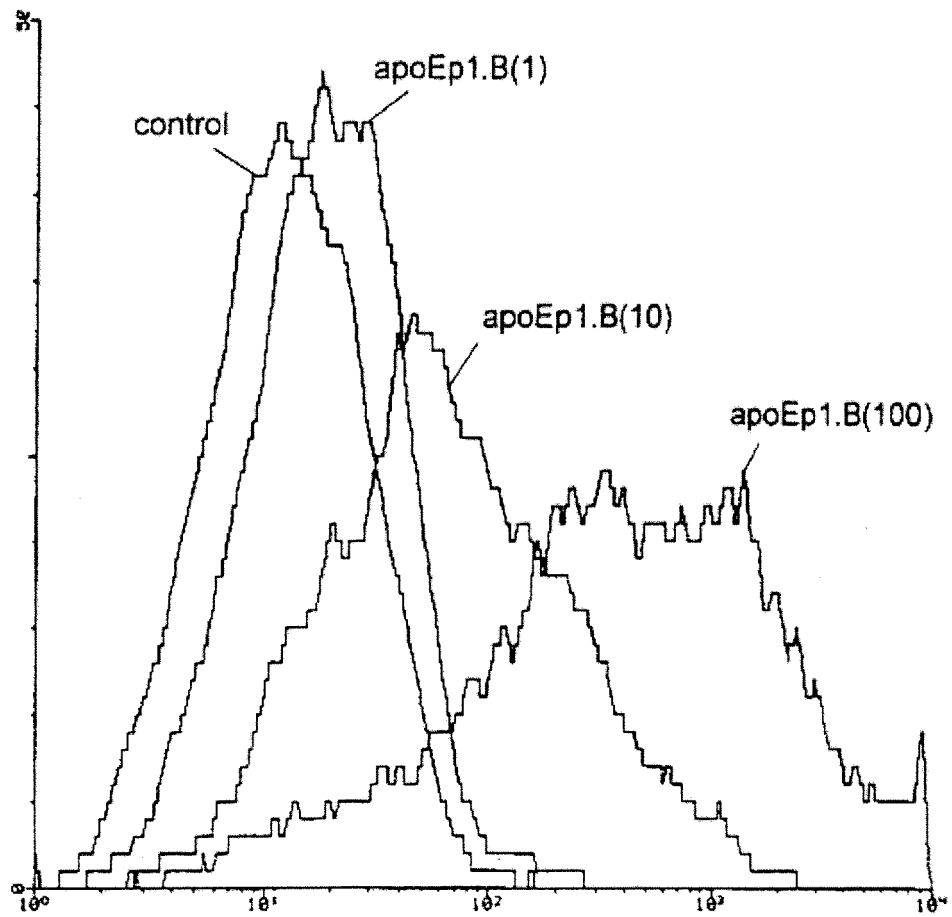


FIGURA 6

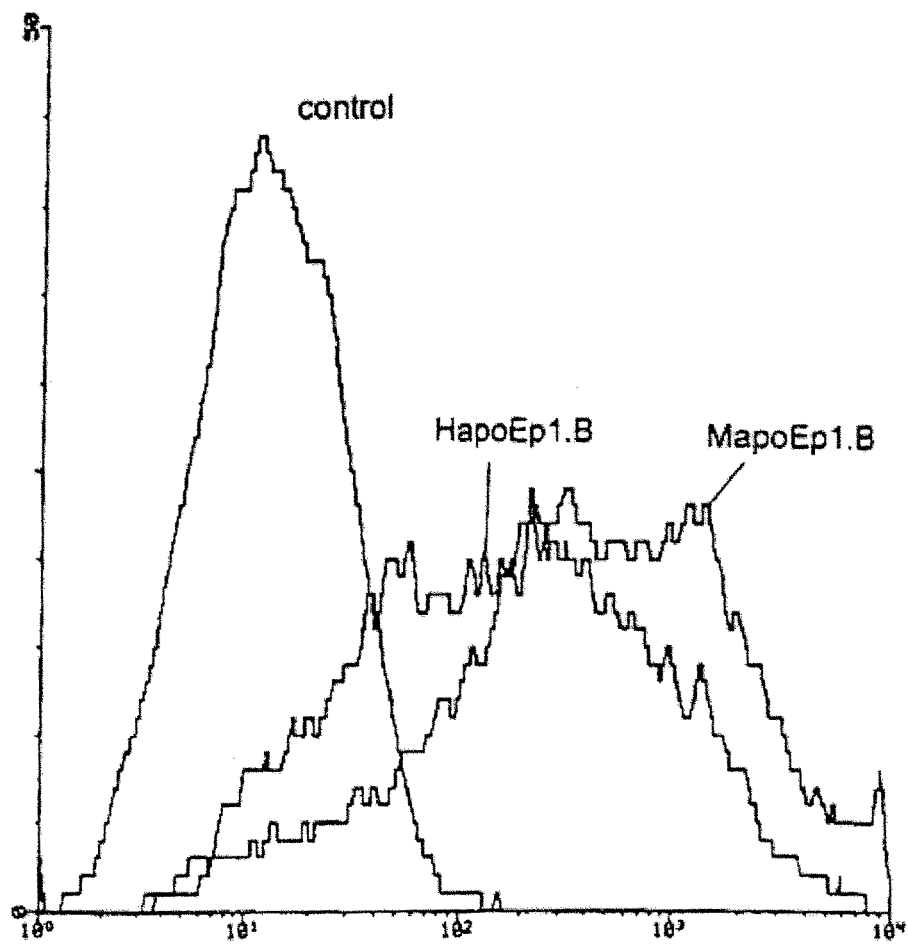


FIGURA 7

Nivel de quimioquina en sobrenadante de 24 horas

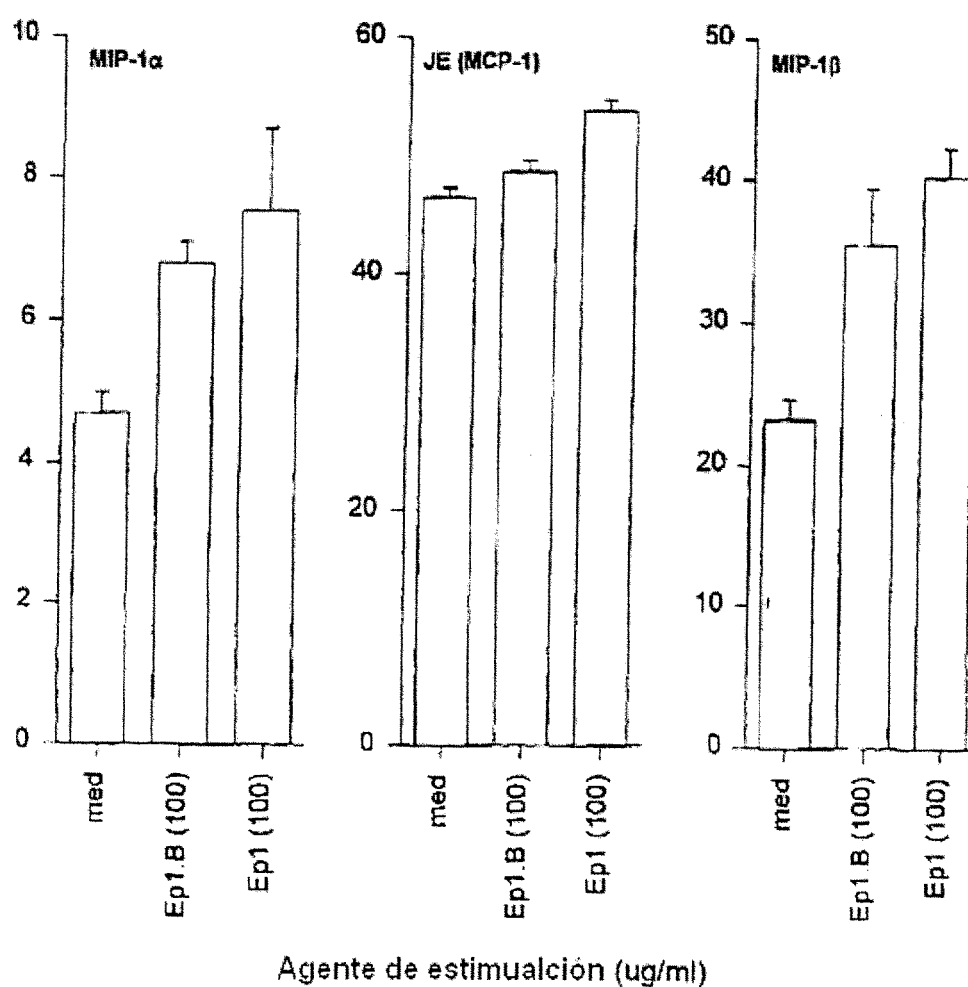


FIGURA 8A

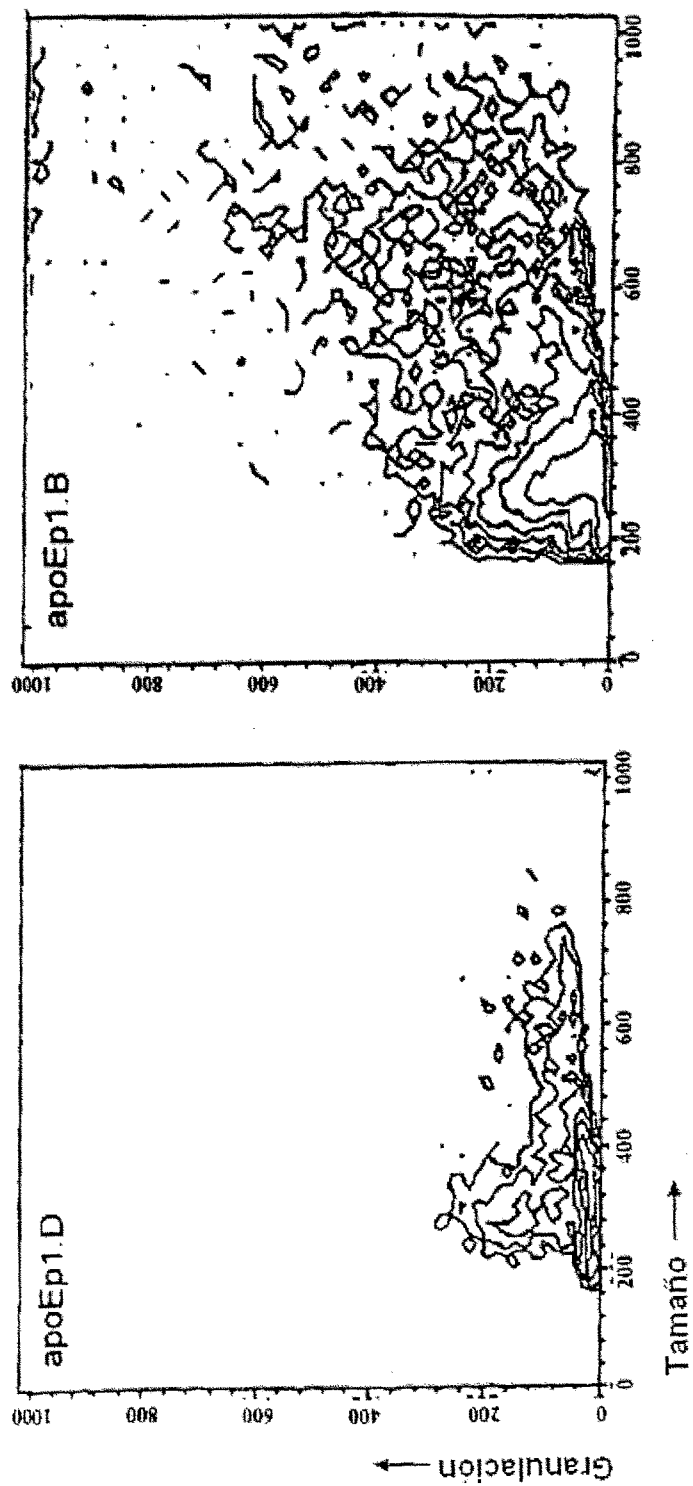


FIGURA 8B

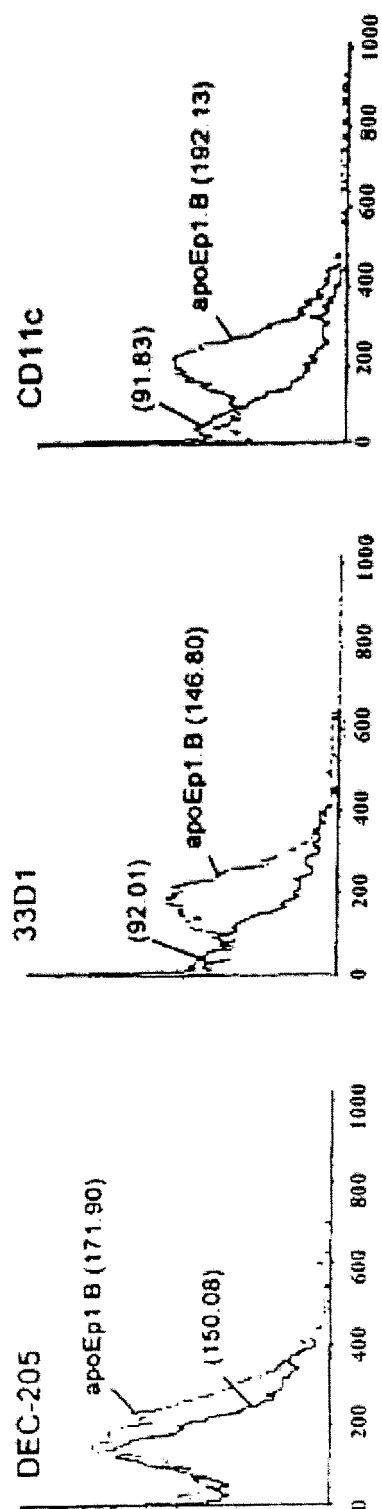


FIGURA 9

Ep1B potencia la estimulación mitogénica

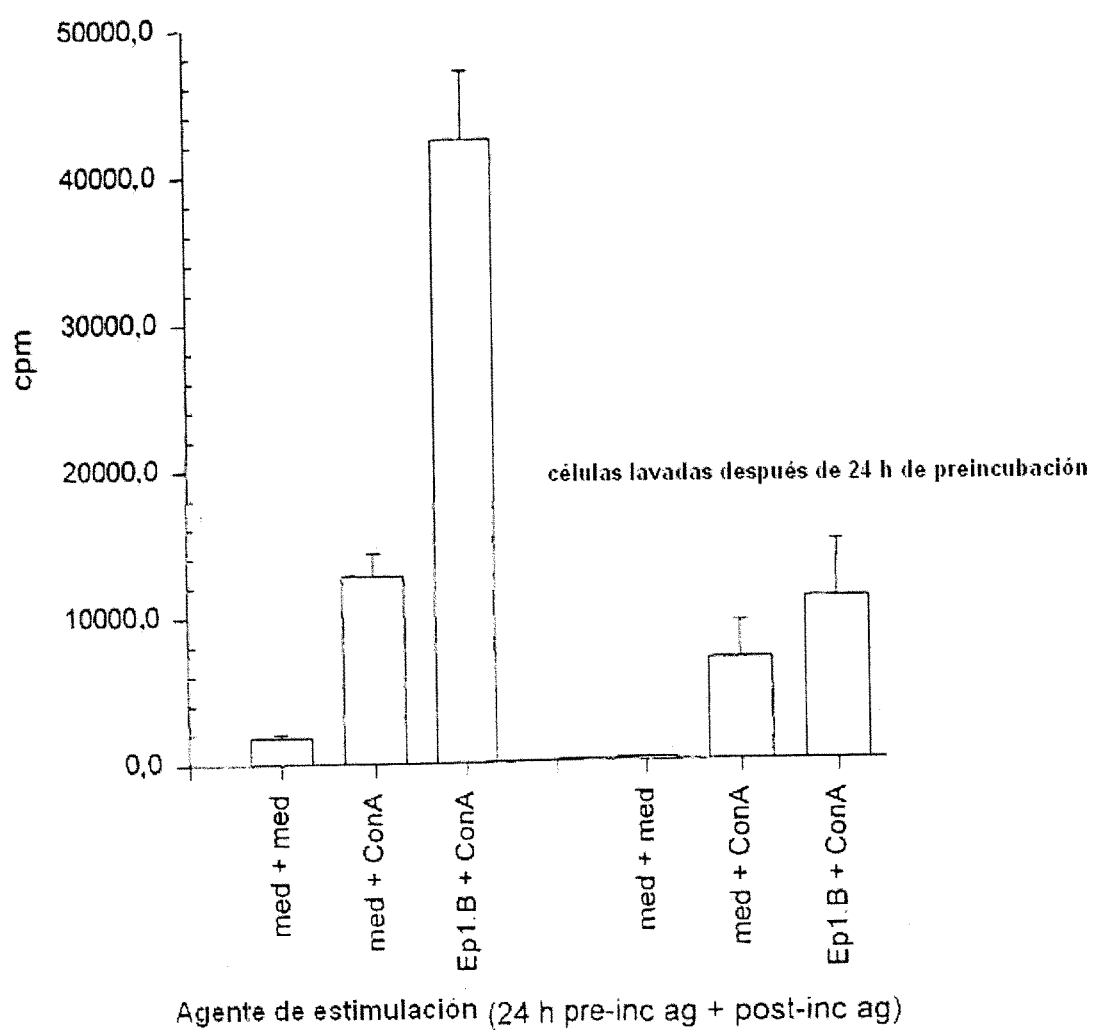
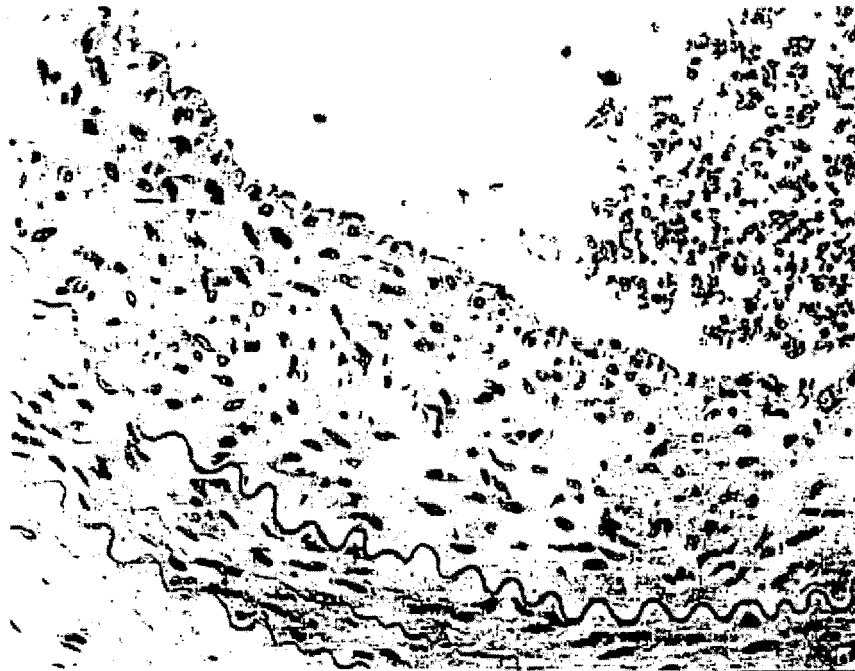


FIGURA 10

A



B

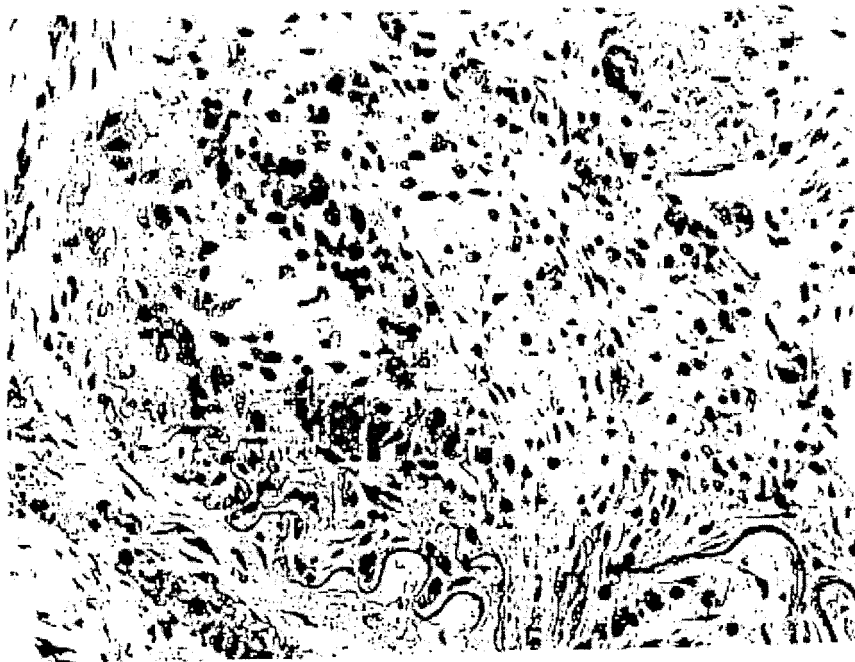


FIGURA 10 CONTINUACIÓN

C



FIGURA 11

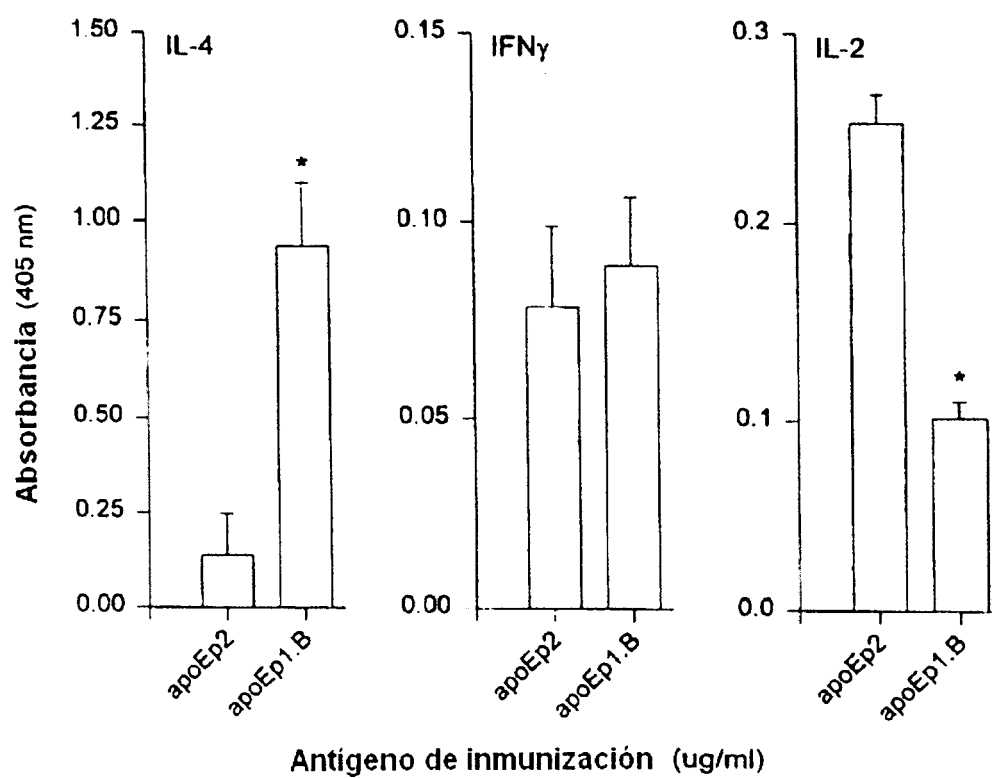


FIGURA 12

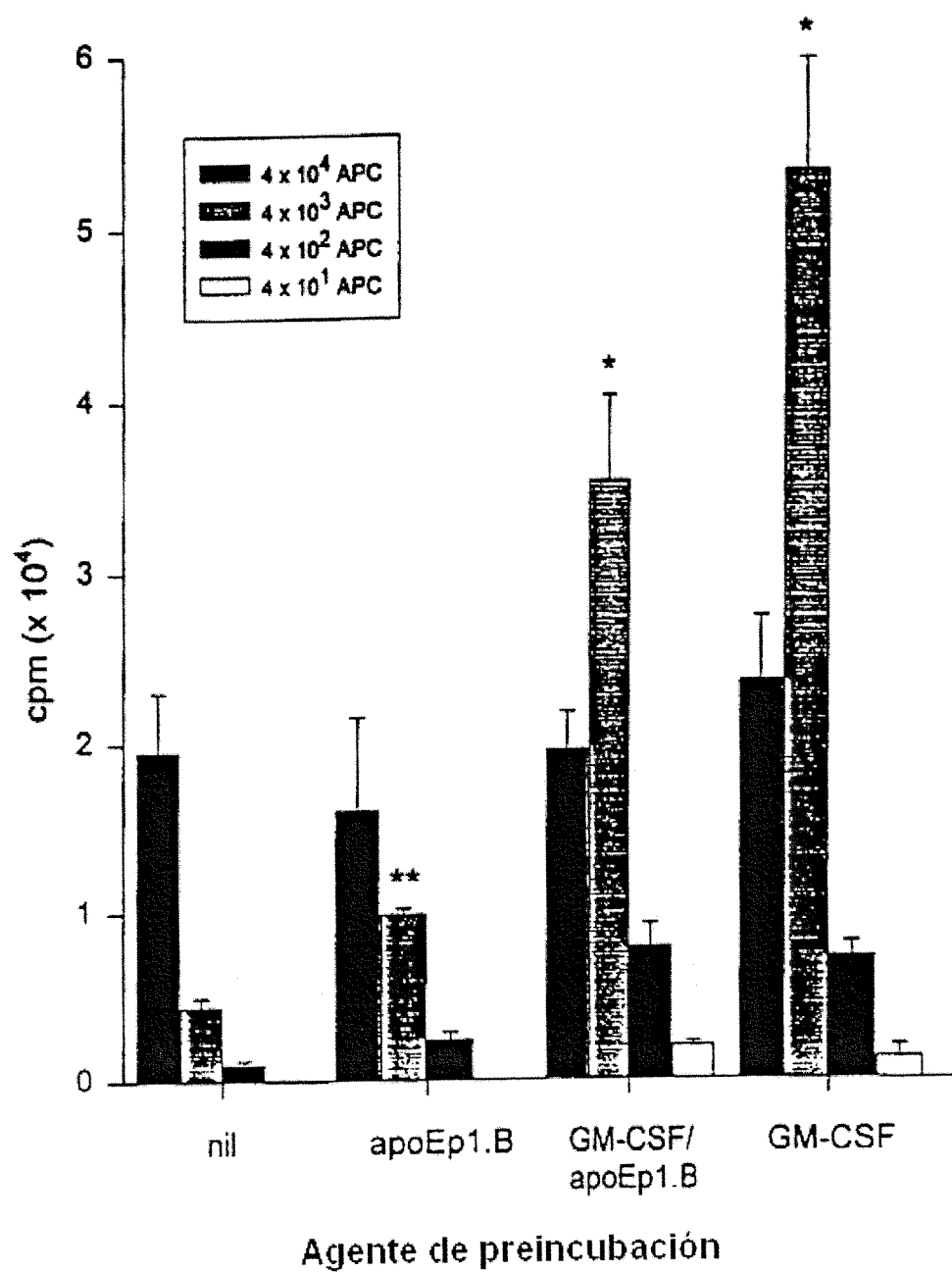


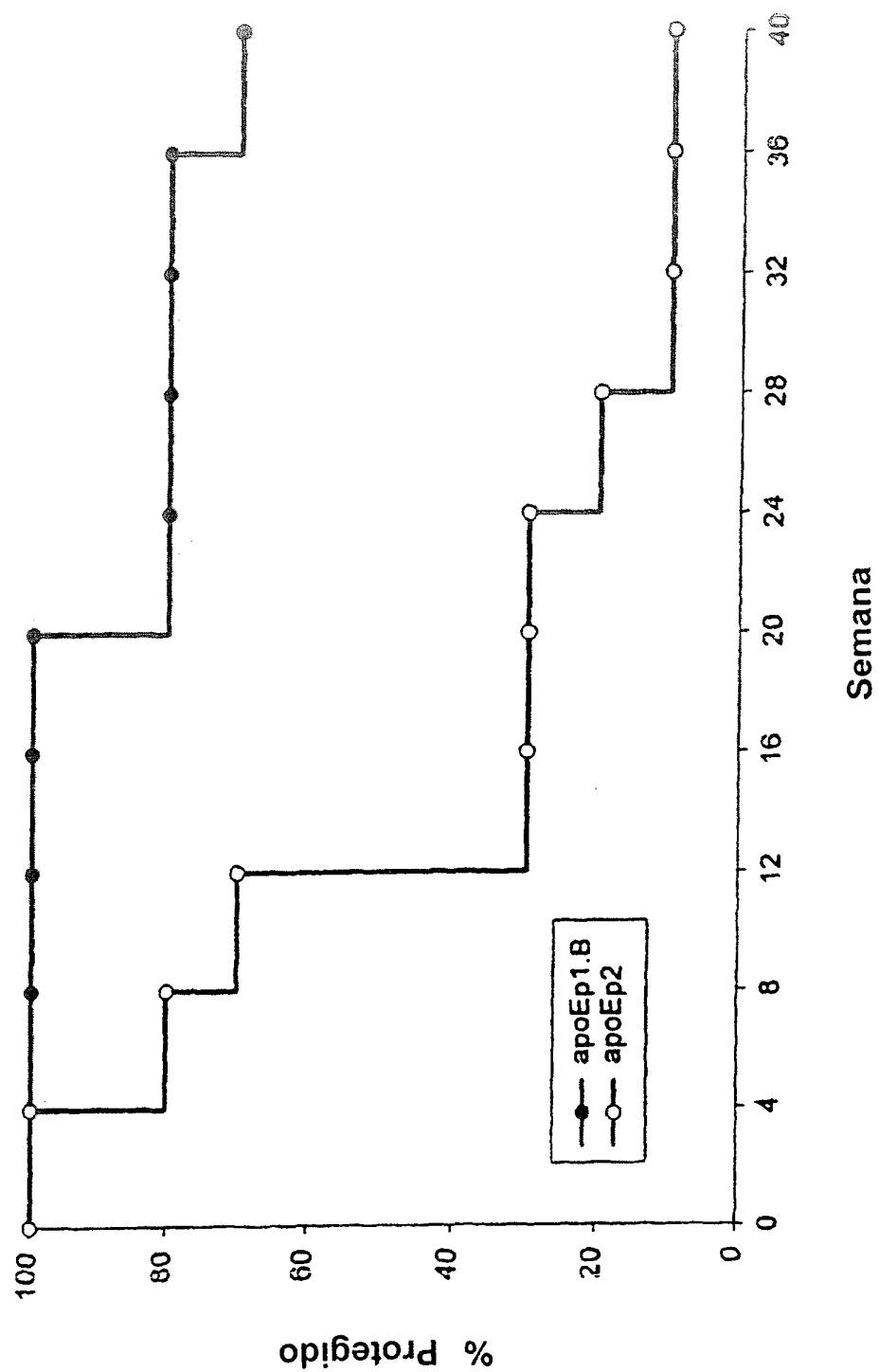
FIGURE 13A

FIGURA 13B

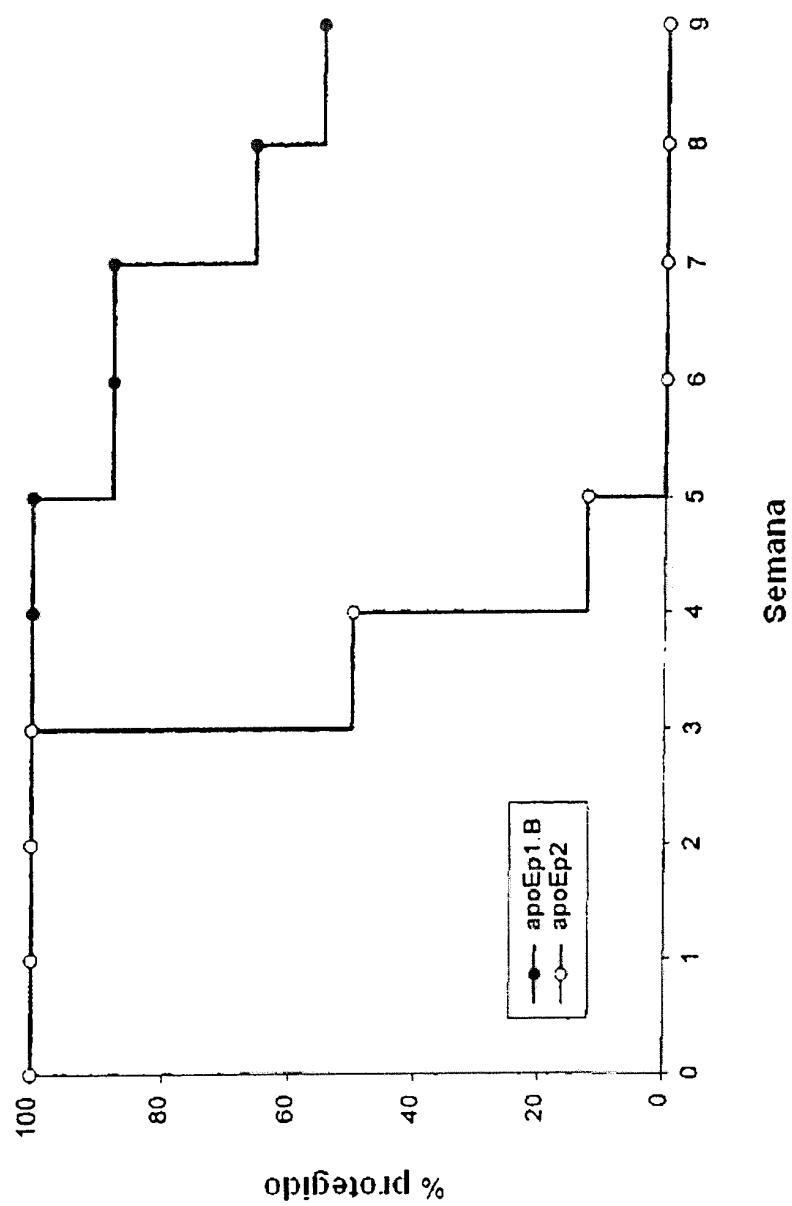


FIGURA 14

Immunización en la almohadilla de la pata con apoEp1.B en IFA protege a ratones NOD de diabetes

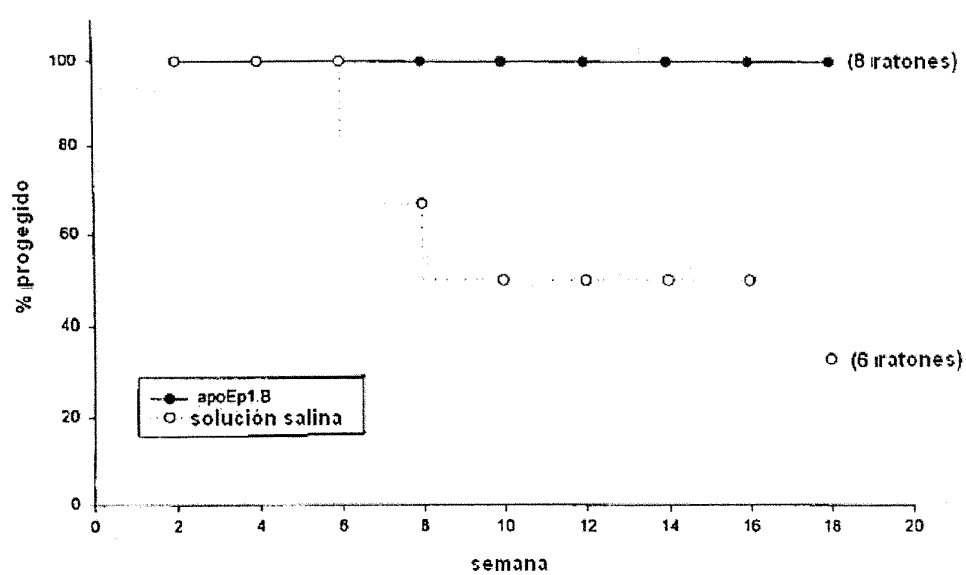


FIGURA 15

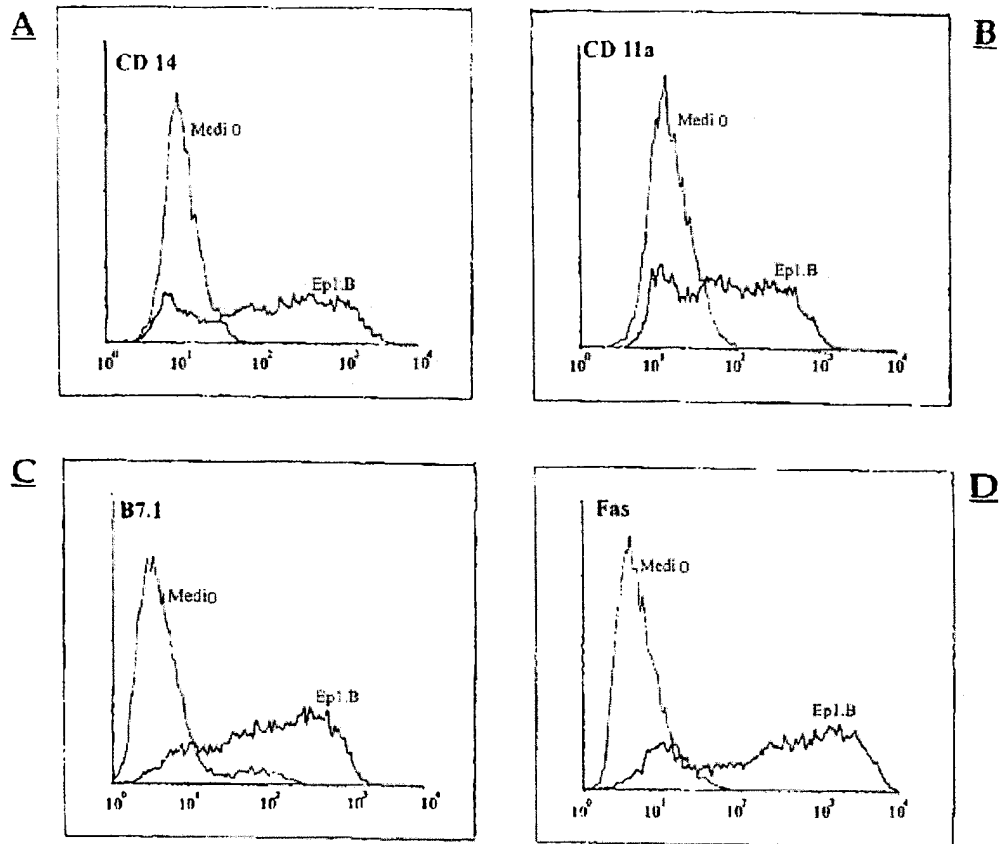
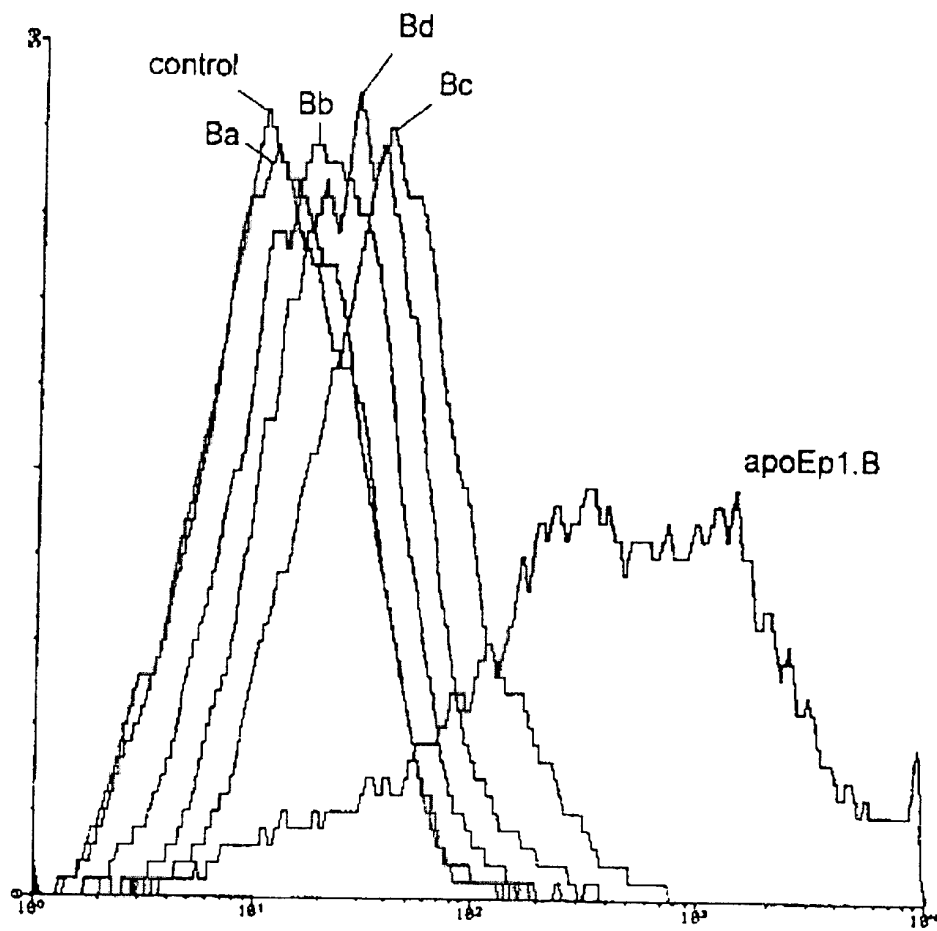


FIGURA 16



ES 2 276 481 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Rider, Beverley J.
Singh, Bhagirath

5

<120> Procedimientos de modulación inmune

<130> 9611-007

10

<140>
<141>

15

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

20

<210> 1
<211> 14
<212> PRT
<213> Murine

25

<400> 1

30

Thr	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Gln	Ala	Glu	Ile	Phe	Gln	Ala	Arg
1				5					10				

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Humano

35

<400> 2

40

Ala	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Gln	Ala	Glu	Ala	Phe	Gln	Ala	Arg
1				5					10				

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> construcción sintética

45

<400> 3

50

Thr	Ala	Gln	Ile	Arg	Leu	Gln	Ala	Glu	Ile	Phe	Gln	Ala	Arg
1				5					10				

55

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> construcción sintética

60

<400> 4

65

Thr	Gln	Ala	Ile	Arg	Leu	Gln	Ala	Glu	Ile	Phe	Gln	Ala	Arg
1				5					10				

ES 2 276 481 T3

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

5 <213> construcción sintética

<400> 5

	Thr	Gln	Gln	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Glu	Ile	Phe	Gln	Ala	Arg
10	1				5					10				

<210> 6

<211> 14

15 <212> PRT

<213> construcción sintética

<400> 6

	Thr	Gln	Gln	Ile	Ala	Leu	Gln	Ala	Glu	Ile	Phe	Gln	Ala	Arg
20	1				5					10				

<210> 7

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Murino

30

<400> 7

	Gln	Thr	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Gln	Ala	Glu	Ile	Phe	Gln	Ala	Arg
35	1				5					10				15	

<210> 8

<211> 13

40 <212> PRT

<213> Murino

<400> 8

	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Gln	Ala	Glu	Ile	Phe	Gln	Ala	Arg
45	1				5					10			

50

55

60

65