

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 115**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/03** (2006.01)

**C07K 14/08** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2008** **PCT/BE2008/000010**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2009** **WO09100505**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2008** **E 08706161 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2249855**

54 Título: **Péptidos inmunogénicos y su uso en trasplante**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**24.07.2017**

73 Titular/es:

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

**Herestraat 49, bus 913**

**3000 Leuven, BE y**

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAINT-REMY, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 626 115 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Péptidos inmunogénicos y su uso en trasplante

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos inmunogénicos y a su uso en la supresión y/o el tratamiento de rechazo de un aloinjerto.

## 10 Antecedentes de la invención

El trasplante de órganos o de médula ósea es una práctica clínica habitual para la curación de una disfunción orgánica terminal o para la recuperación después de disfunción o agotamiento de médula ósea, respectivamente. Los órganos que pueden trasplantarse incluyen piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas, intestino, córnea, e incluso manos o partes de la cara. El trasplante celular incluye células de médula ósea y de sangre del cordón umbilical, pero también células tales como las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans, hepatocitos y mioblastos. La nueva tecnología ha hecho recientemente posible injertar células madre que se han transformado *in vitro* por reprogramación de genes para adoptar el patrón de diferenciación de prácticamente cualquier célula. Esta enorme diversidad de situaciones en las que el trasplante es obligatorio probablemente aumente en los años venideros, debido tanto a los avances tecnológicos como al envejecimiento de las poblaciones.

Un trasplante de células y de órganos realizado entre diferentes individuos que pertenecen a la misma especie se denomina aloinjerto o alotrasplante. La alorreactividad describe una respuesta inmunitaria al trasplante de aloinjerto que se dirige hacia diferencias alélicas entre un hospedador (receptor) y un donante.

El mecanismo del rechazo de aloinjerto se basa en el reconocimiento de aloantígenos. Estos pueden dividirse en 3 categorías principales, en concreto, antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (CMH, siglas del inglés *major histocompatibility complex*), antígenos de histocompatibilidad secundarios y aloantígenos órgano específicos. El rechazo de aloinjerto implica el reconocimiento por linfocitos T del receptor del aloinjerto de dichos aloantígenos presentados en el contexto de determinantes del CMH, que están presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA) junto con péptidos procedentes del procesamiento de aloantígenos.

Los CMH se dividen en dos categorías, clase I y clase II, codificados por diferentes locus génicos. En el hombre, tres locus codifican antígenos de clase I, denominados clase A, B y C, y tres locus codifican antígenos de clase II, denominados DP, DQ y DR. El polimorfismo de los antígenos del CMH es muy alto, dando como resultado una probabilidad extremadamente baja de encontrar 2 individuos no relacionados compartiendo antígenos del CMH.

La función de los antígenos del CMH es presentar péptidos a células T. Clásicamente se considera que los antígenos de clase I presentan péptidos principalmente procedentes de antígenos endógenos de células, mientras que los antígenos de clase II presentan péptidos generados por el procesamiento de antígenos desde el exterior. Se han descrito distintas rutas de procesamiento y presentación en la superficie celular para la presentación de antígenos de clase I en comparación con los de la clase II. Sin embargo, datos recientes indican claramente que los antígenos producidos de un modo endógeno pueden presentarse de un modo eficaz a través de la ruta del CMH de clase II, mientras que los antígenos exógenos pueden procesarse a través de la ruta de clase I. Por tanto, cualquier proteína, ya sea de origen intracelular como extracelular, se procesa en péptidos que se presentan a células T por determinantes de MCH tanto de clase I como de clase II.

Los péptidos presentados por determinantes del CMH de clase II se reconocen por células T que llevan la molécula CD4 (células CD4+), mientras que los péptidos presentados por determinantes del CMH de clase I son reconocidos por células T CD8+. El mecanismo mediante el cual las células T reconocen péptidos incluye 3 posibilidades. Las células T pueden reconocer al propio péptido, a los determinantes del CMH o tanto al péptido como a los determinantes del CMH. Las estructuras cristalinas de diversos complejos péptido - CMH -TCR han mostrado que en el alorreconocimiento, puede observarse cada uno de estos modos de reconocimiento. Sin embargo, el reconocimiento de determinantes del CMH no excluye la presencia de un péptido, necesario para la estabilización de la molécula del CMH en la superficie celular. Sin embargo, en dicho caso, el péptido no difiere necesariamente en su secuencia de aminoácidos de la del péptido correspondiente del receptor del injerto.

Las CPA presentan en su superficie una gran cantidad de antígenos procedentes del procesamiento de antígenos endógenos, incluyendo antígenos de los CMH. Por tanto, los antígenos de clase II presentan péptidos de moléculas del CMH tanto de clase I como de clase II, que pueden reconocerse por células T aloespecíficas. Se sabe los antígenos de clase I y clase II se liberan de las células u órganos donantes, que se captan, se procesan y se presentan por las CPA del receptor para el reconocimiento de células T.

Además de los antígenos del CMH principales, se han definido antígenos de histocompatibilidad secundarios en cuanto a su capacidad para provocar rechazo de injerto mediado por células, pero carecen de las características estructurales de los antígenos del CMH. Estos antígenos secundarios se procesan en péptidos y se presentan por

antígenos del CMH. El rechazo mediante antígenos de histocompatibilidad secundarios del donante, depende del polimorfismo de ese antígeno observado entre individuos pertenecientes a la misma especie, ya que, por definición, dichos individuos son tolerantes a sus propios antígenos de histocompatibilidad secundarios. Dichos antígenos pueden expresarse de manera ubicua o de una manera selectiva en un tejido o célula. Estos incluyen glucoproteínas de superficie, pero principalmente antígenos intracelulares tales como factores de transcripción nuclear. Uno de los mejores ejemplos de antígenos de histocompatibilidad secundarios es el proporcionado por antígenos codificados por el cromosoma Y.

En el hombre, la importancia de los antígenos de histocompatibilidad secundarios para el rechazo se ha observado principalmente en la aceptación de médula ósea y en reacciones de injerto frente a huésped (GVH *graft versus host*) donde las células inmunocompetentes del injerto están activadas contra antígenos del receptor. Esto se debe a que la inmensa mayoría de los trasplantes de médula ósea se realizan con una coincidencia completa de antígenos del CMH.

La tercera categoría de antígenos son los antígenos específicos de tejido. Dichos antígenos pueden presentar variaciones alélicas (es decir, polimorfismo) entre el donante y el receptor. Los alo péptidos procedentes de antígenos específicos de tejido pueden presentarse por antígenos del CMH tanto de clase II como de clase I para el reconocimiento por células T aloespecíficas.

El mecanismo subyacente del rechazo de injerto se clasifica normalmente en dos categorías, reconocimiento directo o indirecto. La ruta directa implica el reconocimiento de antígenos donantes presentados por CPA donantes. La ruta indirecta implica el reconocimiento de antígenos donantes presentados por CPA del receptor. Esta distinción se aplica para los tres tipos de aloantígenos descritos anteriormente y es importante tenerlo en cuenta por dos razones principales, en particular el sitio en el que estas rutas están activas y la cinética del proceso de rechazo.

El sitio en el que estas rutas están activas es diferente. Las CPA donantes contenidas en el injerto migran a los ganglios linfáticos regionales del receptor donde estimulan a células T receptoras. Por el contrario, las CPA del receptor infiltran el injerto donde reemplazan progresivamente CPA donantes. El tipo de células que presentan el antígeno no es necesariamente el mismo. Por ejemplo, en la piel, la célula presentadora principal es la célula de Langerhans, mientras que en los ganglios linfáticos estas son principalmente células dendríticas convencionales.

La distinción entre las rutas directa e indirecta también es importante en cuanto a la cinética de rechazo. Por tanto, el rechazo agudo es principalmente el resultado de la ruta directa, en la que las células T receptoras están activadas por CPA donantes. Las células T del receptor reconocen directamente discrepancias alélicas resultantes del polimorfismo de moléculas del CMH. El péptido presentado por la molécula del CMH puede presentar variaciones alélicas y por lo tanto puede contribuir al reconocimiento de células T, pero este no es necesariamente el caso. De hecho, todas las moléculas del CMH contienen cientos de péptidos, solo algunos de los cuales presentan variaciones alélicas con péptidos correspondientes del receptor.

El tamaño del repertorio de las células T es tal que una proporción significativamente elevada de todas las células T (hasta 1 célula T de 10.000) puede reaccionar contra variaciones alélicas del CMH, de tal manera que este mecanismo predomina en la fase de rechazo agudo. En receptores presensibilizados con aloantígenos por exposición previa, por ejemplo, mediante infusión sanguínea o gestación, los anticuerpos aloespecíficos también pueden participar en el proceso de rechazo agudo. En algunos casos, los determinantes de histocompatibilidad menor también pueden desempeñar una función en el rechazo agudo mediante la ruta directa.

El rechazo agudo se reduce en el entorno clínico emparejando antígenos del CMH entre el donante y el receptor, identificando receptores presensibilizados y, en una gran mayoría de casos, suprimiendo la capacidad del receptor de rechazar el injerto con fármacos inmunosupresores.

Los mecanismos básicos del rechazo crónico de injerto son múltiples, pero también pueden diferenciarse en mecanismos directos e indirectos. Sin embargo, en muchas situaciones, predomina la ruta indirecta. Esto se debe a la desaparición progresiva de las CPA donantes que han migrado fuera del injerto y al hecho de que las células del injerto que expresan moléculas del CMH de clase I inducen insensibilidad de las células T del receptor. Una excepción son las células del endotelio vascular y las células epiteliales que, en condiciones inflamatorias, pueden expresar moléculas del CMH de clase II y por lo tanto tener la capacidad de activar células T aloespecíficas del receptor.

La ruta indirecta se genera por aloantígenos que se liberan del injerto y son captados por las CPA receptoras para su presentación a células receptoras. Estos antígenos generan péptidos que se presentan en antígenos de CMH de clase II o de clase I. Experimentos recientes ponen de manifiesto que la presentación en antígenos de CMH de clase II es más importante. Ratones deficientes en antígenos de CMH de clase II no pueden rechazar un injerto de un donante de antígeno de histocompatibilidad secundario distinto. En el hombre, la eliminación de CPA donantes del injerto no impide el rechazo crónico, mientras que la supresión de la activación de células T CD4+ con inmunosupresores, tales como ciclosporina, reduce significativamente la incidencia del rechazo crónico.

Una explicación probable para la predominancia de la presentación del CMH de clase II en la ruta indirecta del rechazo crónico de injerto, es que las células T CD8+ no se activan fácilmente por reconocimiento de alo péptidos presentados por determinantes del CMH de clase I, a menos las células T CD4+ proporcionen ayuda. Esto depende, más probablemente, de la producción de interleucina 2 (IL-2) por células T CD4+, necesaria para la maduración completa de células T CD8+.

Por lo tanto, las células T del subtipo CD4+ que reconocen péptidos dentro del concepto de determinantes del CMH de clase II tienen diferentes funciones: la producción de IL-2 para la maduración de células T CD8+ en células T efectoras, la producción de células B ayudantes de citocinas para madurar en células formadoras de antígeno y la infiltración del injerto en el que mantienen un estado de inflamación.

El rechazo de injerto, y en particular el rechazo crónico de injerto, actualmente representa el mayor reto en el ámbito clínico. Produce una morbilidad significativa y requiere mantener a los receptores del injerto con una terapia inmunosupresora con muchos efectos secundarios negativos. Hay una necesidad de identificar métodos para disminuir la tasa de rechazo de injerto. Esto no solo sería un beneficio para los pacientes que van a recibir un injerto, sino también para la sociedad en su conjunto, ya que la proporción entre coste y beneficio, para mantener sana a una población, se reduciría.

Joffre O. *et al.* (2004) Blood 103, 4216-4221 desvelan una población de células T reguladoras (CD4+CD25+) activadas con células presentadoras de antígenos alogénicos que inducen tolerancia específica prolongada a diferentes injertos de médula ósea para antígenos de histocompatibilidad principales y secundarios. Este artículo desvela el uso de dichas células T reguladoras específicas de aloantígeno para inducir tolerancia perdurable a médula ósea alogénica.

Gross D.A. *et al.* (2006) Blood, 108(6), 1841-1848 desvelan una composición de células T reguladoras (CD4+CD25+) específicas para el antígeno de histocompatibilidad secundario Dby y desvelan la implantación de médula ósea masculina exógena.

Roopenian D. *et al.* (2002) Immunol. Rev. 190, 86-94, es una revisión de la función de los antígenos de histocompatibilidad secundarios y su función como aloantígenos en trasplante alogénico. Este artículo desvela secuencias de antígenos H secundarios (H3 y SMYC) que comprenden un motivo redox dentro de la secuencia del epítipo.

Chen T.-C. *et al.* (2004) J. Clinical Invest. 113(12), 1754-1762 desvelan la alteración de un ligando peptídico dentro de la secuencia epitópica del antígeno masculino Dby para la inducción de tolerancia en trasplante alogénico.

Wood K.J. *et al.* (2003) Nature Revs. Immunol. 3(1), 199-210, es una revisión sobre células T reguladoras en trasplante y desvela que las T Regs, CD4+CD25+, tienen una actividad supresora contra las CPA.

El documento WO9958552 desvela péptidos que comprenden una secuencia motivo CHGC dentro del epítipo para inducir inmunidad de células T como un método de vacunación.

El documento WO2007104715, de los autores Gross *et al.*, desvela células T reguladoras, CD4+ CD25+, específicas para, entre otros, péptidos del antígeno Dby.

## Sumario de la invención

El primer aspecto de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados que comprenden (i) un epítipo de célula T procedente de una proteína aloantigénica de un aloinjerto y que comprende (ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, para su uso en la prevención o tratamiento en un receptor del rechazo de un aloinjerto de mamífero, caracterizado por que el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es adyacente al epítipo de células T, o está separado del epítipo de células T mediante un enlazador.

En realizaciones específicas, el aloinjerto es un injerto de órgano sólido, tal como riñón, pulmón, corazón, hígado, páncreas, hueso o piel.

En otras realizaciones específicas, el aloinjerto es un injerto celular, tal como de médula ósea, un injerto de células de sangre del cordón umbilical, un injerto de células madre, o un injerto de células de islote pancreático.

Son ejemplos de proteínas aloantigénicas los antígenos de histocompatibilidad secundarios, los antígenos de histocompatibilidad principales y antígenos específicos de tejido.

En realizaciones particulares, el motivo anterior no se produce de manera natural dentro de una región de 11 aminoácidos en posición N o C terminal adyacente al epítipo de célula T en la proteína aloantigénica.

En realizaciones particulares, el péptido tiene la longitud entre 12 y 50 aminoácidos.

En determinadas realizaciones, el motivo anterior está en posición N terminal del epítipo de célula T.

En determinadas realizaciones al menos una X en el motivo anterior es Gly, Ala, Ser o Thr.

En determinadas realizaciones al menos una X en el motivo anterior es His o Pro.

En determinadas realizaciones al menos una C en el motivo anterior está metilada.

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para obtener una población de células T citotóxicas específicas de antígeno de aloinjerto. Los métodos comprenden las etapas de proporcionar células de sangre periférica; poner en contacto estas células con un péptido inmunogénico que comprende (i) un epítipo de célula T procedente de una

proteína antigénica de aloinjerto, una proteína aloantigénica de un aloinjerto y (ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C y expandir estas células en presencia de IL-2.

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos no terapéuticos para la obtención de una población de células T citotóxicas específicas de antígeno de aloinjerto. Estos métodos comprenden las etapas de

- a) proporcionar un péptido inmunogénico que comprende (i) un epítipo de célula T procedente de una proteína antigénica de aloinjerto, una proteína aloantigénica de un aloinjerto y (ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C; y
- b) administrar el péptido inmunogénico a un sujeto para un fin no terapéutico; y c) obtener del sujeto la población de células T específicas de antígeno de aloinjerto

Un aspecto adicional de la invención se refiere a poblaciones de células T citotóxicas específicas de antígeno de aloinjerto, que suprimen las respuestas inmunitarias a aloantígenos, que se obtienen por los métodos de obtención de células mencionados anteriormente.

Un aspecto adicional se refiere a poblaciones de células T citotóxicas específicas para un aloantígeno de un aloinjerto como se describe anteriormente, para su uso en la prevención o el tratamiento en un receptor del rechazo del aloinjerto.

En realizaciones de los diversos aspectos mencionados anteriormente, la proteína aloantigénica o el antígeno de aloinjerto es el antígeno Dby codificado por el cromosoma H-Y.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados que comprenden (1) un epítipo de célula T del antígeno Dby y (2) el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C; estando el motivo adyacente al epítipo de célula T o separado del epítipo de célula T mediante un enlazador.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos de producción de péptidos inmunogénicos aislados que comprenden las etapas de identificar un epítipo de célula T en una secuencia de proteína de una proteína del CMH, de un antígeno de histocompatibilidad secundario o de un antígeno específico de tejido, y producir un péptido en el que una secuencia con un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es adyacente a la secuencia del epítipo de célula T, o está separada del epítipo de célula T mediante un enlazador.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

El término “**péptido**”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácido de entre 2 y 200 aminoácidos, conectada por enlaces peptídicos, pero que puede, en realizaciones particulares, comprender estructuras no aminoacídicas (como por ejemplo un compuesto de unión orgánico). Los péptidos según la invención pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de los mismos, o pueden contener aminoácidos de origen no natural incorporados por síntesis peptídica química o por modificación química o enzimática.

El término “**epítipo**”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a una o a varias partes (que pueden definir un epítipo conformacional) de una o más proteínas que se reconocen específicamente y se unen mediante un anticuerpo o una parte del mismo (Fab', Fab21, etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de un linfocito de célula B o T, y que es capaz, mediante esta unión, de inducir una respuesta inmunitaria.

El término “**antígeno**”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a una estructura de una macromolécula que comprende uno o más haptenos (que provocan una respuesta inmunitaria solamente cuando se unen a un transportador) y/o que comprende uno más epítipos de células T.

Típicamente, la macromolécula es una proteína o un péptido (con o sin polisacáridos) o una molécula de composición proteica y que comprende uno o más epítipos; en el presente documento, como alternativa, la macromolécula puede denominarse “**proteína antigénica**” o “**péptido antigénico**”.

Las expresiones “**aloantígeno**” o “**antígeno de aloinjerto**”, cuando se usan en el presente documento, se refiere a un antígeno procedente (liberado de y/o presentado en) una célula o tejido, que cuando se transfiere de un donante a un receptor, puede reconocerse y unirse mediante un anticuerpo o receptor de células B o T del receptor. Los alógenos son típicamente productos de genes polimórficos. Un aloantígeno es una proteína o un péptido que, cuando se compara entre un donante y un receptor (pertenecientes a la misma especie), muestra ligeras diferencias estructurales. La presencia de dicho antígeno donante en el organismo de un receptor puede provocar una respuesta inmunitaria en el receptor. Dicha respuesta inmunitaria alorreactiva es específica para el aloantígeno.

La expresión aloantígeno también incluye antígenos procedentes (liberados de y/o presentados en) un injerto transferido de un donante a un receptor, cuyos antígenos están ausentes en el receptor.

El término “**alorreactividad**”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta inmunitaria que se dirige contra diferencias alélicas entre el receptor y el donante del injerto. La alorreactividad se aplica a anticuerpos y a células T.

La presente invención se basa en la alorreactividad de células T, que está basada en el reconocimiento de células T de aloantígenos presentados en el contexto de determinantes de MHC como complejos péptido-MHC.

El término “**aloinjerto**”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula o grupo de células, que se organiza o no en un órgano o parte de un órgano, que se extrae de un donante y se transfiere, se injerta o trasplanta a/en un receptor perteneciente a la misma especie que la del donante.

Los términos “**donante**” y “**receptor**” se refieren respectivamente al individuo que proporciona un injerto y al individuo que recibe este mismo injerto. Estos individuos son mamíferos, en particular primates o seres humanos. Típicamente los donantes y los receptores son individuos diferentes que pertenecen a la misma especie.

La expresión “**rechazo de aloinjerto**”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a cualquier mecanismo mediante el cual el sistema inmunitario del receptor reacciona contra el aloinjerto (es decir, es alorreactivo) y por lo tanto destruye gradualmente la integridad y/o funcionalidad del aloinjerto.

La expresión “**epítipo de célula T**”, en el contexto de la presente invención, se refiere a un epítipo de célula T dominante, subdominante o secundario, es decir, una parte de una proteína antigénica que está reconocida específicamente y unida mediante un receptor en la superficie celular de un linfocito T.

El que un epítipo sea dominante, subdominante o secundario depende de la reacción inmunitaria provocada contra el epítipo. La dominancia depende de la frecuencia a la cual dichos epítopos son reconocidos por células T y que tienen la capacidad de activarlos, entre todos los posibles epítopos de células T de una proteína. En particular, un epítipo de célula T es un epítipo unido por moléculas de MHC de clase I o de MHC de clase II.

El término el término “**MHC**” se refiere a “complejo principal de histocompatibilidad”. En seres humanos, los genes de MHC se conocen como genes de HLA (“antígeno leucocitario humano”).

Aunque no hay una convención seguida sistemáticamente, alguna bibliografía utiliza “HLA” para referirse a moléculas de proteínas HLA, y “MHC” para referirse a los genes que codifican las proteínas HLA. Como tales, los términos “MHC” y “HLA” son equivalentes cuando se usan en el presente documento. El sistema HLA en el hombre tiene sus equivalentes en el ratón, es decir, el sistema H2. Los genes de HLA más intensamente estudiados son los nueve genes de MHC clásicos denominados: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLADPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA y HLA-DRB1. En seres humanos, el MHC se divide en tres regiones: clase I, II y III. Los genes A, B y C pertenecen al MHC de clase I, mientras que los seis genes D pertenecen a la clase II. Las moléculas de MHC de clase I están constituidas por una sola cadena polimórfica que contiene 3 dominios (alfa 1, 2 y 3), que se asocia a la beta 2 microglobulina en la superficie celular. Las moléculas de clase II están constituidas por dos cadenas polimórficas, conteniendo cada una de ellas 2 cadenas (alfa 1 y 2, y beta 1 y 2).

Las moléculas de MHC de clase I se expresan prácticamente en todas las células nucleadas. Los fragmentos peptídicos presentados en el contexto de las moléculas de MHC de clase I se reconocen por linfocitos T CD8+ (linfocitos T citotóxicos o CTL). Los linfocitos T CD8+ frecuentemente maduran en efectores citotóxicos que pueden lisar células portadoras del antígeno estimulador. Las moléculas de MHC de clase II se expresan principalmente en linfocitos activados y en células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T CD4+ (linfocitos T auxiliares o HTL, *helper T lymphocytes*) se activan con el reconocimiento de un único fragmento peptídico presentado por una molécula de MHC de clase II, normalmente encontrada en una célula presentadora de antígeno como un macrófago o célula dendrítica. Los linfocitos T CD4+ proliferan y secretan citocinas que dan soporte a una respuesta mediada por anticuerpos a través de la producción de IL-4 e L-10 o dan soporte a una respuesta mediada por células a través de la producción de IL-2 e IFN-gamma.

Los HLA (antígenos leucocitarios humanos) funcionales se caracterizan por un surco de unión profundo al cual se unen péptidos antigénicos, posiblemente endógenos así como extraños. El surco se caracteriza adicionalmente por una forma bien definida y por propiedades físico-químicas. Los sitios de unión al HLA de clase I están cerrados, ya que las partes terminales del péptido están inmovilizadas en los extremos del surco. Estos también están implicados en una red de enlaces de hidrógeno con restos de HLA conservados. A la vista de estas restricciones, la longitud de los péptidos unidos está limitada a 8-10 restos. Sin embargo, se ha demostrado que también pueden unirse péptidos de hasta 12 restos de aminoácido al HLA de clase I. La superposición de las estructuras de diferentes complejos de HLA confirmó un modo de unión general en el que los péptidos adoptan una conformación extendida, relativamente lineal.

A diferencia de los sitios de unión del HLA de clase I, los sitios de la clase II están abiertos en ambos extremos. Esto permite a los péptidos extenderse desde la región real de unión, por lo tanto “colgando” en ambos extremos. Los HLA de clase II pueden, por tanto, unir ligandos peptídicos de longitud variable, que varía de 9 a más de 25 restos de aminoácido. Similar al HLA de clase I, la afinidad de un ligando de clase II, se determina por un componente “constante” y uno “variable”. La parte constante de nuevo resulta de una red de enlaces de hidrógeno formada entre restos conservados en el surco de HLA de clase II y la cadena principal de un péptido unido. Sin embargo, este

patrón de enlace de hidrógeno no está confinado a los restos N y C terminales del péptido sino que está distribuido en toda la cadena. Esto último es importante porque restringe la conformación de péptidos formando complejo a un modo de unión estrictamente lineal. Esto es habitual en todos los alotipos de clase II. El segundo componente determinante de la afinidad de unión de un péptido es variable debido a determinadas posiciones de polimorfismo dentro de sitios de unión de clase II. Diferentes alotipos forman diferentes bolsillos complementarios dentro del surco, representando por tanto una selección de péptidos dependientes de subtipo, o de especificidad. Cabe destacar que, las limitaciones en los restos de aminoácidos mantenidas dentro de bolsillos de clase II son en general más “flexibles” que las de la clase I. Hay mucha más reactividad cruzada de péptidos entre diferentes alotipos de HLA de clase II. La secuencia de los +/- 9 aminoácidos de un epítipo de célula T del MHC de clase II que encaja en el surco de la molécula de MHC II normalmente se numera de P1 a P9. Los aminoácidos N terminales adicionales del epítipo se numeran P-1, P-2 y así sucesivamente, los aminoácidos C terminales del epítipo se enumeran P+1, P+2 y así sucesivamente.

La expresión “**antígeno de histocompatibilidad secundario**” se refiere a péptidos que proceden de proteínas celulares normales y que están presentados por el MHC que pertenece a los complejos de clase I y/o de clase II. Cualquier polimorfismo genético que afecte cualitativa o cuantitativamente a la presentación de dichos péptidos en la superficie celular puede dar lugar a un antígeno de histocompatibilidad secundario.

La expresión “**compuesto orgánico que tiene una actividad reductora**” cuando se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, más en particular a secuencias de aminoácidos, capaces de reducir enlaces disulfuro en proteínas. Un término alternativamente utilizado para estas secuencias de aminoácidos es “**motivo redox**”.

La expresión “**cantidad terapéuticamente eficaz**” se refiere a una cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo, que produce el efecto terapéutico o preventivo deseado en un paciente.

Por ejemplo, en referencia a una enfermedad o a un trastorno, esta es la cantidad que reduce a algún grado uno o más síntomas de la enfermedad o del trastorno, y más particularmente retorna a parámetros fisiológicos o bioquímicos normales, bien parcial o completamente, asociados con o causantes de la enfermedad o trastorno. Según una realización particular de la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo, que conduciría a una mejora o restablecimiento de la situación fisiológica normal. Por ejemplo, cuando se usa para tratar terapéuticamente a un mamífero que padece un trastorno inmunitario, esta es una cantidad diaria de péptido/kg de peso corporal de dicho mamífero. Como alternativa, cuando la administración es mediante terapia génica, la cantidad de ADN desnudo o de vectores víricos se ajusta para garantizar la producción local de la dosificación del péptido de la invención, derivado u homólogo del mismo en cuestión.

El término “**natural**”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia relacionada con el hecho de que la secuencia es idéntica a una secuencia de origen natural.

A diferencia de este el término “**artificial**” se refiere a una secuencia que, como tal, no se produce en la naturaleza. A menos que se especifique de otra manera, los términos natural y artificial por tanto se refieren exclusivamente a una secuencia de aminoácidos (o de nucleótidos) particular (por ejemplo, la secuencia del péptido inmunogénico, una secuencia comprendida dentro del péptido inmunogénico, una secuencia epitópica) y no se refieren a la naturaleza del péptido inmunogénico como tal.

Opcionalmente, una secuencia artificial se obtiene a partir de una secuencia natural mediante modificaciones limitadas tales como cambiando uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de origen natural o añadiendo aminoácidos N o C terminales de una secuencia de origen natural. En el presente documento los aminoácidos se denominan con su nombre completo, con su abreviatura de tres letras o de una sola letra.

En el presente documento, los motivos de las secuencias de aminoácidos se escriben según el formato de Prosite. El símbolo X se utiliza para una posición en la que se acepta cualquier aminoácido.

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

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

El término “**derivado**”, cuando se usa en el presente documento con referencia a los péptidos de la invención, se refiere a moléculas que contienen al menos la parte activa del péptido (es decir, capaz de provocar actividad de células T CD4+ citolítica) y, además de esto, comprende una parte complementaria que puede tener diferentes fines, tales como estabilizar los péptidos o alterar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del péptido.

La expresión “**identidad de secuencia**” de dos secuencias, cuando se usa en el presente documento, se refiere al número de posiciones con idénticos nucleótidos o aminoácidos dividido entre el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las secuencias, cuando las dos secuencias se alinean. En realizaciones particulares, dicha identidad de secuencia es de 70 % a 80 %, de 81 % a 85 %, de 86 % a 90 %, de 91 % a 95 %, de 96 % a 100 %, o de 100 %.

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

### Descripción detallada

En el trabajo que conduce a la presente invención, inicialmente se observó que, en uno de los modelos más estudiados de rechazo de injerto, dicho rechazo podría prevenirse inmunizando previamente al individuo receptor (singénico con el individuo donante), con un péptido inmunogénico, sin requerir inmunosupresión. El péptido inmunogénico capaz de garantizar este efecto es un péptido que comprende un solo epítipo de célula T procedente de una proteína antigénica de aloinjerto, ligado a un motivo redox tal como C-(X)2-C. Claramente esta observación abre una nueva vía de posibilidades para prevenir y/o tratar el rechazo de aloinjerto en un receptor y/o para acondicionar el sistema inmunitario del receptor de tal manera que el riesgo o la probabilidad del rechazo de aloinjerto se reduzca o disminuya significativamente, o incluso se elimine por completo.

En el presente documento se desvela el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado según la invención para prevenir o tratar en un receptor mamífero, el rechazo de un aloinjerto. Más particularmente la invención se refiere al uso de un péptido inmunogénico que comprende (i) un epítipo de célula T procedente de una proteína aloantigénica de un aloinjerto de un mamífero y (ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CSI]-(X)2-C, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento en un receptor de mamífero, del rechazo del aloinjerto. Por tanto, el péptido inmunogénico o el medicamento que lo comprende puede utilizarse para tratamiento previo o profiláctico o inmunización de un receptor de un aloinjerto para suprimir, evitar, reducir parcial o totalmente, o eliminar (parcial o totalmente) el rechazo (agudo o crónico) del aloinjerto posteriormente transferido. Del mismo modo, el péptido inmunogénico o el medicamento que lo comprende puede utilizarse para el tratamiento terapéutico o inmunización de un receptor de un aloinjerto para suprimir, reducir parcial o totalmente, o eliminar (parcial o totalmente) el avance del rechazo, tal como rechazo crónico, de dicho aloinjerto.

Adicionalmente se observó que las células T CD4+, en particular células T efectoras CD4+ y células T CD8+ del individuo pretratado o preinmunizado con el péptido inmunogénico que comprende el epítipo de célula T de aloinjerto modificado como se describe anteriormente, no se activaban tras recibir el aloinjerto efectivo. En contra de ello, se indujo una población de células T reguladoras (Tregs) CD4+ que presentaba citotoxicidad contra células presentadoras de antígeno (CPA) que presentan un aloantígeno procedente del aloinjerto.

Por tanto, se desvela el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado según la invención para prevenir la activación de células T efectoras CD4+ de un receptor de un aloinjerto causada por una proteína aloantigénica procedente del aloinjerto. Por consiguiente, la invención se refiere al uso de péptidos inmunogénicos que comprenden (i) un epítipo de célula T procedente de una proteína aloantigénica de un aloinjerto y (ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C para la preparación de un medicamento para la prevención de la activación de células T efectoras CD4+ de un receptor mediante una proteína aloantigénica procedente de dicho aloinjerto.

Adicionalmente se desvela el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado para inducir en un receptor de un aloinjerto células T reguladoras CD4+ que son citotóxicas a células que presentan una proteína aloantigénica procedente del aloinjerto. Más particularmente se desvela el uso de un péptido inmunogénico según la invención que comprende (i) un epítipo de célula T procedente de una proteína aloantigénica de un aloinjerto y (ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, para la preparación de un medicamento para inducir en un receptor células T reguladoras CD4+ que son citotóxicas a células que presentan una proteína aloantigénica procedente del aloinjerto.

Adicionalmente la divulgación incluye el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado según la invención que comprende (i) un epítipo de célula T procedente de una proteína aloantigénica de un aloinjerto y (ii) el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C para la preparación de un medicamento para la prevención de la activación de células T



efectoras CD8+ de un receptor mediante una proteína aloantigénica procedente de dicho aloinjerto.

En lo anterior, el péptido inmunogénico o el medicamento que lo comprende, puede utilizarse para el tratamiento previo o profiláctico o inmunización de un receptor de un aloinjerto para suprimir, prevenir, reducir parcial o totalmente o eliminar (parcial o totalmente) una activación normalmente esperada en el receptor de células T efectoras CD4+ y/o células T CD8+ después de, o posterior a, la transferencia efectiva del aloinjerto. Probablemente, dicho péptido inmunogénico o el medicamento que lo comprende puede utilizarse para el tratamiento terapéutico o inmunización de un receptor de un aloinjerto para suprimir, reducir parcial o totalmente, o eliminar (parcial o totalmente) la activación en el receptor de células T efectoras CD4+ y/o células T CD8+ simultáneamente con o después de la transferencia efectiva del aloinjerto. Como alternativa, o simultáneamente con cualquiera de lo anterior, dicho péptido inmunogénico o medicamento que lo comprende puede utilizarse para el tratamiento previo o profiláctico o inmunización de un receptor de un aloinjerto para inducir una activación normalmente inesperada en el receptor de células T reguladoras CD4+ específicas de aloinjerto capaces de destruir células que presentan uno o más aloantígenos después de, o posterior a, la transferencia efectiva del aloinjerto. Del mismo modo, dicho péptido inmunogénico o medicamento que lo comprende puede utilizarse para el tratamiento terapéutico o inmunización de un receptor de un aloinjerto para inducir activación en el receptor de células T reguladoras CD4+ específicas de aloinjerto capaces de destruir células que presentan uno o más aloantígenos. Dicha inducción puede ocurrir de manera simultánea con, o después de, la transferencia efectiva del aloinjerto.

En cualquiera de los usos descritos anteriormente en el presente documento, el receptor es un mamífero, en particular un primate (no humano) o un ser humano.

En realizaciones particulares con respecto a lo anterior, el aloinjerto es un injerto de órgano sólido o un injerto celular. Los injertos de órganos sólidos incluyen riñones, pulmones, corazones, hígado, páncreas, huesos, piel o tejidos blandos. Los injertos celulares incluyen, por ejemplo, un injerto de médula ósea, injerto de células sanguíneas del cordón umbilical, injerto de células madre, injerto de células de islote pancreático, o trasfusión de células sanguíneas (en particular en vista de posibles reacciones inmunitarias hacia granulocitos).

En otras realizaciones particulares de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, dicha proteína aloantigénica se selecciona del grupo de antígenos de histocompatibilidad secundarios, antígenos de histocompatibilidad principales o antígenos específicos de tejido. Cuando la proteína aloantigénica es un antígeno de histocompatibilidad principal, este es bien un antígeno de MHC de clase I o un antígeno de MHC de clase II. Un importante punto a tener en cuenta es la variabilidad de los mecanismos mediante los cuales las células T específicas de aloantígeno reconocen péptidos afines en la superficie de CPA. Como se ha indicado anteriormente (véase Antecedentes de la invención), las células T alorreactivas pueden reconocer bien determinantes aloantigénicos de la propia molécula de MHC, un péptido aloantigénico unido a una molécula de MHC de cualquier fuente autogénica o alogénica, o una combinación de restos localizados dentro del péptido procedente del aloantígeno y la molécula de MHC, siendo la última de origen autogénico o alogénico. Esto contrasta con la situación encontrada con respuestas inmunitarias hacia antígenos nominales, en la que las células T están activadas uniéndose a determinantes localizados dentro tanto del péptido de fuente alogénica como de la propia molécula de MHC (respuestas convencionales) o uniéndose a determinantes que están localizados tanto en un péptido autoderivado como en una propia molécula de MHC (como se observa en las respuestas autoinmunitarias).

Según la presente invención, los péptidos aloantigénicos acoplados a un motivo redox se utilizan para reducir el rechazo de aloinjerto. Estos péptidos son péptidos que pueden presentarse bien por determinantes alogénicos de MHC (denominados ruta directa de alorreconocimiento) o mediante propias moléculas de MHC (denominados ruta indirecta de alorreconocimiento). Los mecanismos subyacentes de la presente invención implican péptidos aloantigénicos (incluyendo péptidos aloantigénicos procedentes de moléculas de MHC de clase I y de clase II) que se presentan por determinantes de MHC de clase II de fuente alogénica o autogénica. Por consiguiente, dado que esto no requiere necesariamente que las células T alorreactivas reconozcan determinantes localizados tanto en el péptido aloantigénico como en la molécula de MHC, los péptidos aloantigénicos pueden seleccionarse independientemente.

Según realizaciones particulares, los péptidos alogénicos son péptidos obtenidos de antígenos de histocompatibilidad secundarios.

En la técnica se conocen métodos para identificar péptidos alogénicos adecuados a partir de antígenos de histocompatibilidad secundarios. Por ejemplo estos pueden obtenerse directamente por elución de CPA y ensayando su capacidad para activar células T CD4+. La fuente de dichas células T es de donantes que se han sensibilizado a los antígenos de histocompatibilidad secundarios bien por trasfusión de sangre o células, gestación o por exposición a injertos tisulares que expresan los antígenos de histocompatibilidad secundarios. Las células T específicas pueden ser policlonales, oligoclonales o monoclonales y pueden utilizarse en un ensayo de proliferación de células T adecuado descrito más adelante.

Son ejemplos de antígenos de histocompatibilidad secundarios los procedentes de proteínas codificadas por el cromosoma HY (antígenos H-Y). Otros ejemplos pueden encontrarse, por ejemplo, en Goulmy E, Current Opinion in

Immunology, vol 8, 75-81, 1996 (véase, en particular, la Tabla 3 del mismo); Ha de observarse que, en el hombre, muchos antígenos de histocompatibilidad principales se han detectado a través de su presentación en determinantes de MHC de clase I utilizando células T CD8+ citolíticas. Sin embargo, dichos péptidos se obtienen del procesamiento de proteínas que también contienen epítomos de células T restringidos al MHC de clase II, proporcionando de este modo la posibilidad de diseñar los péptidos de la presente invención.

En otras realizaciones particulares, el péptido alogénico es un aloantígeno específico de tejido. Los aloantígenos específicos de tejido pueden identificarse utilizando el mismo procedimiento. Un ejemplo de esto es el epítipo restringido a MHC de clase I procedente de una proteína expresada en riñones pero no en bazo y capaz de provocar células T CD8+ con actividad citotóxica sobre las células renales (Poindexter *et al*, Journal of Immunology, 154: 3880-3887, 1995).

En otras realizaciones particulares, el péptido alogénico es un aloantígeno de MHC. Se encuentran ejemplos de péptidos que incluyen epítomos de células T de MHC de clase II procedentes de antígenos de MHC de clase II en Benichou *et al*, Journal of Experimental Medicine, 175: 305-308, 1192 y en Liu *et al*, Journal of Immunology, 150: 3180-3186, 1993. En Tam *et al*, Journal of Immunology, 156: 3765-3771, 1996 se describen péptidos procedentes de antígenos de MHC de clase I y presentados por antígenos de MHC de clase II

Las células T reguladoras citotóxicas provocadas por los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden suprimir respuestas inmunitarias incluso contra aloantígenos complejos. Un requisito mínimo para que dichas células se activen es reconocer un péptido afín presentado por determinantes de MHC de clase II, lo que conduce a la apoptosis de la CPA, por lo tanto suprimiendo las respuestas de células T (células T tanto CD4+ como CD8+) en todos los epítomos de células T presentados por la CPA. Un mecanismo adicional mediante el cual células T reguladoras citotóxicas pueden suprimir la respuesta inmunitaria global hacia antígenos complejos es suprimiendo la activación de células T espectadoras.

En algunas situaciones, en el proceso de rechazo participa más de un aloantígeno. En dichas circunstancias, la misma CPA puede no presentar todos los aloantígenos relevantes, ya que algunos de dichos aloantígenos se liberan del injerto y son captados por CPA posiblemente diferentes. Por lo tanto se espera que la combinación de dos o más péptidos inmunogénicos procedentes del mismo aloantígeno o de diferentes aloantígenos pueda utilizarse para la prevención y el tratamiento del rechazo de injerto.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a usos y a métodos, como se describe anteriormente en el presente documento, en el que el péptido inmunogénico se reemplaza por células T reguladoras CD4+ sensibilizadas con el péptido inmunogénico, o por una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido inmunogénico (por ejemplo, en forma de ADN desnudo o de un vector vírico que va a administrarse a un individuo en lugar del péptido inmunogénico). Además, en cualquiera de lo anterior, puede utilizarse una combinación de múltiples péptidos inmunogénicos, es decir, más de 1 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Estos aspectos de la invención, así como la modificación adicional del péptido inmunogénico, se describen con detalle en lo sucesivo el presente documento.

La presente invención se basa en el hallazgo de que un péptido inmunogénico, que comprende un epítipo de célula T procedente de un aloantígeno y una secuencia peptídica que tiene actividad reductora, puede generar una población de células T reguladoras CD4+, que tiene un efecto citotóxico sobre células presentadoras de antígeno. Esta se basa adicionalmente en el hallazgo de que dicho péptido inmunogénico es capaz de prevenir la activación de células T CD8+ específicas de aloantígeno y/o de células T efectoras CD4+.

Por consiguiente, se desvelan péptidos inmunogénicos que comprende al menos un epítipo de célula T de un aloantígeno con un potencial para desencadenar una respuesta inmunitaria, acoplado a un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora, tal como un péptido con un motivo de secuencia tiorreductasa. El epítipo de célula T y el compuesto orgánico están, opcionalmente, separador mediante un enlazador (por ejemplo, una molécula espaciadora orgánica o una secuencia peptídica). En realizaciones opcionales adicionales, el péptido inmunogénico comprende adicionalmente una secuencia de direccionamiento a endosoma (por ejemplo, secuencia de direccionamiento a endosoma tardío) y/o secuencias "flanqueantes" adicionales.

Estos péptidos inmunogénicos pueden representarse esquemáticamente como A-L B o B-L-A, donde A representa un epítipo de célula T de un (auto o no auto) antígeno, con potencial para desencadenar una reacción inmunitaria, L representa un enlazador y B representa un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora.

La actividad reductora de un compuesto orgánico puede ensayarse con respecto a su capacidad para reducir un grupo sulfhidrilo tal como en el ensayo de solubilidad de insulina conocido en la técnica, en el que la solubilidad de la insulina se altera después de la reducción, o con una insulina marcada con fluorescencia. El compuesto orgánico reductor puede acoplarse en el lado amino terminal del epítipo de célula T o en el carboxilo terminal del epítipo de célula T.

Generalmente, el compuesto orgánico con actividad reductora es un péptido. Los fragmentos peptídicos con

actividad reductora se encuentran en tioredoxinas que son pequeñas enzimas reductoras de disulfuro que incluyen glutarredoxinas, nucleorredoxinas, tioredoxinas y otras oxidoredoxinas de tiol/disulfuro. Estos ejercen actividad reductora para enlaces disulfuro en proteínas (tales como enzimas) a través de cisteínas activas redox dentro de secuencias consenso de dominio activo conservadas: X(2)-C, C-X(2)-S, C-X(2)-T, S-X(2)-C, T-X(2)-C (Fomenko *et al.* (2003) *Biochemistry* 42, 11214-11225), en las que X representa cualquier aminoácido. Dichos dominios también se encuentran en proteínas más grandes tales como disulfuro isomerasa proteína (PDI) y fosfolipasa C específica de fosfoinositida.

Por consiguiente, en realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos para su uso según la presente invención comprenden como motivo redox el motivo de secuencia de tioredoxina C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C. En una realización adicional el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C se posiciona en el extremo N del epítipo de célula T. En la presente solicitud, dicho tetrapéptido se denominará "el motivo". En realizaciones particulares, los péptidos de la invención contienen el motivo de secuencia C-X(2)-[CS] o [CS]-X(2)-C. En realizaciones más particulares los péptidos contienen el motivo de secuencia X(2)-S, SX(2)-C o C-X(2)-C.

Como se explica con detalle más adelante, los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden prepararse mediante síntesis química, lo que permite la incorporación de aminoácidos no naturales. Por consiguiente, en el motivo de compuestos reductores según realizaciones particulares de la presente invención, C representa cisteína u otros aminoácidos con un grupo tiol tal como mercaptovalina, homocisteína u otros aminoácidos naturales o no naturales con una función tiol. Para tener actividad reductora, las cisteínas presentes en el motivo no deben aparecer como parte de un puente disulfuro de cisteína. No obstante, el motivo puede comprender cisteínas modificadas, tal como cisteína metilada, que se transforma en cisteína con grupos tiol libres *in vivo*.

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

Por consiguiente, en los péptidos inmunogénicos de la presente invención que comprenden el motivo (redox) descrito anteriormente, el motivo se localiza de tal manera que, cuando el epítipo se aloja en el surco del MHC, el motivo permanece fuera del surco de unión del MCH. El motivo se coloca bien inmediatamente adyacente a la secuencia epitópica dentro del péptido, o está separado del epítipo de célula T mediante un enlazador. Más particularmente, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos de 7 aminoácidos o menor. Más particularmente, el enlazador comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. Como alternativa, un enlazador puede comprender 6, 8 o 10 aminoácidos. Los aminoácidos típicos utilizados en enlazadores son serina y treonina. Son ejemplos de péptidos con enlazadores según la presente invención CXXC-G-epítipo, CXXC-GG- epítipo CXXC-SSS- epítipo CXXC-SGSG- epítipo y similares.

En aquellas realizaciones particulares de los péptidos de la presente invención, en las que la secuencia motivo sea adyacente a la secuencia epitópica, esto se indica como posición P-4 a P-1 o P+1 a P+4 en comparación con la secuencia epitópica. Aparte de un enlazador peptídico pueden utilizarse otros compuestos orgánicos como enlazadores para enlazar entre sí las partes del péptido inmunogénico.

Los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden comprender además secuencias de aminoácidos cortas adicionales en el extremo N o C terminal de la secuencia (artificial) que comprende el epítipo de célula T y el compuesto reductor (motivo). Dicha secuencia de aminoácidos generalmente se denomina en el presente documento "secuencia flanqueante". Una secuencia flanqueante puede colocarse en el extremo N y/o C terminal del motivo redox y/o del epítipo de célula T en el péptido inmunogénico. Cuando el péptido inmunogénico comprende una secuencia de direccionamiento a endosoma, puede haber una secuencia flanqueante entre el epítipo y una secuencia de direccionamiento a endosoma y/o entre el compuesto reductor (por ejemplo, motivo) y una secuencia de direccionamiento a endosoma. Más particularmente, una secuencia flanqueante es una secuencia de hasta 10 aminoácidos, o de entre 1 y 7 aminoácidos, tal como una secuencia de 2 aminoácidos.

En realizaciones particulares de la invención, el motivo redox en el péptido inmunogénico se localiza en el extremo N terminal del epítipo.

En realizaciones particulares adicionales, cuando el motivo redox presente en el péptido inmunogénico contiene una cisteína, esta cisteína está presente en el motivo en la posición más remota desde el epítipo, por tanto el motivo se aparece como CX(2)-[ST] o C-X(2)-S en el extremo N terminal del epítipo o aparece como [ST]-X(2)-C o S-X(2)-C en el extremo C carboxilo del epítipo.

En determinadas realizaciones de la presente invención, se proporcionan péptidos inmunogénicos que comprenden una secuencia epitópica y una secuencia motivo. En realizaciones particulares adicionales, el motivo aparece varias veces (1, 2, 3, 4, 5 o incluso más veces) en el péptido, por ejemplo como repeticiones del motivo que pueden

separarse entre sí por uno o más aminoácidos (por ejemplo, CXXC X CXXC X CXXC [SEQ ID NO: 1]), como repeticiones que son adyacentes entre sí CXXC CXXC CXXC [SEQ ID NO: 2]) o como repeticiones que se solapan entre sí CXXCXXCXXC [SEQ ID NO: 3] o CXCCXCCXCC [SEQ ID NO: 4]). Como alternativa, se proporcionan uno o más motivos en ambos extremos N y C de la secuencia epitópica de célula T. Otras variaciones contempladas para los péptidos inmunogénicos de la presente invención incluyen péptidos que comprenden repeticiones de una secuencia epitópica de célula T o epítomos de células T múltiples diferentes, en las que cada epítomo está precedido y/o seguido por el motivo (por ejemplo repeticiones de “motivo-epítomo” o repeticiones de “motivo-epítomo-motivo”). En el presente documento, todos los motivos pueden tener la misma secuencia pero esto no es obligatorio. Debe observarse que secuencias repetitivas de péptidos que comprenden un epítomo que en sí mismo comprende el motivo también darán como resultado una secuencia que comprende tanto el ‘epítomo’ como un ‘motivo’. En dichos péptidos el motivo dentro de una secuencia epitópica funciona como un motivo fuera de una segunda secuencia epitópica. Sin embargo, en realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la presente invención comprenden solo un epítomo de célula T.

Como se describe anteriormente, los péptidos inmunogénicos según la invención comprenden, además de un compuesto/motivo reductor, un epítomo de célula T procedente de un aloantígeno. Un epítomo de célula T en una secuencia de proteína puede identificarse mediante ensayos funcionales y/o mediante uno o más ensayos de predicción por ordenador. Los aminoácidos en una secuencia epitópica de célula T se numeran según su posición en el surco de unión de las proteínas del MHC. En realizaciones particulares, el epítomo de célula T presente dentro de los péptidos de la invención consta de entre 8 y 25 aminoácidos, incluso más particularmente de entre 8 y 16 aminoácidos, incluso más particularmente consta de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos. En una realización más particular, el epítomo de célula T consta de una secuencia de 9 aminoácidos. En una realización particular adicional, el epítomo de célula T es un epítomo, que está presentado a células T mediante moléculas de MHC de clase II. En realizaciones particulares de la presente invención, la secuencia epitópica de célula T es una secuencia epitópica que se aloja en la hendidura de una proteína de MHC II, más particularmente un nonapéptido que se aloja en la hendidura del MHC II. El epítomo de célula T de los péptidos inmunogénicos de la invención puede corresponder bien a una secuencia epitópica natural de una proteína o puede ser una versión modificada de la misma, siempre que el epítomo de célula T modificado conserve su capacidad para unirse dentro de la hendidura del MHC, similar a la secuencia epitópica de célula T natural.

El epítomo de célula T modificado puede tener la misma afinidad de unión por la proteína del MHC que el epítomo natural, pero también puede tener una afinidad más baja. En realizaciones particulares la afinidad de unión del péptido modificado no es menor que 10 veces menos que la del péptido original, más particularmente no es menor que 5 veces menos. Es un descubrimiento de la presente invención que los péptidos de la misma tengan un efecto estabilizador sobre complejos de proteína. Por consiguiente, el efecto estabilizador del complejo péptido-MHC compensa la afinidad reducida del epítomo modificado por la molécula de MHC.

En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención comprenden adicionalmente una secuencia de aminoácidos (u otro compuesto orgánico) que facilita la captación del péptido en endosomas (tardíos) para el procesamiento y presentación dentro de determinantes de MHC de clase II. El direccionamiento a endosomas tardíos está mediado por señales presentes en la cola citoplasmática de proteínas y corresponde a motivos peptídicos bien identificados tales como el motivo [DE]XXL[LI] o DXXLL basado en dileucina (por ejemplo, DXXXLL), el motivo YXX0 basado en tirosina o el motivo denominado de agrupamiento ácido. El símbolo 0 representa restos de aminoácido con cadenas laterales hidrófobas voluminosas, tales como Phe, Tyr y Trp. Las secuencias de direccionamiento a endosomas tardíos permiten el procesamiento y la presentación eficiente del epítomo de célula T procedente de antígeno por moléculas de MHC de clase II. Dichas secuencias de direccionamiento a endosomas están incluidas, por ejemplo, dentro de la proteína gp75 (Vijayasaradhi *et al.* (1995) J Cell Biol 130, 807-820), la proteína CD3 gamma humana la HLA-BM  $\beta$  (Copier *et al.* (1996) J. Immunol. 157, 1017-1027), la cola citoplasmática del receptor de DEC205 (Mahnke *et al.* (2000) J Cell Biol 151, 673-683). Otros ejemplos de péptidos que funcionan como señales de clasificación en el endosoma se desvelan en la revisión de Bonifacio y Traub (2003) Annu. Rev. Biochem. 72, 395-447. Como alternativa, la secuencia puede ser la de un epítomo de célula T subdominante o secundario de una proteína, que facilita la captación en el endosoma tardío sin superar la respuesta de la célula T hacia el epítomo de célula T procedente de aloantígeno.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden generarse por acoplamiento a un motivo reductor como se describe en el presente documento, en el extremo N o C terminal a un epítomo de célula T de una proteína aloantigénica (bien directamente adyacente a la misma o separada por un enlazador). Además, la secuencia epitópica de célula T del péptido inmunogénico y/o el motivo redox pueden modificarse y/o una o más secuencias flanqueantes y/o una secuencia de direccionamiento pueden introducirse (o modificarse) en comparación con la secuencia epitópica de célula T de origen natural. Por consiguiente, la secuencia resultante del péptido inmunogénico diferirá en la mayoría de los casos de la secuencia de la proteína aloantigénica de interés. En este caso los péptidos inmunogénicos de la invención son péptidos con una secuencia de origen no natural, “artificial”.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden variar sustancialmente en longitud, por ejemplo, de aproximadamente 12-13 aminoácidos (un epítomo de célula T de 8-9 aminoácidos y el motivo redox de 4 aminoácidos) hasta 50 o más aminoácidos. Por ejemplo, un péptido inmunogénico según la invención puede comprender una secuencia de direccionamiento a endosoma de 40 aminoácidos, una secuencia flanqueante de

aproximadamente 2 aminoácidos, un motivo como se describe en el presente documento de 4 aminoácidos, un enlazador de 4 aminoácidos y un péptido de epítipo de célula T de 9 aminoácidos. En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención constan de entre 12 aminoácidos y de 20 hasta 25, 30, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos. En una realización más particular, los péptidos constan de entre 10 y 20 aminoácidos. Más particularmente, cuando el compuesto reductor es un motivo redox como se describe en el presente documento, la longitud del péptido inmunogénico que comprende el epítipo y el motivo opcionalmente conectado por un enlazador tiene una longitud de 19 aminoácidos o menor, por ejemplo, de 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 aminoácidos.

Como se ha detallado anteriormente, los péptidos inmunogénicos para su uso en la reducción o prevención de rechazo de aloinjerto según la invención, comprenden un motivo reductor como se describe en el presente documento, enlazado a una secuencia epitópica de célula T. Según realizaciones particulares, los epítipos de célula T proceden de aloantígenos que no comprenden de manera natural una secuencia de aminoácidos con propiedades redox dentro de una secuencia de 11 aminoácidos en el extremo N o C terminal adyacente al epítipo de célula T de interés. Más particularmente, la invención incluye la generación de péptidos inmunogénicos a partir de proteínas aloantigénicas que no comprenden una secuencia seleccionada de C-X(2)-S, S-X(2)-C, C-X(2)-C, S-X(2)-S, C-X(2)-T, T-X(2)-C dentro de una secuencia de 11 aminoácidos en el extremo N o C terminal de la secuencia epitópica. En realizaciones particulares adicionales, la presente invención proporciona péptidos inmunogénicos de proteínas aloantigénicas para su uso en el tratamiento de rechazo de aloinjerto y para la generación de células T reguladoras específicas de antígeno de aloinjerto, mediante lo cual las proteínas aloantigénicas no comprenden las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente con propiedades redox dentro de su secuencia.

En realizaciones particulares adicionales, los péptidos inmunogénicos de la invención son péptidos que comprenden epítipos de célula T que no comprenden una secuencia de aminoácidos con propiedades redox dentro de su secuencia natural. Sin embargo, en realizaciones alternativas, un epítipo de célula T que se une a la hendidura del MHC puede comprender un motivo redox tal como se describe en el presente documento dentro de su secuencia epitópica; los péptidos inmunogénicos para su uso según la invención que comprenden dicho epítipo de célula T deben comprender adicionalmente otro motivo redox acoplado (adyacente o separado mediante un enlazador) en el extremo N o C terminal al epítipo, de tal manera que el motivo unido pueda garantizar la actividad reductora (contrario al motivo presente en el epítipo, que se oculta dentro de la hendidura).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para generar péptidos inmunogénicos de la presente invención descritos en el presente documento. Dichos métodos incluyen la identificación de epítipos de célula T en una proteína aloantigénica de interés. En la técnica se conocen sobradamente formas para la identificación *in vitro* y por ordenador de epítipos de células T y en lo sucesivo se elaboran algunos aspectos en el presente documento. Los péptidos inmunogénicos generados se evalúan opcionalmente con respecto a su capacidad para inducir células T reguladoras CD4+ específicas de aloantígeno que son citotóxicas para células que presentan (partes de) la proteína aloantigénica de interés.

Los péptidos inmunogénicos según la invención se generan utilizando epítipos de células T de las proteínas alogénicas de interés. Los aloantígenos que pueden utilizarse para la selección de epítipos de célula T son típicamente aloantígenos, que se seleccionan del grupo que consiste en antígenos de MHC de clase I, antígenos de MHC de clase II, antígenos de histocompatibilidad secundarios o aloantígenos específicos de tejido. En realizaciones particulares, el epítipo de célula T utilizado es un epítipo de célula T dominante.

La identificación y selección de un epítipo de célula T a partir de aloantígenos, para su uso en el contexto de la presente invención, implica opcionalmente uno o más de los siguientes métodos. Por ejemplo, secuencias peptídicas aisladas de una proteína aloantigénica se someten a ensayo, por ejemplo, mediante técnicas de biología de células T, para determinar si las secuencias peptídicas provocan una respuesta de célula T. Aquellas secuencias peptídicas en las que se encuentra que provocan una respuesta de célula T se definen como que tienen actividad estimuladora de célula T. La actividad estimuladora de célula T humana puede ensayarse adicionalmente cultivando células T obtenidas de un individuo sensibilizado contra un aloantígeno con un péptido/epítipo procedente del aloantígeno y determinando si se produce la proliferación de células T en respuesta al péptido/epítipo. Esto puede medirse, por ejemplo, por captación celular de timidina marcada con tritio. Los índices de estimulación para respuestas por células T contra péptidos/epítipos pueden calcularse como la CPM máxima en respuesta a un péptido/epítipo dividido entre la CPM control. Un índice de estimulación (I.E.) de células T igual a o mayor que dos veces el nivel de fondo se considera "positivo". Los resultados positivos se usan para calcular el índice de estimulación medio para cada péptido/epítipo para el grupo de péptidos/epítipos ensayado. Los epítipos de células T no naturales (o modificados) también pueden, opcionalmente, ensayarse con respecto a su capacidad de unión a moléculas de MHC de clase II. La unión de epítipos de células T no naturales (o modificados) con moléculas de MHC de clase II puede realizarse de diferentes maneras. Por ejemplo, se obtienen moléculas solubles de HLA de clase II por lisis de células homocigotas para una molécula de clase II determinada. Esta última se purifica por cromatografía de afinidad. Las moléculas solubles de clase II se incuban con un péptido de referencia marcado con biotina producido según su fuerte afinidad de unión por esa molécula de clase II. Los péptidos a evaluar con respecto a la unión a la molécula de clase II se incuban después a diferentes concentraciones y su capacidad para desplazar el péptido de referencia de su unión con la molécula de clase II se calcula añadiendo neutravidina. Pueden encontrarse métodos, por ejemplo, en Texier *et al.*, (2000) J. Immunology 164, 3177-3184).

Los péptidos inmunogénicos de la invención tienen un índice de estimulación de célula T medio mayor que o igual a 2,0. Un péptido inmunogénico que tenga un índice de estimulación de célula T mayor que o igual a 2,0 se considera útil como un agente profiláctico o terapéutico. Más particularmente, los péptidos inmunogénicos según la invención tienen un índice de estimulación de célula T medio de al menos 2,5, de al menos 3,5, de al menos 4,0, o incluso de al menos 5,0. Además, dichos péptidos tienen típicamente un índice de positividad (I.P.) de al menos aproximadamente 100, de al menos 150, de al menos 200 o de al menos aproximadamente 250. El índice de positividad de un péptido se determina multiplicando el índice de estimulación de célula T medio por el porcentaje de individuos, en una población de individuos sensibles a un aloantígeno (por ejemplo, al menos 9 individuos, al menos 16 individuos o al menos 20 o 30 o incluso más), que tienen células T que responden al péptido (por tanto que corresponde al IE multiplicado por la naturaleza promiscua del péptido/epítipo). Por tanto, el índice de positividad representa tanto la fuerza de una respuesta de célula T contra un péptido (I. E) como la frecuencia de una respuesta de célula T a un péptido en una población de individuos sensibles a un aloantígeno. Para determinar los epítipos de células T óptimos, por ejemplo, mediante técnicas de mapeo adecuadas, un péptido que tenga actividad estimuladora de célula T, y por tanto que comprenda al menos un epítipo de célula T, determinado por técnicas de biología de células T, se modifica por adición o delección de restos de aminoácido en el extremo N o C del péptido y se ensaya para determinar un cambio en la reactividad de la célula T con respecto al péptido modificado. Si se encuentra que dos o más péptidos que comparten un área de solapamiento en la secuencia de proteína nativa tienen actividad estimuladora de célula T humana, determino mediante técnicas de biología de células T, pueden producirse péptidos adicionales que comprendan toda o una parte de dichos péptidos y dichos péptidos adicionales pueden ensayarse mediante un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, se seleccionan péptidos y se producen de manera recombinante o sintética. Los epítipos de células T o péptidos se seleccionan basándose en varios factores, incluyendo la fuerza de la respuesta de célula T contra el péptido/epítipo (es decir, índice de estimulación) y la frecuencia de la respuesta de célula T contra el péptido en una población de individuos.

En la técnica se conocen métodos utilizados para la identificación de antígenos de histocompatibilidad secundarios. Por tanto, pueden utilizarse estrategias de clonación posicional o de clonación de expresión para identificar antígenos de histocompatibilidad secundarios candidatos. Para una descripción completa de la metodología, véase por ejemplo Mendoza *et al*, Immunity, 7: 461-472, 1997. Como alternativa, los péptidos realmente presentados por CPA en moléculas bien de MHC de clase I o de clase II, pueden eluirse y separarse mediante diversos métodos de cromatografía. Una descripción completa de dicha metodología se encontrará en Scott *et al*, Immunity, 12: 711-720, 2000.

Los antígenos candidatos pueden explorarse mediante uno o más algoritmos *in vitro* para identificar una secuencia epitópica de célula T dentro de una proteína antigénica. Los algoritmos adecuados incluyen, pero sin limitación, los encontrados en las siguientes páginas web:

- <http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc/>;
- <http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc/>;
- <http://www.imtech.res.in/raghava/mhcbln/>;
- <http://www.syfueithi.de/home.htm>;
- <http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC>;
- <http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/anti.genic.html>;
- <http://www.jenner.ac.uk/MHCPred/>.

Más particularmente, dichos algoritmos permiten la predicción dentro de una proteína antigénica de una o más secuencias nanopeptídicas que se alojarán en el surco de una molécula MHC II.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden producirse por expresión recombinante, por ejemplo, en células bacterianas (por ejemplo *Escherichia coli*), en células de levadura (por ejemplo, especies de *Pichia*, especies de *Hansenula*, especies de *Saccharomyces* o especies de *Schizosaccharomyces*), en células de insecto (por ejemplo de *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*), en células de plantas o de mamíferos (por ejemplo, células CHO, células COS). En consecuencia, la construcción de los vectores de expresión adecuados requeridos (incluyendo información adicional tal como secuencias promotoras y de terminación) implica, en otro orden de cosas, técnicas de ADN recombinantes convencionales. Los péptidos inmunogénicos de la invención producidos de manera recombinante pueden proceder de una proteína precursora más grande, por ejemplo, mediante escisión enzimática de sitios de escisión enzimática insertados adyacentes al extremo N y/o C del péptido inmunogénico, seguido de purificación adecuada.

En vista de la longitud limitada de los péptidos inmunogénicos de la invención, estos pueden prepararse por síntesis peptídica química, en la que los péptidos se preparan acoplando los diferentes aminoácidos entre sí. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión, por ejemplo, de D aminoácidos, aminoácidos con cadenas laterales de origen no natural o aminoácidos con cadenas laterales modificadas tales como cisteína metilada. Los métodos de síntesis peptídica química se describen bien y los péptidos pueden encargarse a compañías tales como Applied Biosystems y a otras compañías. La síntesis peptídica puede realizarse bien como síntesis peptídica en fase sólida (SPFS) o por el contrario como síntesis peptídica en fase en solución. Los métodos de SPFS que mejor se conocen son la síntesis química en fase sólida con t-Boc y Fmoc bien conocida por el experto en la materia.

Además, los péptidos pueden unirse entre sí para formar péptidos más largos utilizando una técnica de ligamiento (acoplamiento quimioselectivo de dos fragmentos peptídicos desprotegidos) como originalmente describe Kent (Schnolzer & Kent (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.* 40, 180-193) y revisan, por ejemplo, Tam *et al.* (2001) *Biopolymers* 60, 194-205. Esto proporciona el tremendo potencial para conseguir la síntesis de proteínas que se encuentra más allá del alcance de la SPFS. Muchas proteínas con un tamaño de 100-300 restos se han sintetizado satisfactoriamente mediante este método. Los péptidos sintéticos han seguido desempeñando un papel crucial, incluso cada vez mayor, en los campos de investigación de bioquímica, farmacología, neurobiología, enzimología y biología molecular debido a los enormes avances en la SPFS.

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

Por consiguiente, en un aspecto adicional más, la presente invención proporciona métodos para la generación de células T citotóxicas específicas de antígeno de aloinjerto (células Tregs o células T reguladoras CD4+) *in vivo* o *in vitro* (*ex vivo*). En particular, se proporcionan células T que son citotóxicas contra cualquier célula que presente un antígeno de aloinjerto y pueden obtenerse como una población de células. Por consiguiente la invención se extiende a (poblaciones de) Tregs citotóxicas específicas de antígeno de aloinjerto, mediante los métodos descritos en el presente documento.

En realizaciones particulares, se proporcionan métodos que comprenden el aislamiento de células de sangre periférica, la estimulación de la población de células *in vitro* poniendo en contacto un péptido inmunogénico según la invención (es decir que comprende un epítipo de célula T procedente de una proteína aloantigénica) con las células de sangre periférica aisladas, y la expansión de la población celular estimulada, más particularmente en presencia de IL-2. Los métodos según la invención tienen la ventaja de que se producen cantidades más elevadas de Tregs y que pueden generarse Tregs que son específicas para la proteína antigénica de aloinjerto (utilizando un péptido que comprenda un epítipo específico de antígeno). Como alternativa, las células T citotóxicas específicas de proteína antigénica de aloinjerto pueden obtenerse por incubación en presencia de CPA que presentan un péptido inmunogénico específico de proteína antigénica de aloinjerto según la invención después de transducción o transfección de las CPA con una construcción genética capaz de dirigir la expresión de dicho péptido inmunogénico. De hecho, las propias CPA pueden administrarse a un sujeto que necesite desencadenar *in vivo* la inducción del subconjunto beneficioso de células T CD4+ citotóxicas.

En una realización alternativa, las Tregs pueden generarse *in vivo*, es decir, administrando a un sujeto un péptido inmunogénico proporcionado en el presente documento, y recogiendo las Tregs generadas *in vivo*.

Las células T reguladoras específicas de antígeno de aloinjerto obtenibles por los métodos anteriores son de particular interés para su uso en (la preparación de un medicamento para) la prevención o el tratamiento en un receptor del rechazo de un aloinjerto. Para cualquiera de los usos de los péptidos inmunogénicos de la invención descritos anteriormente, dichos péptidos pueden reemplazarse por Tregs específicas de antígeno de aloinjerto. Se contempla el uso de células tanto alogénicas como autogénicas. Cualquier método que comprenda administrar a un sujeto que lo necesite, las Tregs específicas de antígeno de aloinjerto (es decir, para la prevención o el tratamiento de rechazo de aloinjerto) también se denomina en la técnica "terapia celular adoptiva". Dicha terapia es de interés particular en caso del tratamiento crónico de reacciones inmunitarias específicas de aloinjerto y para la recaída de dichas reacciones. Las Tregs son cruciales en la inmunorregulación y tienen un enorme potencial terapéutico. La eficacia de la inmunoterapia basada en Tregs depende de la especificidad Ag de las células T reguladoras. Además, el uso de Treg específicas de Ag en oposición a Treg expandida policlonal reduce el número total de Treg necesario para la terapia.

se desvelan secuencias de ácido nucleico que codifican los péptidos inmunogénicos de la presente invención y métodos para su uso, por ejemplo, para expresión recombinante o en terapia génica. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico pueden expresar un péptido inmunogénico de la invención.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden de hecho administrarse a un sujeto que lo necesite utilizando cualquier método de terapia génica adecuado. En cualquier uso o método de la invención para el tratamiento y/o la prevención de rechazo de aloinjerto, la inmunización con un péptido inmunogénico de la presente invención puede combinarse con transferencia de célula adoptiva de (una población de) Tregs específicas para dicho péptido inmunogénico y/o con terapia génica. Cuando dicha inmunización, transferencia de célula adoptiva y terapia génica, se combina, puede utilizarse de manera simultánea o secuencial en cualquier combinación posible.

En terapia génica, las moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican los péptidos inmunogénicos pueden utilizarse como ADN desnudo o en liposomas o en otros sistemas de lípidos para el suministro a células diana. Otros métodos para la transferencia de ADN plasmídico en células son muy conocidos por los expertos en la técnica para su uso en terapia génica humana e implican el direccionamiento del ADN a receptores en células formando complejos del ADN plasmídico con proteínas. En su forma más simple, la transferencia génica puede realizarse

inyectando simplemente pequeñas cantidades de ADN en el núcleo de una célula, a través de un proceso de microinyección. Una vez que se introducen los genes recombinantes en una célula, estos pueden reconocerse por los mecanismos normales de la célula para la transcripción y traducción, y se expresará un producto génico. También se han descrito otros métodos para la introducción de ADN en mayores cantidades de células. Estos métodos incluyen: transfección, en la que el ADN se precipita con fosfato de calcio y las células lo absorben por pinocitosis; electroporación, en la que las células se exponen a grandes pulsos de tensión para introducir orificios en la membrana; lipofección/fusión de liposomas, en la que el ADN se empaqueta en vesículas lipófilas que se fusionan con una célula diana; y bombardeo con partículas utilizando ADN unido a pequeños proyectiles. Otro método para la introducción de ADN en las células es acoplar el ADN a proteínas químicamente modificadas. Las proteínas de adenovirus pueden desestabilizar endosomas y potenciar la captación de ADN en las células. La mezcla de adenovirus con soluciones que contienen complejos de ADN, o la unión de ADN con polisina unida por enlace covalente a adenovirus utilizando agentes de reticulación de proteínas, mejora sustancialmente la captación y expresión del gen recombinante. También pueden utilizarse vectores de virus adenoasociados para el suministro de genes en células vasculares. Como se usa en el presente documento, “transferencia génica” significa el proceso de introducir una molécula de ácido nucleico exógena en una célula, que normalmente se realiza para permitir la expresión de un producto particular codificado por el gen. Dicho producto puede incluir una proteína, un polipéptido, ADN o ARN antisentido, o ARN enzimáticamente activo. La transferencia génica puede realizarse en células cultivadas o por administración directa en mamíferos. También se proporciona un vector que comprende una secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico según la invención. En particular el vector se genera de tal manera que la secuencia de la molécula de ácido nucleico se expresa únicamente en un tejido específico. En la técnica se conocen bien métodos para conseguir expresión génica específica de tejido, por ejemplo, colocando la secuencia que codifica un péptido inmunogénico de la invención bajo el control de un promotor, que dirige la expresión del péptido específicamente en uno o más tejidos u órganos. Los vectores de expresión procedentes de virus, tales como retrovirus, virus de la vacuna, adenovirus, virus adenoasociados, herpes virus, virus de ARN o virus de papiloma bovino, pueden utilizarse para el suministro de péptidos que codifican secuencias de nucleótidos (por ejemplo, ADNc), homólogos o sus derivados en la población de células o tejidos diana. Los expertos en la técnica conocen bien métodos que pueden utilizarse para construir vectores de virus recombinantes que contengan dichas secuencias codificantes. Como alternativa, en terapia génica, pueden utilizarse células modificadas técnicamente que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico según la invención.

Cuando la administración de uno o más péptidos según la invención se garantiza a través de transferencia génica (es decir la administración de un ácido nucleico que garantice la expresión de los péptidos según la invención *in vivo* después de la administración), la dosificación apropiada del ácido nucleico puede determinarse basándose en la cantidad del péptido expresado como resultado del ácido nucleico introducido.

Según la presente invención se contemplan medicamentos para su uso en el tratamiento y/o prevención de rechazo de aloinjerto. El medicamento de la invención es normalmente, aunque no necesariamente, una formulación (farmacéutica) que comprende, como principio activo, al menos uno de los péptidos inmunogénicos de la invención, una (población de) Tregs específica para dicho péptido inmunogénico o un vector terapéutico génico capaz de expresar dicho péptido inmunogénico. Aparte del principio (o principios) activo, dicha formulación comprenderá al menos uno de un diluyente, transportador o adyuvante (farmacéuticamente aceptable). Típicamente, los compuestos farmacéuticamente aceptables (tales como diluyentes, transportadores y adyuvantes) pueden encontrarse, por ejemplo, en un manual de Farmacopea (por ejemplo, Farmacopea de Estados Unidos, Europea o Internacional). El medicamento o la composición farmacéutica de la invención normalmente comprenden una cantidad (profiláctica o terapéuticamente) eficaz del principio (o principios) activo, en el que la eficacia es con respecto a la afección o trastorno a prevenir o tratar. En particular, las composiciones farmacéuticas de la invención son vacunas para aplicación profiláctica o terapéutica.

Puede ser necesario que el medicamento o la composición farmacéutica de la invención se administren a un sujeto que lo necesite como parte de un régimen profiláctico o terapéutico que comprende múltiples administraciones de dicho medicamento o composición. Dichas administraciones múltiples normalmente se producen de una manera secuencial y el intervalo de tiempo entre dos administraciones puede variar y se ajustará a la naturaleza del principio activo y a la naturaleza de la afección a prevenir o tratar. La cantidad de principio activo proporcionada a un sujeto que lo necesite, en una sola administración, también puede variar y dependerá de factores tales como el estado físico del sujeto (por ejemplo, el peso, la edad), el estado de la afección que vaya a prevenirse o a tratarse y la experiencia del médico, del especialista o del personal de enfermería que esté tratando al paciente.

El término “diluyentes” se refiere, por ejemplo, a soluciones salinas fisiológicas. El término “adyuvante” normalmente se refiere a un agente farmacológico o inmunológico que modifica (preferentemente aumenta) el efecto de otros agentes (por ejemplo, fármacos, vacunas) aunque tiene escasos, si tuviese algunos, efectos directos cuando se proporcionan por sí mismos. Como un ejemplo de un adyuvante se da el hidróxido de aluminio (alumbre), al cual puede adsorberse un péptido inmunogénico de la invención. Adicionalmente, en la técnica se conocen muchos otros adyuvantes y pueden utilizarse siempre que faciliten la presentación del péptido en la presentación de MHC de clase II y activación de células T. La expresión “transportador farmacéuticamente aceptable” significa cualquier material o sustancia con el que se formula el principio activo para facilitar su aplicación o diseminación en el lugar a tratar, por



ejemplo disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición, y/o para facilitar su conservación, transporte o manipulación sin influir en su eficacia. Estos incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares. Pueden incluirse principios adicionales para controlar la duración de la acción del principio activo en la composición. El transportador farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que se ha comprimido para formar un líquido, es decir, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse adecuadamente como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos medicinales, pulverizaciones, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, gránulos o polvos. Los transportadores farmacéuticos adecuados para su uso en dichas composiciones farmacéuticas y su formulación es bien conocida por los expertos en la técnica y no hay ninguna restricción particular para su selección con la presente invención. También pueden incluirse aditivos tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, pegamentos, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similar, siempre que los mismos sean coherentes con la práctica farmacéutica, es decir, transportadores y aditivos que no creen un daño permanente a los mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de cualquier manera conocida, por ejemplo, mezclando homogéneamente, recubriendo y/o moliendo los principios activos, en un procedimiento de una etapa o de múltiples etapas, con el material transportador seleccionado y, cuando sea apropiado, los otros aditivos tales como agentes tensioactivos. También pueden prepararse por micronización, por ejemplo, en vista de obtenerlos en forma de microesferas que normalmente tienen un diámetro de aproximadamente 1 a 10  $\mu\text{m}$ , en concreto para la fabricación de microcápsulas para la liberación controlada o sostenida de los principios activos.

Los péptidos inmunogénicos, homólogos o derivados de los mismos (y sus sales fisiológicamente aceptables o composiciones farmacéuticas, todos ellos incluidos en la expresión "principios activos") pueden administrarse mediante cualquier vía apropiada para la afección a prevenir o tratar y que sea apropiada para los compuestos, en este caso las proteínas inmunogénicas a administrar. Las vías posibles incluyen la vía regional, sistémica, oral (en forma sólida o para inhalación), rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural). La vía de administración preferida puede variar, por ejemplo, con la afección del receptor o con la afección a prevenir o a tratar.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Las formulaciones de la presente invención, adecuadas para administración oral, pueden presentarse como unidades individuales, tales como cápsulas, obleas o comprimidos, conteniendo cada uno de ellos una cantidad predeterminada del principio activo; como polvos o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse como un bollo, un pesario o una pasta. Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más principios accesorios. Los comprimidos fabricados por compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclarse con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden opcionalmente recubrirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo en su interior.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona inmunopéptidos aislados que comprenden un epítipo de célula T de un MCH, un antígeno de histocompatibilidad secundario o un antígeno específico de tejido y un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, estando el motivo adyacente al epítipo de célula T o separado del epítipo de célula T por un enlazador, más particularmente un enlazador de a lo sumo 7 aminoácidos. En realizaciones particulares adicionales el epítipo de célula T procede de una proteína que es un aloantígeno establecido. En realizaciones particulares, el epítipo de célula T es de un MCH, de un antígeno de histocompatibilidad secundario o de un antígeno específico de tejido en el que el motivo no aparece de manera natural dentro de una región de 11 aminoácidos en el extremo N o C terminal del epítipo de célula T.

En todos los métodos y aplicaciones descritos en el presente documento, un antígeno de aloinjerto particular se ilustra mediante el antígeno Dby codificado por el cromosoma H-Y. Por lo tanto, la invención también se refiere a un péptido inmunogénico que comprende un epítipo de célula T del antígeno Dby y, adyacente a dicho epítipo de célula T o separado de dicho epítipo de célula T mediante un enlazador, un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C. En particular, el epítipo de célula T se caracteriza por FNSNRANSS (SEQ ID NO: 5) o CHGCFFNSNRANSS (SEQ ID NO: 6), y los péptidos inmunogénicos ejemplares de la invención que los comprenden se caracterizan por LVLAPTREL (SEQ ID NO: 7) o CGHCLVLAPTREL (SEQ ID NO: 8). La invención se refiere adicionalmente a los usos de/métodos de uso de estos péptidos inmunogénicos descritos en el presente documento, así como a las composiciones/medicamentos descritos en el presente documento, basándose en estos péptidos inmunogénicos.

La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, que se proporcionan sin ninguna

intención limitativa. Además, todas las referencias descritas en el presente documento se incluyen explícitamente en el mismo por referencia.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Provocación de células T reguladoras citotóxicas por inmunización con un péptido modificado

La secuencia del antígeno Dby murino, que está codificado por el cromosoma H-Y, se introdujo en algoritmos utilizados para identificar epítomos de células T para ratones de la cepa C57B1/6. Se identificó un supuesto epítomo de secuencia FNSNRANSS (SEQ ID NO: 5) y se utilizó como una base para la producción de un péptido inmunogénico según la presente invención, que incluye una secuencia consenso que engloba una actividad tiorreductasa, en concreto CHGC (SEQ ID NO: 9). Por lo tanto se sintetizó un nuevo péptido con la secuencia CHGCFNSNRANSS (SEQ ID. NO: 6; la secuencia consenso tiorreductasa se indica subrayada).

Grupos de ratones hembra C57B1/6 se inmunizaron con 10 µg de péptido de SEQ ID NO: 6 emulsionado en CFA (adyuvante completo de Freund) para la primera inyección SC (subcutánea) y en IFA (adyuvante incompleto de Freund) para las dos inmunizaciones posteriores. El bazo de dichos ratones se recuperó 10 días después de la última inmunización y se obtuvieron células T CD4+ mediante clasificación celular utilizando perlas magnéticas.

Estas células T CD4+ se evaluaron *in vitro* con respecto a su capacidad para inducir apoptosis de CPA (células presentadoras de antígeno). Por tanto, células de bazo de ratones C57B1/6 no expuestos previamente (*naïve*) se privaron de células T CD4+ por clasificación con perlas magnéticas y se utilizaron como CPA. Dichas CPA se cargaron con péptidos de cualquiera de SEQ ID NO: 5 o de SEQ ID NO: 6 por incubación durante 16 h a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron para eliminar los péptidos libres residuales.

Después de la adición de células T CD4+ obtenidas de ratones inmunizados con el péptido modificado, las CPA cargadas con la secuencia natural (SEQ ID NO: 5) o su homólogo modificado (SEQ ID NO: 6) se indujeron en apoptosis como se observa mediante unión a la superficie de Anexina V. Las células T CD4+ de control, bien de ratones inmunizados con un antígeno simulado o de ratones inmunizados con el péptido natural de SEQ ID NO: 5 no indujeron ningún grado significativo de apoptosis de CPA.

Estos experimentos demuestran que un epítomo de célula T de un antígeno de histocompatibilidad secundario puede, por inmunización directa en el ratón y después de modificación según la presente invención añadiendo una fracción de tiorreductasa, provocar células Tregs citotóxicas. Adicionalmente se demuestra que las Tregs citotóxicas pueden activarse y ejercer sus propiedades inmunosupresoras cuando se activan con la secuencia natural del epítomo T. En su conjunto, esto proporciona pruebas de que las Tregs citotóxicas específicas de antígenos de histocompatibilidad secundarios pueden generarse por inmunización directa.

### Ejemplo 2: Modelo preclínico para la prevención de rechazo de injerto (ratones no expuestos previamente)

Uno de los modelos más estudiados de rechazo de injerto es el injerto de piel entre animales singénicos de diferente sexo. Por tanto, el cromosoma H-Y contiene diversos genes, en particular en gen Dby, que codifica un antígeno de histocompatibilidad secundario que provoca una fuerte activación de células T CD4+ y rechazo crónico en hembras. Se ha demostrado que el rechazo se debe principalmente a la presentación del antígeno Dby por las CPA de hembras, normalmente a través de la ruta indirecta (véase Braun *et al*, Journal of Immunology, 166: 4879-4883, 2001).

Se considera que este modelo es directamente aplicable a la situación en seres humanos, dado que los antígenos derivados de H-Y también se expresan en el ser humano. Además, se sabe que los injertos de médula ósea o de órganos sólidos de donantes masculinos son más frecuentemente rechazados por receptores femeninos que cuando el injerto es de origen femenino.

Los epítomos de células T del antígeno Dby se han descrito y seleccionado como se muestra en el Ejemplo 1 (péptido de SEQ ID NO: 5). Se preparó un péptido sintético de SEQ ID NO: 6. Se crearon grupos de 3 ratones hembra C57B1/6 (haplotipo H-2b) para ensayar la capacidad de los péptidos modificados de SEQ ID NO: 1 para provocar tolerancia al aloinjerto de piel. Cuando sea aplicable, la preinmunización se realizó mediante 3 inyecciones subcutáneas de péptidos que contenían bien el epítomo natural o su homólogo modificado. Las inyecciones se realizaron a intervalos quincenales en CFA/IFA o alumbre. Por lo tanto los grupos fueron los siguientes:

Grupo 1: aloinjerto de piel sin preinmunización

Grupo 2: autoinjerto de piel

Grupo 3: preinmunización con péptido de SEQ ID NO: 6 emulsionado en CFA (primera inmunización) e IFA para la segunda y tercera inmunización)

Grupo 4: igual que en el Grupo 3, pero con alumbre como adyuvante

Grupo 5: igual que en el Grupo 3, pero utilizando el péptido natural de SEQ ID NO: 5

Todos estos ratones, excepto los ratones del Grupo 2, recibieron un aloinjerto de piel de machos C57B1/6 de 1 cm<sup>2</sup>, bien directamente (Grupo 1) o 2 semanas después de la última inmunización para los Grupos 3, 4 y 5. El grupo de ratones 2 recibió un autoinjerto. La tasa de rechazo se evaluó el día 10 y 20 y se consideró eficaz si más del 50 % de la superficie del injerto era necrótica. La Tabla I resume los resultados.

5

**Tabla 1.** Resumen de la tasa de rechazo de un experimento en el que ratones hembra C57B1/6 se injertaron con piel de machos singénicos que se hicieron tolerantes al aloinjerto por preinmunización con un péptido que contenía un epítipo de célula T CD4+ unido a una secuencia consenso de tiorreductasa

| Grupos de 3 ratones a menos que se indique          | Día 10 | Día 20 |
|-----------------------------------------------------|--------|--------|
| Grupo 1 aloinjerto                                  | 3/3    | 2/3*   |
| Grupo 2 autoinjerto (n=6)                           | 1/6    | 1/6    |
| Grupo 3 preinmunización en CFA/IFA                  | 0/3    | 0/3    |
| Grupo 3 preinmunización en alumbre con SEQ ID NO: 6 | 0/3    | 0/3    |
| Grupo 3 preinmunización en alumbre con SEQ ID NO: 5 | 2/3    | 2/3**  |
| * 1 muerte accidental                               |        |        |
| **proceso de rechazo acelerado                      |        |        |

10 Estos experimentos indican que la preinmunización con el péptido modificado de SEQ ID NO: 6 en CFA/IFA o alumbre impide completamente el rechazo de injerto, mientras que la pre-sensibilización con el péptido natural de SEQ ID NO: 5 acelera el rechazo.

15 Estos experimentos pueden realizarse utilizando ratones hembra C57B1/6 de tipo silvestre, que llevan un repertorio de células T del linaje CD4+ que puede activarse mediante todos los epítipos de células T restringidos de MHC clase II procedentes del cromosoma H-Y. Además, dichos ratones tienen un repertorio de célula T CD8+ normal, que puede activarse mediante epítipos de célula T restringidos de MHC de clase I. Como se sabe que las células T CD8+ citotóxicas son suficientes para el rechazo de injerto, se puede llegar a la conclusión de que un péptido modificado de SEQ ID NO: 6 no se le impide el rechazo mediante la activación de células T CD4+, sino que también  
20 suprime el rechazo mediante células T CD8+.

Los antígenos H-Y también están presentes en el ser humano, donde desempeñan la función de antígenos de histocompatibilidad secundarios, muy similar en el ratón. El antígeno Dby es reconocido como uno de los principales de dichos antígenos. La secuencia de uno del epítipo de células T principal de Dby es LVLAPTREL (SEQ ID. NO: 7). Este epítipo de célula T puede modificarse según la presente invención añadiendo una secuencia consenso que contiene una actividad tiorreductasa, por ejemplo, dando como resultado un péptido inmunogénico CGHCLVLAPTREL (SEQ ID. NO: 8).

### 30 Ejemplo 3: Modelo preclínico para la prevención del rechazo de injerto (ratones sensibilizados)

Los experimentos anteriores se realizaron en ratones no expuestos previamente, inmunizados directamente con un péptido modificado según la presente invención. Dado que los pacientes clínicos que esperan un injerto a menudo ya están sensibilizados contra aloantígenos, debido, por ejemplo, a una infusión de sangre previa o a una gestación, se diseñó un experimento para evaluar el efecto de los péptidos modificados administrados a ratones que ya  
35 estaban sensibilizados con el antígeno Dby.

Por tanto, grupos de ratones hembra C57B1/6 se transfirieron de forma adoptiva con esplenocitos de ratones macho singénicos. Esto se realizó inyectando 20.106 células por vía intraperitoneal o subcutánea. Diez días después, el bazo de dichos ratones se extrajo para confirmar que se generaron células T efectoras CD4+ contra el antígeno Dby.

40 Los ratones presensibilizados por transferencia adoptiva de células se injertaron después con piel macho como se describe en el Ejemplo 2. Posteriormente se evaluó la tolerancia al injerto de piel en dichos ratones pre-inmunizados.

Estos experimentos demuestran que la administración *in vivo* de un péptido inmunogénico de la invención elimina o neutraliza la función de células T CD4+ efectoras existentes contra el antígeno Dby.

### 45 Ejemplo 4. Las Tregs citotóxicas específicas para el antígeno Dby suprimen la capacidad de células CD4+ efectoras para activar células T citolíticas CD8+ contra el antígeno Uty y por lo tanto prevenir el rechazo de injerto mediado por CD8+

50 Los ratones Mata-Hari son ratones Ragl-/- que expresan un receptor de célula T que reconoce un epítipo H2b restringido a la clase I del antígeno Uty, un antígeno alternativo codificado por el cromosoma H-Y. Dichos ratones pueden rechazar el injerto de piel de ratones H2b macho singénicos a través de activación de células T CD8+.

55 Se utilizaron células T transgénicas CD8+ de ratones Mata-Hari para reconstituir de forma adoptiva ratones H2b Rag2-/- utilizando un número de células que era suficiente para mediar el rechazo solo cuando se proporcionaba ayuda mediante células T CD4+ efectoras.

Para proporcionar dicha ayuda, se prepararon células T CD4+ efectoras, así como células T reguladoras CD4+ citotóxicas, en ratones H2k no expuestos previamente, mediante inmunización con los péptidos correspondientes de SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 1.

- 5 Las células T CD4+ restringidas a H2k citotóxicas o efectoras, se transfirieron a ratones Rag2<sup>-/-</sup> ya reconstituidos con células T CD8+ restringidas a H2b transgénicas. Para garantizar que las células T CD4+, bien efectoras o células T citotóxicas, se activaban *in vivo*, los ratones Rag2<sup>-/-</sup> también recibieron un trasplante de esplenocitos H2k de un ratón macho.
- 10 Los ratones Rag2<sup>-/-</sup> reconstituidos se injertaron después con la piel de un macho H2b y se hizo un seguimiento del rechazo del injerto durante 3 semanas. En dicho sistema, el número limitante de células T CD8+ rechazará el injerto H2b únicamente si reciben ayuda de células T CD4+ efectoras, que están activadas por esplenocitos restringidos a H2k, para impedir el rechazo de injerto por células T efectoras.
- 15 La co-reconstitución con células citotóxicas CD4+ y efectoras CD4+ anula la capacidad de las células T CD4+ efectoras para proporcionar ayuda al rechazo de injerto mediado por CD8+.

La inyección de células T CD4+ citotóxicas que reconocen un péptido de MHC de clase II de un antígeno (Dby) regula negativamente el rechazo de injerto mediado por CD8+ a través del reconocimiento de otro antígeno (Uty) codificado por el cromosoma H-Y.

**Ejemplo 5. El rechazo de injerto causado por antígenos de MHC de clase II divergentes se previene con células T reguladoras CD4+ citotóxicas**

- 25 Los ratones Bm12 constituyen una variante de los ratones C57B1/6 en los que se ha producido una mutación espontánea en el locus I-Ab. Esta mutación consiste en 3 sustituciones de aminoácidos en un tramo de 5 aminoácidos y por tanto genera un emparejamiento erróneo limitado del MHC de clase II entre ratones Bm12 y ratones C57B1/6 de tipo silvestre. No obstante, este emparejamiento erróneo es suficiente como para provocar el rechazo del aloinjerto de piel en ratones Bm12.
- 30 Los 3 aminoácidos sustituidos son Ile67Phe, Arg70Gln y Thr71Lys localizados en la tercera región híper variable de la cadena beta. Se preparó un péptido sintético que incluía estos restos y que tenía la secuencia: PEFLEQKRA (SEQ ID. NO: 10). Este péptido se modificó según la invención incorporando una secuencia consenso tiorreductasa, dando como resultado el péptido inmunogénico ejemplar CGHCPEFLEQKRA (SEQ ID. NO: 11).
- 35 Se provocaron células T reguladoras CD4+ citotóxicas contra el péptido modificado de SEQ ID NO: 11 en ratones C57B1/6 mediante 3 administraciones subcutáneas del péptido en CFA/IFA dadas a intervalos quincenales. Después, dichos ratones se injertaron con la piel de ratones Bm12.
- 40 Se observó que los ratones C57B1/6 rechazaban rápidamente el injerto de B12m a menos que se preinmunizasen con el péptido de SEQ ID NO: 11, pero no cuando se utilizaba el péptido natural de SEQ ID NO: 10 para la preinmunización. Estos experimentos demuestran que los péptidos inmunogénicos de la invención pueden provocar células T reguladoras citotóxicas CD4+ y por lo tanto conceden tolerancia de un aloinjerto con emparejamiento erróneo de MHC de clase II.
- 45

**Ejemplo 6: Las células T CD4+ reguladoras citotóxicas se provocan por inmunización *in vivo* con un péptido que comprende un epítipo de célula T del antígeno de histocompatibilidad secundario HA-1, al cual se añade una secuencia consenso de tiorreductasa.**

- 50 Ratones BALB/c (grupo 1) se inmunizaron con 25 µg de un péptido que contenía un epítipo de célula T (natural) del antígeno de histocompatibilidad secundario HA-1 mediante 3 inyecciones en la almohadilla plantar en CFA/IFA realizadas a intervalos quincenales. La secuencia del péptido corresponde a los aminoácidos 302 a 310 de HA-1, en concreto: ARLQVAKAE (SEQ ID NO: 12).
- 55 Un segundo grupo de ratones BALB/c (grupo 2) se inmunizó utilizando el mismo protocolo con el péptido de SEQ ID NO: 12 al cual se añadió un motivo consenso que presentaba actividad tiorreductasa (o abreviado: motivo redox) en el extremo amino terminal, dando como resultado CHGCARLQVAKAE (SEQ ID NO: 13; el motivo redox se indica subrayado) denominado epítipo de célula T modificado).
- 60 Diez días después de la última inmunización, se extrajeron los bazo de todos los ratones y se prepararon células T CD4+ por separación en perlas magnéticas.
- Las células adherentes al bazo, preparadas de ratones BALB/c no expuestos previamente, se utilizaron como células presentadoras de antígeno (CPA). Dichas CPA (2x10<sup>7</sup>) se cargaron con el péptido de SEQ ID NO: 12 o con el péptido de SEQ ID NO: 13 (5 µg/ml) mediante una incubación de 1 h seguido de un lavado.
- 65

Las células T CD4+ obtenidas de ratones bien del grupo 1 o del grupo 2 se añadieron a la población de las CPA y se co-cultivaron durante 24 h a 37 °C. Después, las células se recuperaron y se incubaron con un anticuerpo anti-CD11c marcado con fluorescencia y con anexina V marcada con FITC como un marcador de apoptosis. Finalmente, las células se analizaron por análisis Facs (separación de células activadas por fluorescencia, del inglés *Fluorescence Activated Cell Sorting*)

Estos experimentos demuestran que un péptido de SEQ ID NO: 13 puede provocar células T CD4+ con propiedades citotóxicas frente las CPA que presentan bien el epítipo de célula T del antígeno de histocompatibilidad secundario HA-1 natural (SEQ ID NO: 12) o el epítipo de célula T del antígeno de histocompatibilidad secundario HA-1 modificado (SEQ ID NO: 13).

#### **Ejemplo 7. Modelo preclínico para la prevención del rechazo de injerto de órganos vascularizados (ratones no expuestos previamente)**

El producto del gen Dby, como se describe en el Ejemplo 2, se presenta por determinantes del MHC tanto de clase I como de clase II. En injertos de órganos vascularizados, tales como el corazón, además de la presentación del MHC de clase I, las células del endotelio pueden expresar moléculas de MHC de clase II así como moléculas co-estimuladoras tales como B7. Esto proporciona células endoteliales con la capacidad de activar células T tanto CD8+ como CD4+ específicas para aloantígenos en el contexto de MHC de clase I o clase II, respectivamente.

Sin embargo, las células T CD4+ desempeñan un papel principal en el rechazo de injerto, ya que el empobrecimiento de células T CD4+, pero no el de células T CD8+, del receptor, previene por completo el rechazo (Szeto WY et al, Transplantation (2002) 73: 1116-1122). Además, la producción de citocinas proinflamatorias por células T CD4+ efectoras potencia la inflamación local, principalmente a nivel del endotelio del injerto, lo que da como resultado endotelitis aumentada con expresión aumentada de determinantes de MHC. Por lo tanto, un método mediante el cual se eliminan dichas células T CD4+ específicas de aloantígeno, permitiría la inducción de tolerancia contra el injerto.

En la técnica se sabe que la ruta indirecta de reconocimiento aloantigénico es predominante, en concreto la presentación de CPA del receptor de antígenos liberados por el injerto en células T CD4+ del receptor. Por lo tanto, la prevención de la expansión y de la activación de células T CD4+ efectoras mediante la ruta indirecta sería muy deseable.

Para estabilizar la prueba de concepto de que las células T CD4+ reguladoras citolíticas de la presente invención pueden prevenir el rechazo de un órgano vascularizado, se utilizó el modelo de trasplante de corazón heterotópico. Este método es muy conocido en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Kadner A et al, European Journal of Cardio-thoracic Surgery (2000) 17: 474-481. En resumen, el método consiste en un implante abdominal del corazón en un entorno no operativo, concretamente el corazón está vascularizado pero no da soporte a la circulación. Esto permite realizar un seguimiento prolongado del injerto y múltiples biopsias sin producir la muerte del animal experimental.

Utilizando dicha técnica, se injertaron corazones de machos C57BL/6 en el abdomen de hembras singénicas. El proceso del rechazo, que está mediado por la expresión de antígenos procedentes de H-Y en determinantes de MHC tanto de clase I como clase II, se debe principalmente a la circulación de células T CD4+ específicas del receptor que están activadas mediante el reconocimiento de péptidos procedentes de aloantígeno mediante células endoteliales injertadas. Dichas células T CD4+ producen IL-2 e IFN-gamma, lo que conduce a más inflamación y proporciona ayuda para la maduración de células T CD8+ específicas.

Ratones hembra C57BL/6 se pre-inmunizaron antes de recibir el aloinjerto de machos con péptidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o un péptido simulado. Esto se realiza mediante 3 inyecciones subcutáneas de péptidos realizadas a intervalos quincenales en CFA/IFA. Después de esto, todos los ratones recibieron un trasplante de corazón de macho heterotópico.

Se observa que los ratones hembra pre-inmunizados con el péptido SEQ ID NO: 6 (en concreto el péptido modificado de Dby que contiene el motivo de tiorreductasa) toleran el injerto, como se ilustra mediante un latido ininterrumpido, y la demostración de ausencia de infiltración celular, de síntomas de endotelitis y de lesiones vasculares crónicas. En cambio, los ratones pre-inmunizados con péptido simulado o con péptido de SEQ ID NO: 5 muestran rechazo del corazón trasplantado.

Estos experimentos demuestran que la prevención de la expansión de células T CD4+ y CD8+ específicas para los productos codificados por el cromosoma H-Y mediante provocación de células T CD4+ reguladoras citolíticas contra uno de los epítopos del aloantígeno Dby, según la presente invención, es suficiente para prevenir el rechazo de órganos vascularizados.

LISTADO DE SECUENCIAS

|    |                                                                  |
|----|------------------------------------------------------------------|
|    | <110> Life Sciences Research Partners vzw Saint-Rémy, Jean-Marie |
| 5  | <120> Péptidos inmunogénicos y su uso en trasplante              |
|    | <130> L4683-PCT                                                  |
|    | <160> 13                                                         |
| 10 | <170> PatenIn version 3.3                                        |
|    | <210> 1                                                          |
|    | <211> 14                                                         |
| 15 | <212> PRT                                                        |
|    | <213> Secuencia Artificial                                       |
|    | <220>                                                            |
| 20 | <223> Péptido                                                    |
|    | <220>                                                            |
|    | <221> misc_feature                                               |
|    | <222> (2)..(3)                                                   |
| 25 | <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural       |
|    | <220>                                                            |
|    | <221> misc_feature                                               |
|    | <222> (5)..(5)                                                   |
| 30 | <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural       |
|    | <220>                                                            |
|    | <221> misc_feature                                               |
|    | <222> (7)..(8)                                                   |
| 35 | <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural       |
|    | <220>                                                            |
|    | <221> misc_feature                                               |
|    | <222> (10)..(10)                                                 |
| 40 | <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural       |
|    | <220>                                                            |
|    | <221> misc_feature                                               |
|    | <222> (12)..(13)                                                 |
| 45 | <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural       |
|    | <400> 1                                                          |
|    | Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys                  |
|    | 1 5 10                                                           |
| 50 | <210> 2                                                          |
|    | <211> 12                                                         |
|    | <212> PRT                                                        |
|    | <213> Secuencia Artificial                                       |
| 55 | <220>                                                            |
|    | <223> Péptido                                                    |
|    | <220>                                                            |
|    | <221> misc_feature                                               |
| 60 | <222> (2)..(3)                                                   |
|    | <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural       |
|    | <220>                                                            |

<221> misc\_feature  
 <222> (6)..(7)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(11)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 10 <400> 2  
  
 Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys  
 1 5 10  
  
 <210> 3  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(3)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(6)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(9)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 35 <400> 3  
  
 Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys  
 1 5 10  
  
 <210> 4  
 <211> 10  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 50  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(5)  
 55 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(8)  
 60 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 4

Cys Xaa Cys Cys Xaa Cys Cys Xaa Cys Cys  
1 5 10

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

<220>  
<223> Péptido

<400> 5

Phe Asn Ser Asn Arg Ala Asn Ser Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido

<400> 6

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

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido

<400> 7

Leu Val Leu Ala Pro Thr Arg Glu Leu  
1 5

<210> 8  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido

<400> 8

Cys Gly His Cys Leu Val Leu Ala Pro Thr Arg Glu Leu  
1 5 10

<210> 9  
<211> 4  
<212> PRT



# ES 2 626 115 T3

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido  
 5 <400> 9  
  
 Cys His Gly Cys  
 1  
  
 10 <210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Péptido  
  
 <400> 10  
  
 Pro Glu Phe Leu Glu Gln Lys Arg Ala  
 1 5  
 20  
  
 <210> 11  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido  
  
 30 <400> 11  
  
 Cys Gly His Cys Pro Glu Phe Leu Glu Gln Lys Arg Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 12  
 35 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 40 <223> Péptido  
  
 <400> 12  
  
 Ala Arg Leu Gln Val Ala Lys Ala Glu  
 1 5  
  
 45 <210> 13  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Péptido  
  
 <400> 13

# ES 2 626 115 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | His | Gly | Cys | Ala | Arg | Leu | Gln | Val | Ala | Lys | Ala | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítipo de célula T de una proteína aloantigénica de un aloinjerto y que comprende (ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C para su uso en la prevención o el tratamiento en un receptor de rechazo de un aloinjerto de mamífero, **caracterizado por que** dicho motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es adyacente a dicho epítipo de célula T, o está separado de dicho epítipo de célula T por un enlazador.
2. El péptido según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho aloinjerto es un injerto de órgano sólido, tal como riñón, pulmón, corazón, hígado, páncreas, hueso o piel, o en el que dicho aloinjerto es un injerto celular, tal como de médula ósea, un injerto de célula de sangre del cordón umbilical, un injerto de célula madre o un injerto de célula de islote pancreático.
3. El péptido según la reivindicación 1 o 2, para su uso según la reivindicación 1, en el que dicha proteína aloantigénica se selecciona del grupo de antígenos de histocompatibilidad secundarios, de antígenos de histocompatibilidad principales o de antígenos específicos de tejido.
4. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C no se produce de manera natural dentro de una región de 11 aminoácidos en el extremo N o C terminal adyacente al epítipo de célula T en dicha proteína aloantigénica.
5. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso según la reivindicación 1, que tiene una longitud entre 12 y 50 aminoácidos.
6. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso según la reivindicación 1, en el que:
  - dicho motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C está posicionado en el extremo N terminal del epítipo de célula T, o
  - en el que al menos una X en dicho motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es Gly, Ala, Ser o Thr, o
  - en el que al menos una X en dicho motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es His o Pro, o
  - en el que al menos una C en dicho motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C está metilado.
7. Un método para obtener una población de células T citotóxicas específicas de antígeno de aloinjerto, comprendiendo el método las etapas de:
  - proporcionar células de sangre periférica;
  - poner en contacto dichas células con un péptido inmunogénico que comprenda (i) un epítipo de célula T de una proteína aloantigénica de un aloinjerto y (ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, estando el motivo adyacente al epítipo de célula T separado del epítipo de célula T por un enlazador;
  - y
  - expandir dichas células en presencia de IL-2.
8. Un método no terapéutico para obtener una población de células T citotóxicas específicas de antígeno de aloinjerto, comprendiendo el método las etapas de:
  - a) proporcionar un péptido inmunogénico que comprenda (i) un epítipo de célula T de una proteína aloantigénica de un aloinjerto y (ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, estando el motivo adyacente al epítipo de célula T o separado del epítipo de célula T por un enlazador;
  - b) administrar dicho péptido inmunogénico a un sujeto con un propósito no terapéutico; y
  - c) obtener de dicho sujeto dicha población de células T específicas de antígeno de aloinjerto.
9. Una población de células T citotóxicas específicas de antígeno de aloinjerto, con supresión de respuestas inmunitarias a aloantígenos, obtenida por el método según la reivindicación 7 u 8.
10. Una población de células T citotóxicas específicas para un aloantígeno de un aloinjerto según la reivindicación 9 para su uso en la prevención o el tratamiento en un receptor del rechazo de dicho aloinjerto.
11. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso según la reivindicación 1 o el método según la reivindicación 7 u 8, en el que dicha proteína aloantigénica o el antígeno de aloinjerto es el antígeno Dby codificado por el cromosoma H-Y.
12. Un péptido inmunogénico aislado que comprende:
  - (1) un epítipo de célula T del antígeno Dby, y
  - (2) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, estando el motivo adyacente al epítipo de célula T o separado del epítipo de célula T por un enlazador.