

B.T.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

- PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL -

21 EXPEDIENTE No.

04-83647

54 TITULO

"PEPTIDOS TOLEROGENICOS DE LA PROTEINA BASICA DE MIELINA"

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL

71 SOLICITANTE

APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED

DOMICILIO

University of Bristol, Department of Pathology & Microbiology
University Walk, Bristol BS8 1TD, REINO UNIDO

74 APODERADO

DRA MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

22 BOGOTA, D.C.,

26 AGO. 2004

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I☒ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED

Dirección: University of Bristol, Department of Pathology & Microbiology, University Walk, Bristol BS8 1TD, REINO UNIDO

Nacionalidad o Domicilio: Bristol, REINO UNIDO
Lugar de Constitución: Bristol, REINO UNIDOTeléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CARRERA 9 No. 93-09

Teléfono: 810 74 80 Fax: 810 07 06
E-mail: mcastell@impat.net.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Número 38778.854 TPA 70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: DAVID CAMERON WRAITH; HEATHER BARBARA STREETER; FRANCES MARY PONSFORD; y GRAZIELA MAZZA

Dirección: Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, School of Medical Sciences, University Walk, Clifton, Bristol BS8 1TD, REINO UNIDO

Nacionalidad o Domicilio Británica, Británica, Británica e Italiana

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No. PCT/GB03/00389

Fecha 30/01/2003

Publicación Internacional No. WO 03/084464 A1

Fecha 07/08/2003

⑥

Título (54)

"PEPTIDOS TOLEROGENICOS DE LA PROTEINA BASICA DE MIELINA"

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 38/00 ; C07K 14/47

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

01/02/2002

(31) Número de Solicitud

0202398.2

⑨

Comprobante de pago No.

04-59.145

Fecha

Julio 27 de 2004

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

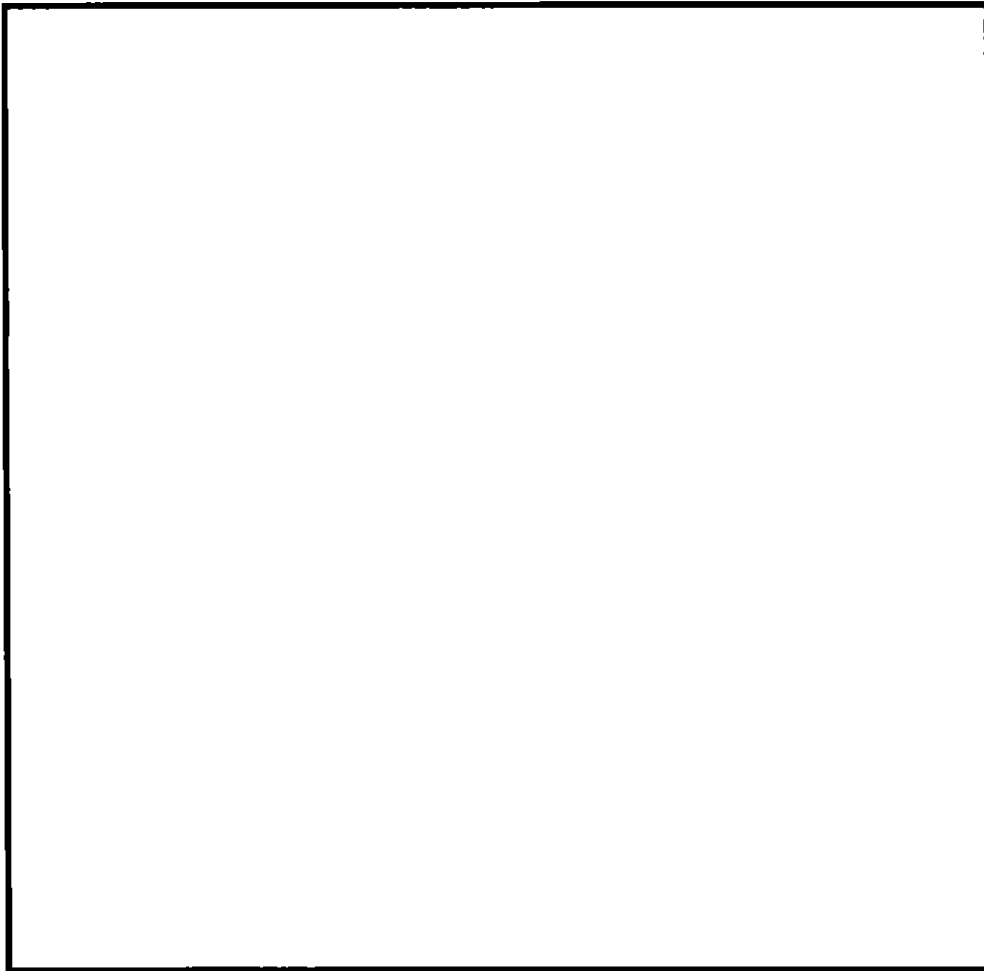
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo hecha a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros : Notificación del registro de Cambio de Dirección, formato PCT/IB/306

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

Margarita Castellanos
C.C. No. 38.779.654 Uuaquén - TPA 70.819 C.S.J.

26 A60. 2004

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04003647 00000000 Folios: 60
Fecha (AMD): 2004-08-26 15:26:49
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NDCI 411 PRESENTA
Dependencia: 2820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 59,145
FECHA : JULIO 27 DE 2004

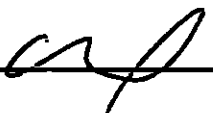
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	21263285	27/07/2004	3,650,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____ 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

(43) International Publication Date
7 August 2003 (07.08.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/064464 A1

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/47,
A61K 38/00

[IT/GB]; Department of Pathology and Microbiology, Uni-
versity of Bristol, School of Medical Sciences, University
Walk, Clifton, Bristol BS8 1TD (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB03/00399

(74) Agents: HARDING, Charles, Thomas et al.; D Young &
Co, 21 New Fetter Lane, London EC4A 1DA (GB).

(22) International Filing Date: 30 January 2003 (30.01.2003)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (*national*): AR, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SI,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0202399.2 1 February 2002 (01.02.2002) GB

(71) Applicant (*for all designated States except US*): API-
TOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED
[GB/GB]; 46-48 Queens Square, Bristol BS1 4LY (GB).

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI,
SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): WRAITH, David,
Cameron [GB/GB]; Department of Pathology and
Microbiology, University of Bristol, School of Medical
Sciences, University Walk, Clifton, Bristol BS8 1TD (GB).
STREETER, Heather, Barbara [GB/GB]; Department of
Pathology and Microbiology, University of Bristol, School
of Medical Sciences, University Walk, Clifton, Bristol
BS8 1TD (GB). PONSFORD, Frances, Mary [GB/GB];
Department of Pathology & Microbiology, University of
Bristol, School of Medical Sciences, University Walk,
Clifton, Bristol BS8 1TD (GB). MAZZA, Graziella

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/064464 A1

(54) Title: TOLEROGENIC PEPTIDES FROM MYELIN BASIC PROTEIN

(57) Abstract: There is provided a peptide which is capable of binding to an MHC class I or II molecule without further processing (i.e. an epitope) which comprises a portion of the region (131-158) of myelin basic protein, in particular there is provided an epitope which is selected from the following myelin basic protein peptides: (134-148, 135-149, 136-150, 137-151, 138-152, 139-153, 140-154). There is also provided the use of such a peptide in a pharmaceutical composition and a method to treat and/or prevent a disease using such a peptide.

TOLEROGENIC PEPTIDES FROM MYELIN BASIC PROTEIN

The present invention relates to peptides from myelin basic protein. In particular, the invention relates to peptides which comprise a portion of the region 131-158 of myelin basic protein and their use in the treatment and/or prevention of a disease.

BACKGROUND

In an adaptive immune response, T lymphocytes are capable of recognising internal epitopes of a protein antigen. Antigen presenting cells (APC) take up protein antigens and degrade them into short peptide fragments. A peptide may bind to a major histocompatibility complex (MHC) class I or II molecule inside the cell and be carried to the cell surface. When presented at the cell surface in conjunction with an MHC molecule, the peptide may be recognised by a T cell (via the T cell receptor (TCR)), in which case the peptide is a T cell epitope.

T cell epitopes play a central role in the adaptive immune response to any antigen, whether self or foreign. The central role played by T cell epitopes in hypersensitivity diseases (which include allergy, autoimmune diseases and transplant rejection) has been demonstrated through the use of experimental models. It is possible to induce inflammatory or allergic diseases by injection of synthetic peptides (based on the structure of T cell epitopes) in combination with adjuvant.

By contrast, it has been shown to be possible to induce immunological tolerance towards particular peptide epitopes by administration of peptide epitopes in soluble form. Administration of soluble peptide antigens has been demonstrated as an effective means of inhibiting disease in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE – a model for multiple sclerosis (MS)) (Metzler and Wraith (1993) *Int. Immunol.* 5:1159-1165; Liu and Wraith (1995) *Int. Immunol.* 7:1255-1263; Anderton and Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261); and experimental models of arthritis, diabetes, and uveoretinitis (reviewed in Anderton and Wraith (1998) as above). This has also been demonstrated as a means of treating an ongoing disease in EAE (Anderton and Wraith (1998) as above).

The use of tolerogenic peptides to treat or prevent disease has attracted considerable attention. One reason for this is that it has been shown that certain tolerogenic epitopes can down-regulate responses of T cells for distinct antigens within the same tissue. This phenomenon, known as "bystander suppression" means that it should be possible to induce tolerance to more than one epitope (preferably all epitopes) within a given antigen, and to more than one antigen for a given disease, using a particular tolerogenic peptide (Anderton and Wraith (1998) as above). This would obviate the need to identify all of the pathogenic antigens within a particular disease.

10

Peptides are also a favourable option for therapy because of their relatively low cost and the fact that peptide analogues can be produced with altered immunological properties. Peptides may thus be modified to alter their interactions with either MHC or TCR.

15

One possible problem with this approach is that it has been shown that not all peptides which act as T-cell epitopes are capable of inducing tolerance. The myelin basic protein (MBP) peptide 89-101 is an immunodominant antigen after immunisation and is also a very effective immunogen both in terms of priming for T cell reactivity and induction of EAE. However, this peptide has been shown to be ineffective at inducing tolerance when administered in solution (Anderton and Wraith (1998), as above).

20

A number of explanations for the observed hierarchy in the ability of T cell epitopes to induce tolerance have been proposed (reviewed in Anderton and Wraith (1998) as above). In particular, it has been proposed that there is a correlation between the affinity of the peptide for the MHC and tolerogenicity (Liu and Wraith (1995) as above), but this does not tally with some of the observations. For example, MBP[89-101], which is not tolerogenic, binds to I-A^S with relatively high affinity. It is thus not straightforward to predict which peptides will induce tolerance.

25

30

The present inventors have shown that if a peptide epitope is of an appropriate size to be presented by immature APC without antigen processing, it can induce immunological tolerance (International patent application number PCT/GB01/03702). The observation

that some T cell epitopes are tolerogenic and others are incapable of inducing tolerance can therefore be explained by the fact that some epitopes require further processing before they are capable of being presented by an MHC molecule. These epitopes which require further processing do not induce tolerance when administered in a soluble form, despite
5 their capacity to induce disease when injected in combination with adjuvant.

The epitopes which do not require further processing are capable of inducing tolerance, and have been termed "apitopes" (Antigen Processing Independent epiTOPES) by the
10 inventors.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present inventors have examined the region 131-158 of MBP, and found a number of peptides which can be presented by fixed antigen presenting cells to T-cells
15

These peptides are defined as apitopes, because they are capable of binding to MHC class I or II without further processing.

In a first aspect, therefore, the present invention provides an apitope which comprises a
20 portion of the region 131-158 of myelin basic protein.

The present inventors have also identified two minimal epitopes in this region which are recognised by particular T-cell clones. The peptide may comprise one or both of these
25 epitopes which are MBP 142-152 and 140-148.

In a preferred embodiment the peptide is selected from the following myelin basic protein peptides: 134-148, 135-149, 136-150, 137-151, 138-152, 139-153, 140-154.

In a second aspect, the present invention provides a pharmaceutical composition
30 comprising one or more peptide according to the first aspect of the application.

In a third aspect, the present invention provides a method for treating and/or preventing a disease in a subject in need of same which comprises the step of administering a peptide according to the first aspect of the invention to the subject.

- 5 The present invention also provides the use of a peptide according to the first aspect of the invention in the manufacture of a medicament for use in the treatment and/or prevention of a disease.

The peptides of the present invention are useful in the prevention and/or treatment of
10 multiple sclerosis.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

- 15 Figure 1 shows the response of T cell clone MS60:D2 to presentation of nested MBP peptides in the region 131-158 by APC.

Figure 2 shows the response of T cell clone N5 to presentation of MBP peptide 140-154 by APC.

20

Figure 3 shows the response of T cell clone N5 to presentation of nested MBP peptides in the region 136-157 by APC.

DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION

25

In a first aspect, the present invention relates to a peptide.

Peptides

- 30 The term "peptide" is used in the normal sense to mean a series of residues, typically L-amino acids, connected one to the other typically by peptide bonds between the α -amino

and carboxyl groups of adjacent amino acids. The term includes modified peptides and synthetic peptide analogues.

- 5 A peptide of the present invention may be any length that is capable of binding to an MHC class I or II molecule without further processing.

10 Peptides that bind to MHC class I molecules are typically 7 to 13, more usually 8 to 10 amino acids in length. The binding of the peptide is stabilised at its two ends by contacts between atoms in the main chain of the peptide and invariant sites in the peptide-binding groove of all MHC class I molecules. There are invariant sites at both ends of the groove which bind the amino and carboxy termini of the peptide. Variations in peptide length are accommodated by a kinking in the peptide backbone, often at proline or glycine residues that allow the required flexibility.

- 15 Peptides which bind to MHC class II molecules are typically between 8 and 20 amino acids in length, more usually between 10 and 17 amino acids in length, and can be much longer. These peptides lie in an extended conformation along the MHC II peptide-binding groove which (unlike the MHC class I peptide-binding groove) is open at both ends. The peptide is held in place mainly by main-chain atom contacts with conserved residues that
20 line the peptide-binding groove.

The peptide of the present invention may be made using chemical methods (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.). For example, peptides can be synthesized by solid phase techniques (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204), cleaved from the resin, and purified by preparative high
25 performance liquid chromatography (e.g., Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY). Automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) in accordance with the instructions provided by the manufacturer.

30

The peptide may alternatively be made by recombinant means, or by cleavage from a longer polypeptide. For example, the peptide may be obtained by cleavage from myelin

basic protein. The composition of a peptide may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure).

5 The peptide of the invention is derivable from region 131-158 of MBP. Preferably the peptide is derivable from a fragment of the antigen which arises by natural processing of the antigen by an APC.

For practical purposes, there are various other characteristics which the peptide should show. For example, the peptide should be soluble at a concentration which permits its use
10 *in vivo*. Preferably the peptide should be soluble at concentrations of up to 0.5 mg/ml, more preferably the peptide should be soluble at concentrations of up to 1 mg/ml, most preferably the peptide should be soluble at concentrations of up to 5 mg/ml.

For intranasal administration the maximum volume of dose which can be taken up using
15 current procedures is approximately 200µl per nostril. If the peptide is soluble at 1mg/ml, a double dose to each nostril enables 800µg to be given to the patient. It is unusual to give more than 5mg in any individual dose.

It is also important that the peptide is sufficiently stable *in vivo* to be therapeutically
20 useful. The present inventors have found that *in vivo*, 30 minutes after administration the total amount of a test peptide drops to about 50%, 4 hours after administration the amount drops to about 30%, but that after 5 days the peptide is still detectable (at about 5%). The half-life of the peptide *in vivo* should be at least 10 minutes, preferably at least 30 minutes, more preferably at least 4 hours, most preferably at least 24 hours.

25 The present inventors have found that following intranasal administration, the amount of peptide in the draining lymph node peaks at about 4 hrs following administration, however peptide is still detectable (at levels of about 5% maximum) after 5 days. Preferably the peptide is sufficiently stable to be present at a therapeutically active concentration in the
30 draining lymph node for long enough to exert a therapeutic effect.

The peptide should also demonstrate good bioavailability *in vivo*. The peptide should maintain a conformation *in vivo* which enables it to bind to an MHC molecule at the cell surface without undue hindrance.

5 *Myelin Basic Protein (MBP)*

MBP is an antigen from myelin, which has been previously characterised and sequenced (Roth et al (1987) *J. Neurosci. Res.* 17(4) 321-328; Accession number M30516).

10 The peptides of the present invention are derivable from MBP region 131-158.

Preferably the peptide is or comprises one or more of the minimal T-cell epitopes in the region, for example the minimal epitope MBP142-152 or 140-148.

15 Preferably the peptide is selected from the following myelin basic protein peptides:

MBP peptide	Sequence
134-148	YKSAHKGFKGVDAQG
135-149	KSAHKGFKGVDAQGT
136-150	SAHKGFKGVDAQGTL
137-151	AHKGFKGVDAQGTLS
138-152	HKGFKGVDQAQGTLSK
139-153	KGFKGVDAQGTLSKI
140-154	GFKGVDAQGTLSKIP

Antigen Processing Independent Epitopes (APITOPES)

20

The peptide of the present invention is capable of binding to an MHC class I or II molecule (in the peptide-binding groove) without further processing. Such peptides are known herein as "apitopes" (Antigen Processing Independent epiTOPES).

Cell surface presentation of peptides derived from a given antigen is not random and tends to be dominated by a small number of frequently occurring epitopes. The dominance of a particular peptide will depend on many factors, such as relative affinity for binding the MHC molecule, spatio-temporal point of generation within the APC and resistance to degradation. The epitope hierarchy for an antigen can change with progression of an immune response, which has important implications for self-tolerance and autoimmunity. Immunodominant determinant regions are likely to be good tolerogens. Hence, in a preferred embodiment, the epitope of the present invention is based on a dominant epitope.

However, after a primary immune response to the immunodominant peptides, epitope "spreading" may occur to sub-dominant determinants (Lehmann *et al* (1992) Nature 358:155-157). Presentation of sub-dominant epitopes may be important in triggering autoimmunity. The epitope of the present invention may, therefore be based on a subdominant epitope.

For any given antigen, cryptic epitopes may also exist. Cryptic epitopes are those which can stimulate a T cell response when administered as a peptide but which fail to produce such a response when administered as a whole antigen. It may be that during processing of the antigen into peptides in the APC the cryptic epitope is destroyed.

A cryptic epitope may act as an epitope *in vitro*, in that it may be capable of binding to an MHC molecule without further processing, and inducing anergy in a T cell which recognises the cryptic epitope. However, such an epitope would be unlikely to be therapeutically useful because it should be incapable of tolerising T cells which recognise a naturally processed epitope of the antigen.

Epitopes for an antigen may be identified by measuring the T cell response to overlapping peptides spanning the entire antigen (see below) when presented by APC. Such studies usually result in "nested sets" of peptides, and the minimal epitope for a particular T cell line/clone can be assessed by measuring the response to truncated peptides.

It cannot be assumed that a minimal epitope of an antigen will behave as an apitope. It may well be that amino acids flanking the minimal epitope will be required for optimal binding to the MHC. The apitope should be designed to cover the possibility that there may be subtle differences between the minimal epitopes of different T cell clones.

5

It should be emphasised that it may not be possible to identify an apitope for all epitopes. There is clear evidence that some epitopes bind MHC in a way that is dependent on MHC-loading in endosomes and hence require processing (Viner et al (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:2214-2218). This is another reason why one cannot assume that each minimal

10

Identification of peptides containing T cell epitopes

There are a number of methods known in the art to identify the T cell epitopes within a given antigen.

15

Naturally processed epitopes may be identified by mass spectrophotometric analysis of peptides eluted from antigen-loaded APC. These are APC that have either been encouraged to take up antigen, or have been forced to produce the protein intracellularly by transformation with the appropriate gene. Typically APC are incubated with protein either in solution or suitably targeted to the APC cell surface. After incubation at 37°C the cells are lysed in detergent and the class II protein purified by, for example affinity chromatography. Treatment of the purified MHC with a suitable chemical medium (for example, acid conditions) results in the elution of peptides from the MHC. This pool of peptides is separated and the profile compared with peptide from control APC treated in the same way. The peaks unique to the protein expressing/fed cells are analysed (for example by mass spectrometry) and the peptide fragments identified. This procedure usually generates information about the range of peptides (usually found in "nested sets") generated from a particular antigen by antigen processing.

20
25
30

Another method for identifying epitopes is to screen a synthetic library of peptides which overlap and span the length of the antigen in an *in vitro* assay. For example, peptides

- which are 15 amino acids in length and which overlap by 5 or 10 amino acids may be used. The peptides are tested in an antigen presentation system which comprises antigen presenting cells and T cells. For example, the antigen presentation system may be a murine splenocyte preparation, a preparation of human cells from tonsil or PBMC.
- 5 Alternatively, the antigen presentation system may comprise a particular T cell line/clone and/or a particular antigen presenting cell type.

- T cell activation may be measured via T cell proliferation (for example using ^3H -thymidine incorporation) or cytokine production. Activation of TH1-type CD4+ T cells
- 10 can, for example be detected via IFN γ production which may be detected by standard techniques, such as an ELISPOT assay.

- Overlapping peptide studies usually indicate the area of the antigen in which an epitope is located. The minimal epitope for a particular T cell can then be assessed by measuring the
- 15 response to truncated peptides. For example if a response is obtained to the peptide comprising residues 1-15 in the overlapping library, sets which are truncated at both ends (i.e. 1-14, 1-13, 1-12 etc. and 2-15, 3-15, 4-15 etc.) can be used to identify the minimal epitope.

20 *Antigen Processing Independent Presentation Systems (APIPS)*

- Once an epitope has been identified, the next step is to investigate whether it also behaves as an apitope.
- 25 An apitope must be presented to T cells without the need for antigen processing. Having identified peptides containing T cell epitopes, apitopes may be identified using a processing free system. Truncated peptides and peptide analogues may be tested for activation using an antigen processing independent presentation system (APIPS).

30 Examples of APIPS include:

- a) fixed APC (with or without antibodies to CD28);

- b) Lipid membranes containing Class I or II MHC molecules (with or without antibodies to CD28); and
- c) purified natural or recombinant MHC in plate-bound form (with or without antibodies to CD28).

5

It is known to use fixed APC to investigate T cell responses, for example in studies to investigate the minimal epitope within a polypeptide, by measuring the response to truncated peptides (Fairchild *et al* (1996) *Int. Immunol.* 8:1035-1043). APC may be fixed using, for example formaldehyde (usually paraformaldehyde) or glutaraldehyde.

10

Lipid membranes (which may be planar membranes or liposomes) may be prepared using artificial lipids or may be plasma membrane/microsomal fractions from APC.

15

In use, the APIPS may be applied to the wells of a tissue culture plate. Peptide antigens are then added and binding of the peptide to the MHC portion of the APIPS is detected by addition of selected T cell lines or clones. Activation of the T cell line or clone may be measured by any of the methods known in the art, for example via ³H-thymidine incorporation or cytokine secretion.

20 *Tolerance*

The peptides of the present invention should be capable of inducing tolerance to MBP as they are epitopes for this antigen.

25 As used herein, the term "tolerogenic" means capable of inducing tolerance.

30

Tolerance is the failure to respond to an antigen. Tolerance to self antigens is an essential feature of the immune system, when this is lost, autoimmune disease can result. The adaptive immune system must maintain the capacity to respond to an enormous variety of infectious agents while avoiding autoimmune attack of the self antigens contained within its own tissues. This is controlled to a large extent by the sensitivity of immature T lymphocytes to apoptotic cell death in the thymus (central tolerance). However, not all

self antigens are detected in the thymus, so death of self-reactive thymocytes remains incomplete. There are thus also mechanisms by which tolerance may be acquired by mature self-reactive T lymphocytes in the peripheral tissues (peripheral tolerance). A review of the mechanisms of central and peripheral tolerance is given in Anderton *et al*
5 (1999) (*Immunological Reviews* 169:123-137).

Tolerance may result from or be characterised by the induction of anergy in at least a portion of CD4+ T cells. In order to activate a T cell, a peptide must associate with a "professional" APC capable of delivering two signals to T cells. The first signal (signal 1)
10 is delivered by the MHC-peptide complex on the cell surface of the APC and is received by the T cell via the TCR. The second signal (signal 2) is delivered by costimulatory molecules on the surface of the APC, such as CD80 and CD86, and received by CD28 on the surface of the T cell. It is thought that when a T cell receives signal 1 in the absence of signal 2, it is not activated and, in fact, becomes anergic. Anergic T cells are refractory to
15 subsequent antigenic challenge, and may be capable of suppressing other immune responses. Anergic T cells are thought to be involved in mediating T cell tolerance.

Without wishing to be bound by theory, the present inventors predict that peptides which require processing before they can be presented in conjunction with MHC molecules do
20 not induce tolerance because they have to be handled by mature antigen presenting cells. Mature antigen presenting cells (such as macrophages, B cells and dendritic cells) are capable of antigen processing, but also of delivering both signals 1 and 2 to a T cell, leading to T cell activation. Apitopes, on the other hand, will be able to bind class II MHC on immature APC. Thus they will be presented to T cells without costimulation, leading
25 to T cell anergy and tolerance.

Of course, apitopes are also capable of binding to MHC molecules at the cell surface of mature APC. However, the immune system contains a greater abundance of immature than mature APC (it has been suggested that less than 10% of dendritic cells are activated,
30 Summers *et al.* (2001) *Am. J. Pathol.* 159: 285-295). The default position to an apitope will therefore be anergy/tolerance, rather than activation.

It has been shown that, when tolerance is induced by peptide inhalation, the capacity of antigen-specific CD4+ T cells to proliferate is reduced. Also, the production of IL-2, IFN- γ and IL-4 production by these cells is down-regulated, but production of IL-10 is increased. Neutralisation of IL-10 in mice in a state of peptide-induced tolerance has been shown to restore completely susceptibility to disease. It has been proposed that a population of regulatory cells persist in the tolerant state which produce IL-10 and mediate immune regulation (Burkhart *et al* (1999) *Int. Immunol.* 11:1625-1634).

The induction of tolerance can therefore be monitored by various techniques including:

- 10 (a) reduced susceptibility to contract the disease for which the peptide is a target epitope *in vivo*;
- (b) the induction of anergy in CD4+ T cells (which can be detected by subsequent challenge with antigen *in vitro*);
- (c) changes in the CD4+ T cell population, including
 - 15 (i) reduction in proliferation;
 - (ii) down-regulation in the production of IL-2, IFN- γ and IL-4; and
 - (iii) increase in the production of IL-10.

Target diseases

20

The peptide of the invention may be used in the treatment and/or prevention of a disease.

The peptides of the present invention are particularly useful in the treatment and/or prevention of multiple sclerosis (MS). Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease characterised by multiple demyelinating lesions disseminated throughout the CNS white matter and occurring at various sites and times (McFarlin and McFarland, 1982 *New England J. Medicine* 307:1183-1188 and 1246-1251). MS is thought to be mediated by autoreactive T cells.

30 MBP is immunogenic and MBP-specific T lymphocytes have encephalitogenic activity in animals (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).

Pharmaceutical composition

In a second aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising one or more peptide(s) of the first aspect of the invention. The composition may also comprise one or more apitopes from another region of MBP or from a different antigen.

The present inventors predict that, despite "bystander suppression" it may be necessary to target a number of different T cell clones in order to induce tolerance effectively. Hence a plurality of peptides may be administered to an individual in order to prevent or treat a disease.

The pharmaceutical composition may, for example comprise between 1 and 50 apitopes, preferably between 1 and 15 apitopes. If there is more than one apitope, preferably the apitopes are either all able to bind to MHC class I, or all able to bind MHC class II, without further processing.

Where there are two or more apitopes, the pharmaceutical composition may be in the form of a kit, in which some or each of the apitopes are provided separately for simultaneous, separate or sequential administration.

Alternatively (or in addition) if the pharmaceutical composition (or any part thereof) is to be administered in multiple doses, each dose may be packaged separately.

The pharmaceutical composition may comprise a therapeutically or prophylactically effective amount of the or each apitope and optionally a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

Also, in the pharmaceutical compositions of the present invention, the or each apitope may be admixed with any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s), or solubilising agent(s).

Administration

The peptide may be administered in soluble form in the absence of adjuvant.

5

Preferably the peptide is administered by a mucosal route.

Studies have shown that peptide, when given in soluble form intraperitoneally (i.p.), intravenously (i.v.) or intranasally (i.n.) or orally can induce T cell tolerance (Anderton and Wraith (1998) as above; Liu and Wraith (1995) as above; Metzler and Wraith (1999) Immunology 97:257-263).

10

Preferably the peptide is administered intranasally.

15

Studies in mice have demonstrated that the duration of peptide administration required to induce tolerance depends on the precursor frequency of T cells in the recipient (Burkhart et al (1999) as above). In many experimental studies, it has been shown that repeated doses of peptide are required to induce tolerance (Burkhart et al (1999) as above). The exact dose and number of doses of peptide will therefore depend on the individual, however, in a preferred embodiment a plurality of doses is administered.

20

If a plurality of peptides is administered simultaneously, they may be in the form of a "cocktail" which is suitable for administration in single or multiple doses. Alternatively it may be preferable to give multiple doses but vary the relative concentrations of the peptides between doses.

25

In a preferred embodiment a "dose escalation" protocol may be followed, where a plurality of doses is given to the patient in ascending concentrations. Such an approach has been used, for example, for phospholipase A2 peptides in immunotherapeutic applications against bee venom allergy (Müller et al (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 and Akdis et al (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

30

EXAMPLES

The following examples serve to illustrate the present invention, but should not be construed as a limitation thereof. The invention particularly relates to the specific
5 embodiments described in these examples

EXAMPLE 1 – Identification of epitopes within MBP region 134-154

Materials and Methods

10

Antigens

Human MBP is prepared from brain white matter as described by Deibler et al. (Deibler *et al.*, 1972 *Preparative Biochemistry* 2:139), and its purity assessed by SDS-PAGE. MBP and Mycobacterium tuberculosis purified protein derivative (PPD) (UK Central Veterinary
15 Laboratory, Surrey) are used in proliferative assays at previously determined optimal concentrations; the optimum concentration for each antigen is 20 µg/ml. A panel of 15-mer overlapping peptides spanning MBP region 131-158 are synthesized using standard Fmoc chemistry on an Abimed AMS 422 multiple peptide synthesizer (Abimed, Langenfeld, Germany). Each peptide is displaced by 1 aa and overlapped by 14 aa.

20

Tissue culture medium

RPMI-1640 medium supplemented with 20mM HEPES (Sigma, Poole, UK), penicillin (100U/ml), streptomycin sulphate (100 mg/ml), and 4 mM L-glutamine (all from Life Technologies, Paisley, Scotland), is used as the tissue culture medium. Medium without
25 serum is used for washing lymphoid cells and TCL. For all culture conditions and assays, medium is supplemented with 10 % heat inactivated autologous plasma.

Generation of T cell clones

MBP-specific T cell lines (TCL) are generated from 8 MS patients and 2 healthy control
30 donors. PBMC from each subject are separated as described above and plated out at 1×10^6 cells/ml in 6-well plates in the presence of MBP (50 µg/ml); a portion of PBMC from each subject is regularly frozen and stored for subsequent restimulations. Seven days later the

cells are fed with fresh medium containing 2% IL-2 (Lymphocult-HT; Biotest LTD., Birmingham, UK), and on day 12 of culture all cells are restimulated with antigen, IL-2 and irradiated (2500 Rad) autologous PBMC as a source of antigen presenting cells (APC), at a cell ratio of 1T cell:5 APC. Cells are expanded in IL-2 every 3-4 days, and on day 14 are restimulated with antigen, IL-2 and PBMC, as described above. On the day of the first restimulation cells are examined for specific proliferation to MBP. Briefly, 2×10^4 T cells and 1×10^5 irradiated autologous PBMC are cultured in triplicate, in 96-well round-bottom plates, in the presence of MBP. Cells are cultured for 2 days and pulsed with (^3H)-Thymidine at 0.4 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ during the last 18 hours of the culture. Cells are then harvested as described above, and a TCL is considered to be MBP-specific with a $\delta\text{cpm} > 1000$ and a $\text{SI} > 3$.

Following 3 restimulation/expansion cycles TCL are cloned using PHA (Sigma, Poole, Dorset, UK) in the presence of autologous irradiated PBMC as APC. T cells are plated under limiting dilution conditions at 0.1 cell/well, 0.3 cell/well and 1 cell/well and cultured in Terasaki plates (Nunc International, Costar) with 1×10^4 irradiated PBMC, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA, and 2% IL-2. After 10-12 days, growth-positive wells are expanded onto 96-well round-bottom plates, using 1×10^5 irradiated PBMC, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA and IL-2. Three days later wells are fed with fresh medium containing IL-2, and on day 7 the clones are expanded onto 48-well plates using 5×10^5 irradiated PBMC, PHA and IL-2; at this point clones are tested in proliferation assays for specific responses to MBP. MBP-specific clones are expanded a week later onto 24-well plates, using 1×10^6 irradiated PBMC with PHA or Dynabeads (Dyna, UK) and IL-2. The clones are maintained in 24-well plates using a 7-10 day restimulation/expansion cycle.

25

Proliferation assay

Live or p-formaldehyde fixed Mgar (HLA-DR2 +ve) cells were incubated with peptides in serum or in serum alone, together with T cells. The T cell proliferative response was measured by ^3H -thymidine uptake as follows. Triplicate aliquots of 100 μl of each culture were grown in a 96-well round bottom microtitre plate for 48 hours, then pulsed with 0.4 μCi [^3H]-Thymidine (Amersham International, Amersham, UK). After 20 hours cells are harvested onto glass fibre mats (LKB-Wallac, Turku, Finland) using a Mach 111 harvester

96 (Tomtec, Orange, New Jersey, USA). [³H]- Thymidine incorporation is determined using a Microbeta liquid scintillation counter (LKB-Wallac). Test wells containing antigen are considered positive when the $\delta\text{cpm} > 1000$ and the Stimulation Index (SI) > 3 , where $\text{SI} = \text{CPM antigen containing culture} / \text{CPM culture without antigen}$.

5

Results

10 The response of T cell clone MS60:D2 to presentation of nested MBP peptides in the region 131-158 is shown in Figure 1. Peptides 134-148, 135-149, 136-150, 137-151, 138-152, 139-153 and 140-154 are defined as apitopes as they could be presented by fixed APC to T cells without further processing.

15 The response of T cell clone N5 to presentation of peptide 140-154 is shown in Figure 2. This further confirms that peptide 140-154 can be presented by fixed APC without further processing.

20 EXAMPLE 2 - Identification of the minimum epitope recognised by T cell clones N5 and MS60:D2

Live Mgar cells were incubated with overlapping peptides from MBP region 136-157 in serum or serum alone, together with N5 T cells. T cell proliferation was measured by ³H-thymiding uptake.

25

The results are shown in Figure 3. The minimal epitope recognised by T cell clone N5 is MBP 142-152.

A similar experiment was performed for T cell clone MS60:D2 (Fig. 1, unfixed Mgar).

30 The minimal epitope recognised by this T cell clone is MBP 140-148.

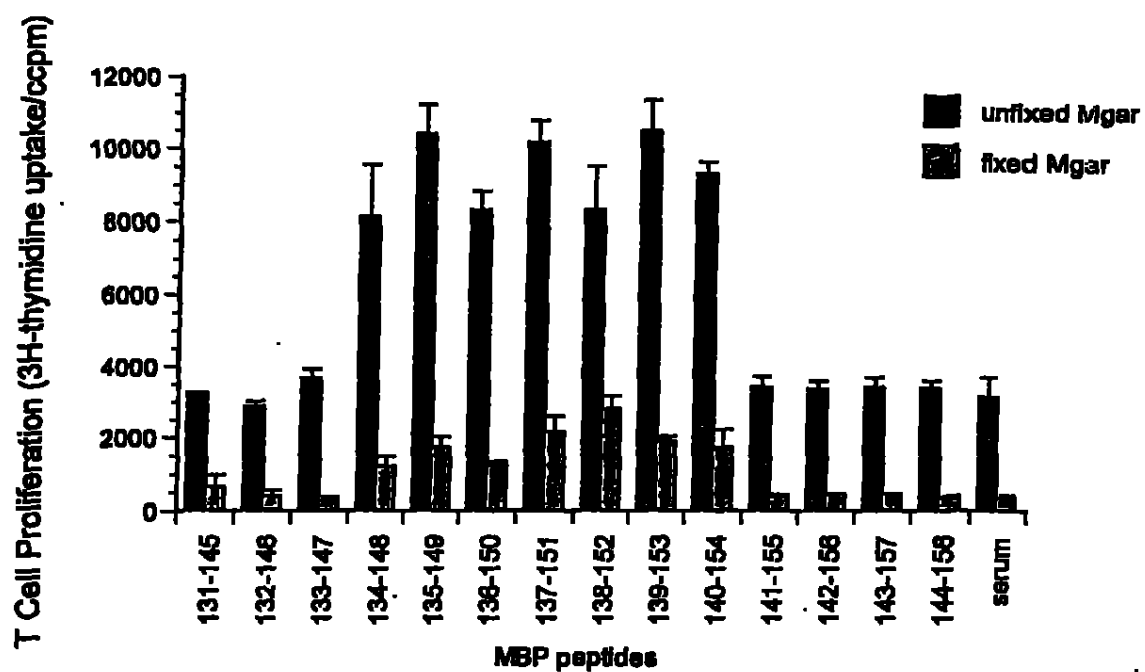
Various modifications and variations of the described methods and system of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not
5 be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in chemistry or biology or related fields are intended to be covered by the present invention. All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference.

CLAIMS

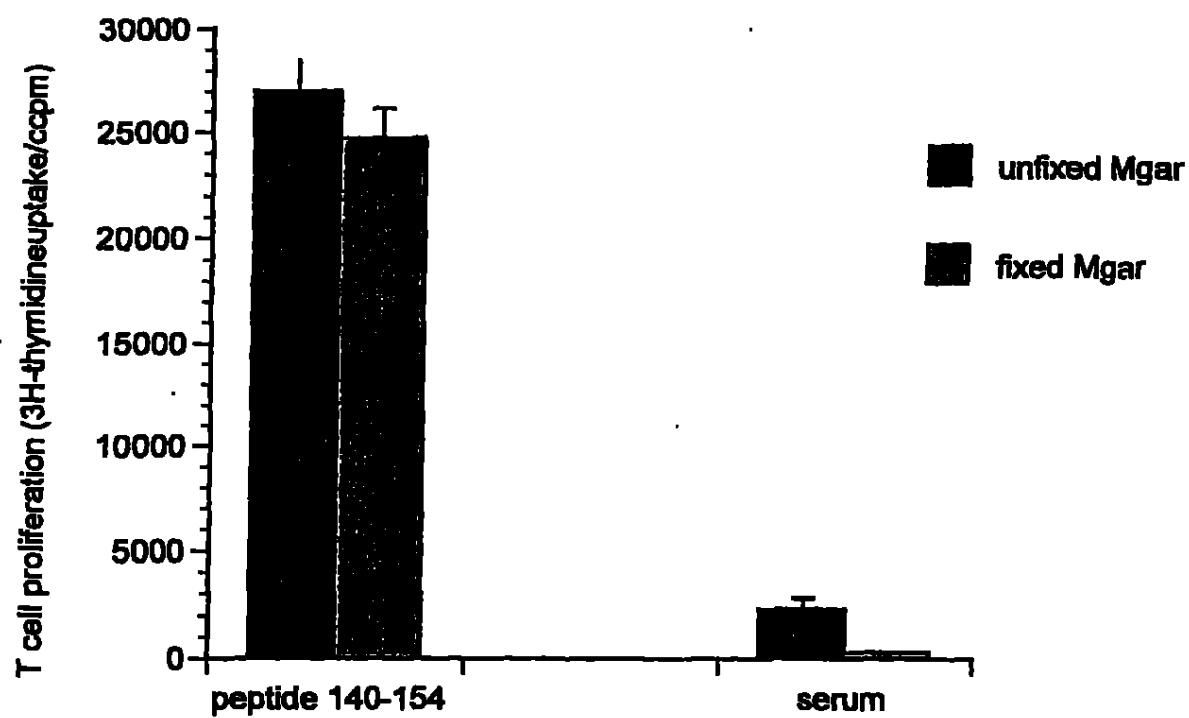
1. A peptide which is capable of binding to an MHC class I or II molecule without further processing, and which comprises a portion of the region 131-158 of myelin basic protein.
5
2. A peptide according to claim 1 which comprises the minimal epitope 142-152 and/or the minimal epitope 140-148.
- 10 3. A peptide according to claim 1 or 2, which is selected from the following myelin basic protein peptides: 134-148, 135-149, 136-150, 137-151, 138-152, 139-153, 140-154.
4. A peptide according to any preceding claim, for use in the treatment and/or prevention of a disease.
- 15 5. A peptide according to claim 4, wherein the disease is multiple sclerosis.
6. A pharmaceutical composition comprising one or more peptide according to any of claims 1 to 5.
- 20 7. A method for treating and/or preventing a disease in a subject in need of same which comprises the step of administering a peptide according to any of claims 1 to 5 to the subject.
- 25 8. The use of a peptide according to any of claims 1 to 5 in the manufacture of a medicament for use in the prevention and/or treatment of a disease.

1/3

Figure 1

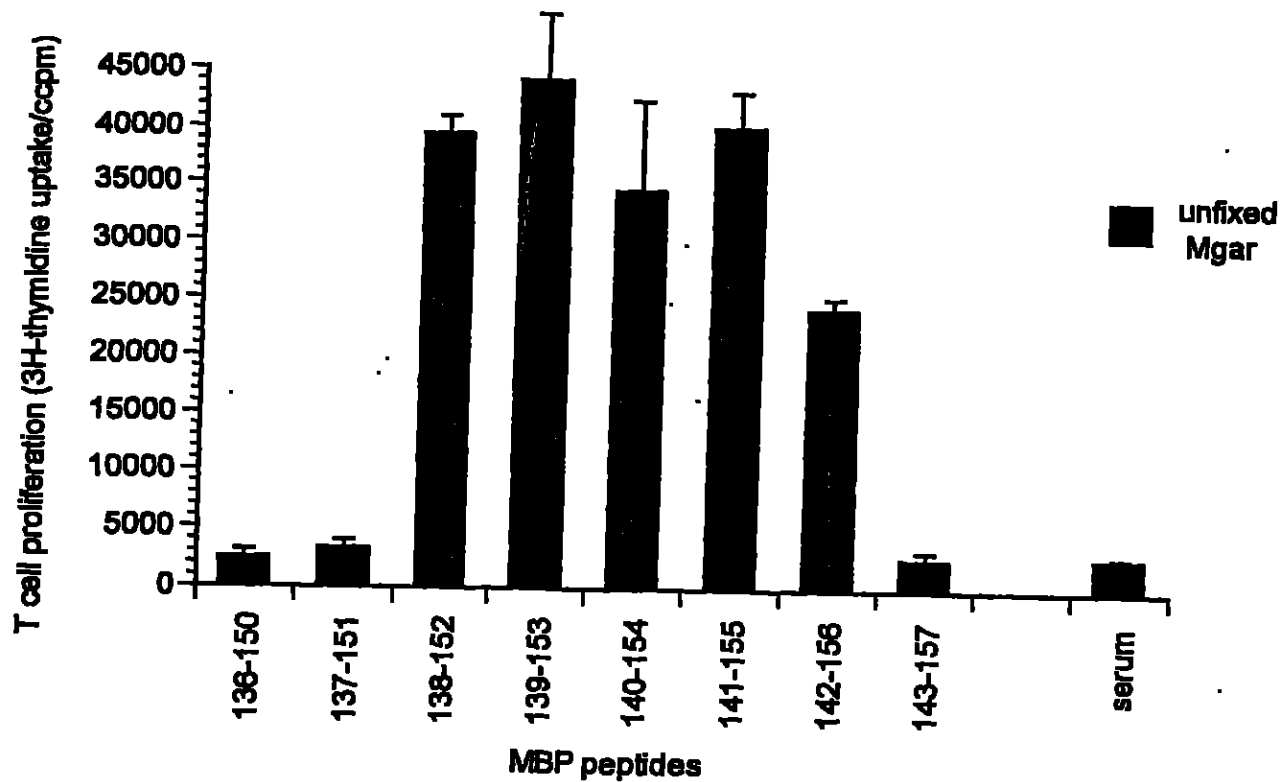


2/3

Figure 2

3/3

Figure 3



PEPTIDOS TOLÉROGENICOS DE LA PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA

La presente invención se refiere a péptidos de la proteína básica de mielina. En particular, la invención se refiere a los péptidos que constan de una porción de la región 131-158 de la proteína básica de mielina y su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.

ANTECEDENTES

En una respuesta inmunológica adaptable, los linfocitos T son susceptibles de reconocer epitopes internos de un antígeno proteico. Las células que presentan antígenos (APC) absorben antígenos proteicos y los degradan en fragmentos cortos de péptidos. Un péptido puede fijarse a una molécula clase I y II de mayor histocompatibilidad compleja (MHC) que se encuentra dentro de la célula y transportarla a la superficie celular. Cuando se presenta en la superficie celular en conjunción con una molécula MHC, se puede reconocer el péptido por medio de una célula T (por vía del receptor de células T (TCR)) en cuyo caso el péptido es un epítipo de célula T.

Los epitopes de células T juegan un rol central en la respuesta inmunológica adaptable a cualquier antígeno, ya sea del mismo ó extraño. Se ha demostrado a través de modelos experimentales, el rol central que juegan los epitopes de células T en las enfermedades de hipersensibilidad (que incluyen la alergia, las enfermedades auto inmunes y el rechazo al trasplante). Es posible inducir enfermedades inflamatorias o alérgicas inyectando péptidos sintéticos (basados en la estructura de epitopes de células T) en combinación con adyuvante. En contraste, se ha demostrado que es posible inducir tolerancia inmunológica a epitopes péptidos especiales, administrando epitopes péptidos en forma soluble. Se ha demostrado que la administración de antígenos de péptidos solubles es un medio efectivo para inhibir la enfermedad en encéfalo mielitis autoinmune experimental (EAE – Un modelo para esclerosis múltiple (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 modelos experimentales de artritis, diabetes y uveoretinitis (revisado en Anderton y Wraith,1998 como se menciona anteriormente). Esto también se ha probado como un medio para tratar una enfermedad progresiva en EAE (Anderton y Wraith (1998) como se menciona anteriormente). Ha llamado mucho la atención, el uso de péptidos tolerogénicos para tratar o para prevenir la enfermedad. Una razón para esto es que se ha demostrado que ciertos epitopes tolerogénicos pueden regular por disminución las respuestas de las células T a diferentes antígenos dentro del mismo tejido. Este fenómeno conocido como supresión circundante (bystander supression) significa que debería ser posible inducir tolerancia a más de un epitope (preferentemente a todos) dentro de un antígeno determinado y a más de un antígeno para una enfermedad dada, usando un péptido tolerogénico particular (Anderton y Wraith, 1998, como se menciona anteriormente) esto evitaría la necesidad de identificar todos los antígenos patógenos dentro de una enfermedad determinada.

Los péptidos también son una opción favorable para la terapia, debido a su costo relativamente bajo y al hecho de que péptidos análogos se pueden producir con propiedades inmunológicas alteradas. De este modo los péptidos pueden modificarse, para alterar sus interacciones ya sea con MHC o con TCR.

Un posible problema con este enfoque es que se ha demostrado que no todos los péptidos que actúan como epitopes de células T son capaces de inducir tolerancia. El péptido de proteína básica de mielina (MBP) 89-101 es un antígeno inmuno dominante después de la inmunización y es también un inmunógeno muy efectivo tanto en términos de la preparación para la reactividad de células T como de la inducción de EAE. Sin embargo, se ha demostrado que este péptido no es

efectivo para inducir tolerancia cuando se administra en solución (Anderton y Wraith, 1998, como se cita anteriormente).

Se han propuesto un número de explicaciones para la jerarquía observada en la capacidad de los epitopes de células T para inducir tolerancia (revisado en Anderton y Wraith, 1998, como se menciona anteriormente). En particular, se ha propuesto la existencia de una correlación entre la afinidad del péptido para el MHC y la tolerogenicidad (Liu y Wraith, 1995, como se menciona anteriormente), pero esto no está de acuerdo con algunas de las observaciones. Por ejemplo, la MBP [89-101], que no es tolerogénica, se fija a I-A^S con una afinidad relativamente alta. Entonces, el predecir cuáles péptidos inducirán tolerancia no es algo inmediato.

Los inventores de la presente han demostrado que si un epítopo péptido es de un tamaño apropiado para ser introducido por un APC inmaduro sin proceso antigénico, puede producir tolerancia inmunológica (Solicitud de Patente Internacional Número PCT/GB01/03702). La observación de que algunos epitopes de células T son tolerogénicos y otros son incapaces de inducir tolerancia se puede explicar, por lo tanto, por el hecho de que algunos epitopes requieren un proceso adicional antes de poder ser introducidos por una molécula MHC. Estos epitopes que requieren un proceso adicional no inducen tolerancia cuando se administran en forma soluble, a pesar de su capacidad para producir enfermedad cuando se inyectan en combinación con un adyuvante.

Los epitopes que no requieren proceso adicional son capaces de inducir tolerancia y los inventores de la presente los han llamado "apitopes" (Epitopes Independientes del Procesamiento de Antígenos) (Antigen Processing Independent epiTOPES).

SINTESIS DE LA INVENCION

Los inventores de la presente han examinado la región 131-158 de MBP y han encontrado una serie de péptidos que pueden presentarse por medio de células fijas presentadoras de antígenos a las células T.

Estos péptidos se definen como apitopes, porque son capaces de fijarse al MHC clase I o II sin proceso adicional.

Por lo tanto en un primer aspecto, la presente invención provee un apitope que consta de una porción de la región 131-158 de proteína básica de mielina. Los inventores de la presente, también han identificado dos epitopes mínimos en esta región que son reconocidos por clones de células T determinados. El péptido puede constar de uno o ambos de estos epitopes que son el MBP 142-152 y 140-148.

En una realización preferida el péptido se selecciona de los siguientes péptidos proteicos básicos de mielina: 134-148, 135-149, 136-150, 137-151, 138-152, 139-153, 140-154.

En un segundo aspecto, la presente invención brinda una composición farmacéutica que consta de uno o más péptidos de acuerdo con el primer aspecto de la solicitud.

En un tercer aspecto, la presente invención brinda un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto que lo necesita, y que consta del paso de administrar al sujeto un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La presente invención también brinda el uso de un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para ser usado en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

Los péptidos de la presente invención son útiles para la prevención y/o tratamiento de la esclerosis múltiple.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la respuesta del clon de células T MS60:D2 a la presentación de los péptidos MBP anidados en la región 131-158 por APC.

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

La Figura 3 muestra la respuesta del clon de células T N5 a la presentación de los péptidos MBP anidados en la región 136-157 por APC.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido.

PÉPTIDOS

El término "péptido" se usa en el sentido normal para referirse a una serie de residuos, típicamente aminoácidos L, unidos entre sí como es típico por enlaces péptidos entre grupos α -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y péptidos sintéticos análogos.

Un péptido de la presente invención puede tener cualquier longitud que le permita unirse a una molécula MHC Clase I o II sin proceso adicional.

Los péptidos que se unen a moléculas MHC Clase I tienen típicamente de 7 a 13, más usualmente de 8 a 10 aminoácidos de longitud. La unión del péptido se estabiliza en sus dos extremos por los contactos entre los átomos que están en la cadena principal del péptido y los sitios invariantes de la unión-peptídica enlazante de todas las moléculas MHC Clase I. Hay sitios invariantes a ambos extremos del vínculo que unen las terminales amino y carboxi del péptido. Las variaciones en la longitud del péptido se acomodan por medio de un enrollamiento en la columna vertebral del péptido, a menudo en residuos de prolina o de glicina que permiten la flexibilidad requerida.

Los péptidos que se unen a moléculas MHC Clase II, tienen típicamente entre 8 y 20 aminoácidos de longitud, más usualmente entre 10 y 17 aminoácidos

de longitud y pueden ser mucho más largos. Estos péptidos yacen en una estructura extendida a lo largo de la unión-peptídica enlazante de MHC Clase II la cual (a diferencia de la unión-peptídica enlazante MHC Clase I) está abierta en ambos extremos. El péptido se mantiene en el lugar principalmente por medio de los contactos de los átomos que están en la cadena principal con residuos conservados que alinean la unión-peptídica enlazante.

El péptido de la presente invención, se puede obtener utilizando métodos químicos (Peptide Chemistry, A Practical Text Book. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin). Por ejemplo, los péptidos se pueden sintetizar por medio de técnicas de fase sólida (Roberge JY et al., 1995, Science 269: 202-204), segmentados de la resina, y purificados por medio de cromatografía preparativa líquida de alta resolución (por ejemplo, Creighton, 1983, Proteins Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY). Se puede lograr la Síntesis Automatizada, por ejemplo utilizando un Sintetizador de Péptidos ABI 431 A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones que brinda el fabricante.

Alternativamente, el péptido puede obtenerse por medios recombinantes, o por segmentación de un polipéptido más largo. Por ejemplo, el péptido se puede obtener por segmentación de la proteína básica de mielina. Se puede confirmar la composición del péptido por medio del análisis de los aminoácidos o por secuenciación (Ej.: el procedimiento de degradación de Edman).

El péptido de la invención es derivable de la región 131-158 de MBP. El péptido puede, preferentemente, derivar de un fragmento del antígeno que surge del procesamiento natural del antígeno por un APC.

Con fines prácticos hay otras varias características que debería mostrar el péptido. Por ejemplo, el péptido debería ser soluble en una concentración que permitiera su uso "in vivo". El péptido debería ser, preferentemente, soluble en concentraciones de hasta 0,5 mg/ml; más preferentemente, el péptido debería ser

soluble en concentraciones de hasta 1 mg/ml; más preferentemente aún, el péptido debería ser soluble en concentraciones de hasta 5 mg/ml. Para la administración intranasal, el volumen máximo de dosis que puede admitirse usando los procedimientos corrientes es de aproximadamente 200 μ l por fosa nasal. Si el péptido es soluble en 1 mg/ml, se le puede administrar al paciente una dosis doble de 800 μ g en cada fosa nasal. Es inusual administrar más de 5 mg en cualquier dosis individual.

Es también importante que el péptido sea lo suficientemente estable "in vivo" para que sea útil terapéuticamente. Los inventores de la presente han encontrado que "in vivo" 30 minutos después de la administración de la cantidad total de un péptido de prueba, cae aproximadamente a 50%. 4 horas después de la administración, la cantidad cae aproximadamente a 30%, pero después de cinco días el péptido es aún detectable (a aproximadamente 5%). El período de vida medio del péptido "in vivo" debería ser por lo menos de 10 minutos, preferentemente por lo menos de 30 minutos, más preferentemente por lo menos de 4 horas, más preferentemente aún de por lo menos 24 horas.

Los inventores de la presente han encontrado que después de la administración intranasal la cantidad de péptido en el ganglio linfático drenante, alcanza su pico máximo aproximadamente 4 horas después de la administración, sin embargo el péptido aún se puede detectar (a niveles de aproximadamente 5% como máximo) después de 5 días. El péptido es, preferentemente, lo suficientemente estable como para estar presente en una concentración terapéuticamente activa en el ganglio linfático drenante, durante el tiempo suficiente como para producir un efecto terapéutico.

El péptido debería también demostrar buena biodisponibilidad "in vivo". También debería mantener una conformación "in vivo" que le permitiera fijarse a una molécula de MHC en la superficie celular sin obstáculos.

Proteína Básica de Mielina (MBP) La MBP es un antígeno de la mielina, que previamente se ha caracterizado y secuenciado (Roth et al.,1987J Neurosci.Res 17 (4) 321-328; Número de acceso M30516.)

Los péptidos de la presente invención derivan de la región MBP 131-158.

Preferentemente, el péptido tiene o consta de uno o más de los epitopes de células T mínimos en la región, por ejemplo el epítipo mínimo MBP 142-152 ó 140-148.

Preferentemente el péptido se selecciona de los siguientes péptidos proteicos básicos de mielina.

Péptido MBP	Secuencia
134-148	YKSAHKGFKGVDAQG
135-149	KSAHKGFKGVDAQGT
136-150	SAHKGFKGVDAQGTL
137-151	AHKGFKGVDAQGTLS
138-152	HKGFKGVDAQGTLSK
139-153	KGFKGVDAQGTLSKI
140-154	GFKGVDAQGTLSKIF

Epitopes Independientes del Procesamiento de Antígenos (APITOPES)

El péptido de la presente invención es capaz de unirse a una molécula MHC Clase I ó II (en la unión-peptídica enlazante) sin proceso adicional. Dichos péptidos se conocen en la presente como "apitopes" (Epitopes Independientes del Procesamiento de Antígenos).

La presentación de la superficie celular de los péptidos que derivan de un antígeno dado no es casual y tiende a ser dominada por un pequeño número de epitopes que se presentan frecuentemente. El predominio de un péptido determinado, dependerá de muchos factores tales como la afinidad relativa para

fijar la molécula de MHC, punto de generación-temporal dentro de las APC y resistencia a la degradación. La jerarquía del epítopo por un antígeno puede cambiar con la progresión de una respuesta inmunológica, que tiene implicancias importantes para la auto tolerancia y la auto inmunidad. Las regiones determinantes de inmuno dominio son probablemente buenos tolerógenos. En consecuencia en una realización preferida, el apítopo de la presente invención se basa en un epítopo dominante.

Sin embargo, después de una respuesta inmunológica primaria a los péptidos inmuno dominantes, puede ocurrir el "despliegue" del epítopo a determinantes sub-dominantes (Lehmann et al., 1992. *Nature* 358:155-157). La presentación de los epítopos sub-dominantes puede ser importante para disparar la auto-inmunidad. El apítopo de la presente invención puede por lo tanto basarse en un epítopo sub-dominante.

También pueden existir los epítopos crípticos, para cualquier antígeno dado. Los epítopos crípticos son aquellos que pueden estimular una respuesta celular T, cuando se administran como un péptido, pero que no logran producir tal respuesta, cuando se administran como un antígeno completo. Puede ocurrir que durante el procesamiento del antígeno a péptidos en las APC se destruya el epítopo críptico.

Un epítopo críptico puede actuar como un apítopo "in vitro" al ser capaz de fijar una molécula de MHC sin proceso adicional e inducir anergia en una célula T que reconoce al epítopo críptico. Sin embargo, sería improbable que tal epítopo fuera terapéuticamente útil, porque no sería capaz de tolerar células T que diferenciaran un epítopo naturalmente procesado, del antígeno.

Los epítopos para un antígeno se pueden identificar midiendo la respuesta de las células T a los péptidos solapados que cubren el antígeno completo (ver abajo) cuando son presentados por medio de APC. Dichos estudios generalmente

resultan en "conjuntos anidados de péptidos" y el epitope mínimo para una línea/clon de células T determinadas puede evaluarse midiendo la respuesta a los péptidos truncados.

No se puede suponer que un epitope mínimo de un antígeno, se comportará como un apitope. Puede suceder que se necesiten los aminoácidos que bordean al epitope mínimo para la fijación óptima al MHC. El apitope debería diseñarse para cubrir la posibilidad de que hubiera diferencias sutiles entre los epitopes mínimos de los diferentes clones celulares T.

Se debería destacar que tal vez no sea posible identificar un apitope para todos los epitopes. Hay una clara evidencia de que algunos epitopes fijan el MHC en una forma que depende de la carga de MHC en los endosomas y por lo tanto requieren procesamiento (Viner et al., 1995 Proc Natl. Acad. Sci. 92:2214-2218).

Esta es otra razón por la cual no se puede suponer que cada epitope mínimo se comportará inevitablemente como un apitope.

Identificación de los péptidos que contienen epitopes de células T

Hay un número de métodos conocidos en la técnica para identificar los epitopes de células T dentro de un antígeno dado.

Los epitopes procesados naturalmente pueden identificarse por medio de un análisis espectrofotométrico de masa de péptidos eluidos de las APC cargadas de antígenos. Estas son APC que han sido estimuladas para absorber antígeno, o que han sido forzadas a producir la proteína intracelularmente por transformación con el gen apropiado. Típicamente las APC se incuban con proteína, ya sea en solución o adecuadamente dirigida a la superficie celular de las APC. Después de la incubación a 37°C, las células se disuelven en detergente y la proteína clase 2 se purifica, por ejemplo, por cromatografía afin. El tratamiento del MHC purificado en un medio químico adecuado (por ejemplo: condiciones ácidas) da por resultado la elución de péptidos del MHC. Esta

agrupación de péptidos se separa y el perfil se compara con el péptido del APC testigo, tratado en la misma forma. Los puntos máximos exclusivos de las células proteicas explícitas/alimentadas se analizan (por ejemplo, por medio de espectrometría de masa) y se identifican los fragmentos de péptidos. Este procedimiento usualmente da información sobre la escala de los péptidos (generalmente se encuentran en los "conjuntos anidados") generados de un antígeno particular por medio del procesamiento del antígeno. Otro método para identificar epitopes es enmascarar un conjunto de péptidos sintético que se solapa y extiende la longitud del antígeno en un ensayo "in vitro". Por ejemplo, pueden usarse péptidos que tengan 15 aminoácidos de longitud y 5 ó 10 aminoácidos solapados. Los péptidos se prueban en un sistema de presentación de antígenos que consta de células que presentan antígenos y células T. Por ejemplo, el sistema de presentación de antígenos puede ser una preparación de esplenocito de murino, una preparación de células humanas de amígdala o de PBMC. Alternativamente, el sistema de presentación del antígeno puede constar de una línea/clon de células T determinada/o y/o un antígeno determinado que presente el tipo de célula.

Se puede medir la activación de células T vía la proliferación de células T (usando, por ejemplo, la absorción de ^3H -Timidina) o la producción de citosina. La activación de las células T del tipo TH1 CD4+ puede por ejemplo detectarse por medio de la producción de IFN γ que puede detectarse por técnicas estándar tales como un ensayo ELISPOT.

Los estudios de péptidos solapados generalmente indican el área del antígeno en que se ubica un epitope. Se puede luego determinar el epitope mínimo para una célula T especial, midiendo la respuesta de los péptidos truncados. Por ejemplo, si se obtiene una respuesta a los residuos 1-15 que contienen péptidos en el conjunto solapado, se pueden usar conjuntos que estén

truncados en ambos extremos para identificar el epítopo mínimo.(ejemplo 1-14, 1-13, 1-12, etc. y 2-15, 3-15, 4-15, etc.)

Sistemas Presentadores Independientes del Procesamiento de Antígenos (APIPS)

Una vez que se ha identificado un epítopo, el paso siguiente es investigar si también se comporta como un apítopo.

Un apítopo debe presentarse a las células T sin necesidad de procesar antígenos. Habiendo identificado a los péptidos que contienen epítopos de células T, los apítopos pueden identificarse usando un sistema libre de procesamiento. Los péptidos truncados y los péptidos análogos se pueden evaluar por medio de la activación usando un sistema presentador independiente del procesamiento de antígenos (APIPS).

Los ejemplos de APIPS, incluyen:

- a) APC fijo (con o sin anticuerpos a CD 28);
- b) Membranas de lípidos que contienen moléculas MHC clase I o II (con o sin anticuerpos a CD 28), y
- c) MHC natural o recombinante purificado en forma de placas unidas (con o sin anticuerpos a CD 28)

Se conoce el uso de APC fijo para investigar las respuestas de las células T, por ejemplo en estudios para investigar el epítopo mínimo dentro de un polipéptido, midiendo la respuesta a los péptidos truncados (Fairchild et al., 1996. Int. Immunol. 8: 1035-1043). Se puede fijar el APC usando, por ejemplo formaldehído. (en general paraformaldehído) ó glutaraldehído.

Las membranas de lípidos (que pueden ser membranas planas o liposomas) pueden prepararse usando lípidos artificiales o pueden ser fracciones de membranas plasmáticas /microsomales de APC.

En la utilización, los APIPS se pueden aplicar a las cavidades de una placa de cultivo de tejidos. Luego se agregan antígenos peptídicos y se detecta la unión del péptido a la porción de MHC de los APIPS, agregando líneas o clones de células T seleccionadas. Se puede medir la activación de la línea o del clon de células T por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de la absorción de ^3H Timidina o de la secreción de citosina.

Tolerancia.

Los péptidos de la presente invención deberían ser capaces de inducir tolerancia al MBP pues son apitopes para este antígeno

.Como se usa aquí, el término "tolerogénico" significa capaz de inducir tolerancia.

La tolerancia es la falta de respuesta a un antígeno. La tolerancia a los auto antígenos es un rasgo esencial del sistema inmunológico, cuando éste se pierde puede sobrevenir la enfermedad auto inmunológica. El sistema inmunológico adaptable debe mantener la capacidad de respuesta a una enorme variedad de agentes infecciosos, mientras se evita el ataque auto inmune de los auto antígenos contenidos dentro de sus propios tejidos. Esto se controla en gran medida por medio de la sensibilidad de los leucocitos T inmaduros, a la muerte celular apoptótica en el timo (tolerancia central) sin embargo, no se detectan todos los auto antígenos en el timo, entonces la muerte de los timocitos auto reactivos permanece incompleta. De ese modo, hay también mecanismos por medio de los cuales se puede adquirir tolerancia por medio de los linfocitos T auto reactivos maduros, en los tejidos periféricos (tolerancia periférica). En Anderton et al., 1999, Immunological Reviews 169:123-137, aparece una revisión de los mecanismos de tolerancia central y periférica.

La tolerancia puede ser la causa de anergia, o caracterizarse por la inducción de la misma en por lo menos una porción de las células T CD 4+. Para

activar una célula T un péptido puede asociarse con una APC "profesional" capaz de transmitir dos señales a las células T. La primera señal (señal 1) es transmitida por el complejo de péptidos MHC sobre la superficie celular de las APC y es recibida por la célula T vía los TCR. La segunda señal (señal 2) es transmitida por las moléculas coestimuladoras sobre la superficie de las APC, tales como las CD 80 y las CD 86 y recibida por la CD 28 sobre la superficie de la célula T. Se piensa que cuando una célula T recibe la señal 1 en ausencia de la señal 2, no se activa, y, en realidad, se vuelve anérgica. Las células T anérgicas son refractarias a la prueba antigénica subsiguiente y pueden ser capaces de suprimir otras respuestas inmunológicas. Se piensa que las células anérgicas T, están involucradas con la tolerancia atenuante de las células T.

Sin desear ceñirse a la teoría, los inventores de la presente predicen que los péptidos que requieren procesamiento antes de poder presentarse en fusión con las moléculas MHC, no inducen tolerancia, porque tienen que ser tratados por medio de células maduras presentadoras de antígenos. Las células maduras presentadoras de antígenos (tales como los macrófagos, las células B y las células dendríticas son susceptibles del procesamiento antigénico, pero también de transmitir la señal 1 y la señal 2 a una célula T, que conduce a la activación de la célula T. Los apitopes, por otra parte, podrán fijarse a las MHC clase II sobre las APC inmaduras. Así se introducirán a las células T sin coestimulación, conduciendo a la anergia celular T, y a la tolerancia.

Por supuesto, los apitopes también son capaces de fijarse a las moléculas MHC en la superficie celular de las APC maduras. Sin embargo, el sistema inmunológico contiene un caudal mayor de APC inmaduras que de APC maduras.

(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 errónea a un apítope será, por lo tanto, de anergia/tolerancia, más que de activación.

Se ha demostrado que, cuando la tolerancia es inducida por medio de la inhalación de los péptidos, la capacidad para proliferar de las células T CD4+ antígeno-específicas, se reduce. También la producción de los IL 2, la producción de los IFN γ y de los IL-4, por medio de estas células se regula por disminución, pero la producción de los IL-10 aumenta. La neutralización de los IL-10 en ratones en estado de tolerancia inducida por los péptidos, ha demostrado que restituye completamente la susceptibilidad a la enfermedad. Se ha planteado que una población de células reguladoras persiste en el estado de tolerancia que producen IL-10 y la regulación inmunológica atenuante (Burkhart et al. 1999, Int Immunol. 11: 1625-1634).

La inducción de tolerancia puede, por lo tanto, monitorearse por medio de varias técnicas, incluyendo:

a) Susceptibilidad reducida a contraer la enfermedad para la cual el péptido es un epítipo al que se apunta *in vivo*.

b) La inducción de anergia en las células T CD4+ (que pueden detectarse por medio de la prueba subsiguiente con antígeno *in vitro*);

c) Cambios en la población de células T CD4+ (incluyendo

(i) reducción de la proliferación

(ii) regulación por disminución en la producción de IL2, IFN- γ e

IL 4; y

(iii) aumento en la producción de IL 10

Enfermedades a las que se apunta.

El péptido de la invención puede usarse en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

Los péptidos de la presente invención son particularmente útiles en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple (MS). La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por lesiones desmielinizantes múltiples diseminadas en toda la materia blanca del CNS y que tiene lugar en diversos lugares y tiempos (McFarlin y McFarland, 1982. New England J. Medicine 307: 1183-1188 y 1246-1251). Se piensa que la MS puede atenuarse por medio de células autoreactivas.

El MBP es inmunológico y los linfocitos T MBP-específicos tienen 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.)

Composición farmacéutica.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que consta de uno o más péptidos del primer aspecto de la invención. La composición también puede constar de uno o más apitopes de otra región de MBP o de un antígeno diferente.

Los inventores de la presente predicen que, a pesar de la "supresión circundante" puede ser necesario dirigir una serie de clones de células T diferentes, para inducir tolerancia de manera efectiva. De ahí que se le puedan administrar a un individuo una diversidad de péptidos para prevenir o tratar una enfermedad.

La composición farmacéutica, por ejemplo, puede comprender entre 1 y 50 apitopes, preferentemente entre 1 y 15 apitopes. Si hay más de 1 apitope, los apitopes, preferentemente, son todos capaces de fijarse ya sea a las MHC clase I o a las MHC clase II, sin procesamiento adicional.

Donde haya 2 o más apitopes, la composición farmacéutica puede estar en forma de conjunto, en el cual algunos o cada uno de los apitopes se proveen en forma separada para la administración simultánea, separada o secuencial.

Alternativamente (o además) si la composición farmacéutica (o cualquier parte de la misma) debe administrarse en dosis múltiples, cada dosis puede envasarse en forma separada.

La composición farmacéutica puede constar de una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de apitopes o de cada uno de ellos, y opcionalmente constar de un portador, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, también los apitopes o cada uno de ellos pueden mezclarse con cualquier aglutinante(s), lubricante(es), agente(s) de suspensión, agente(s) cobertor(es), o agente(s) solubilizante(s) adecuados.

Administración.

El péptido puede administrarse en forma soluble en ausencia del adyuvante.

El péptido se administra preferentemente por vía mucosa.

Los estudios han demostrado que el péptido puede inducir tolerancia de las células T, cuando se administra en forma soluble intraperitonealmente (i.p), en forma intravenosa (i.v) o intranasal (i.n) u oralmente (Anderton and Wraith, 1998, como se cita anteriormente, Liú y Wraith, 1995, como se cita anteriormente; Metzler y Wraith, 1999 Immunology 97: 257-263).

El péptido se administra preferentemente en forma intranasal.

Los estudios en ratones han demostrado que la duración de la administración de péptidos requerida para inducir tolerancia depende de la frecuencia precursora de las células T en el receptor (Burkhart et al., 1999 como

se cita anteriormente). En muchos estudios experimentales se ha demostrado que se requieren repetidas dosis de péptidos para inducir tolerancia (Burkhart et al., 1999 como se cita anteriormente). Por lo tanto, la dosis exacta y el número de dosis de péptidos dependerá del individuo; sin embargo, en una realización preferida se administra una pluralidad de dosis.

Si se administran simultáneamente una pluralidad de péptidos, puede hacerse en forma de "cocktail ", lo que resulta adecuado para administrarse en dosis simples o múltiples. Alternativamente sería preferible administrar dosis múltiples, aunque variando las concentraciones relativas de los péptidos entre las dosis.

En una realización preferida se puede seguir un protocolo de "intensificación de dosis", donde se da al paciente una cantidad de dosis en concentraciones crecientes. Dicho enfoque se ha usado, por ejemplo, para péptidos de fosfolipasa A2 en aplicaciones de inmunoterapia contra la alergia al veneno de la abeja (Muller et al., 1998 J. Allergy Clin Immunol. 101: 747-754 y Akdis et al., 1998, J. Clin. Invest. 102: 98-106)

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención, pero no deberían interpretarse como limitativos de la misma. La invención se refiere particularmente a las realizaciones específicas descritas en estos ejemplos:

Ejemplo 1- Identificación de los aptótopes dentro de la región 134-154 de MBP

Materiales y métodos

Antígenos.

El MBP humano se prepara a partir de materia cerebral blanca, como lo describen Deibler et al. (Deibler et al. 1972, Preparative Biochemistry 2: 139), y su pureza se determina por SDS-PAGE. Se usa MBP y derivados de proteínas

purificadas de tuberculosis micobacteriana (PPD) (Reino Unido, Laboratorio Veterinario Central, Surrey) en ensayos proliferativos a concentraciones óptimas previamente determinadas; la concentración óptima para cada antígeno es de 20 µg/ml. Se sintetiza un panel de péptidos solapados de 15-mer. que abarcan la región 131-158 de MBP, utilizando química estándar F-moc, sobre un sintetizador múltiple de péptidos Abimed AMS 422 (Abimed, Langenfeld, Alemania). Cada péptido es desplazado por 1 aa y solapado por 14 aa.

Medio de cultivo del tejido

El medio RPMI 1640 se usa como medio de cultivo del tejido, suplementado con 20mM HEPES (Sigma, Poole, UK), penicilina (100 U/ml), sulfato de estreptomicina (100 mg/ml) y 4 mM L-glutamina (todos de Life Technology, Paisley, Escocia). Se utiliza un medio sin suero para lavar las células linfocíticas y el TCL. Para todas las condiciones de cultivos y ensayos, el medio se complementa con 10% de plasma autoderivado inactivo al calor.

Generación de clones de células T

Las líneas de células T MBP-específicas se generan a partir de 8 pacientes con MS y dos donantes saludables controlados. Se separan los PBMC de cada sujeto como se describe anteriormente y 1×10^6 células/ml se colocan en 6 placas cóncavas en presencia de MBP (50 µg/ml); se congela regularmente una porción de PBMC de cada sujeto y se almacena para reestimulaciones subsiguientes. Siete días más tarde, las células se alimentan con un medio nuevo que contenga 2% de IL-2 (Lymphocult- HT; Biotest LTD., Birmingham, UK), y en el día 12 del cultivo se reestiman todas las células con antígeno, IL-2 y PBMC irradiado (2500 Rad) autoderivado como una fuente de antígeno que introduce células (APC) a una razón celular de una célula T:5APC. Las células se expanden en IL-2 cada 3 ó 4 días, y en el día 14 se reestiman con antígeno, IL-2 y PBMC, como se describe anteriormente. En el día de la primera reestimulación, las células se

examinan para proliferación específica a MBP. En resumen, se cultivan por triplicado 2×10^4 células T y 1×10^5 PBMC irradiado autoderivado, en 96 placas cóncavas de fondo redondo, en presencia de MBP. Las células se cultivan durante 2 días y se les agrega en forma de pulsos (^3H) Timidina a $0,4 \mu\text{Ci/concavidad}$ durante las últimas 18 horas del cultivo. Las células se cosechan luego como se describe anteriormente y un TCL se considera como MBP-específico con un $\delta\text{cpm} > 1000$ y un $\text{SI} > 3$.

A continuación se clonan los TCL siguiendo 3 ciclos de reestimulación/expansión utilizando PHA (Sigma, Poole, Dorset, UK) en presencia de PBMC irradiado autoderivado como APC. Las células T se colocan en una placa bajo condiciones de dilución limitantes a 0,1 célula/concavidad y a 0,3 célula/concavidad y a 1 célula/concavidad y se cultivan en placas Terasaki (Nunc Internacional, Costar con 1×10^4 de PMC irradiado, $5 \mu\text{g/ml}$ de PHA y 2% de IL-2. Después de 10-12 días, las cavidades con crecimiento positivo se expanden a 96-placas cóncavas con fondo redondo usando 1×10^5 de PBMC irradiado, $5 \mu\text{g/ml}$ de PHA y de IL-2. Tres días más tarde las cavidades se alimentan con medio nuevo que contenga IL-2 y en el día 7, los clones se expanden a las placas cóncavas 48 usando 5×10^5 de PBMC irradiado, PHA e IL-2; En este punto los clones se prueban en ensayos de proliferación para respuestas específicas al MBP. Los clones de MBP específico se expanden una semana más tarde a las placas cóncavas 24, usando 1×10^6 de PBMC irradiado con PHA o Dynabeads (Dynal, UK.) e IL-2. Los clones se mantienen en las placas cóncavas 24, usando un ciclo de reestimulación/expansión de 7 a 10 días.

Ensayo de Proliferación.

Se incubaron células vivas o Mgar fijo de p-formaldehído (HLA-DRR+ve) con péptidos en suero o en suero solo, junto con células T. La respuesta proliferativa de célula T se midió por absorción de ^3H -Timidina de la siguiente

manera: se hicieron crecer durante 48 horas alícuotas triplicadas de 100 μ l de cada cultivo en una placa cóncava microtitulo de fondo redondo 96, luego se le agregan en forma de pulsos 0,4 μ Ci [3 H] Timidina (Amersham Internacional, Amersham UK). Después de 20 horas las células se cosechan en moldes de fibra de vidrio (LKB- Wallac, Turku, Finland) utilizando un cosechador Mach 111 96 (Tomtec, Orange, New Jersey, USA). La incorporación de [3 H] Timidina se determina usando un contador de centelleo líquido Microbeta (LKB Wallac). Las cavidades de prueba que contienen antígeno se consideran positivas cuando el δ cpm > 1000 y el Índice de estimulación (SI) > 3, donde SI = antígeno de CPM que contiene cultivo/cultivo CPM sin antígeno.

Resultados

En la figura 1 se muestra la respuesta del clon de células T MS 60:D2 a la introducción de los péptidos MBP anidados en la región 131-158. Los Péptidos 134-148, 135-149, 136-150, 137-151, 138-152, 139-153, y 140-154 se definen como apitopes ya que podrían introducirse a las células T por APC fijos sin procesamiento adicional.

En la Fig 2 se muestra la respuesta del clon de células T N5 a la introducción de péptidos 140-154. Esto confirma además que el péptido 140-154, puede introducirse por APC fijo sin procesamiento adicional.

Ejemplo 2. Identificación del epítopo mínimo reconocido por los clones de células T N5 y MS 60:D2

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

Los resultados se muestran en la fig 3. El mínimo epítopo reconocido por el clon de células T N5 es MPB 142-152.

Se realizó un experimento similar para el clon de células T MS 60:D2 (Fig 1, Mgar no fijo). El mínimo epítope reconocido por el clon de células T es MBP 140-148.

Para aquellos entendidos en la técnica se pondrán de manifiesto varias modificaciones y variaciones de los métodos y el sistema de la invención descritos, sin apartarse del alcance y el espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica, no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. Por cierto, se intenta que la presente invención abarque varias modificaciones a los modos descritos para llevar a cabo la invención, que resultan obvios para aquellos expertos en química o biología o campos relacionados. Todas las publicaciones mencionadas en la especificación descrita anteriormente se incorporan a la presente como referencias.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que sea capaz de unirse a una molécula clase I o II de MHC sin procedimiento adicional y que consta de una porción de la región 131-158 de la proteína básica de mielina.
2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que consta del epítopo mínimo 142-152 y/o del epítopo mínimo 140-148.
3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, seleccionado de los siguientes péptidos de proteína básica de la mielina: 134-148, 135-149, 136-150, 137-151, 138-152, 139-153, 140-154.
4. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para usar en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad.
5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 4, donde la enfermedad es esclerosis múltiple.
6. Una composición farmacéutica que conste de uno o más péptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5.
7. Un método para tratar y/o prevenir una enfermedad en un sujeto que lo necesite, que comprende el paso de la administración del péptido a un sujeto, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, en la fabricación de un medicamento para utilizarlo en la prevención y / o tratamiento de la enfermedad.

RESUMEN

Se provee un péptido que es capaz de fijarse a una molécula MHC de la clase I ó II sin proceso adicional (esto es un apitope) que consta de una porción de la región (131-158) de proteína básica de mielina, en particular se provee un apitope que es seleccionado de los siguientes péptidos proteicos básicos de mielina: 134-148, 135-149, 136-150, 137-151, 138-152, 139-153, 140-154). Se provee además el uso de tal péptido en una composición farmacéutica y un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad utilizando tal péptido.

FIGURA 1

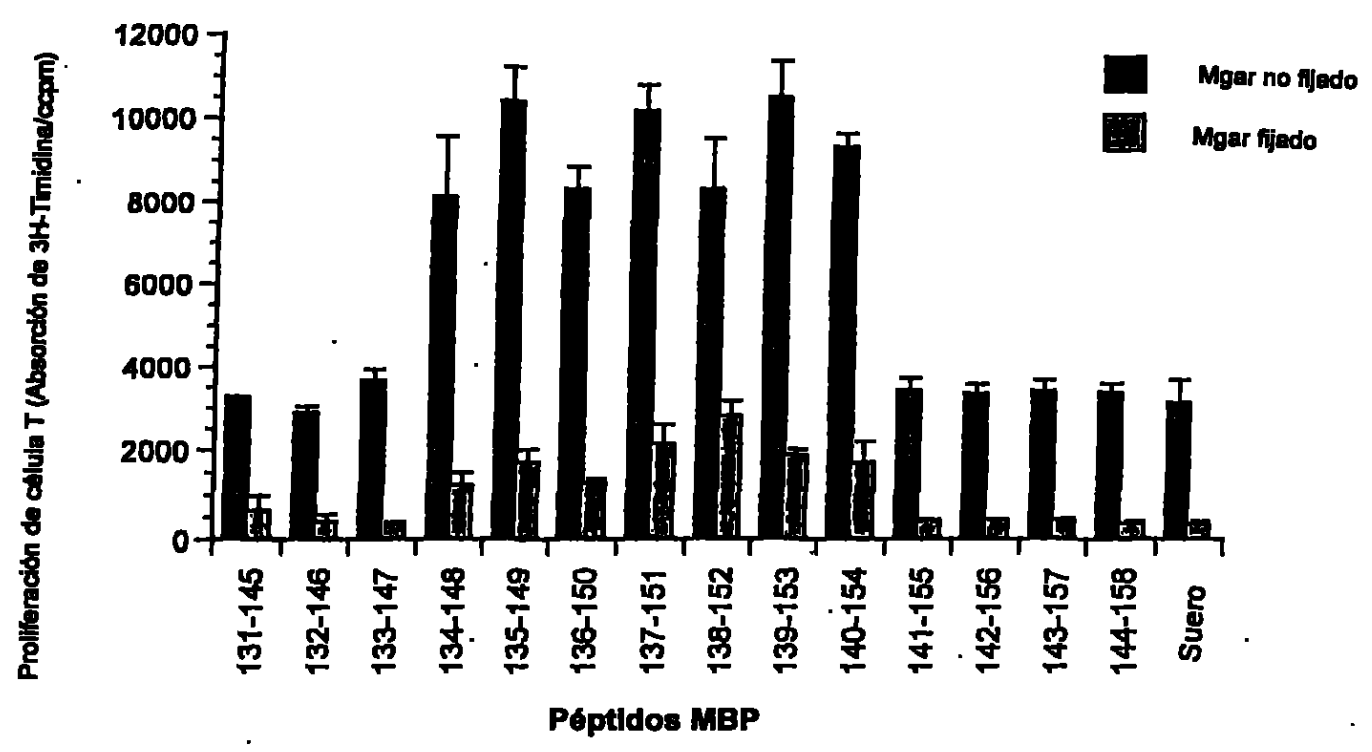


FIGURA 2

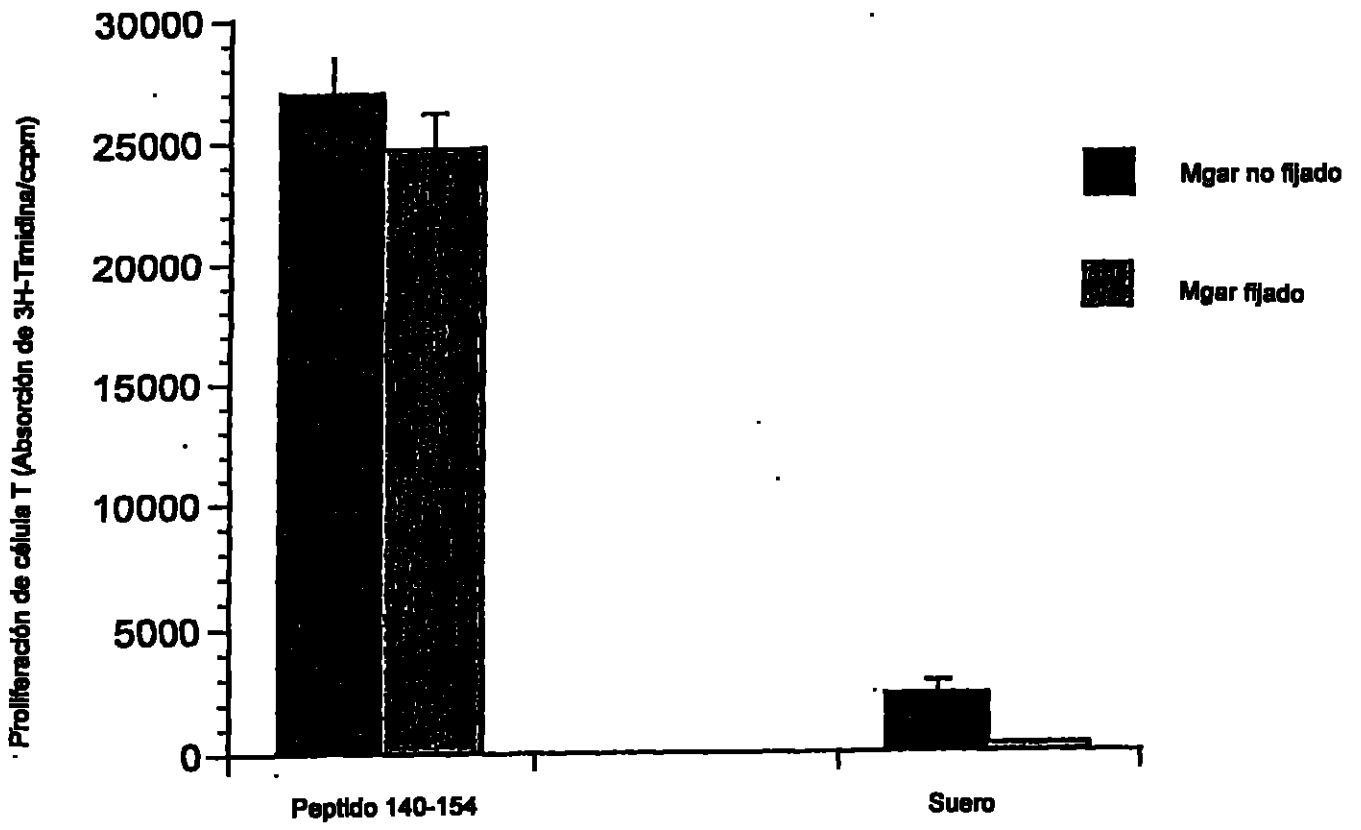
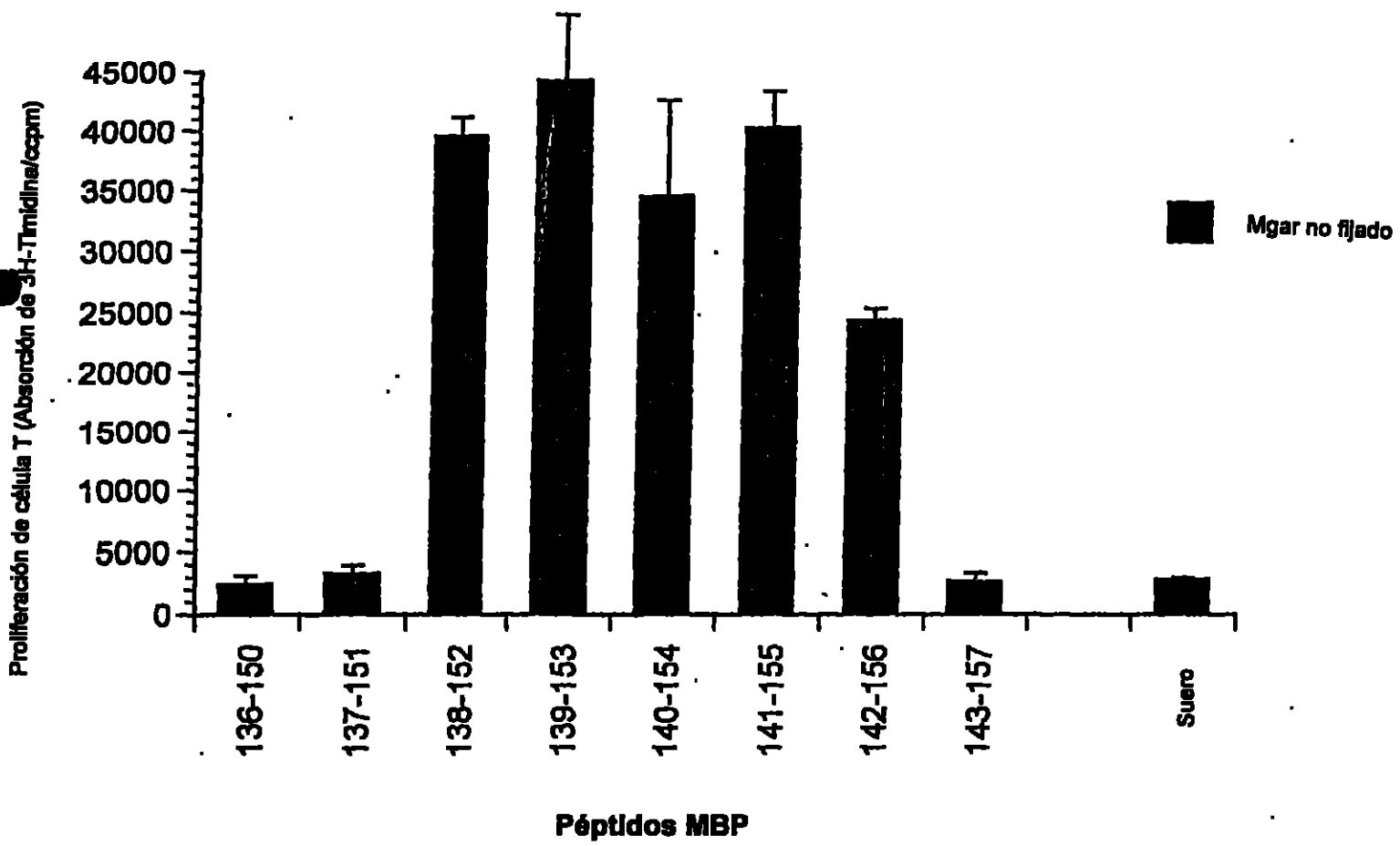


FIGURA 3



PATENT COOPERATION TREATY

55

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To: HOLLIDAY, L. G. D Young & Co 21 New Fetter Lane London EC4A 1DA GRANDE BRETAGNE	NOVELTY ORDER ENTRY RECEIVED - 6 OCT 2003 AMSO ENTRY FOR LOHBA
---	---

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

SOUTHAMPTON

- 6 OCT 2003

Date of mailing
(day/month/year)

02/10/2003

Applicant's or agent's file reference P013368WO LGH		REPLY DUE within 1 / 00 months/days from the above date of mailing
International application No. PCT/GB 03/ 00399	International filing date (day/month/year) 30/01/2003	Priority date (day/month/year) 01/02/2002
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C07K14/47		
Applicant APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED et al.		

1. This written opinion is the first drawn up by this International Preliminary Examining Authority.

2. This opinion contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the opinion
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(d).

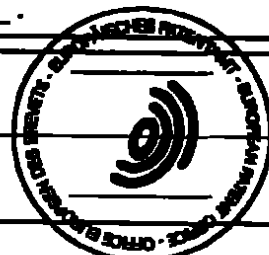
How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.
For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4b1.
For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6.

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: **01/06/2004**

Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer Examiner Formalities officer (incl. extension of time limits) Tel. (+49-89) 2399 2828
---	--



I. Basis of the opinion

The basis of this written opinion is the application as originally filed.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been and will not be the subject of the international preliminary examination in respect of the claims which have not been searched (Article 17(2)(a) or (3) and Rule 66.1(e) PCT; see also international search report).

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

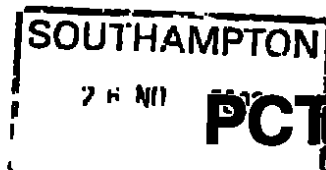
1. To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out:
2. In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims, which have been the subject of an international search report, does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).
3. If amendments are filed, the applicant should comply with the requirements of Rule 66.8 PCT and indicate the basis of the amendments in the documents of the application as originally filed (Article 34 (2) (b) PCT) otherwise these amendments may not be taken into consideration for the establishment of the international preliminary examination report. The attention of the applicant is drawn to the fact that if the application contains an unnecessary plurality of independent claims, no examination of any of the claims will be carried out.

NB: Should the applicant decide to request detailed substantive examination, then an international preliminary examination report will normally be established directly. Exceptionally the examiner may draw up a second written opinion, should this be explicitly requested.

PATENT COOPERATION TREATY

57

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY-EXAMINING AUTHORITY



To:	ORDER
HOLLIDAY DIARY.	
D Young & Co	
21 New River Lane	
London E6 4DA	26 NOV 2003
GRANDE BRETAGNE	
ANSO	
ENTRY	
FOR	DS LCH

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Applicant's or agent's file reference P013368WO LCH		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/GB 03/ 00399	International filing date (day/month/year) 30/01/2003	Priority date (day/month/year) 01/02/2002	
Applicant APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED et al.			

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1))(see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

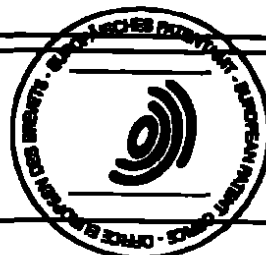
Name and mailing address of the IPBA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Authorized officer

MORENO R A
Tel. (+49-89) 2399 2828



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

(Rationalised Report according to the Notice of the President of the EPO published in the OJ11/2001)

Applicant's or agent's file reference P013368WO LCH	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/4 16)	
International application No. PCT/GB 03/ 00399	International filing date (day/month/year) 30/01/2003	Priority date (day/month/year) 01/02/2002
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G07K14/47		
Applicant APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consists of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:
- I ☒ Basis of the report
 - II ☐ Priority
 - III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☐ Certain defects in the international application
 - VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 28/08/2003	Date of completion of this report 19/11/2003
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer GUGERELL C Tel. (+49-89) 2399 2828



**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/GB 03/00399

I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been the subject of the international preliminary examination in respect of the claims which have not been searched (Article 17(2)(a) or (3) and Rule 66.1(e) PCT); see also international search report).

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out:

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims, which have been the subject of an international search report, does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).

PATENT COOPERATION TREATY

Records index

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)To:
003HARDING, Charles, Thomas
D Young & Co
21 New Fetter Lane
London EC4A 1DA
United Kingdom

DS LCH

Date of mailing (day/month/year)
08 October 2003 (08.10.03)Applicant's or agent's file reference
P013368WO LCH

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/GB03/00399International filing date (day/month/year)
30 January 2003 (30.01.03)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL)
LIMITED
48-48 Queens Square
Bristol BS1 4LY
United Kingdom

State of Nationality

GB

State of Residence

GB

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL)
LIMITED
University of Bristol
Department of Pathology &
Microbiology
University Walk
Bristol BS8 1TD
United Kingdom

State of Nationality

GB

State of Residence

GB

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.89.85

Authorized officer

Frederick SAMUELS

Telephone No. (41-22) 338 9471

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Fecha:

2020
Bogotá, D.C.,

Doctora:
MARGARITA CASTELLANOS A.

Oficio N° 09574

ASUNTO:	Radicación N°	04-83647
	Solicitud Internacional	PCT/GB03/00399
	Fecha inicio fase nacional	01/09/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 15 OCT. 2004.

202047

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Conmutador: 3 820840 Fax: 3 305220
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 305220. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia