

PÉPTIDOS Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE DIABETES

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a péptidos tales como HCPYCSLQPLALEGSLQKRG y a su uso en el tratamiento de diabetes tipo 1. La presente invención también se refiere a la generación de células T CD4+ citolíticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se han descrito varias estrategias para prevenir la generación de una respuesta inmune no deseada contra un antígeno. El documento WO2008/017517 describe una nueva estrategia que utiliza péptidos que comprenden un antígeno de MHC de clase II de una proteína antigénica dada y un motivo de oxidorreductasa. Estos péptidos convierten las células T CD4+ en un tipo celular con propiedades citolíticas llamadas células T CD4+ citolíticas. Dichas células son capaces de aniquilar a través del desencadenamiento de apoptosis a las células presentadoras de antígeno (APC por sus siglas en inglés), las cuales presentan el antígeno a partir del cual se obtiene el péptido. El documento WO2008/017517 demuestra este concepto para alergias y enfermedades autoinmunes tales como diabetes tipo I. En la presente solicitud la insulina puede actuar como un auto-antígeno.

El documento WO2009101207 y Carlier et al. (2012) *Plos one* 7,10 e45366 describen adicionalmente con mayor detalle las células citolíticas específicas de antígeno.

El documento WO2009101206 describe el uso de péptidos con un motivo de oxidorreductasa y un epítipo de MHC de clase II de un alo-antígeno soluble para prevenir una respuesta inmune contra dicho antígeno cuando se utiliza en terapias de reemplazo (por ejemplo, respuesta inmune no deseada contra insulina inyectada en pacientes con diabetes).

El documento WO2016059236 describe péptidos modificados adicionales en los cuales está presente una histidina adicional en la proximidad del motivo de oxidorreductasa.

En el diseño de un péptido contra diabetes tipo I, se pueden tomar en cuenta muchos factores, tales como el tipo del auto-antígeno (insulina, GAD 65, ...), un dominio y epítipo específicos del auto-antígeno, el motivo de oxidorreductasa, la longitud y secuencia de aminoácido entre el motivo de oxidorreductasa y la secuencia del epítipo.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención provee péptidos novedosos obtenidos a partir de insulina para el tratamiento de diabetes tipo 1.

Los péptidos de la presente invención tienen la ventaja que las células T CD4+ citolíticas que se generan utilizando dichos péptidos tienen una producción de IFN-gamma y sFasL incrementada en comparación con los péptidos de la técnica antecedente. También se cree que se incrementa la producción de granzima B en dichas células T CD4+.

Los niveles de expresión incrementados de estos marcadores son indicaciones de una capacidad mayor de los péptidos de la presente invención para generar células T CD4+ citolíticas en comparación con los péptidos de la técnica antecedente.

Un aspecto de la invención se refiere a péptidos con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprenden la secuencia tetrapeptídica Cxx[CST] [SEQ ID NO: 1] o [CST]xxC [SEQ ID NO: 2] (es decir el motivo redox) y, separada de dicho tetrapéptido por 0 a 5 aminoácidos, de preferencia por 0 a 4 aminoácidos (es decir por un enlazador), la secuencia LALEGLSLQK [SEQ ID NO: 3] (es decir el epítipo).

5 Las modalidades de dichos péptidos comprenden la secuencia Cxx[CST]SLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO: 4] o [CST]xxCSLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO:5].

Otras modalidades de dichos péptidos comprenden la secuencia CxxCSLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO: 6].

10 Otras modalidades de dichos péptidos comprenden la secuencia HCxx[CST]SLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO:7] o H[CST]xxCSLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO:8].

Otras modalidades de dichos péptidos comprenden la secuencia HCxxCSLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO: 9].

Otras modalidades de dichos péptidos comprenden la secuencia del motivo redox Cxx[CST] [SEQ ID NO: 1] o [CST]xxC [SEQ ID NO: 2] y la secuencia SLQPLALEGLSLQKRG [SEQ ID NO: 20].

15 Las modalidades específicas de dichos péptidos consisten de la secuencia

Cxx[CST]SLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO: 4],

[CST]xxCSLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO: 5],

CxxCSLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO:6],

HCxx[CST]SLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO:7],

20 H[CST]xxCSLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO:8], o

HCxxCSLQPLALEGLSLQK [SEQ ID NO:9].

Otras modalidades específicas de dichos péptidos consisten de la secuencia

Cxx[CST]SLQPLALEGLSLQKRG [SEQ ID NO: 10],

[CST]xxCSLQPLALEGLSLQKRG [SEQ ID NO: 11],

25 CxxCSLQPLALEGLSLQKRG [SEQ ID NO: 12],

HCxx[CST]SLQPLALEGLSLQKRG [SEQ ID NO:13],

H[CST]xxCSLQPLALEGLSLQKRG [SEQ ID NO:14], o

HCxxCSLQPLALEGLSLQKRG [SEQ ID NO: 15].

30 En modalidades específicas de dichas secuencias Cxx[CST] [SEQ ID NO: 1] es CPY[CST] [SEQ ID NO: 16], [CST]xxC [SEQ ID NO: 2] es [CST]PYC [SEQ ID NO: 17], de manera más específica CxxC [SEQ ID NO: 18] es CPYC [SEQ ID NO:19].

Una modalidad específica es el péptido HCPYCSLQPLALEGLSLQKRG [SEQ ID NO: 26].

En las modalidades anteriores el motivo redox se encuentra en el lado N-terminal del epítipo.

35 En un conjunto de modalidades alternativo los péptidos tienen el motivo redox en el lado C-terminal del epítipo.

Otro aspecto de la invención se refiere a cualquiera de los péptidos como se describió anteriormente para ser utilizados como un medicamento, especialmente en el tratamiento o prevención de diabetes tipo 1 o para reducir los síntomas de diabetes tipo 1.

Otro aspecto se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los péptidos

como se describió anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto se refiere a un método *in vitro* para la generación de una población de células T CD4+ citolíticas, contra APC que presentan epítomos de insulina, que comprende los pasos de:

- proporcionar células de sangre periférica;
- 5 - poner en contacto dichas células *in vitro* con cualquiera de los péptidos inmunogénicos como se describió anteriormente; y
- expandir dichas células en presencia de IL-2.

Otro aspecto se refiere a una población de células T CD4+ citolíticas, contra APC presentadora de insulina que se puede obtener mediante el método anterior para ser utilizada como un medicamento.

10 Otro aspecto se refiere a una población de células que se puede obtener mediante el método anterior para ser utilizada en el tratamiento o prevención de diabetes tipo 1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Liberación de sFasL en líneas celulares generadas con p17-003 o p17-001. Las células específicas para p17-003 o p17-001 (células IL5 positivas; histogramas de color negro) se vuelven a
15 estimular durante 24 horas con células presentadoras de antígeno cargadas con los péptidos p17-003 o p17-001, dependiendo del péptido utilizado para su generación, y el sobrenadante se recolecta después de 24 horas de co-cultivo. Las células IL-5 negativas son para poblaciones de PBMC de control (histogramas abiertos). Los resultados representan el promedio +/- desv. est. de la concentración de sFasL corregida por número de células.

20 Figura 2: Esta figura muestra la respuesta de las líneas celulares a la estimulación con p17-003 o p17-001 en términos de producción de citoquinas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se describe con respecto a modalidades particulares pero la invención no está limitada a las mismas sino solamente por las reivindicaciones. Ningún signo de referencia en las
25 reivindicaciones se debe interpretar como limitativo del alcance. Los siguientes términos o definiciones se proveen solamente para ayudar en el entendimiento de la invención. A menos que se defina específicamente en la presente solicitud, todos los términos utilizados en la presente solicitud tienen el mismo significado que el que tendrían para un experto en la técnica de la presente invención. No se debe interpretar que las definiciones provistas en la presente solicitud tienen un alcance menor que el entendido
30 por una persona con habilidad ordinaria en la técnica.

A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describen de manera específica en detalle se pueden efectuar y han sido efectuados en una manera conocida *per se*, como quedará claro para el experto en la técnica. Nuevamente se hace referencia, por ejemplo, a los libros de texto estándar, a la técnica antecedente general referida anteriormente y a las
35 referencias adicionales citadas en los mismos.

Tal como se utilizan en la presente solicitud, las formas en singular “un”, “uno(una)”, y “el(la)” incluyen referentes tanto en singular como en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. El término “cualquier(a)” cuando se utiliza con relación a aspectos, reivindicaciones o modalidades tal como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier (es decir cualquiera) así como a todas las

combinaciones de dichos aspectos, reivindicaciones o modalidades referidas.

Los términos “que comprende”, “comprende” y “comprendido de” tal como se utilizan en la presente invención son sinónimos con “que incluye”, “incluye” o “que contiene”, “contiene”, y son inclusivos o de extremo abierto y no excluyen miembros, elementos o pasos de método no recitados, adicionales. Dichos términos también abarcan las modalidades “que consiste esencialmente de” y “que consiste en”.

La recitación de intervalos numéricos mediante puntos finales incluye todos los números y fracciones incluidas dentro de los intervalos respectivos, así como los puntos finales recitados.

El término “aproximadamente” tal como se utiliza en la presente invención cuando se hace referencia a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 10\%$ o menos, de preferencia $\pm 5\%$ o menos, de manera más preferida $\pm 1\%$ o menos, y de manera más preferida aún $\pm 0.1\%$ o menos de y a partir del valor especificado, en la medida que dichas variaciones sean apropiadas para efectuar la invención descrita. Se debe entender que el valor al cual se refiere el modificador “aproximadamente” es por sí mismo también descrito de manera específica, y preferida.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “para ser utilizado(a)” como se utiliza en “composición para ser utilizada en el tratamiento de una enfermedad” debe describir también el método de tratamiento correspondiente y el uso correspondiente de una preparación para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad”.

El término “péptido” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácido de entre 12 y 200 aminoácidos, conectada mediante enlaces peptídicos, pero que puede comprender estructuras de tipo no aminoácido.

Los péptidos de conformidad con la invención pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de los mismos, o pueden contener aminoácidos no presentes en la Naturaleza incorporados mediante síntesis química de péptidos o mediante modificación química o enzimática.

El término “antígeno” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una estructura de una macromolécula, típicamente proteína (con o sin polisacáridos) o constituida de composición proteica que comprende uno o más haptenos y que comprende epítomos de célula T.

El término “proteína antigénica” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una proteína que comprende uno o más epítomos de célula T. Un auto-antígeno o proteína auto-antigénica tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una proteína de humano o de animal presente en el cuerpo, que provoca una respuesta inmune dentro del mismo cuerpo humano o animal.

El término “epítopo” se refiere a una o varias porciones (las cuales pueden definir un epítopo conformacional) de una proteína antigénica que es/son reconocidas y ligadas específicamente por un anticuerpo o una porción del mismo (Fab', Fab2', etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de un linfocito de célula B o T, y el cual es capaz de, mediante dicha unión, inducir una respuesta inmune.

El término “epítopo de célula T” en el contexto de la presente invención se refiere a un epítopo dominante, sub-dominante o menor de célula T, es decir una parte de una proteína antigénica que es reconocida y ligada específicamente por un receptor en la superficie celular de un linfocito T. Que un

epítopo sea dominante, sub-dominante o menor depende de la reacción inmune provocada contra el epítopo. La dominancia depende de la frecuencia con la cual dichos epítopos son reconocidos por células T y sean capaces de activarlas, de entre todos los posibles epítopos de célula T de una proteína.

El epítopo de célula T es un epítopo reconocido por moléculas del MHC de clase II, que consiste en una secuencia de +/- 9 aminoácidos que encaja en la ranura de la molécula de MHC II. Dentro de una secuencia peptídica que representa un epítopo de célula T, los aminoácidos en el epítopo se numeran P1 a P9, los aminoácidos N-terminales del epítopo se numeran P-1, P-2 y etc., los aminoácidos C-terminales del epítopo se numeran P+1, P+2 y etc. Los péptidos reconocidos por moléculas del MHC de clase II y no por moléculas del MHC de clase I son referidos como epítopos de célula T restringidos a MHC de clase II.

El término "MHC" se refiere a "antígeno mayor de histocompatibilidad". En los humanos, los genes del MHC son conocidos como genes de HLA ("antígeno leucocítico humano"). Aunque no hay una convención seguida de manera consistente, algunos documentos de la literatura utilizan HLA para referirse a moléculas de la proteína HLA, y MHC para referirse a los genes que codifican para las proteínas HLA. Por lo tanto los términos "MHC" y "HLA" son equivalentes cuando se utilizan en la presente solicitud. El sistema HLA en humano tiene su equivalente en ratón, es decir, el sistema H2. Los genes de HLA estudiados de manera más exhaustiva son los denominados nueve genes de MHC clásico: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, y HLA-DRB1. En los humanos, el MHC está dividido en tres regiones: Clase I, II, y III. Los genes A, B, y C pertenecen al MHC de clase I, mientras que los seis genes D pertenecen a la clase II. Las moléculas de MHC de clase I están constituidas por una sola cadena polimórfica que contiene 3 dominios (alfa 1, 2 y 3), la cual se asocia con microglobulina beta 2 en la superficie celular. Las moléculas de clase II están constituidas por 2 cadenas polimórficas, conteniendo cada una 2 cadenas (alfa 1 y 2, y beta 1 y 2).

Las moléculas de MHC de clase I son expresadas virtualmente en todas las células nucleadas.

Los fragmentos peptídicos presentados en el contexto de las moléculas de MHC de clase I son reconocidas por linfocitos T CD8+ (linfocitos T citolíticos o CTLs). Los linfocitos T CD8+ con frecuencia maduran hasta efectores citolíticos los cuales pueden lisar células que portan el antígeno estimulador. Las moléculas de MHC de clase II son expresadas principalmente en linfocitos activados y células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T CD4+ (linfocitos T auxiliares o Th por sus siglas en inglés) se activan con el reconocimiento de un fragmento peptídico único presentado por una molécula de MHC de clase II, que se encuentra habitualmente en una célula presentadora de antígeno tal como un macrófago o célula dendrítica. Los linfocitos T CD4+ proliferan y secretan citoquinas tales como IL-2, IFN-gamma e IL-4 que apoyan las respuestas mediadas por anticuerpo y mediadas por célula.

Los HLAs funcionales se caracterizan por una ranura de unión profunda a la cual se unen péptidos potencialmente antigénicos, endógenos así como extraños. La ranura se caracteriza adicionalmente por una forma y propiedades fisicoquímicas bien definidas. Los sitios de unión de HLA de clase I son cerrados, en el sentido que los extremos terminales del péptido quedan sujetos en los extremos de la ranura. Estos también están implicados en una red de enlaces de hidrógeno con residuos de HLA conservados. En vista de estas restricciones, la longitud de los péptidos unidos se limita a 8, 9 o 10 residuos. Sin embargo, se ha demostrado que los péptidos de hasta 12 residuos de aminoácido también son capaces de unirse a HLA de

clase I. La comparación de las estructuras de diferentes complejos de HLA confirma un modo de unión general en el cual los péptidos adoptan una conformación extendida, relativamente lineal, o puede implicar residuos centrales que sobresalen de la ranura.

En contraste con los sitios de unión de HLA de clase I, los sitios de la clase II son abiertos en ambos extremos. Esto permite que los péptidos se extiendan desde la región de unión real, “colgando” de esta manera en ambos extremos. Por lo tanto, los HLAs de clase II pueden unirse a ligandos peptídicos de longitud variable, que varían de 9 hasta más de 25 residuos de aminoácido. De manera similar al HLA de clase I, la afinidad de un ligando de clase II se determina por medio de un componente “constante” y un componente “variable”. La parte constante de nuevo es resultado de una red de enlaces de hidrógeno formados entre los residuos conservados en la ranura de HLA de clase II y la cadena principal de un péptido unido. Sin embargo, dicho patrón de enlace de hidrógeno no está confinado a los residuos N-terminales y C-terminales del péptido sino que está distribuido a lo largo de toda la cadena. Esto último es importante debido a que restringe la conformación de los péptidos complejados a un modo de unión estrictamente lineal. Esto es común para todos los alotipos de clase II. El segundo componente que determina la afinidad de unión de un péptido es variable debido a ciertas posiciones de polimorfismo dentro de los sitios de unión de la clase II. Diferentes alotipos forman diferentes bolsas complementarias dentro de la ranura, explicando de esta manera la selección de péptidos dependiente del subtipo, o la especificidad. Como un aspecto importante, las restricciones sobre los residuos de aminoácido mantenidos dentro de las bolsas de la clase II son en general “más flexibles” que para la clase I. Existe mucha más reactividad cruzada de péptidos entre los diferentes alotipos de HLA de clase II. La secuencia de los +/- 9 aminoácidos (es decir 8, 9 o 10) de un epítipo de célula T de MHC de clase II que encaja en la ranura de la molécula de MHC II habitualmente se numeran P1 a P9. Los aminoácidos adicionales hacia el extremo N-terminal del epítipo se numeran P-1, P-2 y así sucesivamente, los aminoácidos hacia el extremo C-terminal del epítipo se numeran P+ 1, P+2 y así sucesivamente.

El término “homólogo” tal como se utiliza en la presente invención con referencia al epítopos utilizado en el contexto de la invención, se refiere a moléculas que tienen por lo menos 50%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 98% de identidad de secuencia de aminoácido con el epítipo presente en la Naturaleza, manteniendo de esta manera la capacidad del epítipo de unirse a un anticuerpo o receptor de superficie celular de una célula B y/o T. Los homólogos particulares de un epítipo corresponden al epítipo natural modificado en cuando mucho tres, de manera más particular en cuando mucho 2, de manera aún más particular en un aminoácido.

El término “derivado” tal como se utiliza en la presente invención con referencia a los péptidos de la invención se refiere a moléculas que contienen por lo menos la porción activa del péptido (es decir el motivo redox y el epítipo de MHC de clase II capaces de provocar la actividad de célula T CD4+ citolítica) y, además de la misma comprende una porción complementaria que puede tener propósitos diferentes tales como estabilizar los péptidos o alterar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del péptido.

El término “identidad de secuencia” de dos secuencias tal como se utiliza en la presente invención se refiere al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido entre el número de

nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las secuencias, cuando las dos secuencias se alinean. En particular, la identidad de secuencia es de 70% a 80%, de 81% a 85%, de 86% a 90%, de 91% a 95%, de 96% a 100%, o 100%.

El término “polinucleótido (o ácido nucleico) que codifica para el péptido” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótido, la cual, cuando se expresa en un ambiente apropiado, da como resultado la generación de la secuencia peptídica relevante o un derivado u homólogo de la misma. Dichos polinucleótidos o ácidos nucleicos incluyen las secuencias normales que codifican para el péptido, así como los derivados y fragmentos de dichos ácidos nucleicos capaces de expresar un péptido con la actividad requerida. El ácido nucleico que codifica para un péptido de conformidad con la invención o fragmento del mismo es una secuencia que codifica para el péptido o fragmento del mismo que se origina a partir de un mamífero o que corresponde a un mamífero, de manera aún más particular un fragmento peptídico de humano.

El término “trastornos inmunes” o “enfermedades inmunes” se refiere a enfermedades en las cuales una reacción del sistema inmune es responsable de o mantiene un mal funcionamiento o situación no fisiológica en un organismo. Se incluye entre los trastornos inmunes, entre otras cosas, a trastornos alérgicos y enfermedades autoinmunes.

Los términos “enfermedad autoinmune” o “trastorno autoinmune” se refieren a enfermedades que son resultado de una respuesta inmune aberrante de un organismo contra sus propias células y tejidos debido a una falla del organismo para reconocer sus mismas partes constituyentes (hasta el nivel sub-molecular) como “propias”. El grupo de enfermedades se puede dividir en dos categorías, enfermedades específicas de órgano y enfermedades sistémicas. Un “alérgeno” se define como una sustancia, habitualmente una macromolécula o una composición proteica que provoca la producción de anticuerpos IgE en pacientes (atópicos) individuales predispuestos, en particular genéticamente predispuestos. Se presentan definiciones similares en Liebers *et al.* (1996) *Clin. Exp. Allergy* **26**, 494-516.

El término “diabetes tipo 1” (T1D) (también conocida como “diabetes mellitus tipo 1” o “diabetes inmuno-mediada” o anteriormente conocida como “diabetes de inicio juvenil” o “diabetes dependiente de insulina”) es un trastorno autoinmune que típicamente se desarrolla en individuos susceptibles durante la niñez. En la base de la patogénesis de T1D se encuentra la destrucción de la mayoría de células beta pancreáticas productoras de insulina por medio de un mecanismo autoinmune. En resumen, el organismo pierde la tolerancia inmune hacia las células beta pancreáticas a cargo de la producción de insulina e induce una respuesta inmune, principalmente mediada por células, asociada con la producción de auto-anticuerpos, lo que conduce a la autodestrucción de las células beta.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo, que produce el efecto terapéutico o preventivo deseado en un paciente. Por ejemplo, con referencia a una enfermedad o trastorno, ésta es la cantidad que reduce hasta cierto grado uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, y de manera más particular regresa a la normalidad, ya sea parcial o completamente, los parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o que son causantes de la enfermedad o trastorno. Típicamente, la cantidad terapéuticamente efectiva es la cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo, que lleva a una mejora o a la restauración de la

situación fisiológica normal. Por ejemplo, cuando se utiliza para tratar terapéuticamente a un mamífero afectado por un trastorno inmune, ésta es una cantidad diaria de péptido/kg de peso corporal de dicho mamífero. De manera alternativa, en caso que la administración sea a través de terapia con genes, se ajusta la cantidad de ADN desnudo o vectores virales para asegurar la producción local de la dosificación relevante del péptido de la invención, derivado u homólogo del mismo.

El término “natural” cuando se hace referencia a un péptido se refiere al hecho que la secuencia es idéntica a un fragmento de una proteína presente en la Naturaleza (tipo silvestre o mutante). En contraste con el mismo el término “artificial” se refiere a una secuencia la cual como tal no se encuentra presente en la Naturaleza. Una secuencia artificial se obtiene a partir de una secuencia natural mediante modificaciones limitadas tales como cambiando/eliminando/insertando uno o más aminoácidos dentro de la secuencia presente en la Naturaleza o agregando/removiendo aminoácidos hacia el extremo N-terminal o hacia el extremo C-terminal de una secuencia presente en la Naturaleza.

Los aminoácidos son referidos en la presente solicitud con sus nombres completos, sus abreviaturas de tres letras o sus abreviaturas de una letra.

Los motivos de las secuencias de aminoácido en la presente solicitud están escritos de conformidad con el formato de Prosite. Los motivos se utilizan para describir una cierta variedad de secuencia en partes específicas de una secuencia. El símbolo X se utiliza para una posición en la cual se acepta cualquier aminoácido. Las alternativas se indican listando los aminoácidos aceptables para una posición dada, entre corchetes (“[]”). Por ejemplo: [CST] significa un aminoácido que se selecciona a partir de Cys, Ser o Thr. Los aminoácidos que están excluidos como alternativas se indican listándolos entre llaves (“{ }”). Por ejemplo: {AM} significa cualquier aminoácido excepto Ala y Met. Los diferentes elementos en un motivo opcionalmente están separados uno del otro por un guión (-). La repetición de un elemento idéntico dentro de un motivo se puede indicar colocando detrás de dicho elemento un valor numérico o un intervalo numérico entre paréntesis. Por ejemplo, X(2) corresponde a X-X o XX; X(2, 5) corresponde a 2, 3, 4 o 5 aminoácidos X, A(3) corresponde a A-A-A o AAA.

Para distinguir entre los aminoácidos X, aquellos entre H y C se denominan aminoácidos X externos (con subrayado sencillo en la secuencia anterior), aquellos dentro del motivo redox se denominan aminoácidos X internos (con subrayado doble en la secuencia anterior).

X representa cualquier aminoácido, en particular un L-aminoácido, de manera más particular uno de los 20 L-aminoácidos presentes en la Naturaleza.

Un péptido, que comprende un epítipo de célula T y una secuencia de motivo de péptido modificado, que tiene actividad reductora es capaz de generar una población de células T CD4+ citolíticas específicas de antígeno contra células presentadoras de antígeno.

Por consiguiente, en su sentido más amplio, la invención se refiere a péptidos que comprenden por lo menos un epítipo de célula T de un antígeno (propio o no propio) con un potencial para desencadenar una reacción inmune, y un motivo de secuencia de tiorreductasa modificado con una actividad reductora sobre los puentes de disulfuro peptídicos. El epítipo de célula T y la secuencia de motivo redox modificado pueden estar inmediatamente adyacentes entre sí en el péptido u opcionalmente están separadas por uno o más aminoácidos (denominada secuencia enlazadora). De manera opcional, el péptido comprende

adicionalmente una secuencia de direccionamiento a endosoma y/o secuencias de “flanqueo” adicionales.

Los péptidos de la invención comprenden un epítipo de una célula T del MHC de clase II de un antígeno (propio o no propio) con un potencial para desencadenar una reacción inmune, y un motivo redox modificado. La actividad reductora de la secuencia del motivo en el péptido se puede analizar respecto a su capacidad para reducir un grupo sulfhidrilo tal como en la prueba de solubilidad de insulina en la cual la solubilidad de insulina se altera después de la reducción, o con un sustrato marcado con fluorescencia tal como insulina. Un ejemplo de dicha prueba utiliza un péptido fluorescente y se describe en Tomazzoli et al. (2006) *Anal. Biochem.* 350, 105–112. Dos péptidos con una marca de FITC se auto-extinguen cuando éstos se unen covalentemente entre sí a través de un puente de disulfuro. Después de reducción con un péptido de conformidad con la presente invención, los péptidos individuales reducidos se vuelven fluorescentes de nuevo.

El motivo redox modificado puede estar posicionado en el lado del extremo amino terminal del epítipo de célula T o en el extremo carboxi terminal del epítipo de célula T.

Los fragmentos de péptido con actividad reductora se encuentran en las tiorreductasas las cuales son enzimas reductoras de disulfuro pequeñas que incluyen glutarredoxinas, nucleorredoxinas, tiorredoxinas y otras tiol/disulfuro oxidorreductasas (Holmgren (2000) *Antioxid. Redox Signal.* **2**, 811-820; Jacquot et al. (2002) *Biochem. Pharm.* **64**, 1065-1069). Estas son multifuncionales, ubicuas y se encuentran en muchos procariotas y eucariotas. Estas ejercen actividad reductora para los puentes de disulfuro en las proteínas (tal como las enzimas) a través de cisteínas activas redox dentro de las secuencias de consenso de dominio activo conservadas: CXXC [SEQ ID NO:18], CXXS [SEQ ID NO:23], CXXT [SEQ ID NO:24], SXXC [SEQ ID NO:21], TXXC [SEQ ID NO:22] (Fomenko et al. (2003) *Biochemistry* 42, 11214-11225; Fomenko et al. (2002) *Prot. Science* **11**, 2285-2296), en las cuales X significa cualquier aminoácido. Dichos dominios también se encuentran en proteínas más grandes tal como la disulfuro isomerasa de proteína (PDI por sus siglas en inglés) y la fosfolipasa C específica de fosfoinositido.

El motivo redox de 4 aminoácidos como se conoce a partir de por ejemplo, Fomenko y el documento WO2008/017517 comprende una cisteína en la posición 1 y/o 4; por lo tanto el motivo es cualquiera de CXX[CST] [SEQ ID NO: 1] o [CST]XXC [SEQ ID NO:2]. Dicha secuencia tetrapeptídica es referida como “el motivo”. El motivo en un péptido puede ser cualquiera de las alternativas CXXC [SEQ ID NO:18], SXXC [SEQ ID NO:21], TXXC [SEQ ID NO:22], CXXS [SEQ ID NO:23] o CXXT [SEQ ID NO:24]. En particular, los péptidos contienen el motivo de secuencia CXXC [SEQ ID NO:18].

Como se explica con detalle más adelante, los péptidos de la presente invención se pueden elaborar mediante síntesis química, lo cual permite la incorporación de aminoácidos no naturales. Por consiguiente, “C” en los motivos redox modificados por redox antes recitados representa ya sea cisteína u otro aminoácido con un grupo tiol tal como mercaptovalina, homocisteína u otros aminoácidos naturales o no naturales con un grupo funcional tiol. Para que tengan actividad reductora, las cisteínas presentes en un motivo redox modificado no deben encontrarse como parte de un puente de disulfuro de cisteína. No obstante, un motivo redox modificado por redox puede comprender cisteínas modificadas tales como cisteína metilada, la cual es convertida en cisteína con grupos tiol libres *in vivo*. X puede ser cualquiera de

los 20 aminoácidos naturales, incluyendo S, C, o T o puede ser un aminoácido no natural. En modalidades particulares X es un aminoácido con una cadena lateral pequeña tal como Gly, Ala, Ser o Thr. En modalidades particulares adicionales, X no es un aminoácido con una cadena lateral voluminosa tal como Trp. En modalidades particulares adicionales X no es cisteína. En modalidades particulares adicionales por lo menos una X en el motivo redox modificado es His. En otras modalidades particulares adicionales por lo menos una X en el redox modificado es Pro.

Los péptidos también pueden comprender modificaciones para incrementar la estabilidad o solubilidad, tal como modificación del grupo NH₂ N-terminal o el grupo COOH C-terminal (por ejemplo, modificación del grupo COOH en un grupo CONH₂).

En los péptidos de la presente invención que comprenden un motivo redox modificado, el motivo está ubicado de tal manera que, cuando el epítipo encaja en la ranura del MHC, el motivo permanece fuera de la ranura de unión del MHC. El motivo redox modificado está colocado ya sea inmediatamente adyacente a la secuencia del epítipo dentro del péptido [en otras palabras una secuencia enlazadora de cero aminoácidos entre el motivo y el epítipo], o está separado del epítipo de célula T por un enlazador que comprende una secuencia de aminoácido de 5 aminoácidos o menos. De manera más particular, el enlazador comprende 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos. Las modalidades específicas son péptidos con un enlazador de 0, 1 o 2 aminoácidos entre la secuencia del epítipo y la secuencia del motivo redox modificado. En aquellos péptidos en los cuales la secuencia de motivo redox modificado está adyacente a la secuencia de epítipo esto se indica como posición P-4 a P-1 o P+1 a P+4 comparado con la secuencia del epítipo. Además de un enlazador peptídico, se pueden utilizar otros compuestos orgánicos como enlazador para enlazar las partes del péptido una con la otra (por ejemplo, la secuencia de motivo redox modificado a la secuencia de epítipo de célula T).

Los péptidos de la presente invención también pueden comprender secuencias de aminoácido cortas adicionales hacia el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia que comprende el epítipo de célula T y el motivo redox modificado. Dicha secuencia de aminoácido generalmente es referida en la presente solicitud como una "secuencia de flaqueo". Una secuencia de flaqueo puede estar posicionada entre el epítipo y una secuencia de direccionamiento a endosoma y/o entre el motivo redox modificado y una secuencia de direccionamiento a endosoma. En algunos péptidos, que no comprenden una secuencia de direccionamiento a endosoma, puede estar presente una secuencia de aminoácido corta hacia el extremo N-terminal y/o C-terminal del motivo redox modificado y/o la secuencia de epítipo en el péptido. De manera más particular una secuencia de flaqueo es una secuencia de entre 1 y 7 aminoácidos, de manera aún más particular una secuencia de 2 aminoácidos.

El motivo redox modificado puede estar localizado hacia el extremo N-terminal del epítipo.

En algunas modalidades de la presente invención, se proveen péptidos que comprenden una secuencia de epítipo y una secuencia de motivo redox modificado. En modalidades particulares adicionales, el motivo redox modificado se presenta varias veces (1, 2, 3, 4 o incluso más veces) en el péptido, por ejemplo, como repeticiones del motivo redox modificado las cuales pueden estar espaciadas una de la otra por uno o más aminoácidos o como repeticiones que están inmediatamente adyacentes una a la otra. De manera alternativa, se proveen uno o más motivos redox modificados tanto en el extremo N-

terminal como en el extremo C-terminal de la secuencia de epítipo de célula T.

Otras variaciones contempladas para los péptidos de la presente invención incluyen péptidos que contienen repeticiones de una secuencia de epítipo de célula T en las cuales cada secuencia de epítipo está precedida y/o es seguida por el motivo redox modificado (por ejemplo, repeticiones de “motivo redox modificado-epítipo” o repeticiones de “motivo redox modificado-epítipo-motivo redox modificado”). En la presente solicitud los motivos redox modificados pueden tener todos la misma secuencia pero esto no es obligatorio. Se indica que las secuencias repetitivas de péptidos que comprenden un epítipo el cual comprende en sí mismo el motivo redox modificado también dará como resultado una secuencia que comprende tanto el “epítipo” así como un “motivo redox modificado”. En dichos péptidos, el motivo redox modificado dentro de una secuencia de epítipo funciona como un motivo redox modificado fuera de una segunda secuencia de epítipo.

Típicamente, los péptidos de la presente invención comprenden solamente un epítipo de célula T. Como se describe más adelante un epítipo de célula T en una secuencia de proteína se puede identificar mediante pruebas funcionales y/o una o más pruebas de predicción *in silico*. Los aminoácidos en una secuencia de epítipo de célula T se numeran de conformidad con su posición en la ranura de unión de las proteínas del MHC. Un epítipo de célula T presente dentro de un péptido consiste en entre 8 y 25 aminoácidos, de manera aún más particular de entre 8 y 16 aminoácidos, de manera incluso aún más particular consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos.

En una modalidad más particular, el epítipo de célula T consiste en una secuencia de 9 aminoácidos. En una modalidad particular adicional, el epítipo de célula T es un epítipo, el cual es presentado a las células T por moléculas del MHC de clase II [epítopos de célula T restringidos a MHC de clase II]. Típicamente, secuencia de epítipo de célula T se refiere a la secuencia octapeptídica o de manera más específica a la secuencia nonapeptídica que encaja en la hendidura de una proteína del MHC II.

El epítipo de célula T de los péptidos de la presente invención puede corresponder ya sea a una secuencia de epítipo natural de una proteína o puede ser una versión modificada de la misma, con la condición de que el epítipo de célula T modificado retenga su capacidad para unirse dentro de la hendidura del MHC, similar a la secuencia natural de epítipo de célula T. El epítipo de célula T modificado puede tener la misma afinidad de unión para la proteína del MHC que la del epítipo natural, pero también puede tener una afinidad reducida. En particular, la afinidad de unión del péptido modificado es de no menos de 10 veces menor que la del péptido original, de manera más particular no menos de 5 veces menor. Los péptidos de la presente invención tienen un efecto estabilizador sobre los complejos de proteína. Por consiguiente, el efecto estabilizador del complejo péptido-MHC compensa la afinidad reducida del epítipo modificado hacia la molécula de MHC.

La secuencia que comprende el epítipo de célula T y el compuesto reductor dentro del péptido también puede estar ligada a una secuencia de aminoácido (u otro compuesto orgánico) que facilite la captación del péptido en los endosomas tardíos para procesamiento y presentación dentro de los determinantes de MHC de clase II. El direccionamiento a endosoma tardío es mediado por señales presentes en la cola citoplasmática de las proteínas y corresponde a motivos peptídicos bien identificados.

Las secuencias de direccionamiento a endosoma tardío permiten el procesamiento y presentación eficiente del epítipo de célula T derivado de antígeno por moléculas del MHC de clase II. Dichas secuencias de direccionamiento a endosoma están contenidas, por ejemplo, dentro de la proteína gp75 (Vijayasaradhi et al. (1995) *J. Cell. Biol.* **130**, 807-820), la proteína CD3 gamma de humano, el HLA-BM 11 (Copier et al. (1996) *J. Immunol.* **157**, 1017-1027), la cola citoplasmática del receptor DEC205 (Mahnke et al. (2000) *J. Cell Biol.* **151**, 673-683). Otros ejemplos de péptidos que funcionan como señales de clasificación hacia el endosoma son descritos en la revisión de Bonifacio y Traub (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395-447. De manera alternativa, la secuencia puede ser la de un epítipo subdominante o menor de célula T proveniente de una proteína, que facilita la captación en el endosoma tardío sin superar la respuesta de célula T hacia el antígeno. La secuencia de direccionamiento a endosoma tardío puede estar localizada ya sea en el extremo amino terminal o en el extremo carboxi terminal del péptido derivado de antígeno para captación y procesamiento eficientes y también puede ser acoplada a través de una secuencia de flaqueo, tal como una secuencia peptídica de hasta 10 aminoácidos. Cuando se utiliza un epítipo menor de célula T para propósitos de direccionamiento, este último típicamente está localizado en el extremo amino terminal del péptido derivado de antígeno.

Por consiguiente, la presente invención contempla péptidos de proteínas antigénicas y su uso para provocar reacciones inmunes específicas. Estos péptidos pueden corresponder a fragmentos de proteínas que comprenden, dentro de sus secuencias es decir un compuesto reductor y un epítipo de célula T separados cuando mucho por 10, de preferencia 7 aminoácidos o menos. De manera alternativa, y para la mayoría de proteínas antigénicas, los péptidos de la invención se generan copulando un compuesto reductor, de manera más particular un motivo redox modificado reductor como se describe en la presente solicitud, de manera N-terminal o C-terminal a un epítipo de célula T de la proteína antigénica (ya sea directamente adyacente a la misma o con un enlazador de cuando mucho 10, de manera más particular cuando mucho 7 aminoácidos). Asimismo la secuencia de epítipo de célula T de la proteína y/o el motivo redox modificado se pueden modificar y/o introducir una o más secuencias de flaqueo y/o una secuencia de direccionamiento (o modificar), en comparación con la secuencia de origen natural. Por lo tanto, dependiendo de que se puedan o no encontrar las características de la presente invención dentro de la secuencia de la proteína antigénica de interés, los péptidos de la presente invención pueden comprender una secuencia que es "artificial" o de "origen natural".

La longitud de los péptidos de la presente invención puede variar sustancialmente. La longitud de los péptidos puede variar desde 13 o 14 aminoácidos, es decir consistir de un epítipo de 8 a 9 aminoácidos, adyacente al mismo los 5 aminoácidos del motivo redox modificado con la histidina, hasta 20, 25, 30, 40 o 50 aminoácidos. Por ejemplo, un péptido puede comprender una secuencia de direccionamiento a endosoma de 40 aminoácidos, una secuencia de flaqueo de aproximadamente 2 aminoácidos, un motivo como el descrito en la presente solicitud de 5 aminoácidos, un enlazador de 4 aminoácidos y un péptido de epítipo de célula T de 9 aminoácidos.

Por consiguiente, en modalidades particulares, el péptido completo consiste en entre 13 aminoácidos hasta 20, 25, 30, 40, 50, 75 o 100 aminoácidos. De manera más particular, en casos en los que el compuesto reductor es un motivo redox modificado como se describe en la presente solicitud, la

longitud de la secuencia (artificial o natural) que comprende el epítopo y el motivo redox modificado opcionalmente conectados por un enlazador (referido en la presente solicitud como “secuencia de motivo redox modificado por epítopo”), sin la secuencia de direccionamiento a endosoma, es crítica. El “motivo redox modificado por epítopo” de manera más particular tiene una longitud de 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos. Dichos péptidos de 13 o 14 a 19 aminoácidos opcionalmente pueden estar acoplados a una señal de direccionamiento a endosoma cuyo tamaño es menos crítico.

Como se detalló anteriormente, en modalidades particulares, los péptidos de la presente invención comprenden un motivo redox modificado reductor como se describe en la presente solicitud ligado a una secuencia de epítopo de célula T.

En modalidades particulares adicionales, los péptidos de la invención son péptidos que comprenden epítopos de célula T que no comprenden una secuencia de aminoácido con propiedades redox dentro de su secuencia natural.

Sin embargo, en modalidades alternativas, el epítopo de célula T puede comprender cualquier secuencia de aminoácido que asegure la unión del epítopo a la hendidura del MHC. En casos en los que un epítopo de interés de una proteína antigénica comprende un motivo redox modificado tal como el descrito en la presente solicitud dentro de su secuencia de epítopo, los péptidos inmunogénicos de conformidad con la presente invención comprenden la secuencia de un motivo redox modificado como se describe en la presente solicitud y/o de otra secuencia reductora acoplada de manera N-terminal o C-terminal a la secuencia del epítopo de modo tal que (contrario al motivo redox modificado presente dentro del epítopo, el cual está enterrado dentro de la hendidura) el motivo redox modificado unido puede asegurar la actividad reductora.

Por consiguiente el epítopo de célula T y el motivo están inmediatamente adyacentes o separados uno del otro y no se traslapan. Para evaluar el concepto de “inmediatamente adyacente” o “separado”, se determina la secuencia de 8 o 9 aminoácidos que encaja en la hendidura del MHC y se determina la distancia entre este octapéptido o nonapéptido y el tetrapéptido del motivo redox o el pentapéptido del motivo redox modificado que incluye histidina.

En términos generales, los péptidos de la presente invención no son naturales (por lo tanto sin fragmentos de proteínas como tales) sino péptidos artificiales que contienen, además de un epítopo de célula T, un motivo redox modificado como se describe en la presente invención, con lo cual el motivo redox modificado está inmediatamente separado del epítopo de célula T por un enlazador que consiste en hasta siete, de manera aún más particular hasta cuatro o hasta 2 aminoácidos.

Se ha demostrado que después de la administración (es decir inyección) a un mamífero de un péptido de conformidad con la invención (o una composición que comprenda dicho péptido), el péptido provoca la activación de células T que reconocen el epítopo de célula T derivado de antígeno y provee una señal adicional para la célula T a través de reducción del receptor de superficie. Esta activación supra-óptima da como resultado que las células T adquieran propiedades citolíticas para la célula que presenta el epítopo de célula T, así como propiedades supresoras en las células T espectadoras. De esta manera, los péptidos o la composición que comprende los péptidos descritos en la presente invención, los cuales contienen un epítopo de célula T derivado de antígeno y, fuera del epítopo, un motivo redox modificado se

pueden utilizar para inmunización directa de mamíferos, incluyendo seres humanos. La invención por lo tanto provee péptidos de la invención o derivados de los mismos, para ser utilizados como una medicina. Por consiguiente, la presente invención provee métodos terapéuticos que comprenden administrar uno o más péptidos de conformidad con la presente invención a un paciente que lo necesite.

5 La presente invención ofrece métodos mediante los cuales las células T específicas de antígeno dotadas con propiedades citolíticas pueden ser estimuladas mediante inmunización con péptidos pequeños. Se ha encontrado que los péptidos que contienen (i) una secuencia que codifica para un epítipo de célula T proveniente de un antígeno y (ii) una secuencia de consenso con propiedades redox, y además también comprende opcionalmente una secuencia para facilitar la captación del péptido en los endosomas tardíos para presentación eficiente de MHC-clase II, estimulan las células T supresoras.

10 Las propiedades inmunogénicas de los péptidos de la presente invención son de interés particular en el tratamiento y prevención de reacciones inmunes.

Los péptidos descritos en la presente solicitud se utilizan como medicamento, de manera más particular se utilizan para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un trastorno inmune en un mamífero, más en particular en un humano.

15 La presente invención describe métodos de tratamiento o prevención de un trastorno inmune de un mamífero en necesidad de dicho tratamiento o prevención, utilizando los péptidos de la invención, homólogos o derivados de los mismos, los métodos comprenden el paso de administrar a dicho mamífero que padece o está en riesgo de un trastorno inmune una cantidad terapéuticamente efectiva de los péptidos de la invención, homólogos o derivados de los mismos para reducir los síntomas del trastorno inmune. Se contempla el tratamiento tanto de humanos como de animales, tales como, mascotas y animales de granja. En una modalidad el mamífero a ser tratado es un humano. En una modalidad particular los trastornos inmunes referidos anteriormente se seleccionan a partir de enfermedades alérgicas y enfermedades autoinmunes.

25 Los péptidos de la invención o la composición farmacéutica que los comprende como se define en la presente solicitud de preferencia se administran a través de administración sub-cutánea o intramuscular. De preferencia, los péptidos o composiciones farmacéuticas que los comprenden se pueden inyectar por vía sub-cutánea (SC) en la región de la parte lateral del brazo superior, a la mitad entre el codo y el hombro. Cuando se necesitan dos o más inyecciones separadas, éstas se pueden administrar en forma concomitante en ambos brazos.

30 El péptido de conformidad con la invención o la composición farmacéutica que lo comprende se administra en una dosis terapéuticamente efectiva. Los regímenes de dosificación de ejemplo, pero no limitativos, están entre 50 y 1500 µg, de preferencia entre 100 y 1200 µg. Los esquemas de dosificación más específicos pueden estar entre 50 y 250 µg, entre 250 y 450 µg o entre 850 y 1300 µg, dependiendo de la condición del paciente y de la gravedad de la enfermedad. El régimen de dosificación puede comprender la administración en una dosis individual o en 2, 3, 4, 5, o más dosis, ya sea simultáneamente o en forma consecutiva. Los esquemas de administración de ejemplo no limitativos son los siguientes:

- Un esquema de dosis baja que comprende la administración SC de 50 µg de péptido en dos inyecciones separadas de 25 µg cada una (100 µL cada una) seguido por tres inyecciones consecutivas de

25 µg de péptido como dos inyecciones separadas de 12.5 µg cada una (50 µL cada una).

- Un esquema de dosis media que comprende la administración SC de 150 µg de péptido en dos inyecciones separadas de 75 µg cada una (300 µL cada una) seguido por tres administraciones consecutivas de 75 µg de péptido como dos inyecciones separadas de 37.5 µg cada una (150 µL cada una).

- Un esquema de dosis alta que comprende la administración SC de 450 µg de péptido en dos inyecciones separadas de 225 µg cada una (900 µL cada una) seguido por tres administraciones consecutivas de 225 µg de péptido como dos inyecciones separadas de 112.5 µg cada una (450 µL cada una).

Para todos los péptidos anteriores se contemplan variantes adicionales, en las cuales, entre histidina y cisteína, están presentes uno o dos aminoácidos X. Típicamente, dicho(s) aminoácido(s) externo(s) X no es/son His, Cys, Ser o Thr.

Los péptidos de la presente invención también se pueden utilizar en métodos de diagnóstico *in vitro* para detectar células T CD4+ restringidas a clase II en una muestra. En este método se pone en contacto una muestra con un complejo de una molécula de MHC de clase II y un péptido de conformidad con la presente invención. Las células T CD4+ se detectan midiendo la unión del complejo con las células en la muestra, en la cual la unión del complejo a una célula es indicativa de la presencia de células T CD4 + en la muestra.

El complejo puede ser una proteína de fusión del péptido y una molécula del MHC de clase II. De manera alternativa las moléculas de MHC en el complejo son tetrámeros. El complejo se puede proporcionar como una molécula soluble o puede estar unido a un vehículo.

Por consiguiente, en modalidades particulares, los métodos de tratamiento y prevención de la presente invención comprenden la administración de un péptido inmunogénico como se describe en la presente invención, en el cual el péptido comprende un epítipo de célula T de una proteína antigénica que desempeña un papel en la enfermedad a ser tratada (por ejemplo, tales como aquellas descritas anteriormente). En modalidades particulares adicionales, el epítipo utilizado es un epítipo dominante.

Los péptidos de conformidad con la presente invención se preparan sintetizando un péptido en el cual el epítipo de célula T y el motivo redox modificado están separados por 0 a 5 aminoácidos. En algunas modalidades el motivo redox modificado se puede obtener introduciendo 1, 2 o 3 mutaciones fuera de la secuencia del epítipo, para conservar el contexto de secuencia como se presenta en la proteína. Típicamente los aminoácidos en P-2 y P-1, así como en P+10 y P+11, con referencia al nonapéptido los cuales son parte de la secuencia natural están conservados en la secuencia del péptido. Estos residuos de flanco generalmente estabilizan la unión al MHC de clase II. En otras modalidades la secuencia N-terminal o C-terminal del epítipo no está relacionada con la secuencia de la proteína antigénica que contiene la secuencia del epítipo de célula T.

Por lo tanto, tomando como base los métodos anteriores para diseñar un péptido, se genera un péptido mediante síntesis química de péptidos, métodos de expresión recombinante o en casos más excepcionales, fragmentación proteolítica o química de proteínas.

Los péptidos tal como se producen en los métodos anteriores se pueden examinar respecto a la

presencia de un epítipo de célula T en métodos *in vitro* e *in vivo*, y se pueden examinar respecto a su actividad reductora en pruebas *in vitro*. Como un control de calidad final, los péptidos se pueden examinar en pruebas *in vitro* para verificar si los péptidos pueden generar células T CD4+ que sean citolíticas a través de una ruta apoptótica para células presentadoras de antígeno que presentan el antígeno que contiene la secuencia del epítipo el cual también está presente en el péptido con el motivo redox modificado.

Los péptidos de la presente invención se pueden generar utilizando técnicas de ADN recombinante, en bacterias, levaduras, células de insecto, células vegetales o células de mamífero. En vista de la longitud limitada de los péptidos, éstos se pueden preparar mediante síntesis química de péptidos, en la cual los péptidos se preparan mediante copulación de los diferentes aminoácidos entre sí. La síntesis química es particularmente apropiada para la inclusión de por ejemplo D-aminoácidos, aminoácidos con cadenas laterales no presentes en la Naturaleza o aminoácidos naturales con cadenas laterales modificadas tal como cisteína metilada.

Los métodos de síntesis química de péptidos están bien descritos y los péptidos se pueden ordenar a partir de compañías tales como Applied Biosystems y otras compañías.

La síntesis de péptido se puede realizar ya sea como síntesis de péptido en fase sólida (SPPS por sus siglas en inglés) o contrario a la síntesis de péptido en fase en solución. Los métodos de SPPS mejor conocidos son química en fase sólida con t-Boc y Fmoc:

Durante la síntesis de péptido se utilizan varios grupos protectores. Por ejemplo, los grupos funcionales hidroxilo y carboxilo se protegen con el grupo t-butilo, la lisina y triptófano se protegen con el grupo t-Boc, y la asparagina, glutamina, cisteína e histidina se protegen con el grupo tritilo, y la arginina se protege con el grupo pbf. Si fuera apropiado, dichos grupos protectores se pueden dejar en el péptido después de la síntesis. Los péptidos se pueden ligar entre sí para formar péptidos más largos utilizando una estrategia de ligadura (copulación quimioselectiva de dos fragmentos de péptido no protegidos) como fue descrito originalmente por Kent (Schnelzer & Kent (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.* **40**, 180-193) y revisado por ejemplo en Tam et al. (2001) *Biopolymers* **60**, 194-205 provee el tremendo potencial para lograr síntesis de proteína que está más allá del alcance de SPPS. Con este método se han sintetizado con éxito muchas proteínas con tamaño de 100-300 residuos. Los péptidos sintéticos han seguido desempeñando un papel crucial cada vez mayor en los campos de investigación de bioquímica, farmacología, neurobiología, enzimología y biología molecular debido a los enormes avances en la SPPS.

De manera alternativa, los péptidos se pueden sintetizar utilizando moléculas de ácido nucleico que codifican para los péptidos de esta invención en un vector de expresión apropiado que incluye las secuencias de nucleótido codificadores. Dichas moléculas de ADN se pueden preparar fácilmente utilizando un sintetizador de ADN automatizado y la bien conocida relación de codón-aminoácido del código genético. Dicha molécula de ADN también se puede obtener como ADN genómico o como ADNc utilizando sondas de oligonucleótido y metodologías de hibridación convencionales. Dichas moléculas de ADN se pueden incorporar en vectores de expresión, incluyendo plásmidos, los cuales están adaptados para la expresión del ADN y producción del polipéptido en un hospedero apropiado tal como bacteria, por ejemplo, *Escherichia coli*, célula de levadura, célula animal o célula vegetal.

Se examinan las propiedades físicas y químicas de un péptido de interés (por ejemplo, solubilidad, estabilidad) para determinar si el péptido es/será apropiado para ser utilizado en las composiciones terapéuticas. Típicamente esto se optimiza ajustando la secuencia del péptido. De manera opcional, el péptido se puede modificar después de la síntesis (modificaciones químicas por ejemplo adición/delección de grupos funcionales) utilizando técnicas conocidas en el campo.

Se cree que los epítomos de célula T por sí mismos desencadenan eventos tempranos al nivel de la célula T auxiliar uniéndose a una molécula de HLA apropiada en la superficie de una célula presentadora de antígeno y estimulando la subpoblación de célula T relevante. Estos eventos llevan a la proliferación de célula T, secreción de linfocina, reacciones inflamatorias locales, el reclutamiento de células inmunes adicionales hacia el sitio, y activación de la cascada de célula B que lleva a la producción de anticuerpos. Un isotipo de estos anticuerpos, IgE, es fundamentalmente importante en el desarrollo de síntomas alérgicos y su producción es tempranamente influenciada en la cascada de eventos, al nivel de la célula T auxiliar, por la naturaleza de las linfocinas secretadas. Un epítomo de célula T es el elemento básico o unidad más pequeña de reconocimiento por parte de un receptor de célula T en el cual el epítomo comprende residuos de aminoácidos esenciales para reconocimiento del receptor, los cuales son contiguos en la secuencia de aminoácido de la proteína.

Sin embargo, se cree que después de la administración de los péptidos con un epítomo de célula T y un motivo redox, suceden los siguientes eventos:

activación de células T específicas de antígeno (i) que resulta de la interacción del cognado con el péptido derivado de antígeno presentado por moléculas del MHC de clase II;

la secuencia de reductasa reduce las proteínas de superficie de célula T, tales como la molécula CD4, el segundo dominio el cual contiene un puente disulfuro restringido. Esto transduce una señal hacia las células T. Entre una serie de consecuencias relacionadas con la ruta oxidativa incrementada, los eventos importantes son influjo de calcio incrementado y translocación del factor de transcripción NF-kB hacia el núcleo. Esto último da como resultado transcripción incrementada de IFN-gamma y granzimas, lo cual permite que las células adquieran propiedades citolíticas a través de un mecanismo inductor de apoptosis; la propiedad citolítica afecta a las células que presentan el péptido por medio de un mecanismo, que implica la secreción de granzima B, e interacciones Fas-FasL. Debido a que el efecto aniquilador de células se obtiene a través de una ruta apoptótica, células citolíticas es un término más apropiado que células citotóxicas para dichas células. La destrucción de las células objetivo presentadoras de antígeno evita la activación de otras células T específicas para epítomos ubicados en el mismo antígeno, o para un antígeno no relacionado que sería procesado por la misma célula presentadora de antígeno; una consecuencia adicional de la activación de célula T es suprimir la activación de células T espectadoras mediante un mecanismo dependiente del contacto célula-célula. En dicho caso, las células T activadas por un antígeno presentado por una célula presentadora diferente también son suprimidas con la condición que dichas células T tanto citolíticas como espectadoras estén en proximidad cercana, específicamente activadas sobre la superficie de la misma célula presentadora de antígeno.

El mecanismo de acción postulado anteriormente está fundamentado con datos experimentales descritos en la solicitud PCT WO2008/017517 citada anteriormente y en las publicaciones de los presentes

inventores.

La presente invención provee métodos para generar células T CD4+ citolíticas específicas de antígeno ya sea *in vivo* o *in vitro* y, de manera independiente de los mismos, métodos para discriminar células T CD4+ citolíticas a partir de otras poblaciones de células tales como Tregs Foxp3+ tomando como
5 base datos de expresión característicos.

La presente invención describe métodos *in vivo* para la producción de las células T CD4+ específicas de antígeno. Una modalidad particular se refiere al método para producir o aislar las células T CD4+ inmunizando animales (incluyendo humanos) con los péptidos de la invención como se describe en la presente solicitud y después aislando las células T CD4+ a partir de los animales inmunizados. La
10 presente invención describe métodos *in vitro* para la producción de células T CD4+ citolíticas específicas de antígeno hacia APC. La presente invención provee métodos para generar células T CD4+ citolíticas específicas de antígeno hacia APC.

En una modalidad, se proveen métodos que comprenden el aislamiento de células de sangre periférica, la estimulación de la población celular *in vitro* mediante un péptido inmunogénico de conformidad
15 con la invención y la expansión de la población de células estimuladas, de manera más particular en presencia de IL-2. Los métodos de conformidad con la invención tienen la ventaja de que se produce un número elevado de células T CD4+ y que se pueden generar células T CD4+ que son específicas para la proteína antigénica (utilizando un péptido que comprende un epítipo específico de antígeno).

En una modalidad alternativa, las células T CD4+ se pueden generar *in vivo*, es decir mediante la
20 inyección de los péptidos inmunogénicos descritos en la presente solicitud a un individuo, y recolección de las células T CD4+ citolíticas generadas *in vivo*.

Las células T CD4+ citolíticas específicas de antígeno hacia APC, que se pueden obtener utilizando los métodos de la presente invención son de interés particular para la administración a mamíferos para inmunoterapia, en la prevención de reacciones alérgicas y el tratamiento de enfermedades
25 autoinmunes. Se contempla el uso de células tanto alogénicas como autogénicas.

Las poblaciones de células T CD4+ citolíticas se obtienen tal como se describe más adelante en la presente solicitud.

Las células T CD4+ citolíticas específicas de antígeno tal como se describen en la presente solicitud se pueden utilizar como un medicamento, de manera más particular para ser utilizadas en terapia
30 con célula adoptiva, de manera más particular en el tratamiento de reacciones alérgicas agudas y relapsos de enfermedades autoinmunes tal como esclerosis múltiple. Las células o poblaciones de células T CD4+ citolíticas aisladas, de manera más particular poblaciones de células T CD4+ citolíticas específicas de antígeno generadas tal como se describe se utilizan para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de trastornos inmunes. Se describen métodos de tratamiento utilizando las células
35 T CD4+ citolíticas aisladas o generadas.

Como se explica en el documento WO2008/017517 las células T CD4+ citolíticas hacia APC se pueden distinguir de las células Treg naturales tomando como base las características de expresión de las células. De manera más particular, una población de células T CD4+ citolíticas demuestra una o más de las siguientes características en comparación con una población de células Treg naturales:

una expresión incrementada de marcadores de superficie incluyendo CD103, CTLA-4, FasL e ICOS después de la activación,

expresión intermedia de CD25,

expresión de CD4, ICOS, CTLA-4, GITR y expresión baja o no expresión de CD127 (IL7-R), no
5 expresión de CD27.

expresión del factor de transcripción T-bet y egr-2 (Krox-20) pero no del represor de transcripción Foxp3,

una producción elevada de IFN-gamma y nada o solamente cantidades traza de IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 o TGF-beta.

10 Además las células T citolíticas expresan CD45RO y/o CD45RA, no expresan CCR7, CD27 y presentan niveles altos de granzima B y otras granzimas así como del ligando Fas.

Los péptidos de la invención, después de la administración a un animal vivo, típicamente un ser humano, provocan que las células T específicas ejerzan una actividad supresora sobre las células T espectadoras.

15 En modalidades específicas las poblaciones de células citolíticas de la presente invención se caracterizan por la expresión de FasL y/o Interferón gamma. En modalidades específicas las poblaciones de células citolíticas de la presente invención se caracterizan también por la expresión de granzima B.

Este mecanismo también implica y los resultados experimentales muestran que los péptidos de la invención, aunque comprenden un epítipo de célula T específico de un cierto antígeno, se pueden utilizar
20 para la prevención o tratamiento de trastornos provocados por una reacción inmune contra otros epítopos de célula T del mismo antígeno o en ciertas circunstancias incluso para el tratamiento de trastornos provocados por una reacción inmune contra otros epítopos de célula T de otros antígenos diferentes si éstos fueran presentados a través del mismo mecanismo por moléculas del MHC de clase II en los alrededores de células T activadas por los péptidos de la invención.

25 Se describen poblaciones de células aisladas del tipo celular que tiene las características descritas anteriormente, las cuales, además son específicas de antígeno, es decir capaces de suprimir una respuesta inmune específica de antígeno.

La presente invención provee composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más péptidos de conformidad con la presente invención, que comprenden también un vehículo farmacéuticamente
30 aceptable. Tal como se detalló anteriormente, la presente invención también se refiere a las composiciones para ser utilizadas como una medicina o a métodos para tratar a un mamífero por un trastorno inmune utilizando la composición y al uso de las composiciones para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de trastornos inmunes. La composición farmacéutica puede ser, por ejemplo, una vacuna adecuada para tratar o prevenir trastornos inmunes, especialmente alergia transmitida por el aire o
35 por los alimentos, así como enfermedades de origen alérgico. Como un ejemplo descrito más adelante en la presente solicitud de una composición farmacéutica, un péptido de conformidad con la invención se adsorbe sobre un coadyuvante apropiado para administración a mamíferos, tal como hidróxido de aluminio (alumbre). Típicamente, se inyectan 50 µg del péptido adsorbido sobre alumbre por vía subcutánea en 3 ocasiones en un intervalo de 2 semanas. Debería ser obvio para los expertos en la técnica que son

posibles otras vías de administración, incluyendo oral, intranasal o intramuscular. Además, el número de inyecciones y la cantidad inyectada pueden variar dependiendo de las condiciones que se van a tratar. Asimismo, se pueden utilizar otros coadyuvantes diferentes de alumbre, con la condición que éstos faciliten la presentación del péptido en la presentación a MHC de clase II y activación de célula T. Por lo tanto, aunque es posible que los ingredientes activos se administren solos, éstos típicamente se presentan como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, tanto para uso veterinario como para uso en humanos, de la presente invención comprenden por lo menos un ingrediente activo, como se describió anteriormente, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, que comprenden, como ingrediente activo, uno o más péptidos de conformidad con la invención, en mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención debe comprender una cantidad terapéuticamente efectiva del ingrediente activo, tal como se indica en la presente solicitud de aquí en adelante con respecto al método de tratamiento o prevención. Opcionalmente, la composición también comprende otros ingredientes terapéuticos. Los otros ingredientes terapéuticos apropiados, así como su dosificación habitual dependiendo de la clase a la cual éstos pertenecen, son bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden seleccionar a partir de otros fármacos conocidos utilizados para tratar trastornos inmunes.

El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” tal como se utiliza en la presente invención significa cualquier material o sustancia con la cual se formula el ingrediente activo con el fin de facilitar su aplicación o diseminación al locus que se va a tratar, por ejemplo, disolviendo, dispersando o difundiendo la composición, y/o para facilitar su almacenamiento, transporte o manejo sin disminuir su efectividad. Estos incluyen todos y cualesquiera solventes, medios para dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares. Se pueden incluir ingredientes adicionales con el fin de controlar la duración de la acción del péptido inmunogénico en la composición. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que ha sido comprimido para formar un líquido, es decir las composiciones de esta invención se pueden utilizar de manera apropiada como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos, aspersiones, aerosoles, suspensiones, ungüentos, cremas, tabletas, comprimidos o polvos. Los vehículos farmacéuticos apropiados para ser utilizados en las composiciones farmacéuticas y su formulación son bien conocidos por los expertos en la técnica, y no existe ninguna restricción particular respecto a su selección dentro de la presente invención. Estas también pueden incluir aditivos tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, agentes de adhesividad, adhesivos, agentes emulsificantes, solventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares, con la condición que los mismos sean consistentes con la práctica farmacéutica, es decir vehículos y aditivos que no creen daño permanente en mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar en cualquier manera conocida, por ejemplo, mezclando, recubriendo y/o moliendo de manera homogénea los ingredientes activos, en un procedimiento de un solo paso o de pasos múltiples, con el material de vehículo seleccionado y, donde sea apropiado, los otros aditivos tales como agentes tensoactivos. Estas también se pueden preparar mediante micronización, por ejemplo, en vista de

obtenerlas en forma de microesferas que tienen normalmente un diámetro de aproximadamente 1 a 10 μm , específicamente para la fabricación de microcápsulas para liberación controlada o sostenida de los ingredientes activos.

Los agentes tensoactivos apropiados, también conocidos como emulgente o emulsificante, para ser utilizados en las composiciones farmacéuticas de la presente invención son materiales no iónicos, catiónicos y/o aniónicos que tienen buenas propiedades emulsificantes, dispersantes y/o humectantes. Los agentes tensoactivos aniónicos apropiados incluyen tanto jabones solubles en agua, así como agentes tensoactivos sintéticos solubles en agua. Los jabones apropiados son sales de metal alcalino o metal alcalinotérreo, sales de amonio no sustituidas o sustituidas de ácidos grasos superiores (C10-C22), por ejemplo, las sales de sodio o potasio de ácido oleico o ácido esteárico, o de mezclas de ácido graso naturales que se pueden obtener a partir de aceite de coco o aceite de sebo. Los agentes tensoactivos sintéticos incluyen las sales de sodio o calcio de ácidos poliacrílicos; sulfonatos y sulfatos de ácido graso; derivados de bencimidazol sulfonados y alquilarilsulfonatos. Los sulfonatos o sulfatos de ácido graso normalmente están en forma de sales de metal alcalino o alcalinotérreo, sales de amonio no sustituido o sales de amonio sustituido con un radical alquilo o acilo que tiene de 8 a 22 átomos de carbono, por ejemplo la sal de sodio o calcio de ácido lignosulfónico o ácido dodecilsulfónico o una mezcla de sulfatos de alcohol de ácido graso obtenidos a partir de ácidos grasos naturales, sales de metal alcalino o alcalinotérreo de ésteres de ácido sulfúrico o sulfónico (tal como laurilsulfato de sodio) y ácidos sulfónicos de aductos de alcohol de ácido graso/óxido de etileno. Los derivados de bencimidazol sulfonado apropiados típicamente contienen 8 a 22 átomos de carbono. Los ejemplos de alquilarilsulfonatos son las sales de sodio, calcio o alcanolamina de ácido dodecylbencensulfónico o ácido dibutil-naftalensulfónico o un producto de condensación de ácido naftalen-sulfónico/formaldehído. También son apropiados los fosfatos correspondientes, por ejemplo, sales de éster de ácido fosfórico y un aducto de p-nonilfenol con etileno y/u óxido de propileno, o fosfolípidos. Los fosfolípidos apropiados para este propósito son los fosfolípidos naturales (que se originan a partir de células animales o vegetales) o sintéticos del tipo cefalina o lecitina tal como por ejemplo fosfatidil-etanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, lisolecitina, cardiolipina, dioctanilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y sus mezclas.

Los agentes tensoactivos no iónicos apropiados incluyen derivados polietoxilados y polipropoxilados de alquilfenoles, alcoholes de ácido graso, ácidos grasos, aminas o amidas alifáticas que contienen por lo menos 12 átomos de carbono en la molécula, alquilaren-sulfonatos y dialquilsulfosuccinatos, tales como derivados de éter poliglicólico de alcoholes alifáticos y cicloalifáticos, ácidos grasos saturados e insaturados y alquilfenoles, los derivados típicamente contienen 3 a 10 grupos de éter glicólico y 8 a 20 átomos de carbono en la porción de hidrocarburo (alifática) y 6 a 18 átomos de carbono en la porción alquilo del alquilfenol. Los agentes tensoactivos no iónicos apropiados adicionales son aductos solubles en agua de óxido de polietileno con polipropilenglicol, etilendiamino-polipropilenglicol que contiene 1 a 10 átomos de carbono en la cadena alquilo, cuyos aductos contienen 20 a 250 grupos de éter de etilenglicol y/o 10 a 100 grupos de éter de propilenglicol. Dichos compuestos normalmente contienen de 1 a 5 unidades de etilenglicol por unidad de propilenglicol. Los ejemplos representativos de agentes tensoactivos no iónicos son nonilfenol - polietoxietanol, éteres poliglicólicos de aceite de ricino,

aductos de óxido de polipropileno/polietileno, tributilfenoxi-polietoxietanol, polietilenglicol y octilfenoxi-polietoxietanol. Los ésteres de ácido graso de polietilen-sorbitán (tal como trioleato de polioxitilen-sorbitán), glicerol, sorbitán, sacarosa y pentaeritritol también son agentes tensoactivos no iónicos apropiados. Los agentes tensoactivos catiónicos apropiados incluyen sales de amonio cuaternario, particularmente halogenuros, que tienen 4 radicales hidrocarburo opcionalmente sustituidos con halógeno, fenilo, fenilo sustituido o hidroxilo; por ejemplo sales de amonio cuaternario que contienen como N-sustituyente por lo menos un radical alquilo de C8-C22 (por ejemplo cetilo, laurilo, palmitilo, miristilo, oleilo y similares) y, como sustituyentes adicionales, radicales alquilo inferior no sustituido o halogenado, bencilo y/o hidroxilo-alquilo inferior.

Una descripción más detallada de agentes tensoactivos apropiados para este propósito se puede encontrar por ejemplo en "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual" (MC Publishing Corp., Ridgewood, New Jersey, 1981), "Tensid-Taschenbuch", 2a ed. (Hanser Verlag, Vienna, 1981) y "Encyclopaedia of Surfactants, (Chemical Publishing Co., New York, 1981). Los péptidos, homólogos o derivados de los mismos de conformidad con la invención (y sus sales fisiológicamente aceptables o composiciones farmacéuticas incluidos todos en el término "ingredientes activos") se pueden administrar mediante cualquier vía apropiada para la condición a ser tratada y apropiada para los compuestos, en este caso las proteínas y fragmentos a ser administrados. Las posibles vías incluyen regional, sistémica, oral (forma sólida o inhalación), rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intra-arterial, intratecal y epidural). La vía de administración preferida puede variar con, por ejemplo, la condición del receptor o con las enfermedades a ser tratadas. Como se describe en la presente solicitud, el/los vehículo(s) óptimamente es/son "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor del mismo o de los mismos. Las formulaciones incluyen aquellas apropiadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural).

Las formulaciones apropiadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, soluciones amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes para suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en contenedores de dosis unitaria o de dosis múltiples, por ejemplo ampollitas y viales sellados, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito previamente.

Las formulaciones de dosificación unitaria típicas son aquellas que contienen una dosis diaria o sub-dosis unitaria diaria, tal como se recitó en la presente solicitud anteriormente, o una fracción apropiada de las mismas, de un ingrediente activo. Se debe entender que además de los ingredientes mencionados

en particular anteriormente las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica considerando el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellas apropiadas para administración oral pueden incluir agentes saborizantes. Los péptidos, homólogos o derivados de los mismos de conformidad con la invención se pueden utilizar para proveer formulaciones farmacéuticas de liberación controlada que contienen como ingrediente activo uno o más compuestos de la invención ("formulaciones de liberación controlada") en las cuales la liberación del ingrediente activo se puede controlar y regular para permitir la dosificación con menos frecuencia o para mejorar el perfil farmacocinético o de toxicidad de un compuesto de la invención dado. Las formulaciones de liberación controlada adaptadas para administración oral en las cuales las unidades discretas comprenden uno o más compuestos de la invención se pueden preparar de conformidad con métodos convencionales. Se pueden incluir ingredientes adicionales con el fin de controlar la duración de la acción del ingrediente activo en la composición. Por lo tanto se pueden obtener composiciones de liberación controlada seleccionando vehículos poliméricos apropiados tales como por ejemplo poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina y similares. La velocidad de liberación del fármaco y la duración de la acción también se pueden controlar incorporando el ingrediente activo dentro de partículas, por ejemplo microcápsulas, de una sustancia polimérica tal como hidrogeles, ácido poliláctico, hidroximetilcelulosa, polimetacrilato de metilo y los otros polímeros descritos anteriormente. Dichos métodos incluyen sistemas de suministro de fármaco coloidales tales como liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas y etc. Dependiendo de la vía de administración, la composición farmacéutica puede requerir recubrimientos protectores. Las formas farmacéuticas apropiadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de los mismos. Por lo tanto, los vehículos típicos para este propósito incluyen amortiguadores acuosos biocompatibles, etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares y mezclas de los mismos. En vista del hecho que, cuando se utilizan varios agentes activos en combinación, éstos no necesariamente llevan a cabo su efecto terapéutico en conjunto directamente al mismo tiempo en el mamífero que se va a tratar, la composición correspondiente también puede estar en forma de un kit o paquete médico que contiene los dos ingredientes en repositorios o compartimentos separados pero adyacentes. Por lo tanto, en este último contexto, cada ingrediente activo se puede formular en una manera apropiada para una vía de administración diferente de la del otro ingrediente, por ejemplo uno de éstos puede estar en forma de una formulación oral o parenteral mientras que el otro está en forma de una ampolla para inyección intravenosa o un aerosol.

Las células T CD4⁺ citolíticas tal como se obtienen en la presente invención, inducen apoptosis de APC después de la activación de cognado dependiente de MHC de clase II, lo que afecta tanto a células dendríticas como células B, como se demuestra *in vitro* e *in vivo*, y (2) suprimen las células T espectadoras por medio de un mecanismo dependiente de contacto en ausencia de IL-10 y/o TGF-beta. Las células T CD4⁺ citolíticas se pueden distinguir de las Tregs tanto naturales como adaptativas, como se discute con detalle en el documento WO2008/017517.

La presente invención será ilustrada ahora por medio de los siguientes ejemplos que se proveen sin ninguna intención limitativa. Asimismo, todas las referencias descritas en la presente solicitud se

incluyen explícitamente en la presente solicitud para referencia.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Diseño del péptido

Comparado con el péptido descrito en el documento WO2016059236 se sintetiza un péptido que comprende un epítipo de célula T del dominio C de insulina en el cual se ha eliminado la secuencia dipeptídica VR, que no se presenta en la secuencia de insulina, como se muestra en la alineación mostrada a continuación:

P17 001 : HCPYC VR SLQPLALEGSLQKRG [SEQ ID NO: 25]

P17 003 : HCPYC— SLQPLALEGSLQKRG [SEQ ID NO: 26]

Por lo tanto el péptido P17 003 contiene un motivo CxxC [SEQ ID NO:18] precedido por His en el cual xx son Pro y Tyr. El epítipo de célula T de 9 aminoácidos tiene la secuencia LALEGLSLQK [SEQ ID NO: 3] y está separado del motivo CxxC [SEQ ID NO:18] por un enlazador de 4 aminoácidos SLQP. El dipéptido RG es una secuencia de flaqueo hacia el extremo C-terminal del epítipo. En dicho péptido la secuencia SLQPLALEGSLQKRG [SEQ ID NO: 20] es 100% idéntica a la secuencia tal como se presenta en la insulina.

EJEMPLO 2: Metodología para evaluar la actividad reductora de los péptidos

La actividad de reductasa de los péptidos se determina utilizando un agente fluorescente descrito en Tomazzolli *et al.* (2006) *Anal. Biochem.* **350**, 105–112. Dos péptidos que tienen una marca de FITC se vuelven auto-extinguibles cuando éstos están covalentemente unidos entre sí a través de un puente de disulfuro. Después de la reducción mediante un péptido de conformidad con la presente invención, los péptidos individuales reducidos se vuelven fluorescentes otra vez.

Se efectúan experimentos de control con ditiotreitól (100% de actividad reductora) y agua (100% de actividad reductora).

El péptido P17 001 muestra 68% de actividad reductora, mientras que el péptido P17 003 muestra 65% de actividad reductora.

EJEMPLO 3: Liberación de interferón gamma por líneas de célula T CD4+ citolítica

El interferón gamma es un marcador importante para caracterizar células T CD4+ citolíticas.

Se obtiene una línea de células T CD4+ específicas cebando y estimulando células T CD4+ no afectadas por tratamiento provenientes de un paciente con T1D (T1D07) con el péptido p17-001. Después de 12 estimulaciones, las células se co-cultivan con células B LCL autólogas cargadas (2 μ M) con el péptido p17-001 o p17-003. Después de 24 horas, se recolectan los sobrenadantes y se mide el IFN-gamma mediante una prueba multiplex (véase la siguiente tabla 1).

TABLA 1

	Estímulo 1
	IFN-gamma (pg/ml)
p17 UL	2.35 $\pm$ 1.2
p17 001	11.1 $\pm$ 0.8
p17 003	29.7 $\pm$ 14.1

Hay una diferencia sorprendente en la producción de IFN-gamma entre los dos péptidos (aproximadamente 3 veces más IFN-gamma producido después de la estimulación con p17 003 en comparación con p17 001).

5 EJEMPLO 4: Liberación de FasL por líneas de célula T CD4+ citolítica

La línea de células T generada originalmente con p17 001 como se describió anteriormente en el ejemplo 3 se divide y se estimula con el péptido P17 003 o P17 001 durante 4 estimulaciones *in vitro* sucesivas utilizando la línea de célula B LCL autóloga como APC. En el día 11 de cada estimulación (en total 4), las células se analizan respecto a FasL después de la re-estimulación con su péptido correspondiente presentado por células B autólogas. Los sobrenadantes se recolectan después de 24 horas (estimulación 1 y 2) o 72 horas (estimulación 3 y 4) de co-cultivo.

TABLA 2

Expresión de FasL por líneas de célula T CD4+ provenientes de pacientes con T1D

15

Expresión de FasL (pg/ml)	Estimulación 1	Estimulación 2	Estimulación 3	Estimulación 4
Control	0	0	0	0
P17-001	1335 ± 23.1	1144 ± 15.4	1227 ± 49.1	1008 ± 102
P17-003	1795 ± 42.4	1812 ± 34.7	2063 ± 166	1526 ± 102

20

La expresión de FasL (también llamado sFasL) es significativamente más alta para P17-003 para cada una de las cuatro estimulaciones.

Esto ilustra una capacidad mayor del péptido P17-003 para generar células T citolíticas en comparación con el péptido P17-001.

EJEMPLO 5: Liberación de sFasL y producción de citoquina en PBMCs de pacientes con T1D

Se estimulan PBMCs provenientes de pacientes con T1D T1D018 *in vitro* con cualquiera del péptido P17001 o el péptido P17003. Estas dos poblaciones liberan específicamente IL-5 después de la activación antigénica. Después de 6 ciclos de estimulación con los péptidos, ambas líneas celulares están enriquecidas respecto a células productoras de IL-5 con glóbulos para captura de citoquina. Las dos poblaciones de células interleucina 5 negativas se utilizan como controles.

Estas cuatro poblaciones después se analizan respecto a la liberación específica de sFasL, granzima B y citoquinas después de estimulación con su péptido cognado (P17-001 o P17-003). Los sobrenadantes se recolectan después de 24 horas de cultivo y se miden sFasL y granzima B mediante ELISA (sFasL: Diaclone 851730010; granzima B: eBioscience BMS2027) y citoquinas con el kit MACSplex Cytokine 12 (Miltenyi, 130-099-169).

5.1. Producción de sFasL

En la figura 1 se muestran los niveles de sFasL de las cuatro líneas celulares. Esto muestra que las

fracciones IL-5 positivas (histogramas en negro) que están enriquecidas en células específicas, específicas para el péptido p17-003 o p17-001 liberan más sFasL en comparación con las fracciones negativas (histogramas abiertos), indicación de una purificación de células específicas eficiente.

Asimismo, los resultados indican que las células generadas mediante estimulación *in vitro* con p17-003 específicamente liberan de manera significativa 4.5 veces más sFasL en comparación con células generadas por el péptido p17-001 ($p < 0.0001$).

5.2. Producción de granzima B

Las fracciones IL-5 positivas que están enriquecidas en células específicas, específicas para el péptido p17-003 o p17-001 se analizan respecto a la liberación de más granzima B en comparación con las fracciones IL-5 negativas, como una medición de la purificación eficiente de células específicas.

Asimismo, las células generadas mediante estimulación *in vitro* con p17-003 se analizan respecto a la liberación específicamente incrementada de granzima B en comparación con células generadas mediante el péptido p17-001.

5.3. Liberación de citoquina

Para determinar si las células cultivadas *in vitro* provenientes de donadores con T1D son específicas para el péptido P17001 o P17003, se investiga la liberación de citoquinas, una característica distintiva para la activación celular después de la estimulación con péptido, utilizando el kit MACSplex Cytokine 12 (Miltenyi, 130-099-169). El sobrenadante se recolecta después de 24 horas a partir del cultivo de PBMCs de donadores con T1D en ausencia o presencia del péptido. Se determinan las concentraciones de citoquina para los duplicados biológicos y se muestran en pg/ml. La prueba de especificidad se efectúa al final de la estimulación 10 (día de descanso). El resultado se presenta como la diferencia en la concentración de cada citoquina en la condición sin y con péptido.

La figura 2 muestra que la fracción IL-5 positiva de la línea celular P17003 responde específicamente a la estimulación en comparación con las líneas celulares P17003 IL-5 negativas, P17001 IL-5 negativas y P17001 IL-5 positivas. Esto ilustra que el péptido P17003 es más potente para inducir células específicas de péptido en comparación con P17001.

En conclusión, las células generadas *de novo* con P17-003 son más potentes para la liberación de moléculas líticas (tales como sFasL y potencialmente granzima B) y citoquinas que las células generadas con P17-001. Por lo tanto, el péptido da como resultado una población de células CD4+ con propiedades citolíticas superiores contra APC que presenta epítomos de insulina.

EJEMPLO 6: Prueba clínica

Antes de la administración, se reconstituye el péptido de la invención con el diluyente que contiene el coadyuvante. El producto se debe reconstituir extemporáneamente y de preferencia se utiliza dentro de menos de 3 horas después de la reconstitución.

El producto medicinal en investigación se puede formular de manera que después de la reconstitución en el diluyente, la concentración del péptido en el vial sea 250 µg/ml. Se retira el volumen apropiado para cumplir con el protocolo de la prueba clínica. Por ejemplo:

- La dosis baja (Cohorte 1) puede comprender la administración SC de 50 µg del péptido en dos inyecciones separadas de 25 µg cada una (100 µl cada una) seguido por tres inyecciones consecutivas de

25 µg del péptido como dos inyecciones separadas de 12.5 µg cada una (50 µl cada una).

- La dosis media (Cohorte 2) puede comprender la administración SC de 150 µg del péptido en dos inyecciones separadas de 75 µg cada una (300 µl cada una) seguido por tres administraciones consecutivas de 75 µg del péptido como dos inyecciones separadas de 37.5 µg cada una (150 µl cada una).

- La dosis más alta (Cohorte 3) puede comprender la administración SC de 450 µg del péptido en dos inyecciones separadas de 225 µg cada una (900 µl cada una) seguido por tres administraciones consecutivas de 225 µg del péptido como dos inyecciones separadas de 112.5 µg cada una (450 µl cada una).

Los productos en investigación de conformidad con la invención de preferencia se inyectan por vía subcutánea (SC) en la región de la parte lateral del brazo superior, a la mitad entre el codo y el hombro. Cuando se necesitan dos inyecciones separadas, éstas de preferencia se administran de manera concomitante en ambos brazos: por ejemplo la inyección 1 en el brazo derecho y la inyección 2 en el brazo izquierdo.