



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 463**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03701612 .8**
96 Fecha de presentación : **30.01.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1474443**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2004**

54 Título: **Péptidos tolerogénicos de la proteína básica de la mielina.**

30 Prioridad: **01.02.2002 GB 0202399**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.01.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.01.2011

73 Titular/es:
APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) Limited
University Gate East
Park Row Bristol BS1 5UB, GB

72 Inventor/es: **Ponsford, Frances Mary;**
Mazza, Graziella;
Wraith, David Cameron y
Streeter, Heather Barbara

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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:

La presente invención se refiere a péptidos de la proteína básica de la mielina. En particular, la presente invención se refiere a péptidos que comprenden una parte de la región 131 a 158 de la proteína básica de la mielina y su utilización en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.

ANTECEDENTES

En la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T pueden reconocer los epítomos internos de los antígenos de proteína. Las células presentadoras de antígenos (APC) adquieren antígenos de proteína y los degradan en pequeños fragmentos peptídicos. Un péptido se puede unir a una de las moléculas de los principales complejos de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II dentro de las células y ser transportado a la superficie de la célula. Cuando se presenta en la superficie de la célula junto con la molécula MHC, el péptido puede ser reconocido por una célula T (mediante el receptor de la célula T (TCR)), en cuyo caso el péptido es un epítomo de célula T.

Los epítomos de célula T tienen una función central en la respuesta inmune adaptativa a todo antígeno, ya no sea propio o foráneo. La función central que tienen los epítomos de célula T en las enfermedades hipersensibilidad (que comprende las alergias, las enfermedades autoinmunes y el rechazo de los trasplantes) se ha demostrado mediante la utilización de modelos experimentales. Es posible inducir enfermedades inflamatorias o alérgicas mediante la inyección de péptidos sintéticos (basados en la estructura de los epítomos de célula T) en combinación con un adyuvante.

Por el contrario, se ha demostrado que es posible inducir tolerancia inmunológica hacia epítomos de péptido particulares mediante la administración de los epítomos de péptido en forma soluble. Se ha demostrado que la administración de antígenos peptídicos solubles es un medio efectivo para inhibir la enfermedad en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE- un modelo de la esclerosis múltiple (EM)) (Metzler y Wraith, *Int. Immunol.* 5:1159-1165 (1993); Liu y Wraith, *Int. Immunol.* 7:1255-1263 (1995); Anderton y Wraith, *Eur. J. Immunol.*, 28:1251-1261 (1998)), y en modelos experimentales de artritis, diabetes y uveoretinitis (revisado en Anderton y Wraith (1998) anterior). También se ha demostrado esto como una forma de tratamiento de una enfermedad en curso en EAE

(Anderton y Wraith (1998) anterior).

La utilización de péptidos tolerogénicos en el tratamiento o prevención de una enfermedad ha atraído una atención considerable. Una razón para ello es que se ha demostrado que ciertos epítomos tolerogénicos pueden regular negativamente la
5 respuestas de las células T a diferentes antígenos en el mismo tejido. Este fenómeno, conocido como “supresión vecinal” significa que debe ser posible inducir tolerancia a más de un epítomo (preferentemente todos los epítomos) en un antígeno determinado, y a más de un antígeno de una enfermedad determinada, utilizando un péptido tolerogénico en particular (Anderton y Wraith (1998) anterior). Esto obviaría la necesidad de identificar
10 todos los antígenos patógenos en una enfermedad en particular.

Los péptidos también son una opción favorable para la terapia por su coste relativamente bajo y el hecho de que los análogos peptídicos se pueden producir con propiedades inmunológicas modificadas. En consecuencia los péptidos se pueden modificar con el fin de alterar sus interacciones con MHC o TCR.

15 Un posible problema con esta estrategia es que se ha demostrado que no todos los péptidos que actúan como epítomos de célula T son capaces de inducir tolerancia. El péptido 89 a 101 de la proteína básica de mielina (MBP) es un antígeno inmunodominante después de la inmunización y también es un inmunógeno muy efectivo tanto en términos de cebar la reactividad de las células T como en la inducción EAE. Sin embargo, este
20 péptido ha demostrado no ser efectivo en inducir tolerancia cuando se administra en disolución (Anderton y Wraith (1998) anterior).

Se han propuesto múltiples explicaciones para la jerarquía observada en la capacidad de los epítomos de célula T para inducir tolerancia (revisado en Anderton y Wraith (1998) anterior). En particular, se ha propuesto que existe una correlación entre la
25 afinidad del péptido hacia la MHC y la tolerogenicidad (Liu y Wraith (1995) anterior), pero esto no coincide con algunas de las observaciones. Por ejemplo, MBP [89 a 101], que no es tolerogénico, se une a I-A^s con una afinidad relativamente elevada. Por consiguiente, no es obvio predecir que péptidos inducirán tolerancia.

En el contexto de la presente invención se ha demostrado que si un epítomo de
30 péptido es del tamaño adecuado para ser presentado por APC inmaduro sin procesamiento del antígeno, puede inducir tolerancia inmunológica (solicitud de patente internacional número PCT/GB01/03702). La observación de que algunos péptidos de célula T son tolerogénicos y otros son incapaces de inducir tolerancia puede, por

consiguiente, ser explicada por el hecho de que algunos epítomos necesitan procesamiento adicional antes de ser capaces de ser presentados por una molécula MHC. Estos epítomos que necesitan procesamiento adicional no inducen tolerancia cuando se administran en forma soluble, a pesar de su capacidad para inducir enfermedad cuando se inyectan en combinación con un adyuvante.

Los epítomos que no requieren procesamiento adicional son capaces de inducir tolerancia y se han denominado “apítomos” (epíTOSOS Independientes del Procesamiento de Antígenos) en el contexto de la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha examinado la región 131 a 158 de MBP y descubrieron un número de péptidos que pueden ser presentados a las células T por células presentadoras de antígenos fijadas.

Estos péptidos se definen como apítomos, debido a que pueden ser capaces de unirse a la clase I y II de MHC sin procesamiento adicional.

Se han identificado asimismo dos epítomos mínimos en la región 131 a 158 de la proteína básica de la mielina que son reconocidos por clones particulares de células T. El péptido puede comprender uno o ambos de estos epítomos que son MBP 142 a 152 y 140 a 148.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido capaz de unirse a una molécula MHC clase I o II sin procesamiento adicional y que se selecciona de entre los siguientes péptidos básicos de mielina:

YKSAHKGFKGVDAQG (134-148),
KSAHKGFKGVDAQGT (135-149),
SAHKGFKGVDAQGTL (136-150),
AHKGFKGVDAQGTL (137-151),
HKGFKGVDAQGTL (138-152),
GFKGVDAQGTL (140-154).

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 2 muestra la respuesta del clon N5 de células T a la presentación por APC del péptido 140 a 154 de MBP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Péptidos

Un péptido de la presente invención puede ser de una longitud cualquiera que sea capaz de unirse a una molécula MHC de clase I o II sin procesamiento adicional.

Los péptidos que se unen a las moléculas MHC de clase I son típicamente de una longitud comprendida entre 7 y 13 aminoácidos, más frecuentemente de entre 8 y 10 aminoácidos. La unión de los péptidos se estabiliza en sus dos extremos mediante contactos entre átomos de la cadena principal del péptido y lugares invariantes en la hendidura de unión de todas las moléculas MHC de clase I. Existen lugares invariantes en los dos extremos de la hendidura que se unen a los extremos amino y carboxílico del péptido. Las oscilaciones en el tamaño del péptido se acomodan mediante dobleces en el esqueleto del péptido, frecuentemente en los residuos de prolina o glicina que permiten la

flexibilidad necesaria.

Los péptidos que se unen a las moléculas MHC de clase II son típicamente de un longitud comprendida entre 8 y 20 aminoácidos, más frecuentemente de entre 10 y 17 aminoácidos de longitud y pueden ser mucho más largos. Estos péptidos yacen en una conformación extendida a lo largo de la hendidura de unión de péptidos de la molécula MHC II que (por el contrario de la hendidura de unión de péptidos de la MHC clase I) está abierta en los dos extremos. El péptido se sujeta en su lugar principalmente por contactos atómicos entre la cadena principal y residuos conservados que recubren la hendidura de uniones a péptidos.

El péptido de la presente invención se puede producir mediante procedimientos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin). Por ejemplo, los péptidos se pueden sintetizar mediante procedimientos en fase sólida (Roberge JY *et al.*, *Science* 269:204-204 (1995)), separados de la resina, y purificados mediante cromatografía líquida de elevado rendimiento preparativa (por ejemplo, Creighton (1983) Protein structures and molecular principles, WH Freeman and Co., New York NY). La síntesis automática se puede lograr, por ejemplo, utilizando el Peptide Synthesizer ABI 431 A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

El péptido, por el contrario, se puede producir mediante procedimientos recombinantes, o mediante escisión de un polipéptido más largo. Por ejemplo, el péptido se puede obtener mediante la escisión de la proteína básica de la mielina. La composición de un péptido se puede confirmar mediante análisis de aminoácidos o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación Edman).

El péptido de la presente invención se puede derivar de la región 131 a 158 de MBP. Preferentemente el péptido se puede derivar de un fragmento del antígeno que se produce por el procesamiento natural del antígeno por una APC.

En la práctica, el péptido debe mostrar múltiples características adicionales. Por ejemplo, el péptido debe ser soluble en agua a una concentración que permita su utilización *in vivo*. Preferentemente, el péptido debe ser soluble a concentraciones de hasta 0,5 mg/ml, más preferentemente el péptido debe ser soluble a concentraciones de hasta 1 mg/ml, más preferentemente el péptido debe ser soluble a concentraciones de hasta 5 mg/ml.

Para la administración intranasal el máximo volumen de dosis que se puede

adquirir utilizando los procedimientos actuales es de aproximadamente 200 µl por fosa nasal. Si el péptido es soluble a 1 mg/ml, una doble dosis en cada una de las fosas nasales permite administrar 800 µg al paciente. Es poco frecuente administrar más de 5 mg en una dosis individual.

5 También es importante que el péptido sea suficientemente estable *in vivo* para que tenga utilidad terapéutica. Se ha descubierto que *in vivo*, 30 minutos después de la administración la cantidad total de péptido de ensayo se reduce al 50%, 4 horas después de la administración la cantidad cae a aproximadamente al 30%, pero después de 5 días el péptido es todavía detectable (aproximadamente 5%). La vida media del péptido *in vivo*
10 debe ser de por lo menos 10 minutos, preferentemente de por lo menos 30 minutos, más preferentemente de 4 horas y lo más preferido de por lo menos 24 horas.

Se ha descubierto que después de la administración intranasal, la cantidad de péptido en los ganglios linfáticos de drenaje tiene un máximo a aproximadamente las 4 horas después de la administración, sin embargo, el péptido es todavía detectable (a
15 niveles máximos de aproximadamente el 5%) después de 5 días. Preferentemente, el péptido es lo suficientemente estable para estar presente concentraciones terapéuticamente activas en el ganglio linfático de drenaje por tiempo suficiente para un efecto terapéutico.

El péptido debe demostrar también una buena biodisponibilidad *in vivo*. El péptido
20 debe mantener una conformación *in vivo* que le permita unirse a la molécula MHC en la superficie celular sin impedimento.

Proteína básica de la mielina (MBP)

25 MBP es un antígeno de la mielina, que se caracterizó anteriormente y se secuenció (Roth *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, 17(4):321-328 (1987). Número de registro M30516)).

Los péptidos de la presente invención son derivables de la región 131 a 158 de MBP.

Preferentemente el péptido comprende uno o más de los epítomos de célula T
30 mínimos en la región, por ejemplo el epítomo mínimo de MBP 142 a 152 ó 140 a 148.

El péptido de la presente invención se selecciona de entre los siguientes péptidos de la proteína básica de la mielina:

Péptido MBP	Secuencia
134-148	YKSAHKGFKGVDAQG
135-149	KSAHKGFKGVDAQGT
136-150	SAHKGFKGVDAQGTL
137-151	AHKGFKGVDAQGTL
138-152	HKGFKGVDAQGTL
140-154	GFKGVDAQGTL

Epítomos independientes de procesamiento de antígenos (APITOPES)

El péptido de la presente invención es capaz de unirse sin procesamiento adicional a las moléculas MHC de clase I o II (en la hendidura de unión a péptidos). Se hace referencia a dichos péptidos se refieren en la presente memoria como “apítomos” (epítomos independientes del procesamiento de antígenos).

La presentación en la superficie de la célula de péptidos derivados de un antígeno determinado no es al azar y tiende a estar dominada por un número pequeño de epítomos que ocurren con frecuencia. La dominancia de un péptido en particular dependerá de muchos factores, tales como la afinidad relativa para la unión a la molécula MHC, el punto espacio-temporal de producción dentro de la APC y la resistencia a la degradación. La jerarquía de epítomos de un antígeno puede cambiar con la progresión de una respuesta inmune, lo que tiene implicaciones importantes para la auto-tolerancia y la autoinmunidad. Las regiones inmunodominantes determinantes son posiblemente buenos tolerógenos. En consecuencia, en una forma de realización preferida, el apítomo de la presente invención se basa en un epítomo dominante.

Sin embargo, después de una respuesta inmune primaria a los péptidos inmunodominantes, puede tener lugar un “esparcimiento” de los epítomos a determinantes subdominantes (Lehman *et al.*, *Nature* 358:155-157 (1992)). La presentación de epítomos subdominantes puede ser importante en el disparo de la autoinmunidad. El apítomo de la presente invención puede, en consecuencia, estar basado en un epítomo subdominante.

Para un antígeno determinado cualquiera, también pueden existir epítomos crípticos. Los epítomos crípticos son aquellos que pueden estimular una respuesta de células T cuando se administra como un péptido pero que fracasan en la producción de tal respuesta cuando se administran como un antígeno entero. Podría ser que durante el

procesamiento del antígeno en péptidos en la APC se destruya el epítipo críptico.

El epítipo críptico puede funcionar como un apítipo *in vitro*, ya que es capaz de unirse a la molécula de MHC sin procesamiento adicional e inducir anergia en una célula T que reconozca el epítipo críptico. Sin embargo, sería poco probable que tal apítipo fuese de utilidad terapéutica debido a que sería incapaz de hacer tolerantes a las células T que reconocen un epítipo del antígeno procesado naturalmente.

Los epítipos de un antígeno se pueden identificar mediante la medición de la respuesta de las células T a péptidos solapados que cubren todo el antígeno (ver más adelante) cuando son presentados por la APC. Dichos estudios producen generalmente “conjuntos anidados” de péptidos y se puede determinar el epítipo mínimo para una línea/clon particular de células T mediante la medición de la respuesta a péptidos truncados.

No se puede asumir que un epítipo mínimo de un antígeno se comporte como un apítipo. Bien podría ser que los aminoácidos que flanquean el epítipo mínimo sean necesarios para la unión óptima a la MHC. El apítipo debería estar diseñado para contemplar la posibilidad de que haya diferencias sutiles entre los epítipos mínimos de diferentes clones de células T.

Se debería enfatizar que podría no ser posible identificar un apítipo para todos los epítipos. Existe clara evidencia de que algunos epítipos se unen a MHC de un modo que es independiente de la carga de MHC en los endosomas y por consiguiente requieren procesamiento (Viner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:2214-2218 (1995)). Esta es otra razón por la que no se puede asumir que cada epítipo mínimo se comportará inevitablemente como un apítipo.

Identificación de péptidos que comprenden epítipos de célula T

Existe una multiplicidad de procedimientos conocidos en la materia para identificar los epítipos de célula T dentro de un antígeno determinado.

Los epítipos procesados naturalmente se pueden identificar mediante análisis espectrofotométrico de masas de los péptidos eluidos de una APC cargada con antígeno. Éstas son APC que o han sido estimuladas a adquirir antígeno o han sido forzadas a producir la proteína intracelularmente por transformación con el gen adecuado. Típicamente, se incuban APC con proteína en disolución o que está adecuadamente

dirigida a la superficie de la APC. Después de una incubación a 37°C las células se disgregan en detergente y se purifica la proteína de clase II mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad. El tratamiento de la MHC purificada en un medio químico adecuado (por ejemplo, condiciones ácidas) resulta la elución de los péptidos de la MHC. Este conjunto de péptidos se separa y se compara su perfil con los péptidos de APC control tratadas del mismo modo. Los picos específicos de las células en las que se expresó/administró proteína se analizan (por ejemplo, mediante espectrometría de masas) y se identifican los fragmentos de péptidos. Este procedimiento generalmente produce información acerca del rango de péptidos (que generalmente se encuentran en “conjuntos anidados”) generados por procesamiento de antígenos a partir de un antígeno en particular.

Otro procedimiento para identificar epítomos es cribar una biblioteca sintética de péptidos que se solapan y cubren la longitud de un antígeno en un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, se pueden utilizar péptidos de 15 aminoácidos de longitud que se solapan en entre 5 ó 10 aminoácidos. Se ensayan los péptidos en un sistema de presentación de antígenos que comprende células presentadoras de antígeno y células T. Por ejemplo, el sistema de presentación de antígenos pueden ser una preparación de esplenocitos murinos, una preparación de células humanas de las amígdalas o PBMC. Por el contrario, el sistema presentador de antígenos puede comprender una línea o clon particular de células T y/o un tipo particular de célula presentadora de antígenos.

La activación de las células T se puede medir mediante la proliferación de las células T (por ejemplo utilizando incorporación de ³H-Timidina). O producción de citoquinas. La activación de las células T CD4+ de tipo TH1 puede, por ejemplo, detectarse mediante la producción de IFN γ que se puede detectar mediante procedimientos estándar, tales como el ensayo ELISPOT.

Los estudios de péptidos solapados generalmente indican la zona del antígeno en la que se encuentra un epítipo. Entonces, se puede medir el epítipo mínimo de una célula T en particular mediante la medición de la respuesta a péptidos truncados. Por ejemplo, si se obtiene una respuesta al péptido que comprende los residuos 1 a 15 en la biblioteca solapada, los conjuntos truncados en ambos extremos (es decir, 1 a 14, 1 a 13, 1 a 12, etc. y 2 a 15, 3 a 15, 4 a 15 etc.) se pueden utilizar con el fin de identificar el epítipo mínimo.

Sistemas de presentación independientes del procesamiento de antígenos (APIPS)

Una vez se ha identificado un epítopo, la siguiente etapa es investigar si también se comporta como un apítopo.

5 Un apítopo se ha de presentar a las células T sin la necesidad de procesamiento de antígeno. Una vez se han identificado péptidos que comprenden epítomos de célula T, se pueden identificar apítomos utilizando un sistema libre de procesamiento. Los péptidos truncados y análogos de péptidos se pueden ensayar para la activación utilizando un sistema de presentación independiente de procesamiento (APIPS).

10 Los ejemplos de APIPS comprenden:

- a) APC fijada (con o sin anticuerpos a CD28);
- b) Membranas lipídicas que comprenden moléculas MHC de Clase I o II (con o sin anticuerpos a CD28); y
- 15 c) MHC naturales purificadas o recombinantes en forma unida a placas (con o sin anticuerpos a CD28).

20 Se conoce la utilización de APC fijadas con el fin de investigar la respuesta de las células T, por ejemplo, en estudios destinados a investigar el epítopo mínimo dentro de un polipéptido, mediante la medición de la respuesta a péptidos truncados (Fairchild *et al.*, *Int. Immunol.* 8:1035-1043 (1996)). Las APC se pueden fijar utilizando, por ejemplo, formaldehído (generalmente paraformaldehído) o glutaraldehído.

25 Las membranas lipídicas (que pueden ser membranas planas o liposomas) se pueden preparar utilizando lípidos artificiales o pueden ser membranas plasmáticas/fracciones microsomales de APC.

30 En su utilización, las APIPS se pueden aplicar a pocillos de placas de cultivo de tejidos. A continuación, los antígenos de péptidos se añaden y la unión del péptido a la parte MHC de las APIPS se detecta mediante la adición de líneas seleccionadas o clones de células T. La activación de la línea o clon de células T se puede medir mediante uno cualquiera de los procedimientos conocidos en la materia, por ejemplo, incorporación de ³H-Timidina o secreción de citoquina.

Tolerancia

Los péptidos de la presente invención deben ser capaces de inducir tolerancia a MBP ya que son apítomos para este antígeno.

5 Tal como se utilizan en la presente memoria, el término “tolerogénico” hace referencia a poder inducir tolerancia.

La tolerancia es el incumplimiento en la respuesta a un antígeno. La tolerancia a los autoantígenos es una característica esencial del sistema inmune, cuando ésta se pierde se puede producir enfermedad autoinmune. El sistema inmune adaptativo debe
10 mantener la capacidad para responder a una enorme multiplicidad de agentes infecciosos evitando a la vez el ataque autoinmune de los antígenos propios comprendidos en el tejido propio. Esto está controlado en gran parte mediante la sensibilidad de los linfocitos T inmaduros a la muerte celular apoptótica en el timo (tolerancia central). Sin embargo, no todos los autoantígenos se detectan en el timo, de modo que la muerte de los timocitos
15 autorreactivos permanece incompleta. En consecuencia, existen mecanismos mediante los que los linfocitos T autoreactivos pueden adquirir tolerancia en los tejidos periféricos (tolerancia periférica). En Anderton *et al.*, (*Immunological Reviews* 169:123-137 (1999)) se proporciona una revisión de los mecanismos de tolerancia central y periférica.

La tolerancia puede ser resultado de, o ser caracterizada mediante la inducción de
20 anergia en por lo menos una parte de las células T CD4+. Con el fin de activar una célula T, se debe asociar un péptido a una APC “profesional” capaz de administrar dos señales a las células T. La primera señal (señal 1) es administrada por el complejo MHC-péptido en la superficie celular de la APC y es recibida por la célula T por medio del TCR. La segunda señal (la señal 2) es administrada por moléculas coestimuladoras en la superficie de la
25 APC, tales como CD80 y CD86, y es recibida por CD28 en la superficie de la célula T. Se cree que cuando una célula T recibe la señal 1 en ausencia de la señal 2, no se activa y, de hecho, se vuelve anérgica. Las células T anérgicas son refractarias a estímulos antigénicos posteriores, y pueden ser capaces de suprimir otras respuestas inmunes. Las células T anérgicas se cree que están implicadas en la mediación de la tolerancia de las
30 células T.

Sin desear estar vinculados a la teoría, se predice que los péptidos que requieren procesamiento antes de que se puedan presentar junto con las moléculas MHC no inducen tolerancia porque tienen que ser manejadas por células presentadoras de

antígeno maduras. Las células presentadoras de antígeno maduras (tales como los macrófagos, las células B y las células dendríticas) son capaces de procesar antígenos, pero también de administrar tanto la señal 1 como la 2 a una célula T, conduciendo a la activación de células T. Los apítosos, por otra parte, son capaces de unirse a las MHC de clase II o APC inmaduras. En consecuencia, son presentados a las células T sin coestimulación, conduciendo a células T anérgicas y tolerancia.

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

Se ha demostrado que, cuando se induce tolerancia por inhalación de un péptido, se reduce la capacidad para proliferar de las células T CD4+ específicas a antígeno. Además, la producción de IL-2, IFN- γ e IL-4 por estas células se regula negativamente, pero la producción de IL-10 se incrementa. Se ha demostrado que la neutralización de IL-10 en ratones en estado de tolerancia inducida por péptido restablece completamente la susceptibilidad a la enfermedad. Se ha propuesto que en el estado de tolerancia persiste una población de células reguladoras que produce IL-10 y media en la regulación inmune (Burkhart *et al.*, *Int. Immunol.* 11:1625-1634 (1999)).

La inducción de tolerancia puede, por consiguiente, ser seguida mediante múltiples procedimientos que comprenden:

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

Enfermedades diana

Los péptidos de la presente invención se pueden utilizar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

5 Los péptidos de la presente invención son de una utilidad particular en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple (EM). La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por múltiples lesiones de desmielinización diseminadas a lo largo de la materia blanca del SNC que ocurren en múltiples lugares y en diferentes tiempos (McFarlin y McFarland, *New England J. Medicine* 10 307:1183-1188 y 1246-1251 (1982)). Se cree que la EM está mediada por células T autoreactivas.

La MBP es inmunogénica y los linfocitos T MBP específicos tienen actividad encefalitogénica en animales (Segal *et al*, *J. Neuroimmunol.*, 51:7-19 (1994); Voskuhl *et al.*, *J Neuroimmunol.* 42:187-192 (1993); Zamvil *et al.*, *Nature* 317:355-8 (1985)).

Composición farmacéutica

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos del primer aspecto de la presente 20 invención. La composición puede además comprender uno o más apítosos de otra región de la MBP o de un antígeno diferente.

Se predice que, a pesar de la “supresión vecinal” puede ser necesario dirigirse a múltiples clones de células T con el fin de inducir tolerancia con efectividad. En consecuencia se puede administrar una multiplicidad de péptidos a un individuo con el fin 25 de prevenir o tratar una enfermedad.

La composición farmacéutica puede, por ejemplo comprender entre 1 y 50 apítosos, preferentemente entre 1 y 15 apítosos. Si existe más de un apítopo, preferentemente los apítosos son todos ellos capaces de unirse a MHC de clase I o son todos ellos capaces de unirse a MHC de clase II, sin procesamiento adicional.

30 Cuando existen dos o más apítosos, la composición farmacéutica puede estar en forma de un equipo, en el que alguno o cada uno de los apítosos se proporcionan por separado para la administración simultánea, por separado o en secuencia.

Por el contrario, (o adicionalmente) si la composición farmacéutica (o una parte

cualquiera de la misma) se ha de administrar en múltiples dosis, cada una de las dosis se puede empaquetar por separado.

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

Además, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el o cada uno de los apítopos puede estar mezclado con uno cualquiera de entre agregante(s), lubricante(s), agente(s) suspensor(es), agente recubriente(s) o agente disolvente(s) adecuado.
10

Administración

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

Preferentemente el péptido se administra por vía de la mucosa.

15 Los estudios han demostrado que el péptido, cuando se administra en forma soluble intraperitonealmente (i.p.), intravenosamente (i.v.) o intranasalmente (i.n.) u oralmente puede inducir tolerancia de las células T (Anderton y Wraith (1998) anterior); Liu y Wraith (1995) anterior; Metzler y Wraith, *Immunology* 97:257-263 (1999)).

Preferentemente el péptido se administra intranasalmente.

20 Los estudios en ratones han demostrado que la duración de la administración de péptido requerida para inducir tolerancia depende de la frecuencia de células T precursoras en el receptor (Burkhart *et al.*, (1999) anterior). En muchos estudios experimentales, se ha demostrado que se necesitan dosis repetidas del péptido para inducir tolerancia (Burkhart *et al.*, (1999) anterior). La dosis exacta y el número de dosis de
25 péptidos dependerán, en consecuencia, del individuo, sin embargo, en una forma de realización preferida, se administra una multiplicidad de dosis.

Si se administra una multiplicidad de péptidos simultáneamente, estos pueden estar en forma de “cóctel” que es adecuado para la administración de una o múltiples dosis. Por el contrario, puede resultar preferido dispensar múltiples dosis pero cambiar las
30 concentraciones relativas de los péptidos entre las dosis.

En una forma de realización preferida se puede seguir un protocolo de “escalamiento de la dosis”, en el que se administra al paciente una multiplicidad de dosis de concentraciones ascendentes. Se ha utilizado dicha estrategia, por ejemplo, con los

péptidos de la fosfolipasa A2 en aplicaciones inmunoterapéuticas contra la alergia al veneno de las abejas (Müller *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 101:747-754 (1998) y Akdis *et al.*, *J. Clin. Invest.* 102:98-106 (1998).

5

EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo de la presente invención. La invención se refiere particularmente a las formas de realización específicas descritas en estos ejemplos.

10

EJEMPLO 1- Identificación de apítosos en la región 134 a 154 de MBP

Materiales y métodos

15

Antígenos

20

La MBP humana se preparó a partir de materia blanca de cerebro tal como describen Deibler *et al.*, (Deibler *et al.*, *Preparative Biochemistry* 2:139 (1972)), y su pureza se ensayó mediante SDS-PAGE. En los ensayos de proliferación se utiliza derivado de proteína purificado de MBP y *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) (UK Central Veterinary Laboratory, Surrey) a concentraciones óptimas anteriormente determinadas; la concentración óptima para cada uno de los antígenos es de 20 µg/ml. Se sintetiza un panel de péptidos 15-meros solapados que cubren la región 131 a 158 de MBP, utilizando química F-moc estándar en un sintetizador multipéptido Abimed AEM 422 (Abimed, Langenfeld, Alemania). Cada uno de los péptidos está desplazado 1 aa y solapado por 14 aa.

25

Medio de cultivo de tejidos

30

Se utiliza como medio de cultivo de tejidos RPMI-1640 suplementado con 20 mM HEPES (Sigma, Poole, UK), penicilina (100 U/ml), estreptomycin sulfato (100 mg/ml) y 4 mM L-glutamina (todos ellos de Life Technologies, Paisley, Escocia). Se utiliza medio sin suero para lavar células de linfocito y TCL. En todas las condiciones de cultivo y ensayos,

se suplementa el medio con 10% de plasma autólogo térmicamente inactivado.

Generación de clones de célula T

5 Las líneas de célula T MBP-específicas (TCL) se generaron a partir de 8 pacientes de EM y 2 donantes control sanos. Se separaron PBMC de cada uno de los sujetos tal como se describió anteriormente y se sembraron en placas 1×10^6 células/ml en placas de 6 pocillos en presencia de MBP (50 $\mu\text{g/ml}$); regularmente se congela y almacena una parte de PBMC de cada sujeto para reestimulaciones posteriores. Siete días más tarde las
10 células se alimentan con medio fresco que comprende 2% IL-2 (Lymphocult-HT; Biotest LTD., Birmingham, UK) y el día 12 de cultivo se estimulan todas la células con antígeno, IL-2 y se irradia (2.500 Rad), células autólogas PBMC como fuente de células presentadoras de antígeno (APC), en una proporción de 1 célula T:5 APC. Se expanden las células en IL-2 cada 3 a 4 días y en el día 14 se reestiman con antígeno, IL-2 y
15 PBMC, tal como se describió anteriormente. En el día de la primera estimulación se examinan las células para determinar proliferación específica a MBP. Brevemente, se cultivan por triplicado 2×10^4 células T y 1×10^5 PBMC autólogas irradiadas en placas de 96 pocillos de fondo redondo, en presencia de MBP. Las células se cultivan durante 2 días y se pulsan con [^3H]-Timidina a 0,4 $\mu\text{Ci/pocillo}$ durante las últimas 18 horas del cultivo. A
20 continuación se cosechan las células tal como se describió anteriormente y se considera que una TCL es específica a MBP con un $\delta\text{cpm} > 1.000$ y $\text{SI} > 3$.

A continuación de 3 ciclos de estimulación/expansión se clonan las TCL utilizando PHA (Sigma, Poole, Dorset, UK) en presencia de PBMC autólogas irradiadas como APC. Las células T se siembran en placas en condiciones de dilución límite a 0,1 células/pocillo,
25 0,3 células/pocillo y 1 célula/pocillo y se cultivan en placas Terasaki (Nunc International, Costar) con 1×10^4 PBMC irradiadas, 5 $\mu\text{g/ml}$ PHA y 2% IL-2. Después de entre 10 y 12 días los pocillos con crecimiento positivo se expanden a placas de 96 pocillos de fondo redondo, utilizando 1×10^5 PBMC irradiadas, 5 $\mu\text{g/ml}$ PHA e IL-2. Tres días más tarde las placas se alimentan con medio fresco comprendiendo IL-2 y el día 7 se expanden los
30 clones en placas de 48 pocillos utilizando 5×10^5 PBMC irradiadas, PHA e IL-2; en este punto los clones se ensayan para determinar proliferación en respuestas específicas a MBP. Los clones específicos a MBP se expanden una semana más tarde en placas de 24 pocillos, utilizando 1×10^6 PBMC irradiadas, con PHA o Dynabeads (Dynal, UK) e IL-2.

Los clones se mantienen en placas de 24 pocillos utilizando un ciclo de reestimulación/expansión de 7 a 10 días.

Ensayo de proliferación

5 Se incubaron células Mgar (HLA-DR2+ve) vivas o fijadas en p-formaldehído con péptidos en suero o en suero solamente, junto con células T. La respuesta proliferante de las células T se midió por adquisición de ^3H -Timidina tal como sigue. Se crecieron alícuotas triplicadas de 100 μl de cada uno de los cultivos en una placa microtitre de 96
10 pocillos de fondo redondo durante 48 horas y a continuación se pulsó con 0,4 μCi [^3H]-Timidina (Amersham International, Amersham, UK). Después de las 20 horas se cosecharon las células sobre felpas de fibra de vidrio (LKB-Wallac, Turku, Finland) utilizando un Mach 111 Harvester 96 (Tomtec, Orange, New Jersey, USA). La incorporación de [^3H]-Timidina se determinó utilizando un contador de centelleo en líquido
15 Microbeta (LKB-Wallac). Los pocillos de ensayo que comprenden antígeno se consideran positivos cuando $\delta\text{cpm} > 1000$ y el Índice de Estimulación (SI) > 3 , donde SI = CPM en el cultivo que comprende antígeno/CPM en el cultivo sin antígeno.

Resultados

20 En la figura 1 se muestra la respuesta del clon de células T EM60:D2 a la presentación de péptidos anidados de MBP en la región 131 a 158. Los péptidos 134-148, 135 a 149, 136 a 150, 137 a 151, 138 a 152, 139 a 153 y 140 a 154 se definen como apítomos ya que pueden ser presentados por APC fijadas a las células T sin
25 procesamiento adicional.

La respuesta del clon N5 de célula T a la presentación de péptido 140 a 154 se muestra en la figura 2. Esto confirma todavía más que el péptido 140 a 154 puede ser presentado por APC fijadas sin procesamiento adicional.

**EJEMPLO 2- Identificación del epítipo mínimo reconocido por los clones de célula
T N5 y EM60:D2**

Se incubaron células Mgar vivas con péptidos solapados de la región 136 a 157 de MBP en suero o con suero solo, junto con células T N5. La proliferación de las células T se midió mediante adquisición de ³H-Timidina.

Los resultados se muestran en la figura 3. El epítipo mínimo reconocido por el clon N5 de célula T es MBP 142 a 152.

Se realizó un experimento semejante con el clon EM60:D2 de célula T (figura 1, Mgar no fijadas). El epítipo reconocido por este clon de célula T es MBP 140 a 148.

Las múltiples modificaciones y variaciones de los procedimientos y sistemas de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia. Aunque la presente invención ha sido descrita haciendo referencia a las formas de realización específicas, se deberá apreciar que la presente invención tal como reivindica no resulta limitada a dichas formas de realización.

Reivindicaciones

1. Péptido que puede unirse a la molécula MHC de clase I y II sin procesamiento adicional y que se selecciona de entre los péptidos siguientes de la proteína básica de la mielina péptidos siguientes:

YKSAHKGFKGVDAQG (134-148),
KSAHKGFKGVDAQGT (135-149),
SAHKGFKGVDAQGTL (136-150),
AHKGFKGVDAQGTLS (137-151),
HKGFKGVDAQGTLSK (138-152),
GFKGVDAQGTLSKIF (140-154).

2. Péptido según la reivindicación 1, que es el péptido GFKGVDAQGTLSKIF (140 a 154) de la proteína básica de la mielina.

3. Composición farmacéutica que comprende uno o más de los péptidos según la reivindicación 1 ó 2.

4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, que comprende entre 1 y 15 péptidos tolerogénicos de la proteína básica de la mielina.

5. Composición farmacéutica según la reivindicación 3 ó 4, en forma de un kit, en la que alguno o cada uno de los péptidos se proporcionan por separado para la administración por separado, simultánea o secuencial.

6. Péptido según la reivindicación 1 ó 2 para la administración intranasal.

7. Utilización de un péptido según la reivindicación 1 ó 2 en la preparación de un medicamento destinado a la utilización en la prevención y/o el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Figura 1

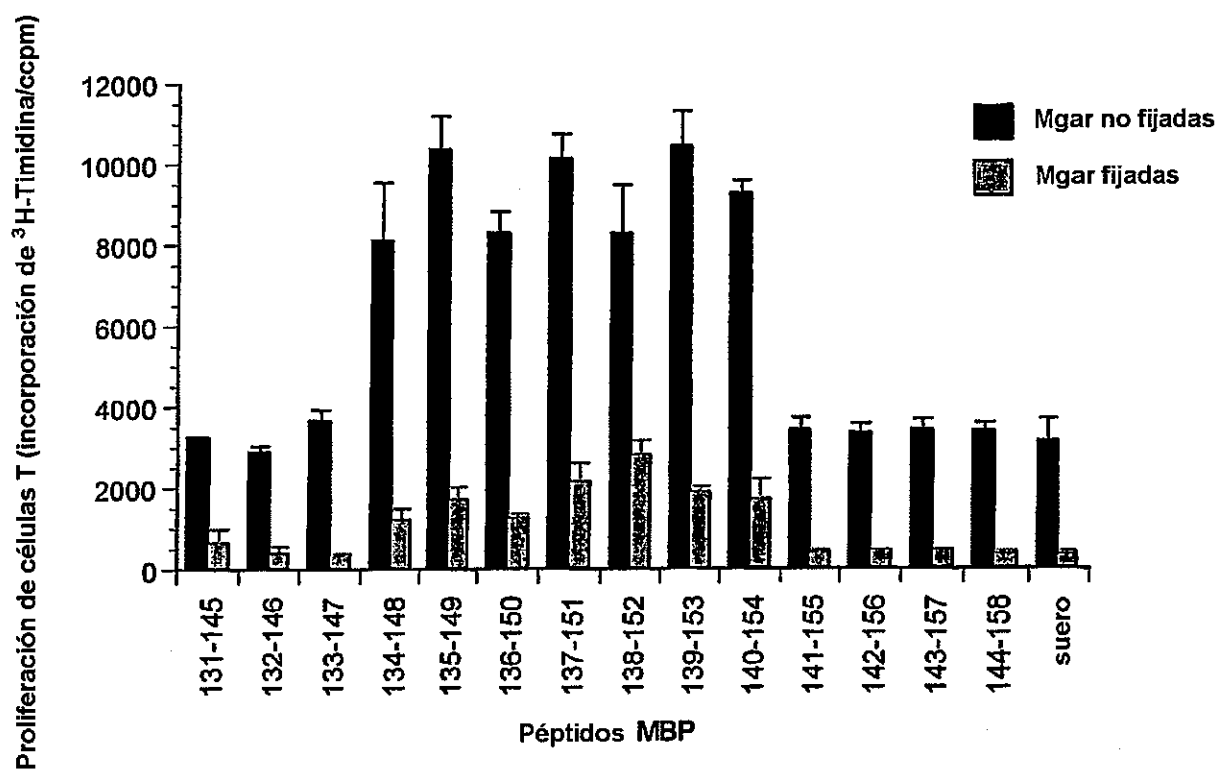


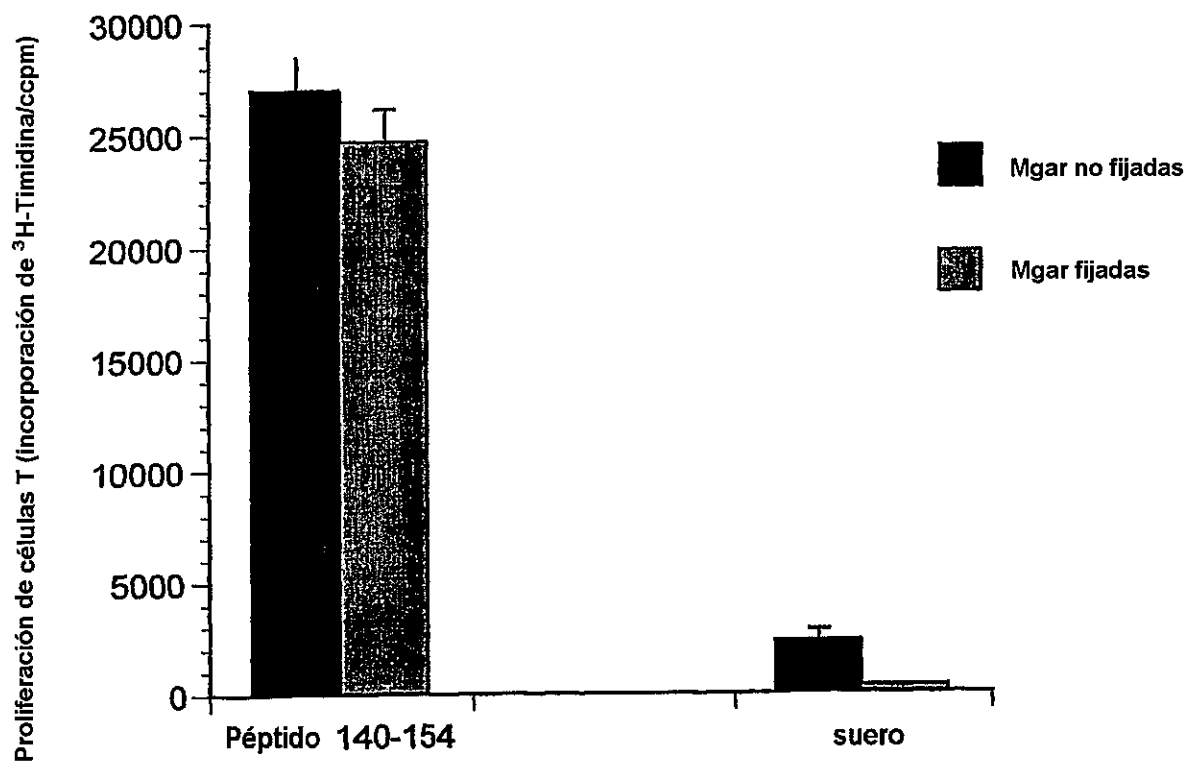
Figura 2

Figura 3

