



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 347**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08002817 .8**
96 Fecha de presentación : **17.08.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1918298**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2008**

54 Título: **Péptido.**

30 Prioridad: **21.08.2000 GB 0020618**
14.06.2001 GB 0114547

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2011

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

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

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un péptido y a su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple. La presente invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende varios de estos péptidos tolerogénicos.

ANTECEDENTES

En una respuesta inmunitaria adaptativa, los linfocitos T pueden reconocer los epítomos internos del antígeno de una proteína. Las células presentadoras de antígeno (APC) toman los antígenos de la proteína y los degradan en pequeños fragmentos de péptidos. Un péptido se puede unir a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en una molécula de clase I ó II en el interior de la célula y ser transportado a la superficie celular. Cuando se presente a la superficie celular conjuntamente con una molécula del MHC, el péptido puede ser reconocido por una célula T (a través del receptor de la célula T (TCR), en cuyo caso el péptido es un epítomo de la célula T.

Los epítomos de la célula T juegan un papel principal en la respuesta inmunitaria adaptativa a cualquier antígeno, tanto si es propio como extraño. El papel principal que desempeñan los epítomos de la célula T en las enfermedades de hipersensibilidad (que incluyen alergia, enfermedades autoinmunes y rechazo de trasplantes) se ha demostrado mediante la utilización de modelos experimentales. Es posible inducir enfermedades inflamatorias o alérgicas mediante una inyección de péptidos sintéticos (basados en la estructura de los epítomos de la célula T) junto con un adyuvante.

Por el contrario, se ha demostrado que es posible inducir una tolerancia inmunológica para epítomos de péptidos concretos mediante la administración de epítomos de péptidos en forma soluble. Se ha demostrado que la administración de antígenos de péptidos solubles es un mecanismo eficaz para la inhibición de enfermedades en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE- a model for multiple sclerosis (MS)) (Metzler y Wraith (1993) Int. Immunol. 5:1159-1165; Liu y Wraith (1995) Int. Immunol. 7:1255-1263; Anderton y Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28:1251-1261); y en modelos experimentales de artritis, diabetes, y uveoretinitis (revisada en Anderton y Wraith (1998) como anteriormente). Esto también se ha demostrado como un mecanismo para el tratamiento de enfermedad en curso en EAE (Anderton y Wraith (1998) como se ha indicado anteriormente).

La utilización de péptidos tolerogénicos para el tratamiento o la prevención de enfermedades ha concentrado una atención considerable. Una de las razones para ello es que se ha demostrado que algunos epítomos tolerogénicos pueden actuar disminuyendo las respuestas de las células T para distintos antígenos dentro del mismo tejido. Este fenómeno, conocido como "supresión específica" significa que debería ser posible inducir la tolerancia a más de un epítomo (preferentemente todos los epítomos) en un antígeno en particular, y a más de un antígeno para una enfermedad en particular, utilizando un péptido tolerogénico concreto (Anderton y Wraith (1998) como anteriormente). Esto evitaría la necesidad de identificar todos los antígenos patógenos en una enfermedad concreta.

Los péptidos también son una buena opción para la terapia debido a su coste relativamente bajo y al hecho de que los análogos de péptido se pueden producir con propiedades inmunológicas alteradas. Por lo tanto, los péptidos se pueden modificar para alterar sus interacciones tanto con MHC como con TCR.

Un posible problema con este enfoque es que se ha demostrado que no todos los péptidos que actúan como epítomos de la célula T son capaces de inducir tolerancia. El péptido de la proteína básica de la mielina (MBP) 89-101 es un antígeno inmunodominante después de la inmunización y también es un inmunogeno eficaz tanto en términos de activador de la reactividad de la célula T como de inducción de la EAE. Sin embargo, este péptido ha demostrado ser ineficaz para la inducción de la tolerancia cuando se administra en solución (Anderton y Wraith (1998) como se ha indicado anteriormente).

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

Si existiera una explicación racional de por qué sólo una proporción de epítomos de péptidos son capaces de inducir la tolerancia, esto facilitaría la selección de péptidos tolerogénicos útiles para el tratamiento y la prevención de la esclerosis múltiple.

SUMARIO DE LA INVENCION

En el contexto de la presente invención se ha demostrado que si un epítomo de péptido presenta un tamaño adecuado para ser presentado por una APC inmadura sin procesamiento del antígeno, puede inducir la tolerancia inmunológica. La observación de que algunos epítomos de células T son tolerogénicos y otros no pueden inducir la tolerancia se puede explicar por tanto por el hecho de que algunos epítomos necesitan más procesamiento antes de que sean capaces de ser presentados por una molécula de MHC. Estos epítomos que necesitan más procesamiento no inducen tolerancia cuando se administran en forma soluble, a pesar de su capacidad de inducir enfermedades cuando se inyectan en combinación con un adyuvante.

Los epítomos que no requieren un procesamiento posterior son capaces de inducir tolerancia, y se han clasificado como "apítomos" (Antigen Processing Independent epiTOPES) (epiTOPOS independientes del procesamiento del antígeno) en el contexto de la presente invención.

Este descubrimiento proporciona un procedimiento de base de reglas para la selección de epítomos tolerogénicos de células T que evita la necesidad de examinar la capacidad tolerogénica de un péptido *in vivo*. Esto resulta particularmente ventajoso en el desarrollo de estrategias para tratamiento o la prevención de enfermedades para las que

no se dispone de modelos animales. Incluso para las enfermedades en las que se dispone de modelos animales, el procedimiento de selección debería simplificar y hacer más seguro el desarrollo de las composiciones inductoras de tolerancia, porque proporciona un mecanismo por el cual la capacidad de inducción de tolerancia de un péptido se puede probar en las células T humanas (reconociendo el antígeno conjuntamente con las moléculas MHC humanas) *in vitro*, antes de su utilización *in vivo*.

En un primer aspecto, por consiguiente, la presente invención proporciona un péptido tolerogénico humano, capaz de unirse a una molécula MHC de clase I ó II sin procesamiento posterior del antígeno, para su utilización en el tratamiento y/o prevención de la esclerosis múltiple, en el que el péptido se selecciona de entre los péptidos siguientes de la proteína básica de la mielina (MBP): 83-99 y 131-145.

Se conocen varios procedimientos en la técnica para el cribado de péptidos que pueden actuar como epítomos de las células T para un antígeno determinado. Comúnmente, por consiguiente, el procedimiento se utilizará para seleccionar un péptido tolerogénico a partir de varios péptidos que comprenden cada uno un epítomo de células T.

Para investigar si un péptido es capaz de unirse a una molécula del MHC de clase I ó II sin procesamiento posterior, se puede estudiar la capacidad del péptido de unirse a una molécula del MHC de clase I ó II utilizando un sistema de presentación independiente del procesamiento del antígeno (APIPS). En un aspecto preferido, el procedimiento comprende, por consiguiente, las siguientes etapas:

- (i) tratamiento de un APIPS con un péptido; y
- (ii) análisis de la unión del péptido a las moléculas del MHC de clase I ó II dentro del APIPS

En el contexto de la presente invención se ha conseguido identificar varios epítomos para la proteína básica de la mielina, que es un autoantígeno de la esclerosis múltiple.

Es conocido que algunos péptidos son capaces de inducir tolerancia para otros epítomos del mismo antígeno, e incluso otros epítomos de un antígeno distinto (mediante el fenómeno conocido como supresión específica). Sin embargo, en el contexto de la presente invención se ha previsto que para suprimir adecuadamente todas las células T autoreactivas, sería ventajoso administrar al paciente una combinación de varios epítomos para el tratamiento y/o prevención de la esclerosis múltiple. En un segundo aspecto, por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una variedad de péptidos según el primer aspecto de la invención, estando cada péptido basado en un epítomo de la célula T.

Una estrategia general para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad en un sujeto puede comprender las etapas siguientes:

- (i) identificación de un antígeno para la enfermedad

- (ii) identificación de un epítopo para el antígeno; y
- (iii) administración del epítopo al sujeto.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10

La figura 1 representa un ejemplo típico del perfil cinético para el derivado de proteína purificada (PPD) de *Mycobacterium tuberculosis* y la MBP en pacientes con esclerosis múltiple (EM) y en individuos sanos. Se comprueba la capacidad de proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un paciente con EM (A) y un individuo normal (B) en presencia de PPD y la MBP total; el perfil cinético de la respuesta de proliferación a la MBP se compara con el PPD del antígeno secundario.

15

La figura 2 es una tabla que resume las respuestas PBMC a la MBP y de sus péptidos en pacientes con EM. Algunos individuos son analizados en tres periodos de tiempo distintos, con un periodo de aproximadamente 4 a 7 meses entre cada punto.

20

La figura 3 es una tabla que resume las respuestas de PBMC a la MBP y a péptidos de la MBP en individuos sanos. Transcurrieron entre 4 y 7 meses entre cada punto.

25

La figura 4 representa un ejemplo de un paciente con EM (EM 49) que responde a múltiples péptidos en 2 periodos de tiempo distintos, pero para quién el perfil de reconocimiento durante el segundo punto, medido 4 meses después, difiere significativamente. Las PBMC se cultivaron en presencia de MBP y un panel de péptidos atravesando la longitud completa de la MBP, y se midió la proliferación mediante el consumo de ³H-timidina. La amplia respuesta proliferativa de células T observada en el primer periodo fue significativamente diferente a la respuesta medida 7 meses después (segundo periodo).

30

35

La figura 5 representa un ejemplo de un paciente cuya amplia respuesta de epítopos (primer periodo) retrocede (segundo periodo) y reaparece después de un periodo de doce meses (tercer punto).

40

La figura 6 representa un mapa de la especificidad precisa de las regiones de los péptidos identificados en el ensayo de la respuesta cinética que se obtiene a través de la utilización de TTC generada por pacientes con EM e individuos sanos. La mayoría de los péptidos utilizados en los ensayos de exploración son de 15-mer de longitud, sin embargo, unos pocos son de 10-mer, y 1 péptido es de 17-mer. La especificidad de cada TTC se comprueba por lo menos dos veces.

45

La figura 7a es una tabla que representa la caracterización de los epítopos de las células T con la proteína básica de la mielina reconocida por linfocitos T en pacientes con EM.

La figura 7b es una tabla que muestra que todos los epítopos de las células T no son necesariamente presentados mediante unos APC fijos y por consiguiente no todos

son epítomos.

Las figuras 8 y 9 representan la presentación de varios péptidos de MBP para clones de células T mediante un APC vivo y fijo. Figura 8A-30-44, figura 8B-110-124, figura 9A-130-144, figura 9B-156-170.

La figura 10 es una tabla que representa los valores pico del índice de estimulación (IE) para la MBP y péptidos de la MBP en pacientes con EM obtenidos en tres periodos distintos. Las muestras para el segundo punto de tiempo se recogieron 4-8 meses después del primer periodo de tiempo, y las muestras para el tercer periodo se obtuvieron 3-5 meses después del segundo periodo. Se midió la cpm de fondo de cada día y ésta estaba comprendida entre 80-700 cpm; una respuesta positiva (negrita) se definió según $IE > 3$ y $\delta cpm > 1000$. (No fue posible recoger muestras para los tres puntos de los pacientes EM19 y EM67.)

La figura 11 es una tabla que representa los valores pico del índice de estimulación (IE) para la MBP y los péptidos de la MBP en individuos sanos. Se midió la cpm de fondo de cada día y ésta estaba comprendida entre 80-700 cpm; una respuesta positiva (negrita) se definió según $IE > 3$ y $\delta cpm > 1000$.

La figura 12 muestra la respuesta de las células T aisladas de un ratón transgénico DR2:MBP82-100 en la presentación de péptidos de la MBP anidados en la región 77-100 mediante APC.

La figura 13 muestra la respuesta del clon de la célula T MS17:A3 en la presentación de péptidos de la MBP anidados en la región 125-148 mediante APC.

La figura 14 es una ilustración del reconocimiento del epítipo de la célula T dentro de la secuencia de la MBP 89-101. Existen tres epítomos distintos pero superpuestos de las células T dentro de la secuencia: 89-94, 92-98 y 95-101. Se muestra el potencial para la segmentación entre los residuos 94 y 95 mediante la acción de la asparaginil endopeptidasa (AEP).

La figura 15 muestra la capacidad de los péptidos de la MBP 87-96 (A) y 89-101 (B) para actuar como un epítipo para las células T que responden al epítipo 89-94.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento para la selección de un péptido tolerogénico.

Tolerancia

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tolerogénico" significa capaz de inducir tolerancia.

La tolerancia es la incapacidad de responder a un antígeno. La tolerancia a los propios antígenos es una característica esencial del sistema inmunológico, cuando ésta se

5 pierde, se puede dar una enfermedad autoinmune. El sistema inmunológico adaptativo debe mantener la capacidad de responder a una enorme variedad de agentes infecciosos mientras que impide un ataque autoinmune de los propios antígenos presentes dentro de sus propios tejidos. Esto está controlado en gran parte por la sensibilidad de los linfocitos T inmaduros a la muerte celular apoptótica en el timo (tolerancia central). Sin embargo, no todos los antígenos propios son detectados en el timo, de forma que la muerte de timocitos autoreactivos permanece incompleta. También existen por consiguiente unos mecanismos mediante los cuales se debe adquirir tolerancia por parte de los linfocitos T autoreactivos maduros en los tejidos periféricos (tolerancia periférica). En Anderton et. al. 10 (1999) (*Immunological Reviews* 169:123-137) se presenta una revisión de los mecanismos de la tolerancia central y periférica.

15 La tolerancia puede ser debida a la inducción de anergia o bien estar caracterizada por ella en por lo menos una porción de las células T CD4+. Para activar una célula T un péptido se ha de asociar con un APC "profesional" capaz de suministrar dos señales a las células T. La primera señal (señal 1) es suministrada por el complejo péptido-MHC en la superficie celular del APC y es recibida por la célula T a través del TCR. La segunda señal (señal 2) es suministrada por moléculas coestimuladoras en la superficie del APC, como CD80 y CD86, y es recibida por CD28 en la superficie de la célula T. Se cree que cuando 20 una célula T recibe la señal 1 en ausencia de la señal 2, no se activa y, de hecho, se vuelve anérgica. Las células T anérgicas son refractarias a un estímulo antigénico posterior, y pueden ser capaces de suprimir otras respuestas inmunes. Se cree que las células T anérgicas están implicadas en la mediación de la tolerancia de la células T.

25 Sin la intención de vincularse a una teoría, en el contexto de la presente invención se predice que los péptidos que requieren un procesamiento antes de que se puedan presentar conjuntamente con moléculas del MHC no inducen tolerancia porque deben ser procesados por células que presentan antígenos maduros. Las células que presentan antígenos maduros (como macrófagos, células B y células dendríticas) son capaces de 30 procesar el antígeno, pero también de suministrar ambas señales 1 y 2 a una célula T, llevando a una activación de la célula T. Los epítomos, por otra parte, serán capaces de unir un MHC de clase II a una APC inmadura. Por consiguiente, estarán presentes en las células T sin coestimulación, conduciendo a una anergia de la célula T y tolerancia.

35 Por supuesto, los epítomos también son capaces de unirse a moléculas MHC en la superficie celular de una APC madura. Sin embargo, el sistema inmunológico contiene una cantidad mayor de APC inmadura que madura (se ha sugerido que se activan menos del 10% de las células dendríticas, Summers et. al. (2001) *Am. J. Pathol.* 159: 285-295). La posición por defecto para un epítomo será, por consiguiente, anergia/tolerancia, más que 40 activación.

45 Se ha demostrado que, cuando la tolerancia se induce mediante la inhalación del péptido, la capacidad de proliferación del antígeno específico CD4+ de la célula T se reduce. También, la producción de IL-2, IFN- γ y IL-4 por parte de estas células está disminuida pero la producción de IL-10 aumenta. La neutralización de la IL-10 en ratones en un estado de tolerancia inducida por el péptido ha demostrado que restablece completamente la susceptibilidad a la enfermedad. Se ha propuesto que una población de células reguladoras persiste en el estado de tolerancia que produce la IL-10 y media en la regulación inmunológica (Burkhart et. al. (1999) *Int. Immunol.* 11: 1625-1634).

La inducción a la tolerancia se puede monitorizar, por consiguiente, mediante varias técnicas que incluyen:

- 5 (a) susceptibilidad reducida de contraer la enfermedad para la que el péptido es un epítipo diana *in vivo*;
- (b) la inducción de anergia en las células T CD4+ (que se puede detectar mediante una estimulación posterior *in vitro*);
- 10 (c) cambios en la población de la célula T CD4+, que incluye
 - (i) reducción de la proliferación;
 - 15 (ii) disminución de la producción de IL-2, IFN- γ y IL-4; y
 - (iii) aumento de la producción de IL-10.

20 *Epítopos independientes del procesamiento de antígenos (APÍTOPOS)*

El procedimiento de la presente exposición comprende la etapa de selección de un péptido que puede unirse a una proteína MHC de clase I ó II sin procesamiento posterior. Estos péptidos son denominados en la presente memoria como “apítopos” (epítopos independientes del procesamiento de antígenos).

La presentación de péptidos en la superficie celular derivada de un antígeno dado no es aleatoria y tiende a estar dominada por un pequeño número de epítopos que surgen frecuentemente. La dominancia de un péptido particular dependerá de muchos factores, como la afinidad relativa para unirse a la molécula MHC, el punto espacio-temporal de generación dentro de la APC y la resistencia a la degradación. La jerarquía del epítipo para un antígeno puede cambiar con la progresión de una respuesta inmunológica, que presenta unas implicaciones importantes para la autotolerancia y la autoinmunidad. Las regiones inmunodominantes determinantes son probablemente tolerógenos buenos. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el apítipo de la presente invención está basado en un epítipo dominante.

Sin embargo, después de una respuesta inmunológica primaria a los péptidos inmunodominantes, la “propagación” del epítipo puede darse para determinantes subdominantes (Lehmann et. al. (1992) Nature 358: 155-157). La presentación de epítopos subdominantes puede ser importante para activar la autoinmunidad. El apítipo de la presente invención puede, por consiguiente, estar basado en un epítipo subdominante.

Por cada antígeno concreto, también pueden existir epítopos crípticos. Los epítopos crípticos son los que pueden estimular una respuesta de la célula T cuando se administran como un péptido pero que no pueden producir esta respuesta cuando se administran como un antígeno completo. Puede ser que durante el procesamiento del antígeno en péptidos en la APC el epítipo críptico se destruya. En el contexto de la

presente invención se ha demostrado que el péptido 92-98 es un péptido críptico para la MBP (Ejemplo 2C). Curiosamente existe un punto de segmentación putativo para la asparaginil endopeptidasa en la región de este péptido, que puede significar que durante el procesamiento natural, no se genera por parte de la APC ningún péptido que contiene esta región.

Un epítipo críptico puede actuar como un apítipo *in vitro*, en el sentido de que puede ser capaz de unirse a una molécula MHC sin procesamiento posterior, y de inducir anergia en una célula T que reconoce el epítipo críptico. Sin embargo, sería improbable que este apítipo fuera terapéuticamente útil porque sería incapaz de inducir tolerancia en las células T que reconocen un epítipo del antígeno procesado de forma natural.

Los epítipos para un antígeno se pueden identificar midiendo la respuesta de la célula T a los péptidos superpuestos que atraviesan todo el antígeno (ver a continuación) cuando son presentados por la APC. Estos estudios normalmente dan como resultado "grupos anidados" de péptidos, y el epítipo mínimo para una línea/clon de células T se puede evaluar midiendo la respuesta a los péptidos truncados.

No se puede asumir que un epítipo mínimo de un antígeno se comportará como un apítipo. Puede ser posible que los aminoácidos que flanquean el epítipo mínimo sean necesarios para una unión óptima al MHC. El apítipo se debería diseñar para cubrir la posibilidad de que existan muchas diferencias sutiles entre los epítipos mínimos de diferentes clones de células T.

Se debería destacar que puede no ser posible identificar un apítipo para todos los epítipos. Existen claras evidencias de que algunos epítipos se unen al MHC de una forma que depende de la carga de MHC en los endosomas y por tanto necesitan procesamiento (Viner et. al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 2214-2218). Esta es otra razón por la que no se puede asumir que cada epítipo mínimo se comportará inevitablemente como un apítipo.

Identificación de péptidos que contienen epítipos de células T

Existen varios procedimientos conocidos en la técnica para identificar los epítipos de la célula T en un antígeno concreto.

Los epítipos procesados de forma natural se pueden identificar mediante un análisis por espectrometría de masa de péptidos eluidos de una APC cargada de antígeno. Estas son APC que o bien se han estimulado para coger un antígeno, o bien se han forzado para producir la proteína intracelularmente mediante transformación con el gen adecuado. Normalmente, las APC se incuban con proteína en solución o dirigidos adecuadamente a la superficie celular de la APC. Después de la incubación a 37°C las células se lisan en detergente y se purifica la proteína de clase II mediante, por ejemplo, cromatografía por afinidad. El tratamiento del MHC purificado con un medio químico adecuado (por ejemplo, condiciones ácidas) da como resultado la elución de péptidos del MHC. Este grupo de péptidos se separa y el perfil se compara con el péptido de la APC control tratada de la misma manera. Se analizan los picos exclusivos de las células que expresan/alimentan la proteína (por ejemplo, mediante espectrometría de masa) y se identifican los fragmentos de péptido. Este procedimiento genera normalmente

información sobre el rango de péptidos (normalmente encontrados en “grupos anidados”) generado a partir de un antígeno concreto mediante procesamiento del antígeno.

5 Otro procedimiento para identificar epítomos es el de cribar una biblioteca sintética de péptidos que superponen y extienden la longitud del antígeno en un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, se pueden utilizar péptidos que presentan 15 aminoácidos en longitud y que se superponen mediante 5 ó 10 aminoácidos. Los péptidos se comprueban en un sistema con la presentación de antígenos que comprende células presentadoras de antígenos y células T. Por ejemplo, el sistema de presentación de antígenos puede ser un preparado de esplenocito murino, un preparado de células humanas de la amígdala o PBMC. Alternativamente, el sistema con presencia de antígenos puede comprender una línea/clon de la célula T y/o un antígeno concreto que presenta el tipo de célula.

15 La activación de la célula T se puede medir a través de la proliferación de la célula T (por ejemplo, utilizando la incorporación de ³H-timidina) o la producción de citoquina. La activación de las células T CD4+ de tipo TH-1 puede, por ejemplo, ser detectada a través de la producción de IFN γ que se puede detectar mediante técnicas habituales, como un ensayo ELISPOT.

20 Los estudios sobre péptidos solapados indican normalmente el área del antígeno en la que se encuentra el epítomo. Se puede evaluar después el epítomo mínimo para una célula T particular midiendo la respuesta a los péptidos truncados. Por ejemplo, si se obtiene una respuesta para el péptido que comprende los residuos 1-15 en la biblioteca solapada, los grupos que están truncados en ambos extremos (es decir, 1-14, 1-13, 1-12, etc. y 2-15, 3-15, 4-15, etc.) se pueden utilizar para identificar el epítomo mínimo.

30 En el contexto de la presente invención se predice que la identificación de la regiones inmunodominantes de un antígeno utilizando ensayos *in vitro* (especialmente los que utilizan líneas celulares T) presentará un patrón irregular de reactividad del péptido. En el estudio sobre la identificación de epítomos de la MBP que se describe en los ejemplos, los inventores utilizaron un ensayo de respuesta cinética en el que la proliferación de PBMC de pacientes con EM e individuos sanos se mide en relación a una biblioteca de péptidos que se solapan. Este ensayo está basado en el hallazgo que, aunque las células T de individuos normales y de pacientes con EM responden de una forma similar a un antígeno de proteína purificado, responden de distinta manera a los péptidos basados en la secuencia de la MBP. Las células T de los pacientes con EM responden con mayor magnitud y una cinética más rápida a los antígenos péptidos cuando se comparan con donantes sanos normales. Esto permite la exploración y la identificación del péptido al que un paciente concreto responde en un momento dado. En el estudio descrito en el presente documento, este enfoque ha revelado varias regiones que contienen epítomos que no se habían identificado utilizando técnicas convencionales. Además, se ha demostrado que el reconocimiento de células T presenta un patrón cíclico, que aparece en un momento, que retrocede y posteriormente, reaparece más tarde.

45 El ensayo cinético descrito en la presente memoria proporciona una herramienta valiosa porque revela el epítomo al que responde un paciente en un momento concreto. Esta información se puede utilizar para confeccionar un enfoque terapéutico de administración de epítomos para un paciente concreto identificando y administrando un apítomo para el epítomo pertinente (si es que existe uno). Esta información también puede

permitir formar un patrón general para la progresión de la enfermedad, de forma que la composición terapéutica se pueda diseñar para incluir los apítopos a los epítopos que tengan posibilidades de estar presentes en una etapa concreta durante la enfermedad.

5 *Sistemas de presentación independiente del procesamiento de antígenos (APIPS)*

10 Cuando ya se ha identificado un epítopo, la etapa siguiente es investigar si también se comporta como un apítopo. Un apítopo ha de presentarse a las células T sin necesidad de un procesamiento del antígeno. Al haberse identificado los péptidos que contienen epítopos de células T, los apítopos se pueden identificar utilizando un sistema sin procesamiento. Se pueden ensayar los péptidos truncados y los péptidos análogos para encontrar activación utilizando un sistema de presentación independiente del procesamiento de antígenos (APIPS).

15 Ejemplos de APIPS incluyen:

- a) APC fijada (con o sin anticuerpos para CD28);
- 20 b) Membranas lipídicas que contienen moléculas MHC de Clase I ó II (con o sin anticuerpos para CD28); y
- c) MHC purificado natural o recombinante en forma de placa (con o sin anticuerpos para CD28).

25 Es conocido que se utiliza APC fijada para investigar las respuestas de las células T, por ejemplo, en estudios para investigar el epítopo mínimo en un polipéptido, midiendo la respuesta a los péptidos truncados (Fairchild et. al. (1996) Int. Immunol. 8: 1035-1043). La APC se puede fijar utilizando, por ejemplo, formaldehído (normalmente para formaldehído) o glutaraldehído.

30 Las membranas lipídicas (que pueden ser membranas planas o liposomas) se pueden preparar utilizando lípidos artificiales o pueden ser membranas plasmáticas o fracciones de microsoma de la APC.

35 En su utilización, el APIPS se puede aplicar a los pocillos en una placa de cultivo tisular. Después, se añaden los antígenos de péptidos y se detecta la unión al péptido de la porción de MHC del APIPS mediante la adición de líneas o clones de células T seleccionadas. La activación de la línea o clon de la célula T se puede medir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, a través de la incorporación de ³H-timidina o la secreción de citoquina.

40

Péptidos

45 La invención se refiere a un péptido para su utilización en la prevención y/o el tratamiento de la esclerosis múltiple. El término "péptido" se utiliza en el sentido normal que significa una serie de residuos, normalmente aminoácidos L, conectados entre sí habitualmente mediante enlaces peptídicos entre los grupos α-amino y carboxilo de los aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y análogos sintéticos del péptido.

Un péptido para la utilización en la prevención y/o tratamiento de la esclerosis múltiple puede ser de cualquier longitud capaz de unirse a una molécula MHC de clase I ó II sin procesamiento posterior.

5

Los péptidos que se unen a las moléculas MHC de clase I son normalmente de una longitud de 7 a 13 aminoácidos, más normalmente de 8 a 10 aminoácidos. La unión del péptido se establece en sus dos extremos mediante el contacto entre átomos en la cadena central del péptido y los sitios invariantes en la ranura de la unión del péptido de todas las moléculas MHC de clase I. Existen sitios que no varían en ambos extremos de la ranura que une el amino y carboxilo terminales del péptido. Las variaciones de la longitud del péptido las proporciona un enroscamiento del esqueleto del péptido, frecuentemente una prolina o residuos de glicina que permiten la flexibilidad necesaria.

10

15

Los péptidos que se unen a las moléculas MHC de clase II son normalmente de entre 8 a 20 aminoácidos de longitud, más normalmente de entre 10 a 17 aminoácidos de longitud, o pueden ser más largos. Estos péptidos yacen en una formación extendida a lo largo de la ranura de la unión del péptido a las MHC II que (al contrario que la ranura de la unión del péptido a las MHC de clase I) está abierta en ambos extremos. El péptido se mantiene colocado en su lugar principalmente mediante contactos de átomos de la cadena principal con residuos conservados presentes en la ranura de unión del péptido.

20

El péptido para su utilización en la presente invención se puede elaborar utilizando procedimientos químicos (Peptide Chemistry, A Practical Textbook, Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlín). Por ejemplo, los péptidos se pueden sintetizar mediante técnicas de fase sólida (Roberge JY et. al. (1995) Science 269: 202-204), fragmentaciones de la resina, y purificado mediante la preparación de una cromatografía líquida de alto rendimiento (por ejemplo, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New Cork NY). Se puede conseguir una síntesis automatizada utilizando, por ejemplo el Sintetizador Peptídico ABI 43 1 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

25

30

Alternativamente, el péptido se puede obtener mediante mecanismos recombinantes, o mediante la escisión de un polipéptido más largo. Por ejemplo, el péptido se puede obtener mediante la fragmentación del antígeno diana. la composición de un péptido se puede confirmar mediante un análisis de aminoácidos o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman).

35

En una forma de realización preferida, el péptido es derivable de un antígeno diana. Un antígeno diana es una molécula (por ejemplo, una proteína o glicoproteína) que es procesada por la APC y reconocida por las células T durante el transcurso de la enfermedad. El antígeno diana dependerá, por supuesto, de la enfermedad diana. Preferentemente, el péptido es derivable de un fragmento del antígeno que aparece por procesamiento natural del antígeno por una APC.

40

45

Por razones prácticas, existen otras características que el péptido debería presentar. Por ejemplo, el péptido debería ser soluble a una concentración que permita su uso *in vivo*. Preferentemente, el péptido debería ser soluble a concentraciones de hasta 0,5 mg/ml, más preferentemente el péptido debería ser soluble a concentraciones de

hasta 1 mg/ml, y más preferentemente el péptido debería ser soluble a concentraciones de hasta 5 mg/ml,

5 Para la administración intranasal el volumen máximo de la dosis que se puede tomar utilizando los procedimientos actuales es de aproximadamente 200 µl por orificio nasal. Si el péptido es soluble a 1 mg/ml, una dosis doble en cada orificio nasal permite administrar 800 µg al paciente. No es habitual administrar más de 5 mg/ml en ninguna dosis individual.

10 También es importante que el péptido sea suficientemente estable *in vivo* para ser terapéuticamente útil. En el contexto de la presente invención se ha descubierto que en *in vivo*, 30 minutos después de la administración la cantidad total de una prueba del péptido de ensayo cae aproximadamente el 50%, 4 horas después de la administración la cantidad cae aproximadamente el 30%, pero que después de 5 días el péptido todavía es detectable (a aproximadamente 5%). La vida media del péptido *in vivo* debería ser de por lo menos 10 minutos, preferentemente de por lo menos 30 minutos, más preferentemente de por lo menos 4 horas, más preferentemente todavía de por lo menos 24 horas.

20 En el contexto de la presente invención se ha descubierto que después de la administración intranasal, la cantidad de péptido en el nódulo linfático alcanza su pico aproximadamente 4 horas después de la administración, sin embargo el péptido todavía es detectable (a niveles de aproximadamente 5% como máximo) después de 5 días. Preferentemente el péptido es suficientemente estable para estar presente a una concentración terapéuticamente activa en el nódulo linfático drenado el tiempo suficiente para ejercer un efecto terapéutico.

25 El péptido también debería presentar una buena biodisponibilidad *in vivo*. El péptido debería mantener una conformación *in vivo* que le permita unirse a una molécula MHC en la superficie celular sin obstáculos.

30 Es probable que un apítopo para un MHC de clase II sea particularmente útil en las enfermedades que están mediadas por las respuestas de las células T CD4+. Por ejemplo, las enfermedades que se originan o se mantienen debido a una respuesta inadecuada o excesiva de las células T CD4+.

35 El péptido es para su utilización en el tratamiento y/o prevención de la esclerosis múltiple (EM). La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por múltiples lesiones desmielinizantes a lo largo de la sustancia blanca del SNC y que tiene lugar en varios sitios y momentos (McFarlin and MFarland, 1982 New England J. Medicine 307: 1183-1188 y 1246-1251). Se cree que la EM está mediada por células T autoreactivas.

40 El péptido puede ser derivable de uno de los autoantígenos, en particular la proteína básica de la mielina (MBP) o la proteína proteolipídica (PLP). La MBP es posiblemente más apropiada que la PLP, porque la PLP es altamente hidrofóbica y los péptidos derivados de ella tienden a formar grupos compactos. La MBP es inmunogénica y los linfocitos T específicos de la MBP presentan una actividad encefalogénica en animales (Segal et. al., 1994 J. Neuroimmunol. 51: 7-19; Voskuhl et. al., 1993 J. neuroimmunol. 42: 187-192; Zamvil et. al., 1985 Nature 317: 355-8).

Los apítopos de MHC de clase I se pueden utilizar, por ejemplo, para modificar las respuestas de un CD8+ antivírico de una forma tolerogénica.

5 *Composición farmacéutica*

En el contexto de la presente invención está previsto que, a pesar de la “supresión específica”, puede ser necesario fijar como objetivo varios clones distintos de células T para inducir eficazmente una tolerancia. Por consiguiente, se pueden administrar varios péptidos a un individuo para prevenir o tratar una enfermedad.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento/prevenición de la esclerosis múltiple que comprende varios apítopos, en los que por lo menos uno de los péptidos es un péptido de la MBP 83-99, o un péptido de la MBP 131-145. La composición farmacéutica puede comprender, por ejemplo, entre 2 y 50 apítopos, preferentemente entre 2 y 15 apítopos. Los apítopos pueden ser derivados del(de los) mismo(s) antígeno(s) diana o de uno distinto. Preferentemente, los apítopos son o bien todos capaces de unirse a una MHC de clase I, o bien todos capaces de unirse a una MHC de clase II, sin procesamiento posterior. En una forma de realización preferida, todos los apítopos en la composición farmacéutica son capaces de unirse a una MHC ya sea de clase I o de clase II sin procesamiento posterior.

La composición farmacéutica puede presentarse en forma de equipo, en el que alguno o cada uno de los apítopos se proporciona separadamente para una administración simultánea, separada o secuencial.

Alternativamente (o además), si la composición farmacéutica (o cualquiera de sus partes) se ha de administrar en dosis múltiples, cada dosis se puede empaquetar separadamente.

La composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del apítopo, o de cada apítopo, y opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

También, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el apítopo, o cada apítopo, se puede mezclar con cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento o agente(s) de solubilización aceptable.

40 *Administración*

El péptido se debería administrar en una forma soluble en ausencia de un adyuvante.

Preferentemente, el péptido se administra a través de la vía mucosa.

Los estudios han demostrado que el péptido, cuando se administra en una forma soluble intraperitonealmente (i.p.), intravenosamente (i.v.) o intranasalmente (i.n.) u oralmente puede inducir tolerancia a la célula T (Anderton y Wraith (1998) como anteriormente; Liu y Wraith (1995) como anteriormente; Metzler y wraith (1999)

Immunology 97: 257-263).

Preferentemente el péptido se administra intranasalmente.

5 Los estudios en ratones han demostrado que la duración de la administración del péptido requerida para inducir tolerancia depende de la frecuencia del precursor de las células T en el recipiente (Burkhart et. al. (1999) como anteriormente). En muchos estudios experimentales, se ha demostrado que se requieren repeticiones de la dosis del péptido para inducir tolerancia (Burkhart et. al. (1999) como anteriormente). La dosis exacta y el número de dosis del péptido dependerán, por lo tanto, del individuo, sin embargo, en una forma de realización preferida se administran varias dosis.

15 Si se administran varios péptidos simultáneamente, pueden estar en la forma de un "cóctel" que es adecuado para la administración de dosis únicas o múltiples. Alternativamente puede ser preferible administrar dosis múltiples pero variar las concentraciones relativas de los péptidos entre las dosis.

20 En una forma de realización preferida, se puede seguir un protocolo de "escalado de dosis", en el que se administra al paciente varias dosis en concentraciones ascendentes. Este enfoque se ha utilizado, por ejemplo, para péptidos de la fosfolipasa A2 en aplicaciones inmunoterapéuticas para combatir la alergia al veneno de la abeja (Müller et. al. (1998) J. Allergy Clin. Immunol. 101: 747-754 y Akdis et. al. (1998) J. Clin. Invest. 102 : 98-106).

25

EJEMPLOS

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

EJEMPLO 1 – Identificación de epítomos de células T en MBP

35 *Materiales y métodos*

Antígenos

40 Se prepara una MBP humana de sustancia blanca del cerebro tal como se describe en Deibler et. al. (Deibler et. al., 1972 Preparative Biochemistry 2: 139), y se evalúa su pureza mediante SDS-PAGE. Se utilizan la MBP y un derivado de la proteína purificada de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) (UK Central Veterinary Laboratory, Surrey) en unos ensayos de proliferación a concentraciones óptimas previamente determinadas: la concentración óptima para cada antígeno es de 50 µg/ml. Se sintetiza un panel de péptidos 15-mer superpuestos que se extienden sobre toda la molécula de la MBP utilizando química F-moc estándar en un sintetizador de péptidos múltiples Abimed AMS 422 (Abimed, Langenfeld, Germany). Cada péptido se desplaza por 5 aa y se superpone por 10 aa. Se producen 33 péptidos que se agrupan en grupos de 3 y los grupos se evalúan a la concentración óptima de 50 µg/ml, de forma que cada péptido *in vitro* está presente a una concentración de 16,6 µg/ml.

Pacientes y sujetos control

Los sujetos en este estudio consisten en 12 pacientes con EM confirmada clínicamente o confirmada por laboratorio (Poser et. al., 1983), con un rango de edad de 29-51 años. Ocho de los 12 pacientes están implicados en un ensayo de interferón- β , y por otra parte todos los otros pacientes con EM no recibieron tratamiento con corticosteroides durante por lo menos 3 meses antes del comienzo del estudio. El grupo de control consistía en 13 individuos sanos con un intervalo de edad de 25-55 años, y ninguna había recibido terapia inmunosupresora durante por lo menos 3 meses antes de que se obtuviera la muestra de sangre.

Medio de cultivo tisular

Como medio de cultivo tisular se utiliza medio RPMI-1640 suplementado con Hepes 20 mM (Sigma, Poole, UK), penicilina (100 U/ml), sulfato de estreptomicina (100 mg/ml), y L-glutamina 4 mM (todos de Life technologies, Paisley, Scotland). Para la lavar las células linfoides y la TCL se utiliza medio sin suero. Para todas las condiciones de cultivo y ensayos, el medio se complementa con plasma autólogo inactivo al 10% caliente.

Condiciones de cultivo y ensayos de proliferación de células T

Se recoge una muestra de sangre periférica con citrato (50-100 ml) mediante venopunción de cada sujeto después de que se haya conseguido el consentimiento informado por escrito. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de la sangre mediante centrifugación por densidad en un Histopaque-1077 (Sigma, Poole, UK), y se cultivaron en 1,5 volúmenes en placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc International, Costar, Coming Inc. New Cork, USA) a una concentración de 1×10^6 células por ml que contenían o PPD, o MBP o péptidos de la MBP. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% CO₂/95% de aire. Entre los días 5 y 14 se retiraron de cada cultivo las alícuotas duplicadas de 100 μ l, se transfirieron a una placa de 96 pocillos de microtitulación con fondo redondeado y se marcaron con [³H]-Timidina 0,4 μ Ci (Amersham International, Amersham, UK). Después de 18 horas, las células se recolectan en una estera de fibra de vidrio (LKB-Wallac, Turku, Finland) utilizando un recolector Mach 111 96 (Tomtec, Orange, New Jersey, USA). La incorporación de [³H]-Timidina se determina utilizando un contador de centelleo líquido Microbeta (LKB-Wallac). Los pocillos de la prueba que contienen antígeno se consideran positivos cuando el δ cpm > 1000 y el Índice de estimulación (IE) > 3, en el que IE = cultivo CPM que contiene antígeno /cultivo CPM que sin antígeno.

Generación de líneas de células T y clones de células T

Las líneas de células T específicas para MBP (TLC) se generan a partir de 8 pacientes con EM y 2 donantes control sanos. Se separó la PBMC de cada sujeto como se ha descrito anteriormente y se colocaron a 1×10^6 células en placas de 6 pocillos en presencia de MBP (50 μ g/ml); una porción de PBMC de cada sujeto se congela regularmente y se guarda para reestimulaciones posteriores. Siete días después las células se alimentan con un medio fresco que contiene 2% de IL-2 (Lymphocult-HT; Biotest LTD, Birmingham, UK), y al día 12 de cultivo todas las células se reestiman con

antígeno, IL-2 y PBMC autólogas irradiadas (2500 Rad) como una fuente de células presentadoras de antígenos (APC), a una proporción celular de célula IT: 5 APC. Las células se expanden en IL-2 cada 3-4 días, y el día 14 se reestiman con antígeno, IL-2 y PBMC, como se ha descrito anteriormente. El día de la primera reestimulación las células se examinan para comprobar su proliferación específica a la MBP. Brevemente, 2×10^4 células T y 1×10^5 de PBMC autólogas irradiadas se cultivan por triplicado, en placas de 96 pocillos de fondo redondo, en presencia de MBP. Las células se cultivan durante 2 días y se marcan con (^3H)-Timidina a $0,4 \mu\text{Ci/pocillo}$ durante las últimas 18 horas de cultivo. Las células se reservan tal como se describe anteriormente, y se considera que una TCL es específica a la MBP con una $\delta\text{cpm} > 1000$ y una $(\text{IE}) > 3$.

Después de 3 ciclos de reestimulación/expansión se clonaron las TCL utilizando PHA (Sigma, Poole, Dorset, UK) en presencia de PBMC autólogas irradiadas como APC. Las células T se colocaron bajo condiciones limitantes de dilución a 0,1 célula/pocillo, 0,3 célula/pocillo y 1 célula/pocillo y se cultivaron en placas Terasaki (Nunc International, Costar) con 1×10^4 de PBMC irradiadas, $5 \mu\text{g/ml}$ de PHA, y 2% de IL-2. Después de 10-12 días, los pocillos con un crecimiento positivo se extienden sobre placas de 96 pocillos con base redonda, utilizando 1×10^5 de PBMC irradiadas, $5 \mu\text{g/ml}$ de PHA y IL-2. Tres días después, los pocillos se llenan con medio fresco que contiene IL-2, y el día 7 los clones se extienden sobre placas de 48 pocillos utilizando 5×10^5 de PBMC irradiadas, PHA y IL-2; en este punto, los clones se comprueban en ensayos de proliferación para respuestas específicas a MBP. Los clones específicos de la MBP se extienden una semana después en placas de 24 pocillos, utilizando 1×10^6 de PBMC irradiadas, con PHA o Dynabeads (Dynal, UK) y IL-2. Los clones se mantienen en placas de 24 pocillos utilizando un ciclo de reestimulación/expansión de 7-10 días, esencialmente como se ha descrito anteriormente. Se comprueba la capacidad de los clones de las células T (TCC) para reconocer el panel de péptidos de la MBP mediante ensayos de proliferación, tal como se ha descrito anteriormente.

Resultados

Reconocimiento de péptidos de la MBP en pacientes con EM e individuos sanos

En el contexto de la presente invención utilizan un ensayo de respuesta cinética en el que se comprueba la capacidad de las PBMC de pacientes con EM e individuos sanos de responder a un panel de péptidos sintéticos de 15-mer superpuestos que se extienden a través de la longitud total de la MBP humana. Se examina la respuesta de proliferación de BPMC de cada cultivo en 5 puntos durante un periodo de 2 semanas, y se compara el perfil cinético de la respuesta a la MBP y a los péptidos con la respuesta a la PPD, representando ésta última un antígeno de respuesta/memoria secundario. No se encontraron diferencias significativas en la respuesta de la PBMC a MBP y/o péptidos entre pacientes con Interferón- β y pacientes sin tratamiento (no se muestran los datos). La respuesta a la MBP tanto en pacientes con EM como en pacientes control sanos alcanzó su pico después que la respuesta a la PPD, siguiendo, de este modo, las características cinéticas de la respuesta a un antígeno de no-recuerdo. La figura 1 muestra un ejemplo típico del perfil cinético a la PPD y a la MBP en pacientes con EM e individuos sanos.

Como se muestra en la figura 2, los dos péptidos más habitualmente reconocidos en los pacientes con EM son 90-114 y 75-99 (6/12 pacientes cada uno), seguido de las

regiones 30-54, 135-159 y 150-170 (5/12 pacientes), y 1-24 y 105-129 (4/12 pacientes). Tres pacientes respondieron a los aminoácidos 15-39 y 120-144. Dos pacientes reconocieron 45-69, y ninguno de los pacientes con EM respondió a la región 60-84.

5 Según la figura 10, cuando todos los pacientes son HLA-DR2 positivo, los dos péptidos que los pacientes con EM reconocen más habitualmente son 90-114 y 75-99 (6/11 pacientes cada uno), seguido de las regiones 120-144, 135-159 y 150-170 (5/11 pacientes), y 1-24 y 15-39, 30-54 y 105-129 (4/11 pacientes). Tres pacientes respondieron a los aminoácidos 45-69 y otra vez, ninguno de los pacientes con EM respondió a la región 60-84.

10 En cambio, los individuos sanos reconocieron significativamente menos péptidos, con sólo 2 sujetos control que respondieron a más de 2 péptidos (C. y J; figura 3). Los individuos control C y J fueron los únicos que reconocieron los aminoácidos 60-84, una región no vista por este grupo de pacientes. Curiosamente, estos dos individuos expresaban el alelo DRB1* 0701. Las regiones 45-69 y 105-129 no fueron reconocidas por ninguno de los donantes sanos, mientras que las 75-99 y las 150-170 fueron reconocidas por 4 individuos sanos; 135-159 fueron reconocidas por tres individuos sanos; 1-24, 30-54, 60-84 y 120-144 fueron reconocidas por dos individuos sanos; y las 15-39 y 90-114 fueron reconocidas por un individuo. En total, 8/13 individuos sanos no responden a ninguno de los péptidos superpuestos, mientras que sólo 1/12 de los pacientes con EM (EM 19) fallaron sistemáticamente a la hora de reconocer los péptidos de la MBP. El caso de este paciente que no responde a la proteína de la MBP es particularmente único.

25 La figura 11 también muestra la respuesta de individuos sanos a los péptidos de la MBP. En este estudio sólo 1 sujeto de control responde a más de 2 péptidos (N11). N11 es también el único individuo que reconoce 60-48 aa, una región no vista por este grupo de pacientes. Las regiones 15-69, 45-69 y 105-129 no son reconocidas por ninguno de los donantes sanos, mientras que las 120-144 y 135-159 son reconocidas por dos de los individuos sanos; y 1-24, 30-54, 60-84, 75-99, 90-114 y 150-170 son reconocidas por un individuo. En total, 9/12 de los individuos sanos no responden a ninguno de los péptidos superpuestos.

35 En total, el día en el que la respuesta a la MBP y/o a los péptidos alcanzó su pico no difiere significativamente entre los individuos sanos y los pacientes, y las cinéticas en ambos grupos se parecen a las de una respuesta antigénica primaria. Además, la magnitud de la respuesta a la MBP y a los péptidos entre pacientes e individuos sanos no difería.

40 Cambios en el reconocimiento del péptido de la MBP con el tiempo

45 Habiendo establecido que los pacientes con EM responden a un amplio abanico de péptidos de la MBP, en el contexto de la presente invención se ha decidido examinar si el reconocimiento de las PBMC en los mismos individuos permanece centrado y es estable durante el transcurso de aproximadamente 4-12 meses. Tal como se muestra en las figuras 2, 10 y 3 ninguno de los pacientes con EM o de los individuos sanos presentaban el mismo patrón de reconocimiento del péptido.

La figura 4 representa un ejemplo de un paciente con EM (EM 49) que responde a

varios péptidos en dos periodos de tiempo distintos, pero el perfil de reconocimiento durante el segundo punto, medido 4 meses después, difiere significativamente. Esto es, en el segundo ensayo cinético, la respuesta de las PBMC a los aminoácidos 15-39, 30-54 y 150-170 persiste, sin embargo, la respuesta a 75-99 y 105-129 remite y cambia a las regiones 90-114 y 135-159.

La figura 5 (EM 60) ilustra un ejemplo de un paciente cuya amplia respuesta al epítipo remite a una respuesta focalizada durante un periodo de 4 meses. Los individuos sanos que se evaluaron la segunda vez no respondieron a ninguno de los péptidos (figura 3).

En total, los resultados demuestran que los pacientes con EM no presentan una serie de patrones de reconocimiento. En cada paciente, la respuesta de la PBMC a varios péptidos puede persistir, remitir y cambiar a nuevas regiones de la MBP, como se puede observar en el paciente EM 49.

Ciclos en el reconocimiento de péptidos

Cuando se analiza la respuesta de las PBMC a los péptidos en 3 o más periodos de tiempo durante un periodo de 12 meses, resulta evidente que en algunos pacientes el reconocimiento del epítipo parece fluctuar más que cambiar irreversiblemente a nuevas regiones del péptido. Por ejemplo, tal como se muestra en las figuras 2 y 10, el paciente EM 60 presenta un patrón cíclico de reconocimiento de los aminoácidos 120-144 y 135-159; esto es, los residuos 120-144 y 135-159 están entre los muchos que se reconocen en la evaluación del primer periodo de tiempo, la respuesta a estas 2 regiones remite durante el segundo periodo de tiempo y después reaparece en el tercer punto de tiempo medido 4 meses después. El perfil cinético del paciente EM 41 demuestra, igualmente, que el reconocimiento de los aminoácidos 135-159 fluctúa durante varios periodos de tiempo (ver figuras 2 y 10).

Entre el grupo control de individuos sanos (figura 3), un individuo (M) presenta una fluctuación de la respuesta a las regiones 75-99 y 135-159, un segundo individuo (F) reconoce la 75-99 en dos de los tres puntos de tiempo analizados, mientras que un tercer sujeto (D) muestra una respuesta cíclica al residuo 15-39.

Mapa preciso de la respuesta a la MBP

Las TCC se generaron a partir de 8 pacientes con EM y 2 individuos sanos, y se utilizó para aclarar la especificidad precisa de las regiones de péptidos identificadas en el ensayo de la respuesta cinética. La especificidad de cada TCC se comprueba por su respuesta proliferativa al panel de 15-mer péptidos. El clon SD:A7 reconoce la región 1-24, y en esta región esta TCC respondió a los aminoácidos 5-19. La región 30-54 es reconocida por 4 clones (EM49:D3, EM49:C8, EM49:A8, EM49:B6) y el epítipo en esta región es 30-44. Un clon (EM39:D7) de un paciente con EM reconoce el péptido 60-74, y curiosamente un individuo sano respondió a esta región (60-84) en nuestro ensayo de la respuesta cinética. Cinco clones (EM43:A7, EM41:B6, EM41:A2, EM41:C6, N5:8) reconocen los aminoácidos 83-99 que están contenidos en la región 75-99. Un paciente produjo TCC específica para los aminoácidos 110-124 (EM60:A2, MS60:B3), contenido en el grupo 105-129, y otra TCC del mismo paciente es específica a 130-144 (EM60:E1),

encontrada en la región 120-144. Cinco individuos produjeron clones que reconocen epítomos dentro de la región 135-159: EM60:F7, EM60:D1, EM59:F1 y N5:19 reconocen los aminoácidos 140-154; EM57:A1 es específico para 140-149, y TCC EM17:A3 responde a la secuencia 130-144. Este panel de clones demuestra claramente la presencia de por lo menos 2 epítomos de célula T en la región 135-159 de la MBP. Por último, la región 150-170 es reconocida por 2 clones específicos para los aminoácidos 156-169. La especificidad de todas las TCC se resume en la figura 6.

EJEMPLO 2 – Identificación de apítomos en la MBP

Materiales y Procedimientos

Ensayo de presentación del antígeno utilizando un APIPS

La presentación de los péptidos a los clones de las células T se mide mediante proliferación. Las APC se fijan en paraformaldehído al 0,5% de y se colocan a una distribución de 1×10^5 células por pocillo en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. Los clones de las células T se colocan a una distribución de 2×10^4 células por pocillo en presencia de diferentes concentraciones de péptido. Después de la incubación durante 48h a 37°C, se mide la proliferación mediante la incorporación de [3 H] timidina durante 16-20h. Los resultados se comparan con la capacidad de las células T de responder al epítomo presentado mediante APC vivo.

La presentación de péptidos a las células T aisladas del ratón transgénico DR2:MBP82-100 fue esencialmente tal como se ha descrito anteriormente exceptuando que la APC se colocó a 5×10^5 células por pocillo, las células T se colocaron a 1×10^5 células por pocillo, y se permitió que la incubación transcurriera durante 72h antes de la adición de [3 H] timidina.

Resultados

En este experimento, los péptidos que se han identificado como epítomos en el ejemplo anterior se examinan para comprobar su capacidad para que sean presentados utilizando un APIPS. Los resultados se representan en la figura 7b. De los cinco epítomos examinados hasta este momento, se descubrió que cuatro eran apítomos (30-44, 80-94, 110-124 y 130-144) y se descubrió que uno actúa como un epítomo pero no como un apítomo (156-170).

Ejemplo 2A - Investigación de péptidos de la MBP 30-44, 110-124, 130-144 y 156-170

Para investigar si varios péptidos de la MBP son apítomos, se investiga su capacidad para ser presentados a las células T mediante APC fijada. Las células Mgar vivas o premarcadas (HLA-DR2+ve) se premarcan con el péptido en suero, o sólo con suero durante 3,5 horas. Después, se extrae el exceso de péptido de las células y se añade el clon de la célula T adecuado. La respuesta de proliferación de la célula T se mide mediante la adquisición de [3 H] timidina.

Tal como se muestra en las figuras 8 y 9, los péptidos 30-44 (figura 8 A), 110-124 (figura 8 B) y 130-144 (figura 9A) se pueden presentar mediante APC fijada sin

procesamiento posterior. Estos péptidos son, por consiguiente, apítomos por definición. El péptido 156-170, por otro lado, requiere procesamiento posterior para la presentación a las células T (figura 9B). Las APC fijadas no pueden presentar este epítipo a las células T, de modo que el 156-170 no es un apítomo.

5

Ejemplo 2B – Identificación de apítomos en las regiones 77-100 y 125-148 de la MBP

Para cualquier epítipo, pueden existir uno o más apítomos, capaces de presentarse a la APC sin procesamiento posterior. Se investiga la presencia de apítomos en dos regiones de la MBP mediante la incubación de células vivas o Mgar fijada con p-formaldehído (HLA-DR2+ve) con péptidos superpuestos en suero de las regiones 77-100 de la MBP (figura 12) y 125-148 (figura 13) o sólo con suero. Se añadieron las células T y después de 72 horas (figura 12) o después de 48h (figura 13) se midió la respuesta proliferativa de la célula T mediante la adquisición de ³H timidina. Para la MBP 77-100, se aislaron las células T de un DR2: ratón transgénico MBP 82-100, mientras que para la MBP 130-144 se utilizó un clon de la célula T EM17:A3.

15

Para la región MBP 77-100 los siguientes péptidos se definen como apítomos:

20

MBP 83-99 ENPVVHFFKNIVTP RTP

MBP 80-84 TQDENPVVHFFKNIV

25

MBP 81-95 QDENPVVHFFKNIVT

MBP 82-96 DENPVVHFFKNIVTP

MBP 83-97 ENPVVHFFKNIVTPR

30

MBP 84-98 MPVVHFFKNIVTPRT

La secuencia de MBP mínima reconocida por las células T del ratón transgénico DR2 MBP 82-100 es la región 85-94.

35

Para la región MBP 125-148 los siguientes péptidos se definen como apítomos:

MBP 130-144 RASDYKSAHKGFKGV

40

MBP 131-145 ASDYKSAHKGFKGVD

MBP 132-146 SDYKSAHKGFKGVDA

MBP 133-147 DYKSAHKGFKGVDAQ

45

La secuencia de MBP mínima reconocida por el clon EM 17:A3 de las células T es la región 133-144.

Ejemplo 2C – Investigación de la región 89-101 de la MBP

En el contexto de la presente invención se ha demostrado previamente que, a diferencia de otros epítomos de células T de la mielina, la administración del péptido 89-101 en forma soluble no previene la encefalomiелitis murina experimental autoinmune (EAE) inducida con toda la mielina o con el péptido 89-101 mismo (Anderton y Wrath (1998) Eur. J. Immunol. 28: 1251).

MBP 89-101 que comprende tres epítomos de células T

Para investigar la reactividad de la célula T para la región 81-111 de la MBP, células de los nódulos linfáticos de ratones cebados con 81-111 se estimulan *in vitro* con estos péptidos 81-111 y estas células se ensayan con el panel de los péptidos solapados 10-mer con dos cambios de residuos que comprenden la región 81-111 (principalmente: 81-90, 83-92, 85-94, 87-96, 89-98, 91-100, 93-102, 95-104, 97-106, 99-108 y 101-111). EL patrón de respuesta a los péptidos que comprenden la región 89-101 muestra una capacidad estimuladora para 5 péptidos adyacentes (N terminal 87-96 a través de 95-104) que refleja la presencia de por lo menos dos (y quizás tres) epítomos diferentes.

Para poder investigar más esta región, se generan tres sublíneas de la línea de células T respondedoras a 81-111 original y éstas se vuelven a ensayar con el panel de los péptidos solapados 10-mer con un cambio de residuos que comprenden la región 84-106. Los resultados muestran la existencia de tres epítomos de células T pero que se solapan dentro de la secuencia 89-101: 89-94, 92-98 y 95-101 (ver figura 14).

Péptido MBP 92-98 es un epítomo críptico

Las tres líneas células T epítomo-específica (TCL) muestran unas diferencias interesantes cuando se ensaya la reactividad al péptido 89-101 y a la MBP recombinante total. Las tres TCL responden al péptido (89-101) pero sólo la 89-94 y 95-101 específica de TCL responden a la MBP total. Esto indica que el antígeno que procesa la MBP intacta genera preferentemente unos ligandos para las células T que reconocen 89-94 y 95-101 pero no los que reconoce 92-98. Esto sugiere que el epítomo 92-98 es críptico (es decir no se puede generar por el procesamiento de un antígeno nativo). Parece que el péptido 89-101 puede participar en tres interacciones diferentes con la molécula MHC que da como resultado ligandos péptido/MHC que son reconocidos por tres poblaciones de células T diferentes. El procesamiento de la MBP sin embargo sólo genera unos ligandos de estas poblaciones de células T (ver figura 14).

La inducción de EAE requiere el reconocimiento de las células T de los epítomos autoantigénicos expresados en el SNC como resultado de la degradación de la MBP intacta. La inmunización de ratones con péptidos que comprenden sólo uno de los tres epítomos de las células T identificados previamente muestra que sólo los que contienen un epítomo procesado naturalmente (89-94 ó 95-101) son capaces de inducir EAE. Esto refuerza además el hallazgo de que 92-98 es un epítomo críptico.

El péptido 92-98 de MBP es el epítipo dominante para la región 89-101 de la MBP

Como se ha mencionado anteriormente, la región 89-101 contiene tres péptidos diferentes pero que se solapan. De éstos, el péptido 92-98 es el dominante para esta región. Por ejemplo, cuando los clones de las células T se generan a partir de ratones cebados con el péptido 89-101, los seis clones que se generan responden al 92-98. Utilizando los péptidos análogos de 89-101 que contienen unas sustituciones individuales de alanina en cada posición, se ha observado que la sustitución de una de las posiciones 92-98 conduce a una ausencia de respuesta, que muestra que la alteración de unos de los residuos dentro del núcleo 92-98 tiene unos efectos notables sobre el reconocimiento de este epítipo.

Péptido MBP 89-101 no consigue crear tolerancia de las células T EAE pertinentes que reconocen el epítipo MBP procesado naturalmente

Para resumir los hallazgos anteriores, se ha descubierto que a) la secuencia 89-101 presenta el potencial para generar 3 epítopos distintos de las células T; b) sólo dos de estos epítopos (89-94 y 95-101) son generados por el procesamiento del antígeno que procesa la MBP intacta (tanto in vitro como in vivo); c) sólo los péptidos que contienen los epítopos procesados naturalmente y los que no contienen un epítipo críptico son eficaces induciendo EAE; d) el péptido 89-101 no consigue proteger frente a los experimentos de terapia con péptidos.

Esta información proporciona una base para investigar la hipótesis de que el péptido 89-101 no consigue crear tolerancia frente a EAE al no conseguir ligar directamente las células T que indican enfermedad. Para apoyar la hipótesis, el péptido (89-101) debe fracasar en la inducción de la tolerancia al epítipo encefalitogénico principal (89-94) puesto que no se unirá directamente al elemento de restricción del CMH (I-A^s) en la conformación adecuada. En otras palabras, 89-101 no actuará como epítipo para las células T que responden a 89-94.

Para comprobar esta posibilidad, se llevaron a cabo unos experimentos de tolerancia con los péptidos 89-101 y 87-96 (Fig. 15 A y B). El péptido 87-96 contiene el epítipo (89-94) más efectivo induciendo EAE.

Métodos

Los ratones recibieron 200 µg de péptido en PBS o PBS sólo intraperitonealmente a los días -8, -6 y -4 antes de los 100 µg de péptido en adyuvante completo de Freund el día 0. Después de 10 días, se cultivaron células de los nódulos linfáticos (6×10^5 por pocillo) en medio X-Vivo 15 suplementado con 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y L-glutamina 2M con o sin antígeno durante 72 horas. Los cultivos se marcan durante las 16 horas finales con 0,5 µCi timidina ^3H y se mide la incorporación utilizando el contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan como cuentas medias por minuto para unos cultivos por triplicado.

Resultados

El cebado con 87-96 indujo una respuesta de recuerdo fuerte por sí misma y una respuesta más débil a 89-101 (Fig 15 A y B □ y ○ respectivamente). Esto concuerda con la necesidad de procesamiento de un antígeno para generar 89-94 desde 89-101. LA utilización de 87-96 como un tolerógeno antes del cebado con 87-96 suprimió las respuestas de recuerdo tanto para 87-96 como para 89-101 (Fig. 15 A ■ y ●). Esto concuerda con las células T reactivas 89-94, una vez que se hayan insensibilizado in vivo, fracasando en la respuesta in vitro a 89-94 cuando han sido generados a partir de 89-96 ó 89-101. De forma crucial, sin embargo, la utilización de 89-101 como tolerógeno antes del cebado con 87-96 fracasa en la inhibición de repuestas de recuerdo ya sea para 87-96 o 89-101 101 (Fig. 15 A ■ y ●). Estos datos demuestran que la administración de péptido 89-101 en la forma tolerogénico no consigue crear tolerancia al epítipo encefalitogénico procesado naturalmente basado en la secuencia 89-94: el péptido 89-101 no consigue comportarse como un apítipo para el epítipo 89-94.

Sin deseo de vincularse a una teoría, se cree que las observaciones se pueden explicar mediante la posición del péptido 89-101 en el sitio de unión del péptido CMH. Si el péptido se une preferentemente de modo que la región 92-98 en la bolsa de unión del péptido, entonces será reconocido por las células T específicas de MBP 92-98. ESto podría explicar porque, cuando los ratones son cebados con el péptido MBP 89-101, todos los clones de las células T generadas reconocen el epítipo MBP 92-98. De igual modo, cuando se utiliza 89-101 para crear tolerancia de las células T, adquirirán tolerancia principalmente las células que reconocen el epítipo MBP 92-98. Si el epítipo MBP 92-98 es un epítipo críptico, no se genera por procesamiento natural de todo el antígeno y las células T que reconocen este epítipo probablemente no existirán in vivo. Incluso si las células T específicas de MBP 92-98 no existen in vivo, no resultaría relevante para la enfermedad. De ahí, 89-101 no consigue evitar el EAE inducido con la MBP total.

EJEMPLO 3- Terapia peptídica para un modelo murino de EM

Se ha demostrado previamente que una dosis única de antígeno de péptido administrada por vía sistémica ya sea por vía intraperitoneal (Liu and Wraith (1995) Int Immunol 8:1255-1263) o intranasal (Metzler and Wraith (1993) 5: 1159-1165) protegerá eficazmente al ratón de la encefalomiелitis autoimmune (EAE) durante un periodo de hasta tres meses (Metzler and Wraith (1999) Immunology 97:257-263). Se requieren por lo menos 5 dosis de péptido para inducir tolerancia en un ratón transgénico Tg4 (Burkhart et al (1999) 11:1625-1634) que expresa un receptor T específico de EAE (Liu et al (1995) Immunity 3:407-415). Trabajos recientes han demostrado que la vía intranasal (IN) es más segura que la vía intraperitoneal (IP) en el ratón Tg4, incluso si ambos enfoques son seguros al mismo nivel en el ratón no transgénico.

El péptido 83-99 de la MBP se ensaya en el ratón transgénico Fug/D6 que expresa tanto la molécula de CMH de clase II HLA-DR2 y un TCR de un clon celular específico para este péptido. Los ratones son tratados con un péptido según o bien la dosis estándar utilizada para el tratamiento del ratón transgénico Tg4 (protocolo Tg4) o el protocolo de desensibilización con escalado de dosis del péptido que se ha utilizado en el tratamiento de pacientes que sufren alergia (protocolo de desensibilización).

Protocolo Tg4: Los grupos de ratones se tratan mediante administración intranasal del péptido 83-99 (4 mg/ml en suero salino tamponado (PNS) o PBS solo en un volumen total de 25 µl.

Los ratones son tratados cada primer y quinto día de la semana durante 5 semanas proporcionando un total de 10 dosis. Al principio de la semana 6 se inyecta a cada ratón el péptido 83-99 en adyuvante completo de Freund (FCA) y también recibe una inyección IP de toxina Pertussis (200 ng) al día 1 y 3. La progresión de EAE se supervisa durante por lo menos 30 días.

Protocolo de desensibilización: Grupos de ratones son tratados mediante administración intranasal de una dosis de escalado del péptido 83-99 o PBS solo en un volumen total de 25 µl. El escalado de dosis empieza a la dosis de 0,1 µg y sigue a través de 1, 3, 6, 12 50 y después tres veces 100µg. Los ratones son tratados cada primer y quinto día de la semana durante 5 semanas proporcionando un total de 10 dosis. Al principio de la semana 6 se inyecta a cada ratón el péptido 83-99 en Adyuvante completo de Freund (FCA) y también recibe una inyección IP de toxina Pertussis (200 ng) al día 1 y 3. La progresión de EAE se supervisa durante por lo menos 30 días.

EJEMPLO 4: Administración nasal de un cóctel de epítopo en pacientes con EM

Se prepara una vacuna que comprende péptidos MBP 30-44, 83-99, 110-124 y 130-144 (es decir algunos de estos epítomos de MBP que han sido identificados como apítomos). La vacuna se ha proporcionado a treinta y cinco pacientes en un ensayo clínico de fase Ia/Ib. EL ensayo es un ensayo clínico cruzado en el que los pacientes están sin recibir tratamiento durante tres meses después de una dosis única de péptido (Ia). Después los pacientes se monitorizan durante tres meses después de la dosis única de vacuna para evaluar su seguridad. El tratamiento después consiste en la administración dos veces por semana mediante deposición intranasal. Para cada paciente: la actividad clínica se analiza mensualmente mediante imagen por resonancia magnética; la actividad inmunológica se monitoriza utilizando un ensayo de respuesta cinética para la proliferación y la producción de citoquina se monitoriza utilizando un ensayo ELISA basado en la célula.

El ensayo clínico implica inicialmente el tratamiento de 5 pacientes que padecen una enfermedad crónica progresiva (CP). Estos pacientes se seleccionan en función de la actividad de IRM baja y son tratados primero con la dosis mayor de péptidos. El tratamiento se inicia en el grupo de paciente CP porque son los que más probablemente demuestran unos posibles efectos dañinos como se evidencia mediante un incremento de la actividad de IRM. El tratamiento de los pacientes con recaídas que remiten se inicia cuando es claro que tanto el tratamiento con una dosis única como una dosis múltiple es seguro en el grupo CP. Un grupo mayor de 30 pacientes de recaídas que remiten se incluye en base a que sufren una potenciación de las lesiones en IRM durante un periodo de monitorización de 3 meses. Estos se dividen en tres grupos para ser tratados con una dosis elevada, media o baja de péptido.

Periodo de tiempo (meses)	Pacientes crónicos progresivos (CP)	Pacientes con recaídas que remiten (RR)
0	Se inicia la monitorización mensualmente	
3	Se inicia la fase Ia (dosis única de péptido) con una IRM a 1-2 semanas después del tratamiento y la monitorización mensualmente	
6	Se inicia la fase Ib (dosis dos veces por semana de péptido) y sigue la monitorización mensualmente	Se inicia la monitorización mensualmente y se incluyen paciente con lesiones potenciadas
9		Se inicia la fase Ib (dosis dos veces por semana de péptido) y sigue la monitorización mensualmente
12	Fin del tratamiento y sigue la monitorización mensual durante 6 meses más	
15		Fin del tratamiento y sigue la monitorización mensual durante 6 meses más

Abreviaturas: APC: células presentadoras de antígeno; CMH: complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: Receptor de la célula T; EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; APITOPE= epítipo independiente del procesamiento del antígeno; APIPS = sistema de presentación independiente del procesamiento del antígeno; aa = aminoácido; EM = esclerosis múltiple; MBP = proteína básica de la mielina; PLP= proteína proteolepídica; TCL = línea celular T; PBMC = células mononucleares de sangre periférica; PPD = derivado de proteína purificada de Mycobacterium tuberculosis; PHA = fitohemaglutinina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The University of Bristol

<120> PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN DE UN PÉPTIDO

<130> P9611WO LCH

<140> PCT/GB01/03702

<141> 2001-08-17

<150> 0020618.5
 <151> 2000-08-21

5 <150> 0114547.3
 <151> 2001-06-14
 <160> 11

10 <170> Patente en Versión 3.0
 <210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr
 1 5 10 15
 Pro

20 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 2
 Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val
 1 5 10 15

30 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr
 1 5 10 15

35 <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 4

- 27 -

	Asp	Glu	Asn	Pro	Val	Val	His	Phe	Phe	Lys	Asn	Ile	Val	Thr	Pro
	1				5					10					15
	<210> 5														
	<211> 15														
5	<212> PRT														
	<213> Homo sapiens														
	<400> 5														
	Glu	Asn	Pro	Val	Val	His	Phe	Phe	Lys	Asn	Ile	Val	Thr	Pro	Arg
	1				5					10					15
10	<210> 6														
	<211> 15														
	<212> PRT														
	<213> Homo sapiens														
15	<400> 6														
	Met	Pro	Val	Val	His	Phe	Phe	Lys	Asn	Ile	Val	Thr	Pro	Arg	Thr
	1				5					10					15
	<210> 7														
20	<211> 15														
	<212> PRT														
	<213> Homo sapiens														
	<400> 7														
	Arg	Ala	Ser	Asp	Tyr	Lys	Ser	Ala	His	Lys	Gly	Phe	Lys	Gly	Val
25	1				5					10					15
	<210> 8														
	<211> 15														
	<212> PRT														
30	<213> Homo sapiens														
	<400> 8														
	Ala	Ser	Asp	Tyr	Lys	Ser	Ala	His	Lys	Gly	Phe	Lys	Gly	Val	Asp
	1				5					10					15
35	<210> 9														
	<211> 15														
	<212> PRT														
	<213> Homo sapiens														
40	<400> 9														

- 28 -

Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala
1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln

1 5 10 15

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

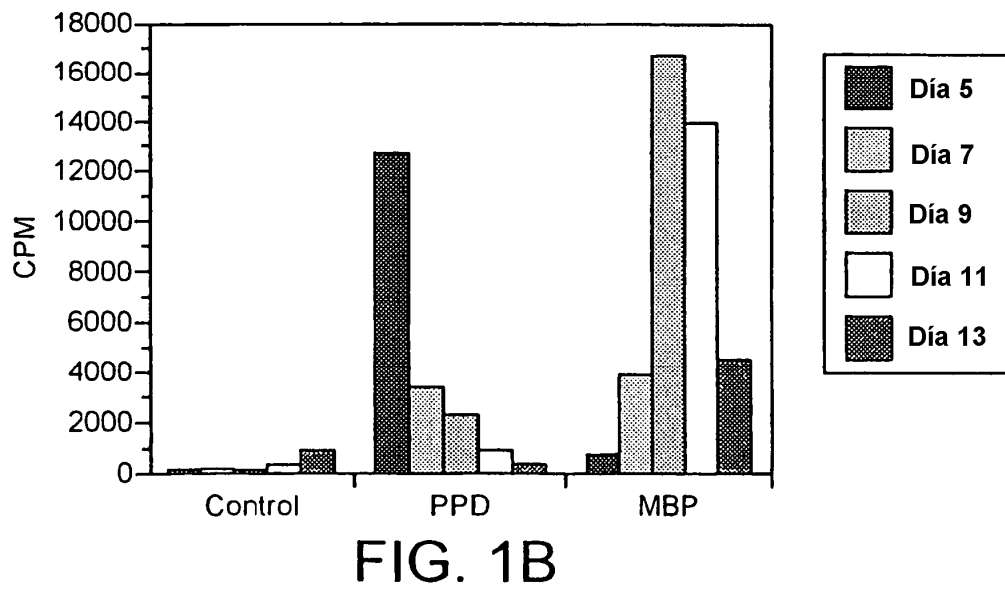
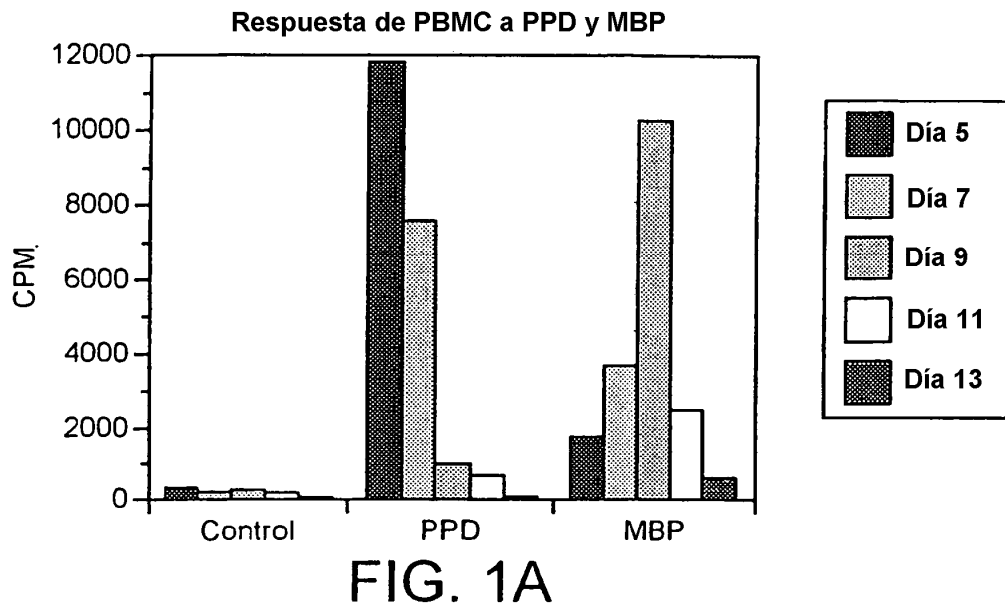
<400> 11

Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido tolerogénico humano que puede unirse a una molécula MCH de clase I o II sin procesamiento posterior del antígeno, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple, en el que el péptido se selecciona de entre los péptidos de la proteína básica de la mielina (MBP) siguientes: 83-99 y 131-145.
- 10 2. Péptido según la reivindicación 1 para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple, que es MBP 83-99.
- 15 3. Péptido según la reivindicación 1 para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple, que es MBP 131-145.
- 20 4. Composición farmacéutica para el tratamiento/prevención de la esclerosis múltiple que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 25 5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4 para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple, que comprende una pluralidad de péptidos tolerogénicos humanos de la MBP.
- 30 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5 para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple, que comprende entre 2 y 15 péptidos tolerogénicos humanos de la MBP.
- 35 7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple, en forma de un kit, en la que se proporcionan alguno o cada uno de los péptidos separadamente para la administración simultánea, separada o secuencial.
- 40 8. Péptido o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple, para la administración intranasal.

1/16



Respuesta a péptidos MBP en pacientes con EM: 1er periodo de tiempo													
MBP		1 to 24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170	
EM 10	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
EM 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 39	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
EM 41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
EM 43	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
EM 49	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
EM 57	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 59	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
EM 60	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
EM 67	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
EM 80	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Respuesta a péptidos MBP en pacientes con EM: 2º periodo de tiempo													
EM 10	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
EM 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
EM 41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 49	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
EM 57	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM 60	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EM 43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respuesta a péptidos MBP en pacientes con EM: 3º periodo de tiempo													
EM 41	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
EM 60	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
EM 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 2

3/16

Respuesta a péptidos MBP en pacientes sanos: 1er período de tiempo													
Individual	MBP	1 to 24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170	
A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	
D	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
J	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
K	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	
Respuesta a péptidos MBP en pacientes sanos: 2º período de tiempo													
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
J	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
K	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Respuesta a péptidos MBP en pacientes sanos: 3º período de tiempo													
D	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	
J	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
M	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	
F	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	

FIG. 3

4/16

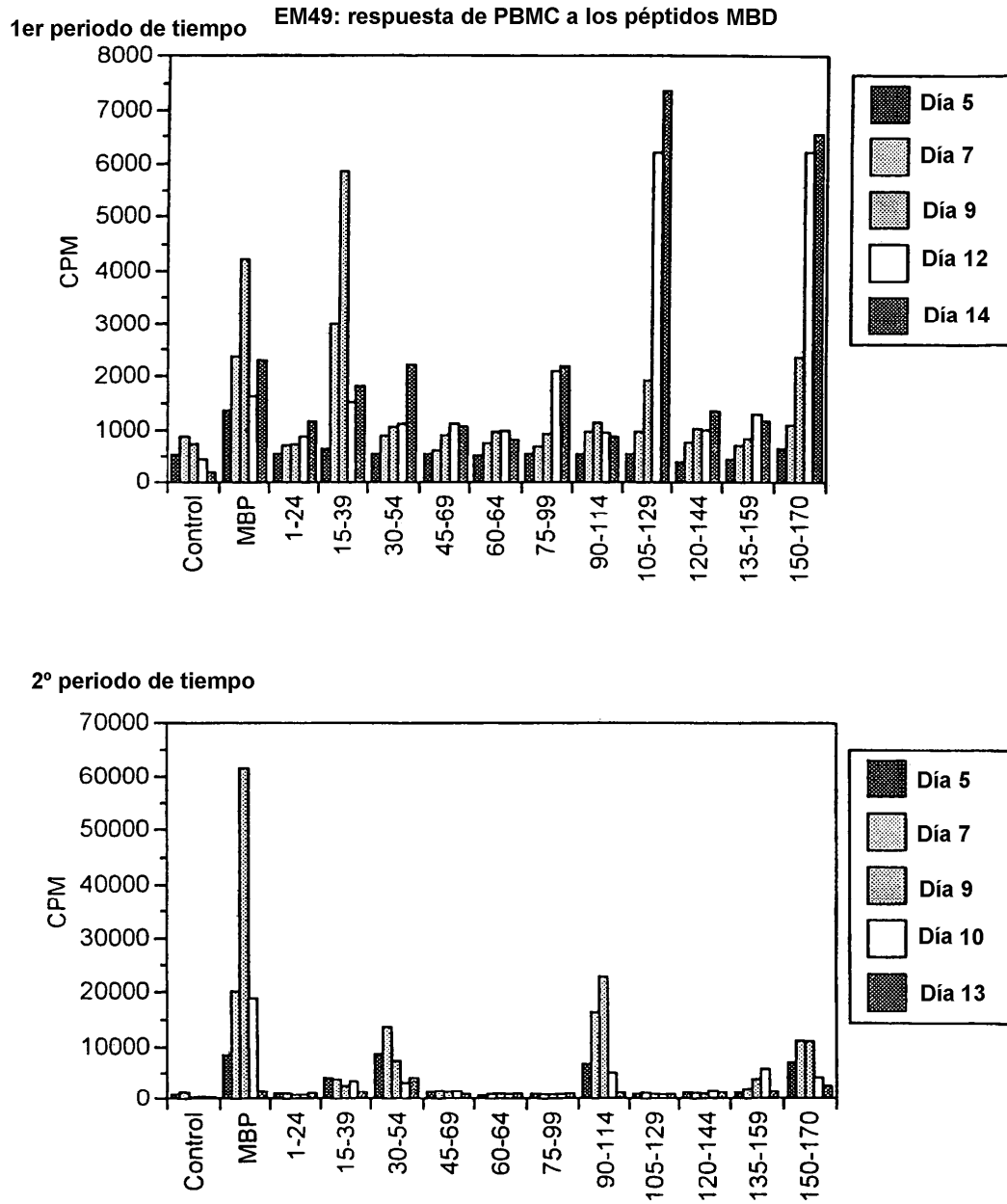


FIG. 4

5/16

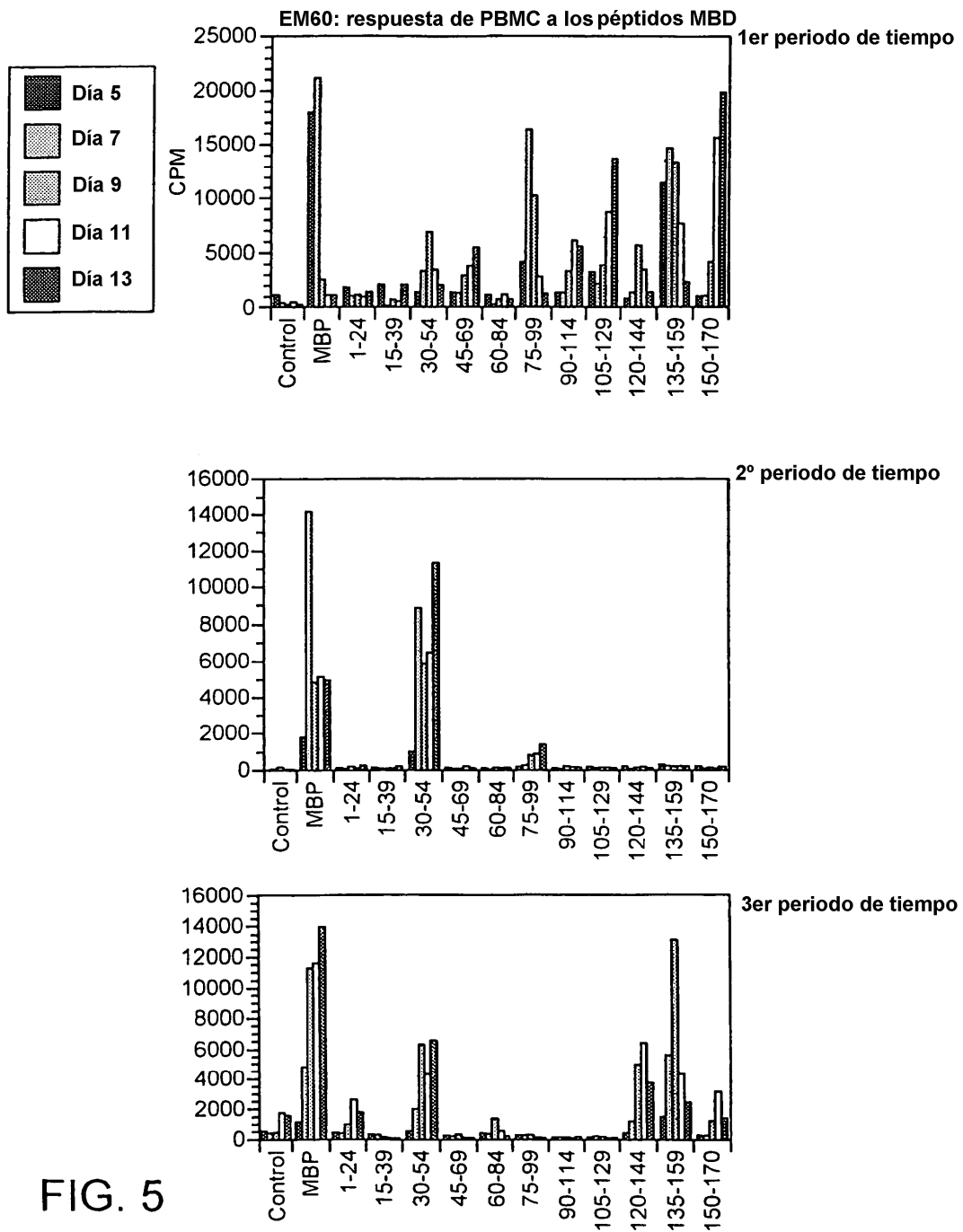


FIG. 5

6/16

TCC	Región MBP	Péptido específico
EM 39 : A7*	1-24	5-19
EM 49 : D3*	30-54	30-44
EM 49 : C8*	30-54	30-44
EM 49 : A8*	30-54	30-44
EM 48 : B6*	30-54	30-44
EM 39 : D7*	60-84	60-74
EM 43 : A7*	75-99	83-99
EM 41 : B6*	75-99	83-99
EM 41 : A2*	75-99	83-99
EM 41 : C6*	75-99	83-99
N5 : 8**	75-99	83-99
EM 60 : A2*	105-129	110-124
EM 60 : B3*	105-129	110-124
EM 60 : E1*	120-144	130-144
EM 17 : A3*	120-144	130-144
EM 60 : F7*	135-159	140-154
EM 60 : D1*	135-159	140-154
EM 57 : A1*	135-159	140-154
EM 59 : F1*	135-159	140-154
N5 : 19**	135-159	140-154
EM 43 : A3*	150-170	156-169
EM 43 : D2*	150-170	156-169

FIG. 6

7/16

REGIÓN DE LA PROTEÍNA ESTUDIADA	EPÍTOPOS IDENTIFICADOS UTILIZANDO CLONES DE CÉLULAS T
1-24	5-19
15-39	No común
30-54	30-44
45-69	No común
60-84	60-74
75-99	80-94 83-99
90-114	No común
105-29	110-124
120-144	130-144
135-159	130-144 140-154
150-170	150-164 156-169

FIG. 7A

EPÍTOTO ESTUDIADO	EPÍTOTO ESTUDIADO
5-19	No hecho
30-44	++
60-74	No hecho
80-94	++
83-99	++
110-124	++
130-144	++
140-154	No hecho
156-170	-

FIG. 7B

8/16

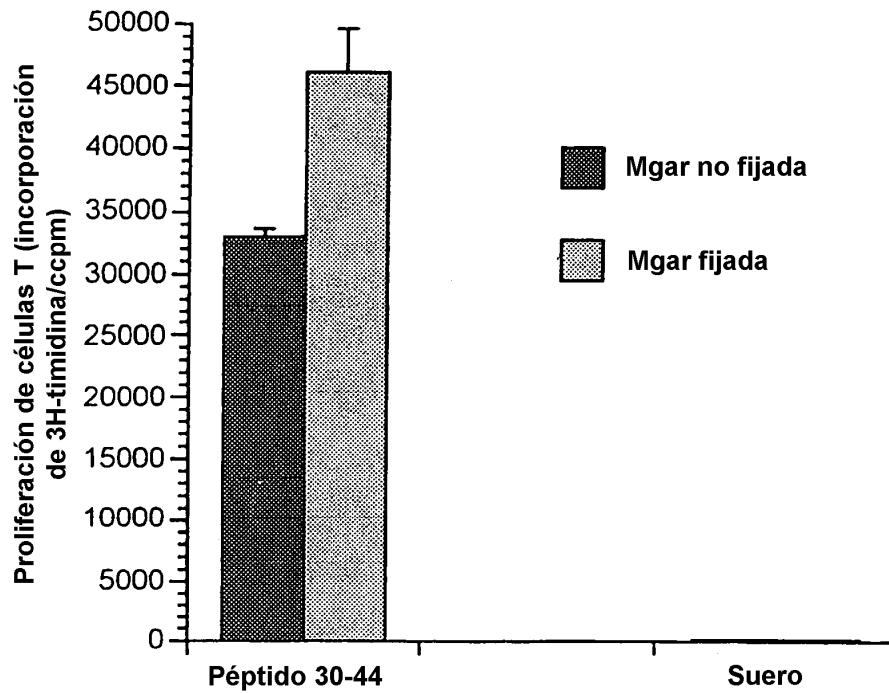


FIG. 8A

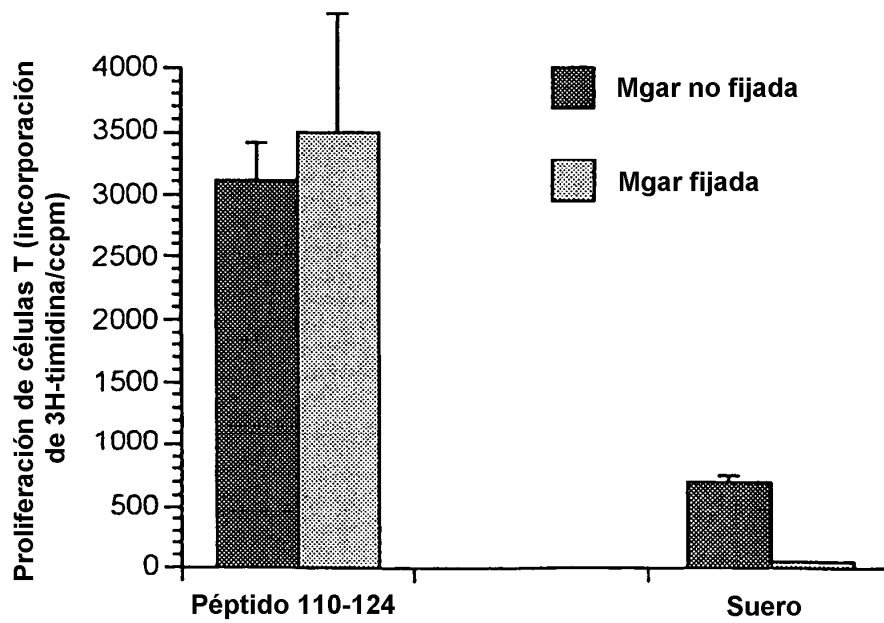


FIG. 8B

9/16

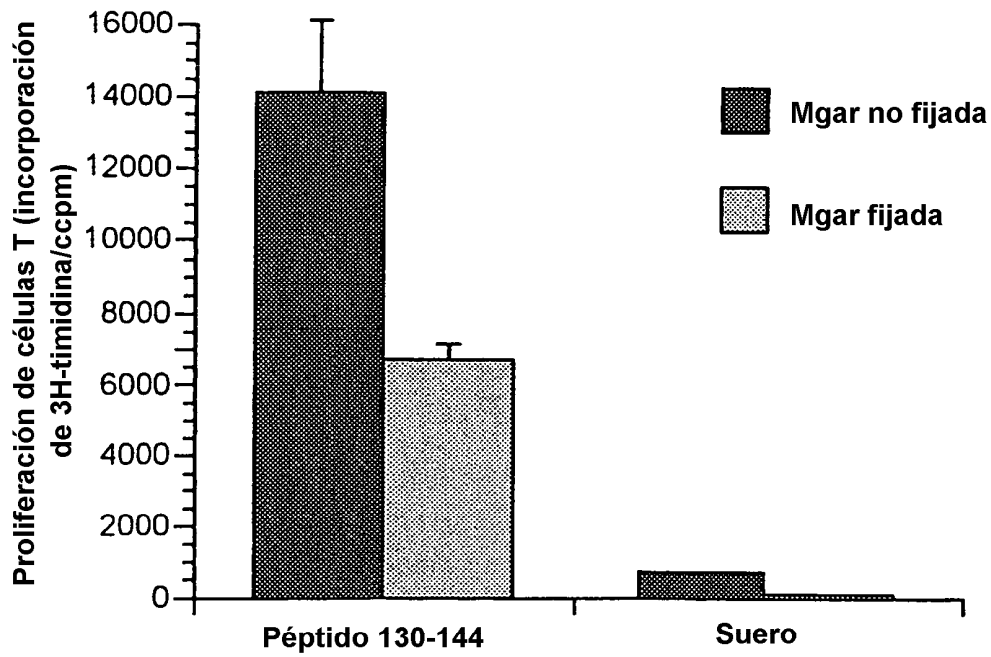


FIG. 9A

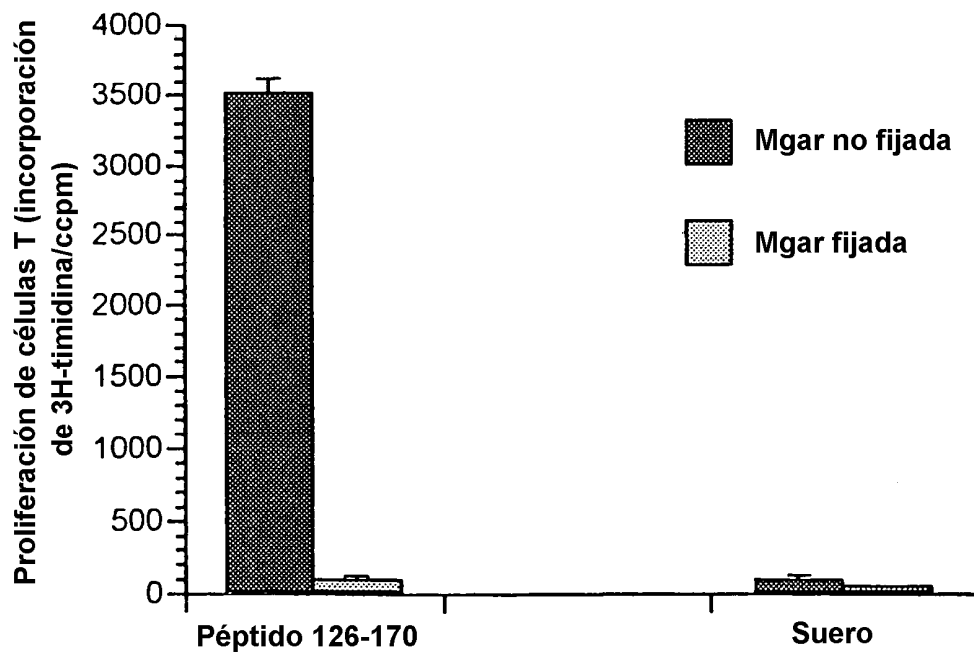


FIG. 9B

10/16

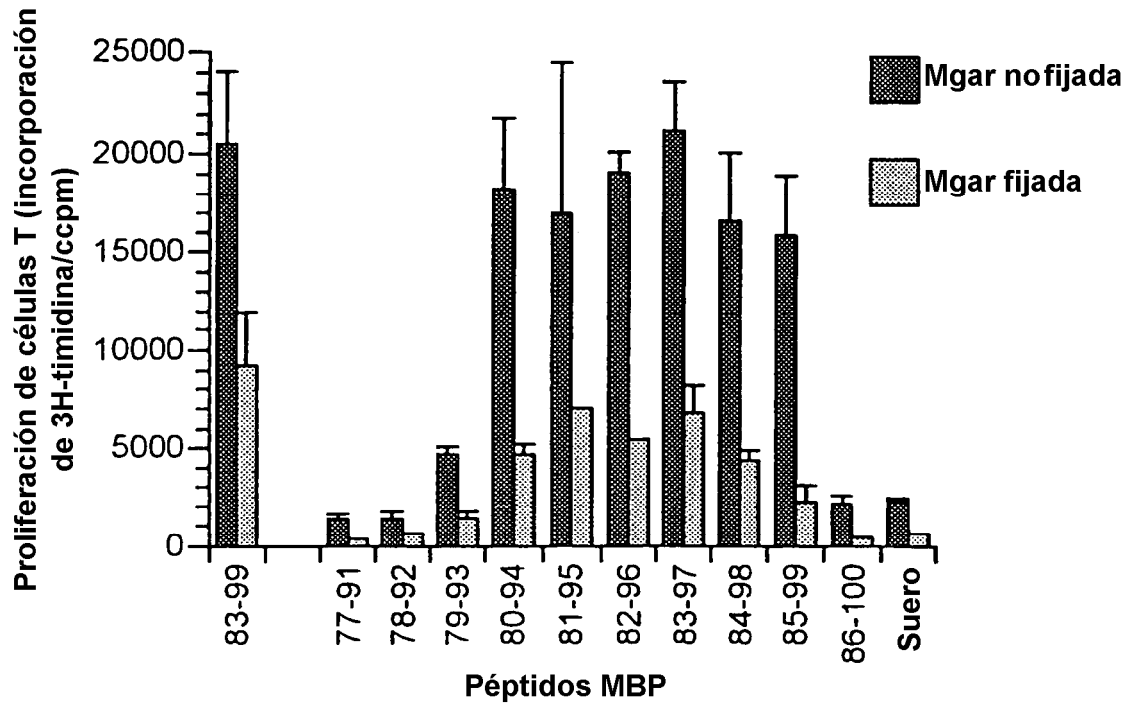
	Periodo de tiempo	MBP	1-24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170
EM 10	1	14	17	3	15	55	1	1	2	15	1	2	1
	2	4	1	<1	<1	<1	<1	9	4	1	<1	4	1
	3	8	3	1	1	1	<1	1	1	2	1	1	0
EM 17	1	29	1	1	1	1.5	2	1	<1	1	1	1.5	2
	2	51	1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	5
	3	51	1	<1	2	1	1	<1	2	1	1	1	1
EM 19	1	1	2	1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	1.5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
EM 39	1	39	3	5	1	3	2	2	7.5	6	<1	2	2
	2	58	1	<1	<1	2	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1
	3	50	8	1	1	1	2	1	1.5	1	<1	3	<1
EM 41	1	59	2	3	2	2	1.5	1	1	2	6	7	3
	2	116	<1	1	<1	<1	<1	1	<1	1	<1	<1	<1
	3	74	2	1.5	1	2	2	8	<1	<1	<1	95	<1
EM 43	1	32	4	22	3	3	3	24	4	2	12	3	4
	2	75	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	66	2	2	1	13	2	1	2	2	2	7	1
EM 49	1	6	5	9	11	5	4	11	4	35	6	5	31
	2	202	2	8	23	4	3	2	73	2	2	11	34
	3	2	1	2	4	1	2	1	1	1	1	1	2
EM 57	1	36	8	<1	1.5	1	1	2	2	<1	<1	<1	<1
	2	7	2	2	2	1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
EM 59	1	57	2	1	65	1	1	9	37	1	1	2	14
	2	27	1	<1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	3	14	1	9	2	1	1	4	2	2	63	137	1
EM 60	1	44	3	2	19	8	2	28	9	11	16	16	12
	2	133	1	<1	83	<1	<1	20	<1	1	<1	2	<1
	3	23	2	<1	13	<1	2	<1	<1	<1	10	26	2
EM 67	1	49	2	3	2	1	2	2	1	<1	1	1	58

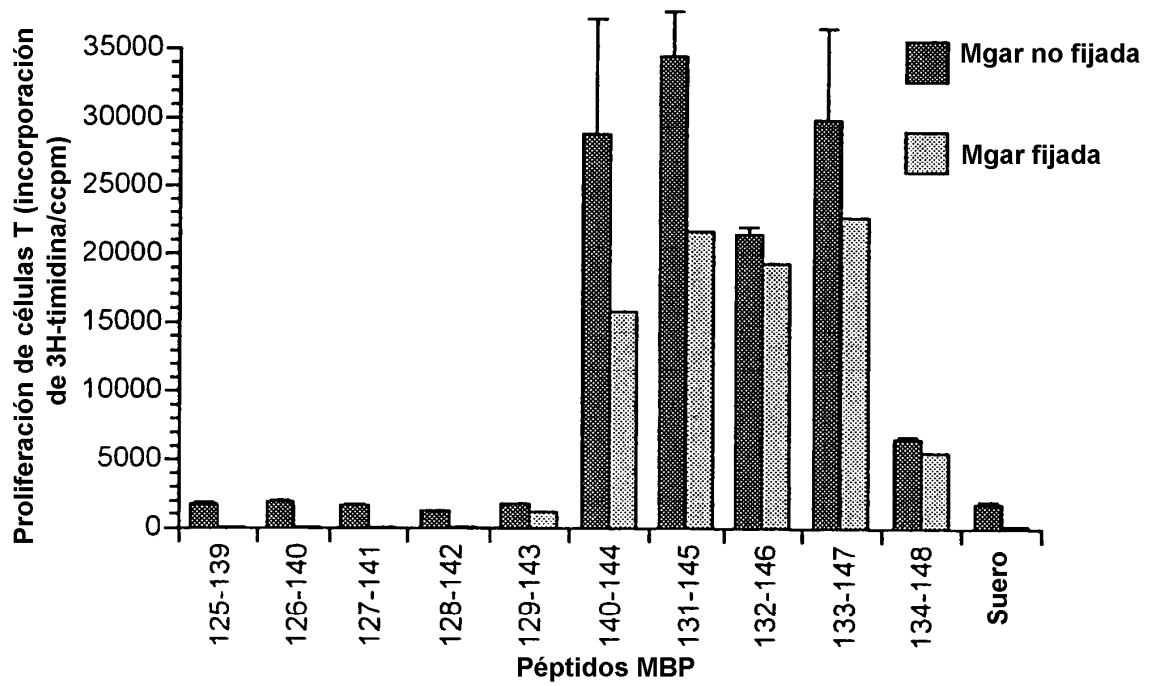
FIG. 10

11/16

	MBP	1-24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170
N1	20	<1	<1	<1	<1	0	1	<1	1	<1	<1	<1
N2	54	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
N3	14	2	2	2	1	4	6	1	1	<1	2	3
N4	6	1	1.5	<1	<1	<1	1	1	<1	<1	1	<1
N5	27	<1	1.5	<1	<1	<1	1.5	1	<1	<1	1	<1
N6	29	5	1	1	3	2	5	6	<1	2	3	2
N7	100	2	<1	2	<1	<1	<1	<1	2	<1	2	2
N8	33	3	<1	1.5	<1	<1	1	1	1	1	2.5	1.5
N9	104	<1	<1	2	<1	1	1	<1	1	2	1	<1
N10	72	3	<1	1	<1	2	1.5	<1	<1	71	5	<1
N11	11	4	1	18	<1	12	5	<1	2	7	7	8
N12	89	1	<1	<1	<1	<1	1	1	<1	<1	<1	<1

FIG. 11

12/16**FIG. 12**

13/16**FIG. 13**

14/16

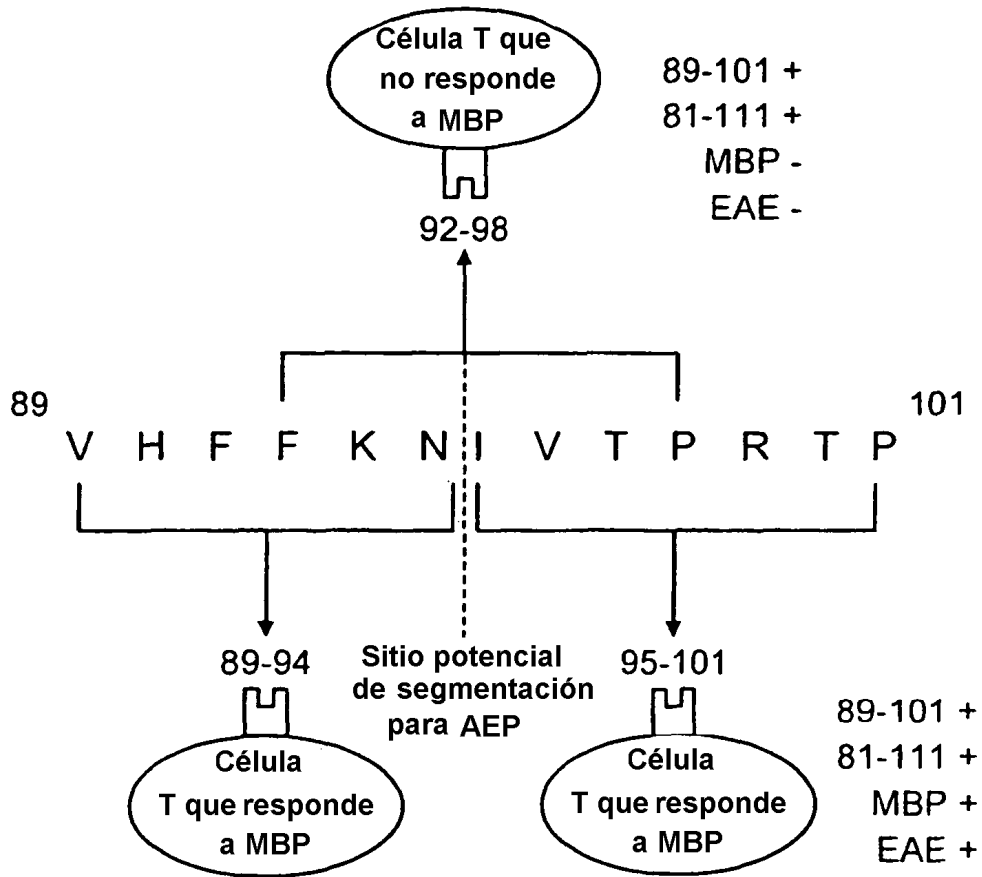


FIG. 14

Símbolo	Péptido intraperitoneal	Péptido para el cebado	Péptido para el recuerdo in vitro
□	Ninguno	87-96	87-96
○	Ninguno	87-96	89-101
■	87-96	87-96	87-96
●	87-96	87-96	89-101

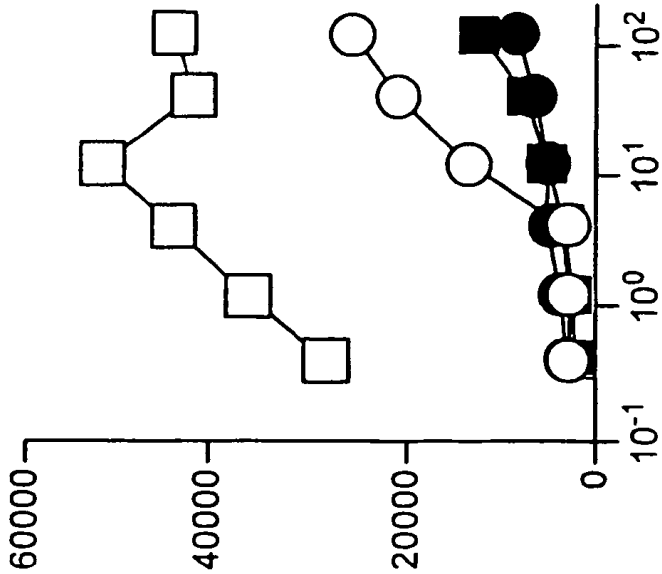


FIG. 15A

16/16

Símbolo	Péptido intraperitoneal	Péptido para el cebado	Péptido para el recuerdo in vitro
	Ninguno	87-96	87-96
	Ninguno	87-96	89-101
	89-101	87-96	87-96
	89-101	87-96	89-101

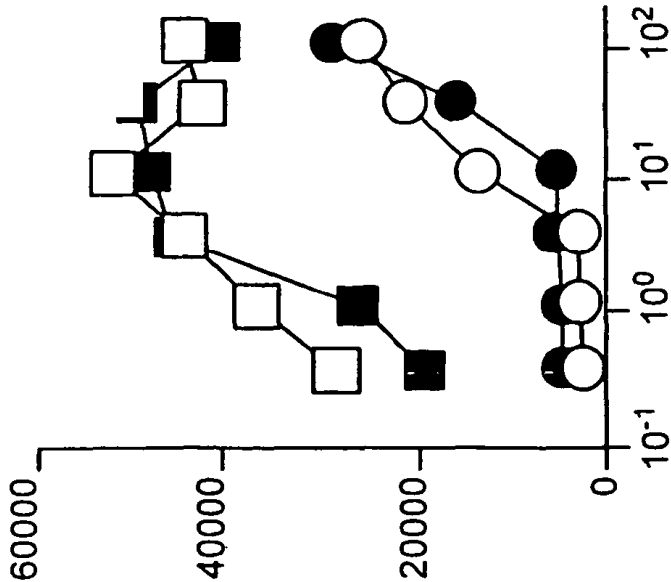


FIG. 15B