

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 972**

21 Número de solicitud: 201131016

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

17.06.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.02.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio Emprendia, Campus Sur, s/n
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**VARELA CALVIÑO, Rubén y
GÓMEZ TOURIÑO, Iria**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

54 Título: **PÉPTIDO ANTIGÉNICO AISLADO DERIVADO DE LA PROTEÍNA S100-BETA,
PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN Y SU USO EN LA PREVENCIÓN, TRATAMIENTO,
DIAGNÓSTICO Y/O SEGUIMIENTO DE LA DIABETES TIPO I.**

57 Resumen:

Péptido antigénico aislado derivado de la proteína S100-beta, procedimiento de identificación y su uso en la prevención, tratamiento, diagnóstico y/o seguimiento de la diabetes tipo I.

La presente invención se refiere a un péptido antigénico aislado derivado de la proteína S100-beta, donde dicho péptido se encuentra unido a una molécula MHC de clase II. La presente invención también se refiere a un procedimiento para la obtención de dicho péptido antigénico, así como la utilización de dicho péptido antigénico en la fabricación de un medicamento para la prevención, seguimiento, diagnóstico y/o tratamiento de la diabetes tipo I. Adicionalmente, la presente invención también se refiere al uso de un péptido antigénico aislado derivado de la proteína S100-beta, pero sin estar unido a una MHC de clase II, para la fabricación de un medicamento para la prevención, tratamiento, diagnóstico o seguimiento de la diabetes tipo I.

ES 2 394 972 A1

DESCRIPCIÓN

Péptido antigénico aislado derivado de la proteína S100-beta, procedimiento de identificación y su uso en la prevención, tratamiento, diagnóstico y/o seguimiento de la diabetes tipo I.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un péptido antigénico derivado de la proteína S100-beta, así como al procedimiento para su identificación y a su utilización en la prevención, tratamiento, diagnóstico o seguimiento de la diabetes tipo I.

Estado de la técnica

La diabetes tipo I (T1D) humana es una enfermedad autoinmune caracterizada clínicamente por la falta de regulación de los niveles de glucosa y que a medio-largo plazo provoca complicaciones neurológicas y vasculares. La T1D es una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes entre la población caucásica. Tan sólo en España, se diagnostican cada año entre 10-20 nuevos casos cada 100.000 niños menores de 14 años, prevalencia que va en aumento, de lo que se deduce que 1 de cada 20 1.000 niños en esa edad es diabético, de modo que hay unos 10.000 niños diabéticos en nuestro país.

La T1D se caracteriza por una deficiencia de insulina, haciendo que los pacientes dependan de inyecciones diarias de insulina exógena para su supervivencia. Antes de la aparición de síntomas clínicos como la hiperglicemia, existe un periodo preclínico asintomático donde las células productoras de insulina son destruidas de forma progresiva. La destrucción de estas células productoras de insulina, las células beta presentes en los llamados islotes de Langerhans pancreáticos, está asociada a la infiltración de dichos islotes por linfocitos y otras células del sistema inmunológico del paciente. Estas células responden contra proteínas propias expresadas por las células beta, como por ejemplo la propia insulina o su precursor la pre-insulina.

Los islotes de Langerhans, donde se encuentran las células productoras de insulina, forman una estructura diferenciada dentro del tejido pancreático y se encuentran rodeados por una capa de células de tipo nervioso llamadas células periféricas de Schwann (pSC) (“*peri islet Schwann cells*”) cuyas funciones no están claras pero que sí expresan un conjunto de proteínas o antígenos que las diferencia

claramente de las células que componen los islotes pancreáticos, entre ellas las células beta. En el modelo murino de la T1D humana, el ratón NOD (“*Non-Obese Diabetic mice*”), que desarrolla un síndrome metabólico que comparte muchas características con la T1D humana como son la hiperglicemia y la deficiencia de insulina, estas 5 células pSC son destruidas por linfocitos del sistema inmune del animal. Algunos de estos linfocitos responden contra antígenos expresados de forma exclusiva en estas células pSC como son la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) o el factor neurotrópico S100-beta. En pacientes humanos con T1D se ha demostrado la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra GFAP y S100-beta así como linfocitos 10 autoreactivos específicos para estas dos proteínas, lo que indica que en esos pacientes las células pSC de los islotes han sido también destruidas por el sistema inmunológico. En el ratón NOD también se ha demostrado que la infiltración linfocitaria de los islotes comienza con la denominada infiltración periférica de los islotes (“*peri-islet infiltration*”) durante la cual se produce la destrucción del manto de células pSC que 15 rodea los islotes propiamente dichos. A continuación y una vez que este manto ha sido destruido, los linfocitos pueden acceder a los islotes, donde destruyen de forma selectiva las células beta productoras de insulina.

El hecho de que las células pSC parecen ser el objetivo inicial de la respuesta autoinmune contra los islotes pancreáticos y que su ralentización, regulación y/o 20 detención absoluta permitiría mantener intactos los islotes pancreáticos, unido al dato de que hoy en día no existe ninguna terapia que permita tratar la T1D humana, señalan la importancia de descubrir nuevos métodos y/o moléculas que permitan tratar la enfermedad en momentos que permitan conservar el mayor número de islotes intactos y durante el mayor tiempo posible.

25 Existe una gran experiencia previa que demuestra que los linfocitos CD4+ están implicados en el desarrollo de la T1D. Análisis histológicos de islotes obtenidos de individuos afectados muestran infiltraciones por parte de linfocitos CD4+. En modelos animales de la T1D la enfermedad puede ser transferida a un animal sano usando linfocitos CD4+ de un animal enfermo. Además, existe una asociación genética 30 entre el desarrollo de la T1D y ciertas moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, críticas para que los linfocitos CD4+ puedan desarrollarse y ser estimulados contra su objetivo. Finalmente, es posible detectar la presencia de linfocitos CD4+ activados en sangre periférica de individuos que han desarrollado la enfermedad.

Existe un creciente interés por definir los segmentos de las proteínas, denominados epítomos peptídicos, reconocidos por los linfocitos CD4+ implicados en la respuesta autoinmune contra las células pSC. La identificación de estos epítomos es importante para comprender los mecanismos que desencadenan la enfermedad, para el desarrollo de ensayos de laboratorio que permitan seguir el daño a los islotes y para diseñar terapias que permitan ralentizar o detener la enfermedad.

Los epítomos peptídicos derivados de antígenos exógenos son presentados a linfocitos T CD4+ después de una serie de eventos moleculares denominados en su conjunto como procesamiento y presentación natural. Para ello, los antígenos o proteínas exógenas son captados por células del sistema inmune denominadas células presentadoras de antígeno (APC). Una vez internalizado, el antígeno correspondiente es fragmentado mediante la combinación de diversos procesos químicos y enzimáticos, generando péptidos que se unen a moléculas MHC de clase II que son exportadas a la superficie de la célula presentadora de antígeno. El procesamiento y presentación natural de antígenos exógenos da lugar a grupos solapantes de péptidos (Figura 1) que se unen a la molécula MHC de clase II mediante el mismo “motivo de unión” pero que poseen diferentes extremos amino y carboxilo. Los aminoácidos de ambos extremos, aunque no forman parte del motivo de unión a la molécula de histocompatibilidad, pueden tener importantes efectos tanto sobre la afinidad de unión a la molécula de histocompatibilidad como en la activación de clones de linfocitos T CD4+.

En modelos animales como el ratón NOD, se ha demostrado que las APC captan proteínas del páncreas y las llevan a nódulos linfáticos que drenan este órgano para estimular allí linfocitos autoreactivos que reconocen péptidos derivados de estas proteínas y unidos a moléculas MHC específicas. Una vez estimulados, estos linfocitos autoreactivos se dirigen al páncreas, donde proceden a eliminar aquellas células que expresen el antígeno del cual ha derivado ese epítomo peptídico. Aunque se sabe que la proteína S100-beta es un objetivo del proceso autoinmune en la T1D humana a partir de estudios que demuestran la presencia de autoanticuerpos y linfocitos autoreactivos contra la proteína completa en pacientes diabéticos, por el momento no existen datos acerca de los epítomos peptídicos generados a partir de esta proteína y que sean reconocidos por linfocitos CD4+ en pacientes con T1D.

Los epítomos peptídicos generados *in vivo* por una APC a partir de una proteína exógena y capaces de estimular a un linfocito CD4+ consisten, por tanto, en varios péptidos de una longitud variable pero que comparten una zona común. Esta zona común o secuencia aminoacídica común contiene los aminoácidos que determinan el

llamado “motivo de unión” a la molécula MHC concreta, o lo que es lo mismo, los aminoácidos que permiten anclar dicho péptido a la molécula MHC. Este conjunto de péptidos derivados de una zona concreta de la proteína y que comparten una zona común forman un conjunto de péptidos solapantes (Figura 1), a partir del cual se
 5 podría sintetizar un epítipo peptídico consenso que incluya esa zona común y que incluya aminoácidos de los extremos de alguno o todos los epítipos peptídicos generados a partir de esa zona de la proteína.

Distintos métodos han sido empleados para intentar identificar epítipos peptídicos presentados por moléculas MHC de clase II y reconocidos por linfocitos T
 10 CD4+. Las siguientes aproximaciones experimentales se encuentran entre las empleadas habitualmente:

1. Predicción “*in silico*”. Las moléculas MHC de clase II se tienden a unir a péptidos que presentan determinados aminoácidos en posiciones concretas de
 15 la secuencia lineal, los denominados “motivos de unión” citados anteriormente. Existen aplicaciones informáticas disponibles que permiten buscar en una proteína segmentos de la secuencia lineal de aminoácidos que posean ese “motivo de unión” y que tengan, por tanto, posibilidades teóricas de ser presentados a linfocitos T CD4+. Sin embargo, esta aproximación presenta una
 20 serie de inconvenientes a la hora de identificar epítipos peptídicos unidos a moléculas MHC de clase II. En primer lugar, no proporciona ninguna información acerca de si dicho péptido va a ser realmente generado *in vivo* en una APC. En segundo lugar, a partir de una proteína se pueden generar muchos péptidos que tengan posibilidades de unión a una molécula MHC de clase II, generando muchos falsos positivos. En tercer lugar, la longitud de dichos
 25 epítipos peptídicos es variable, de forma que aunque se identifique un “motivo de unión”, no se conoce la longitud del péptido generado *in vivo* en una APC.
2. Generación de linfocitos T CD4+. Esta aproximación supone el clonaje de linfocitos T CD4+ que respondan contra la proteína y mediante el empleo de
 30 péptidos sintéticos solapantes entre sí, tratar de identificar cuál es el/los epítipo(s) contra el cual reacciona. Esta técnica presenta también determinados inconvenientes, entre los que se pueden citar: a) los péptidos sintetizados *in vitro* de nuevo no tienen por qué coincidir con el epítipo generado *in vivo*, y b) es una técnica que ha demostrado tener éxito en aquellas situaciones donde
 35 existe un número elevado de linfocitos T CD4+ específicos para dicho

antígeno, como puede ser el caso de una infección viral aguda, pero es mucho más difícil a nivel metodológico en autoinmunidad o en cáncer, donde el número de linfocitos T CD4+ específicos para un epítipo concreto es muchísimo más bajo.

5 3. Procesamiento de la proteína *in vitro*. Se conocen toda una serie de enzimas (proteasas) capaces de digerir proteínas y generar péptidos capaces de unirse a moléculas MHC de clase II. Sin embargo, el número de estas enzimas que interviene en este proceso o su orden de intervención *in vivo* en una APC sobre un antígeno o proteína concreta no se conocen con exactitud y hace que sea
10 muy difícil reproducir este proceso *in vitro*.

4. Síntesis de péptidos solapantes. Otra aproximación experimental habitual a la hora de tratar de identificar péptidos capaces de estimular linfocitos T CD4+ consiste en la síntesis de una librería de péptidos solapantes (Figura 2) en la cual los péptidos poseen una longitud concreta, solapan entre sí y cubren toda
15 la longitud de la proteína. Una vez sintetizados, estos péptidos se emplean como antígenos para estimular linfocitos T CD4+. Esta aproximación, sin embargo, no identifica los epítopos peptídicos procesados y presentados de forma natural, ya que no determina cuáles son los extremos reales de los péptidos generados en la célula y que pueden influir de forma significativa en el reconocimiento del epítipo por parte de linfocitos T CD4+. Además, la
20 respuesta de linfocitos T CD4+ contra alguno de estos péptidos solapantes no garantiza que dicho linfocito T CD4+ reconozca al epítipo natural generado por una APC *in vivo*.

25 Por tanto, no existe hasta la fecha ningún estudio científico en humanos que haya identificado péptidos antigénicos derivados de S100-beta, generados *in vivo* por una célula y que se encuentren unidos posteriormente a una molécula MHC de clase II como la molécula DRB1*0401 (DR4).

30 Los linfocitos humanos no responden contra la proteína completa sino contra segmentos (péptidos o epítopos peptídicos) generados a partir de ella; sin embargo, la determinación de dichos segmentos no es obvia, ni puede determinarse de la simple lectura de la secuencia de aminoácidos de la proteína o de la generación de librerías de fragmentos arbitrarios de la proteína.

35 La publicación de Winer S. *et al.* (Nature Medicine, Vol. 9(2): 198-205 (2003)) sugiere el tratamiento con S100-beta para diabetes, pero emplea la proteína

completa y no epítomos peptídicos concretos. Sin embargo, tal y como se ha mencionado en el párrafo anterior, los linfocitos de un paciente diabético no responden contra la proteína completa sino contra péptidos o epítomos peptídicos que deben ser generados a partir de ella y, de nuevo, la determinación de dichos segmentos no es trivial ni puede determinarse de la simple lectura de la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Los péptidos derivados de S100-beta descritos hasta la fecha se basan en meras fragmentaciones de la proteína en segmentos de una longitud arbitraria y la determinación de la presencia de anticuerpos contra dichos fragmentos. La solicitud de patente WO9801471, por ejemplo, describe epítomos que se utilizan para generar anticuerpos monoclonales en ratones, de modo que estos anticuerpos permitan posteriormente determinar la presencia del polipéptido S100-beta humano en suero de pacientes con melanoma. Para ello, en este documento se sintetizan péptidos de S100-beta, decidiendo de forma arbitraria la longitud de los mismos con la intención de identificar aquellos más útiles para determinar la presencia del polipéptido S100-beta humano en una muestra, pero no aquellos capaces de generar una respuesta inmune *in vivo*. Tal y como se expuso anteriormente, es imposible predecir estudiando únicamente la secuencia de aminoácidos de una proteína cuál o cuáles van a ser los epítomos peptídicos capaces de generar una respuesta inmune *in vivo*, esto es, que sean generados por una célula presentadora de antígeno, se unan a una molécula MHC de clase II y sean presentados en la superficie de dicha célula para que el conjunto molécula MHC-péptido desempeñe su función (por ejemplo, activar la respuesta inmunológica contra dicha proteína o generar una respuesta moduladora que reduzca o elimine dicha respuesta inmune contra la proteína). Esta imposibilidad deriva, en parte, de que las moléculas MHC de clase II presentan una hendidura en la que encajan segmentos más o menos grandes de una proteína (por ejemplo, S100-beta), segmento que luego es “limado o recortado” por ambos extremos por enzimas proteolíticas presentes en el interior celular. Sin embargo, el número, orden de actuación sobre el péptido (si es que dicho orden existe) y si sobre cada proteína particular actúa un grupo concreto y específico de estas enzimas, no se conoce con exactitud a día de hoy. Por esta razón, una célula presentadora de antígeno no genera un solo epítomo peptídico (péptido, subfragmento) de una región de una proteína sino que genera varios epítomos de la misma región que pueden agruparse en “grupos solapantes”, mencionados anteriormente (Figura 1). Los epítomos peptídicos de un “grupo solapante” comparten un mismo “núcleo común”, que interacciona directamente con la hendidura de la

molécula de histocompatibilidad correspondiente, y unos extremos variables, imposibles de predecir y que son generados, como se ha mencionado, por la acción de una o varias proteasas en el interior celular. En la solicitud de patente WO9801471, se fabrica una librería de péptidos segmentando S100-beta en fragmentos arbitrarios de 5 31 aminoácidos, proporcionándose dos fragmentos obtenidos a partir de dicha librería (SEQ. ID. NO. 4 y 6 en WO9801471; ver Figura 18 para homología con las secuencias de la presente invención), en base a las cuales se proponen subfragmentos (SEQ. ID. NO. 5 en WO9801471) o fragmentos mayores abarcando a esas secuencias (SEQ. ID. NO. 2 y 3 en WO9801471; ver Figura 18 para homología con las secuencias de la 10 presente invención), de forma totalmente arbitraria, pero sin determinar su inmunogenicidad. Por tanto, WO9801471 proporciona fragmentos arbitrarios de S100-beta que sirven para determinar la presencia de anticuerpos contra esta proteína en una muestra de pacientes con melanoma, pero ni determina qué partes de la proteína son las que realmente intervienen en la respuesta inmune en un sujeto, ni proporciona 15 información acerca de la implicación de dichos péptidos en la respuesta inmune ante la T1D, por lo que es necesario identificar aquellos péptidos derivados de S100-beta que desencadenan dicha respuesta, de modo que sea posible desarrollar sistemas de diagnóstico y tratamiento de la T1D mucho más sensibles y precisos.

El documento Tsui H. *et al.* (Diabetes, Vol. 57: 918-928 (2008)) identifica 20 epítomos de GFAP y realiza un tratamiento de inmunoterapia que inhibe significativamente la diabetes tipo I, remarcando la importancia de la identificación de los epítomos en el desarrollo de tetrámeros. Los tetrámeros hechos *in vitro* empleando una molécula de histocompatibilidad y un péptido no son equivalentes unos con otros porque sirven para detectar grupos de células inmunes que pueden tener papeles 25 completamente diferentes dentro de una misma patología, de forma que aunque existiesen tetrámeros hechos con una molécula de histocompatibilidad determinada y péptidos derivados de GFAP, tetrámeros fabricados empleando péptidos derivados de S100-beta detectarían linfocitos con funciones completamente diferentes a los linfocitos que detectarían los tetrámeros fabricados con péptidos derivados de GFAP 30 (Figura 3). En este documento, se predicen epítomos peptídicos de GFAP mediante el uso de un algoritmo, obteniendo distintos epítomos (posiciones aminoacídicas 79-87 y 253-261 en GFAP), que son luego empleados para inmunizar ratones. De ellos, tan sólo uno de los epítomos peptídicos (79-87) pero no el otro (253-261) produce una inhibición de la diabetes tipo I, a pesar de que ambos han sido generados de la misma 35 forma. Por tanto, a pesar de que describe el uso de uno de los múltiples algoritmos

empleados en la predicción de epítomos peptídicos, éste no proporciona epítomos útiles para generar una respuesta inmune ya que algunos de los epítomos predichos no funcionan. Este documento también menciona que no existen algoritmos para predecir epítomos unidos a una de las moléculas MHC de clase II que posee el modelo animal
 5 empleado en los experimentos descritos, lo que supone un problema en la identificación de epítomos peptídicos empleando este método. Además, aunque se predicen epítomos peptídicos para ambas clases de MHC (de clase II mediante librerías y de clase I mediante algoritmos), sólo se presentan resultados positivos *in vivo* al inmunizar ratones con epítomos peptídicos unidos a moléculas MHC de clase I, pero no
 10 con aquellos unidos a moléculas MHC de clase II, lo que pone de manifiesto la dificultad que implica la predicción u obtención de epítomos peptídicos específicos presentados por moléculas MHC de clase II.

Por último, la solicitud de patente US 2003/0054414 A1 también utiliza para el diagnóstico y el tratamiento de diabetes tipo I la proteína GFAP, pero tampoco
 15 identifica epítomos peptídicos específicos derivados de la proteína S100-beta que sean presentados a linfocitos CD4+ y que generen una respuesta inmune por parte de dichos linfocitos.

Por tanto, se necesita identificar aquellos epítomos peptídicos específicos de la proteína S100-beta que realmente intervengan en la respuesta inmune *in vivo* que tiene
 20 lugar en la diabetes tipo I y que sean potencialmente útiles en la prevención, diagnóstico, seguimiento y tratamiento de esta patología.

Descripción resumida de la invención

25 Los presentes inventores han identificado específicamente los péptidos antigénicos (también denominados en la presente invención como epítomos peptídicos) generados *in vivo* después de que S100-beta sea procesada por una célula presentadora de antígeno (APC) y que están presentes en la superficie de dichas APC unidos a una molécula MHC de clase II, aislándose los péptidos que realmente intervienen en la
 30 respuesta inmune *in vivo*. Por tanto, la presente invención proporciona los fragmentos específicos de la proteína S100-beta que son generados durante una respuesta inmune y que son capaces de activar a linfocitos, identificando por tanto qué epítomos peptídicos específicos son los que pueden emplearse para la prevención, el tratamiento, el diagnóstico y el seguimiento de la diabetes tipo I.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la obtención de dicho péptido antigénico.

La presente invención también se refiere a la utilización de dicho péptido antigénico en sistemas de diagnóstico de la diabetes tipo I y en la fabricación de un medicamento para la prevención, seguimiento, diagnóstico y/o tratamiento de la diabetes tipo I.

Adicionalmente, los presentes inventores también han observado que cuando el péptido antigénico de la presente invención no se encuentra unido a la MHC de clase II, dicho péptido es útil en la fabricación de un medicamento para la prevención, seguimiento, diagnóstico y/o tratamiento de la diabetes tipo I.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Grupos solapantes de péptidos resultantes del procesamiento intracelular de antígenos exógenos. Las moléculas de histocompatibilidad de clase II presentan en la superficie celular péptidos derivados de una misma región del antígeno, que poseen en común un grupo de aminoácidos que interaccionan directamente con aminoácidos de la molécula de histocompatibilidad (“motivo de unión”) (aminoácidos dentro del recuadro) pero que poseen distintos extremos amino- y/o carboxi-terminal.

Figura 2. Librerías de péptidos solapantes. Consisten en la síntesis de péptidos de una longitud determinada e idéntica para todos, los cuales solapan entre sí en un número concreto de aminoácidos y que cubren la longitud completa del antígeno. Se muestra en la figura una librería compuesta por cuatro péptidos de 15 aminoácidos de longitud solapantes entre sí en 12 aminoácidos y que cubren toda la secuencia de aminoácidos de la proteína (secuencia superior).

Figura 3. Tetrámeros MHC hechos con péptidos diferentes son reconocidos por linfocitos T diferentes. Un tetrámero MHC hecho con una molécula MHC concreta (1) pero conteniendo péptidos diferentes (2, cuadrados o círculos) son reactivos que detectan de forma específica linfocitos T diferentes (3), los cuales pueden tener funciones opuestas en una patología. Además, los tetrámeros MHC pueden llevar acoplados otros componentes como nanopartículas magnéticas, para la detección de linfocitos *in vivo*, o toxinas para la eliminación específica de aquellos linfocitos

autoreactivos que reconozcan el complejo MHC-péptido, como aquellos que reconozcan tetrámeros conteniendo péptidos derivados de S100-beta. Además, estos tetrámeros MHC pueden ser conjugados a otras moléculas o compuestos para generar nuevos reactivos de diagnóstico (por ejemplo, unidos a nanopartículas magnéticas) o de tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, unidos a citocinas o toxinas).

Figura 4. Esquema general de la metodología ELISPOT. En este análisis, placas de cultivo celular son recubiertas con un anticuerpo específico para la citocina que se quiere detectar (1). Una vez que los linfocitos T han sido activados empleando el antígeno correspondiente, se añaden a la placa recubierta de anticuerpo anti-citocina de forma que en aquellos lugares donde exista un linfocito T específico y estimulado por el antígeno quedará capturada la citocina que se quiere detectar (2, célula oscura). Eliminadas las células, se añade un segundo anticuerpo de detección acoplado a una enzima de forma que al añadir un sustrato se genera un color en el lugar donde se encontraba la célula específica de antígeno y productora de la citocina que se quiere detectar (3). La presencia de dicha célula se ve como una mancha (“spot”) en la placa (4), de forma que cada spot representa una célula específica para el antígeno empleado en la estimulación.

Figura 5. Sistema empleado en la internalización de S100-beta en células Priess. La línea linfoblastoide Priess (1) fue incubada de forma secuencial con una lectina obtenida de *Phytolacca americana* (2) biotilada *in vitro* (biotina = círculos negros), con avidina (3) y finalmente con S100-beta purificada y biotilada *in vitro* (4) (biotina = círculos negros). Una vez finalizada la incubación con S100-beta, las células se incubaron a 37°C para que pudiesen internalizar y procesar el antígeno y presentar epítomos peptídicos en la superficie celular unidos a moléculas del MHC DR4 (5). Las células empleadas como control fueron incubadas con todos los elementos excepto S100-beta.

Figura 6. Fraccionamiento por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de los péptidos presentes en moléculas MHC de clase II DR4 en células Priess incubadas o no con S100-beta. Los péptidos obtenidos a partir de células Priess incubadas con S100-beta (cromatograma superior) o células Priess sin incubadas con S100-beta (cromatograma inferior) fueron fraccionados mediante HPLC en columna de fase reversa C18 recogiendo fracciones cada 30 segundos aproximadamente. Cada

fracción fue analizada posteriormente mediante espectrometría de masas. mAU: unidades de absorbancia.

Figura 7. Grupos de epítomos peptídicos solapantes derivados de S100-beta
 5 identificados mediante espectrometría de masas (MS). Después de comparar los
 espectros MS de cada una de las fracciones obtenidas en el HPLC de péptidos
 obtenidos de células incubadas con S100-beta con su correspondiente fracción de
 células Priess control (sin incubar con S100-beta) se identificaron 9 masas únicas
 correspondientes con 3 grupos de péptidos solapantes (grupos A-C) después de la
 10 búsqueda de la secuencia de aminoácidos en Findpept
 (<http://expasy.org/tools/findpept.html>).

Figura 8. Epítomos peptídicos consenso de S100-beta sintetizados con la
 información obtenida de los tres grupos solapantes identificados por espectrometría de
 15 masas (MS). Los epítomos consenso sintetizados contienen al menos un motivo de
 unión a la molécula de histocompatibilidad de clase II DR4. Tal y como se demuestra
 en los ejemplos de la presente invención, estos péptidos consenso pueden ser
 empleados en la identificación *in vitro* de linfocitos T CD4+ autoreactivos en pacientes
 diabéticos.

20

Figura 9. Resultados de ELISPOT para IL-10 de un individuo sano no
 diabético. Se muestra una fotografía de los resultados de síntesis de IL-10 obtenidos de
 un individuo sano cuyos linfocitos han sido incubados con dimetil sulfóxido (DMSO,
 disolvente empleado en la disolución de los péptidos) (fila superior); el péptido
 25 EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT (SEQ ID NO: 17) derivado de una proteína de
Plasmodium falciparum (Pf, empleado como control negativo) (segunda fila); forbol
 12-miristato 13-acetato (PMA, empleado como control positivo) (tercera fila) y el
 epítomo peptídico consenso S100-beta 68-92 (SEQ ID NO: 15) (última fila). Se detecta
 algún “spot” en aquellas células incubadas con PMA y una enorme cantidad de “spots”
 30 en aquellas células incubadas en presencia del epítomo peptídico consenso.

Figura 10. Secuencias de aminoácidos de los epítomos peptídicos
 correspondientes a la Región 1 de S100-beta y de la librería de péptidos solapantes de
 15 aminoácidos de longitud sintetizados a partir del epítomo peptídico consenso SEQ
 35 ID NO: 12.

Figura 11. Resultados de los ensayos de unión a la molécula de clase II DR4 del epítipo peptídico consenso SEQ ID NO: 12 y de los epítipos peptídicos de la Región 1 de S100-beta. Para cada péptido se muestra la unión a 0 horas de ensayo (columnas en blanco) y la cantidad de péptido que permanece unido a la molécula DR4 después de 24 horas de incubación a 37°C (parte negra de las columnas). Como comparación se muestran los resultados de unión de un epítipo con alta afinidad (control positivo) y de afinidad intermedia (control intermedio).

10 Figura 12. Secuencias de aminoácidos de los epítipos peptídicos correspondientes a la Región 3 de S100-beta y de la librería de péptidos solapantes de 15 aminoácidos de longitud sintetizados a partir del epítipo peptídico consenso SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14.

15 Figura 13. Resultados de los ensayos de unión a la molécula de clase II DR4 del epítipo peptídico consenso SEQ ID NO: 13 y de los epítipos peptídicos de la Región 3 de S100-beta. Para cada péptido se muestra la unión a 0 horas de ensayo (columnas en blanco) y la cantidad de péptido que permanece unido a la molécula DR4 después de 24 horas de incubación a 37°C (parte negra de las columnas). Como comparación se muestran los resultados de unión de un epítipo con alta afinidad (control positivo) y de afinidad intermedia (control intermedio).

Figura 14. Resultados de los ensayos de unión a la molécula de clase II DR4 del epítipo peptídico consenso SEQ ID NO: 14 y de los epítipos peptídicos de la Región 3 de S100-beta. Para cada péptido se muestra la unión a 0 horas de ensayo (columnas en blanco) y la cantidad de péptido que permanece unido a la molécula DR4 después de 24 horas de incubación a 37°C (parte negra de las columnas). Como comparación se muestran los resultados de unión de un epítipo con alta afinidad (control positivo) y de afinidad intermedia (control intermedio).

30 Figura 15. Secuencias de aminoácidos de los epítipos peptídicos correspondientes a la Región 2 de S100-beta y de la librería de péptidos solapantes de 15 aminoácidos de longitud sintetizados a partir del epítipo peptídico consenso SEQ ID NO: 15.

35

Figura 16. Resultados de los ensayos de unión a la molécula de clase II DR4 del epítipo peptídico consenso SEQ ID NO: 15 y de los epítipos peptídicos de la Región 2 de S100-beta. Para cada péptido se muestra la unión a 0 horas de ensayo (columnas en blanco) y la cantidad de péptido que permanece unido a la molécula DR4 después de 24 horas de incubación a 37°C (parte negra de las columnas). Como comparación se muestran los resultados de unión de un epítipo con alta afinidad (control positivo) y de afinidad intermedia (control intermedio).

Figura 17. Se muestra una Tabla que hace referencia a las homologías con respecto a los epítipos descritos en la presente invención, de secuencias conteniendo cambios en 1, 2 ó 3 aminoácidos. El asterisco (*) indicado en el encabezamiento de las columnas cuarta a sexta indica que se ha calculado como el n° de aminoácidos idénticos/n° de aminoácidos totales * 100.

Figura 18. Se muestra una Tabla que hace referencia a homologías de las secuencias de la presente invención con las secuencias del documento WO 98101471.

Descripción de la invención

Los presentes inventores han identificado específicamente los péptidos antigénicos (también denominados en la presente invención como epítipos peptídicos) generados *in vivo* después de que S100-beta sea procesada por una célula presentadora de antígeno (APC) y que están presentes en la superficie de dichas APC unidos a una molécula MHC de clase II, aislándose los péptidos que realmente intervienen en la respuesta inmune *in vivo*. Por tanto, la presente invención proporciona los fragmentos específicos de la proteína S100-beta que son generados durante una respuesta inmune y que son capaces de activar a linfocitos, identificando por tanto qué epítipos peptídicos específicos son los que pueden emplearse para la prevención, el tratamiento, el diagnóstico y el seguimiento de la diabetes tipo I.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido antigénico (epítipo peptídico) aislado y derivado de la proteína S100-beta, donde dicho péptido se encuentra unido a una molécula MHC de clase II.

En la presente invención por “péptido antigénico” se entiende una secuencia lineal de aminoácidos presente en la hendidura de una molécula de histocompatibilidad y que posee por tanto capacidad de comportarse como un antígeno.

En la presente invención por “MHC de clase II” se entiende una molécula de histocompatibilidad formada por dos cadenas α (alfa) y β (beta) presentes en la superficie celular, la cual presenta una hendidura capaz de alojar un péptido antigénico.

5 En una realización preferida, dicho péptido se localiza en la región 1 de la proteína S100-beta, y comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

En otra realización preferida, dicho péptido se localiza en la región 2 de la proteína S100-beta, y comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 4, SEQ ID
10 NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7.

En otra realización preferida, dicho péptido se localiza en la región 3 de la proteína S100-beta, y comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

Se entiende por región 1 de la proteína S100-beta a la comprendida entre los
15 aminoácidos 2 y 25, por región 2 a la comprendida entre los aminoácidos 60-92 y a la región 3 a la comprendida entre los aminoácidos 19-46 de la proteína S100-beta (la secuencia de la proteína S100-beta está disponible en el número de acceso NP_06263 de la base de datos de proteínas NCBI), ambos extremos incluidos.

En otra realización preferida, dicho péptido es un péptido consenso para cada
20 una de las regiones 1, 2 y 3, seleccionado del grupo que comprende:

a) péptido de secuencia SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16,

b) péptido que al menos muestra un 80% de homología con los péptidos descritos en a).

25 Preferiblemente, la homología del péptido con los péptidos descritos en a) es del 85%, más preferiblemente del 90%, más preferiblemente del 95%, y aún más preferiblemente es del 98%.

En la presente invención por “péptido consenso” se entiende una secuencia lineal de aminoácidos que solapa con las secuencias de aminoácidos de los péptidos
30 identificados de una región de S100-beta y que posee al menos una posible región de unión a moléculas MHC de clase II.

En una realización más preferida, la molécula MHC de clase II unida al péptido según cualquiera de las realizaciones anteriores es DR4.

En la presente invención se entiende como moléculas MHC de clase II DR4 a la formada por las cadenas α y β codificadas por los alelos DRA1*0101 y DRB1*0401 respectivamente.

En la presente invención, por “homología” se entiende el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de las secuencias de péptidos SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, después de alinear las secuencias e introducir los espacios que sean necesarios para conseguir el máximo porcentaje de identidad con dichas secuencias. Los péptidos que mantienen al menos un 80% de homología con las secuencias SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, son aquellas que difieren en 1, 2 ó 3 aminoácidos con respecto a dichas secuencias (Figura 17). Preferiblemente, la homología del péptido candidato con los péptidos de la invención es del 80%, más preferiblemente del 85%, más preferiblemente del 90%, más preferiblemente del 95%, y aún más preferiblemente es del 98%.

La presente invención hace referencia, por primera vez, a péptidos aislados localizados en tres regiones de la proteína S100-beta, de una longitud variable, y que han sido generados *in vivo* por una APC a la que se le ha proporcionado la proteína S100-beta purificada para que la APC pudiese procesarla, generar epítomos peptídicos y presentar dichos epítomos en su superficie unidos a la molécula MHC de clase II.

Más específicamente, la presente invención da a conocer la secuencia de una serie de péptidos aislados cuya longitud varía entre 11-27 aminoácidos y que se agrupan en tres regiones de la proteína S100-beta completa, formando tres grupos de péptidos solapantes. Dichos péptidos son los siguientes:

- 25
- a) Región 1: tres péptidos cuyo núcleo es la secuencia KAMVALIDVFHQYSG
- SEQ ID NO: 1: KAMVALIDVFHQYSGREGD
- SEQ ID NO: 2: AMVALIDVFHQYSGREGDK
- SEQ ID NO: 3: SELEKAMVALIDVFHQYSG
- 30 b) Región 2: cuatro péptidos cuyo núcleo es la secuencia FQEFMAFFVAMVTTAC
- SEQ ID NO: 4: TLDNDGDGECDFQEFMAFVAMVTTACH
- SEQ ID NO: 5: FQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE
- SEQ ID NO: 6: EFMAFVAMVTTAC
- 35 SEQ ID NO: 7: FQEFMAFVAMVT

- c) Región 3: cuatro péptidos cuyo núcleo es la secuencia KHKLKKSELKELINN
- SEQ ID NO: 8: REGDKHKLKKS
- SEQ ID NO: 9: HKLKKSELKEL
- SEQ ID NO: 10: KHKLKKSELKELINNELSHFLE
- 5 SEQ ID NO: 11: SGREGDKHKLKKSELKELINN

Para cada una de las tres regiones descritas anteriormente se pueden sintetizar uno o más epítomos peptídicos consenso que incluyen toda o parte de las secuencias descritas anteriormente. Estos “epítomos peptídicos consenso” incluyen uno o más
 10 posibles “motivos de unión” a la molécula MHC de clase II, preferiblemente DR4. Las secuencias aminoacídicas de dichos “epítomos peptídicos consenso” son:

- a) KAMVALIDVFHQYSGREGDK (SEQ ID NO: 12)
- b) REGDKHKLKKSELKEL (SEQ ID NO: 13)
- 15 c) KHKLKKSELKELINNELSHFLE (SEQ ID NO: 14)
- d) ECDFQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE (SEQ ID NO: 15)
- e) MAFVAMVTTACHEFFEHE (SEQ ID NO: 16)

A partir de las secuencias descritas anteriormente y de sus derivados (ligandos
 20 peptídicos alterados) se pueden generar distintas moléculas o reactivos útiles en la prevención, tratamiento, diagnóstico o seguimiento de enfermedades.

Entre estas moléculas, la presente invención se refiere a los tetrámeros MHC de clase II-péptido antigénico.

Dichos tetrámeros también pueden fusionarse a una o más de otras moléculas.
 25 Preferiblemente, con fines terapéuticos, dichas moléculas son citocinas, por ejemplo la interleucina-10, la interleucina-5, la interleucina-4 o la interleucina-13, toxinas, por ejemplo, la saporina, o algunos isótopos, por ejemplo, el actinio-225, que regulan la actividad de los linfocitos CD4+ específicos para S100-beta o los eliminan de forma específica (Figura 3). Con fines diagnósticos, dichos tetrámeros también pueden
 30 fusionarse a nanopartículas magnéticas o a compuestos fluorescentes para la detección de linfocitos CD4+ específicos para S100-beta, por ejemplo para la detección *in vivo* mediante tomografía axial (Figura 3) cuando se fusionan a nanopartículas magnéticas, o para la detección *ex vivo* mediante citometría de flujo cuando se fusionan a compuestos fluorescentes. El diagnóstico se realiza de modo que cuando un sujeto
 35 presenta un número de linfocitos CD4+ específicos para S100-beta por encima de un

determinado valor, éste es diagnosticado como diabético, considerando como sanos a aquellos sujetos que muestran niveles por debajo del mismo. Asimismo, los tetrámeros pueden fusionarse a distintas combinaciones de toxinas, citocinas, nanopartículas magnéticas y/o compuestos fluorescentes.

5 En un segundo aspecto, la presente invención también se refiere a un procedimiento que permite la identificación directa y el aislamiento de los epítopos peptídicos procesados de forma natural a partir de un antígeno específico y presentados por moléculas de histocompatibilidad de clase II a linfocitos CD4+. Dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 10 a) purificación de la molécula de histocompatibilidad de clase II,
b) elución de los péptidos unidos a la molécula de histocompatibilidad de clase II; e
c) identificación de los péptidos eluidos en la etapa b).

15 La purificación de la molécula de histocompatibilidad de clase II en la etapa a) se puede llevar a cabo mediante distintos procedimientos, tales como la precipitación con sulfato amónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio aniónico o preferiblemente mediante la cromatografía de afinidad empleando un anticuerpo específico. La elución de los péptidos unidos a la molécula
20 de histocompatibilidad en la etapa b) se puede llevar a cabo mediante distintos procedimientos, tales como la incubación en tampón citrato-fosfato pH: 3,3 a temperatura ambiente o preferiblemente mediante incubación en ácido acético al 10% a 70°C. La identificación de los péptidos según la etapa c) se puede llevar a cabo mediante distintos procedimientos, preferiblemente mediante HPLC y espectrometría
25 de masas.

En un tercer aspecto, la presente invención también se refiere a un péptido antigénico aislado derivado de la proteína S100-beta, donde dicho péptido se encuentra unido a una molécula MHC de clase II, para su utilización en la prevención, tratamiento, diagnóstico y/o seguimiento de la diabetes tipo I. Dicho péptido
30 antigénico puede ser aquel descrito en cualquiera de las realizaciones anteriores.

La presente invención también se refiere a la utilización de un péptido antigénico aislado derivado de la proteína S100-beta, donde dicho péptido se encuentra unido a una molécula MHC de clase II, para la fabricación de un medicamento para la prevención, tratamiento, diagnóstico y/o seguimiento de la diabetes tipo I. Dicho

péptido antigénico puede ser aquel descrito en cualquiera de las realizaciones anteriores.

En la presente invención por “prevención” se entiende evitar la aparición de una enfermedad, en este caso la diabetes tipo I.

5 En la presente invención por “tratamiento” se entiende la intervención clínica en un intento por alterar la evolución natural de la enfermedad y se realiza durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la reaparición de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, disminución de
10 la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o cura parcial del estado patológico y remisión o pronóstico mejorado.

En la presente invención por “diagnóstico” se entiende la capacidad de identificar una determinada enfermedad o estado patológico, en este caso la diabetes tipo I.

15 En la presente invención por “seguimiento” se entiende el proceso continuo y dinámico de recogida de datos sobre el estado patológico del paciente, en este caso con respecto a la diabetes tipo I a efectos de establecer la fase en que se encuentra la enfermedad y consecuentemente aplicar la acción terapéutica adecuada.

En una realización preferida, el péptido antigénico unido a la MHC de clase II
20 según cualquiera de las realizaciones anteriores se utiliza como reactivo para identificar y cuantificar linfocitos CD4+ específicos para epítomos peptídicos de S100-beta, en sistemas de diagnóstico o seguimiento de la diabetes tipo I. En una realización preferida, la detección de linfocitos CD4+ específicos para S-100 beta se lleva a cabo *in vivo* mediante tomografía axial o *ex vivo* mediante citometría de flujo, fusionando
25 los tetrámeros a nanopartículas magnéticas o a compuestos fluorescentes, respectivamente.

La presente invención también se refiere a un método de prevención o tratamiento de la diabetes tipo I que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido antigénico unido a MHC de clase II según la
30 presente invención en sus diferentes realizaciones a un sujeto con necesidad del mismo. La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz se haría de forma preferida mediante vía intradérmica o subcutánea, pudiendo hacerse de manera alternativa mediante vía oral, parenteral o nasal. La administración de una cantidad terapéutica de péptido se realizaría de forma preferida mediante su mezcla en “alum”
35 (sulfato de aluminio y potasio hidratado) o en solución salina, preferiblemente al 0,9%.

Adicionalmente, los péptidos antigénicos unidos a MHC de clase II según cualquiera de las realizaciones de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento, prevención, seguimiento y diagnóstico específico de enfermedades donde intervengan tanto S100-beta como DR4, por ejemplo, artritis reumatoide.

5 En un cuarto aspecto, la presente invención también se refiere al uso de un péptido antigénico aislado derivado de la proteína S100-beta tal como se ha definido anteriormente, pero sin estar unido a una MHC de clase II, para la fabricación de un medicamento para la prevención, tratamiento, diagnóstico o seguimiento de la diabetes tipo I, así como a dicho péptido antigénico aislado derivado de la proteína S100-beta
 10 para su uso en la prevención, tratamiento, diagnóstico o seguimiento de la diabetes tipo I. Dicha prevención o tratamiento de la diabetes tipo I comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido antigénico según la presente invención en sus diferentes realizaciones a un sujeto con necesidad del mismo. La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz se haría de forma preferida
 15 mediante vía intradérmica o subcutánea, pudiendo hacerse de manera alternativa mediante vía oral, parenteral o nasal. La administración de una cantidad terapéutica de péptido se realizaría de forma preferida mediante su mezcla en “alum” (sulfato de aluminio y potasio hidratado) o en solución salina al 0,9%, pudiendo hacerse en otra realización preferida con el péptido encapsulado en un vehículo, o bien unido a la
 20 superficie externa de un vehículo, donde dicho vehículo es seleccionado del grupo que comprende: un liposoma, una micela, una vesícula, una micropartícula, una microcápsula, una microesfera, una nanopartícula, una nanocápsula y una nanoesfera.

El diagnóstico o seguimiento de la diabetes tipo I empleando los péptidos de la invención por sí solos, sin estar unidos a una MHC, se lleva a cabo mediante la
 25 cuantificación de la cantidad de linfocitos CD4+ productores de distintas moléculas. En una realización preferida, el sistema de diagnóstico o seguimiento consiste en detectar la síntesis de interferón-gamma, interleucina-10, interleucina-17, o combinaciones de los mismos por parte de linfocitos CD4+ en respuesta a dichos péptidos antigénicos (Figura 4, Ejemplo 2), preferentemente mediante ELISPOT.

30 En una realización preferida de este cuarto aspecto, el péptido se localiza en la región 1 de la proteína S100-beta, y comprende cualquiera de las secuencias SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 3.

En otra realización preferida de este cuarto aspecto, el péptido se localiza en la región 2 de la proteína S100-beta y comprende cualquiera de las secuencias SEC ID
 35 NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, o SEC ID NO: 7.

En otra realización preferida de este cuarto aspecto, el péptido se localiza en la región 3 de la proteína S100-beta y comprende cualquiera de las secuencias SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10 o SEC ID NO: 11.

En otra realización preferida de este cuarto aspecto, el péptido es un péptido consenso para cada una de las regiones 1, 2 y 3, y es seleccionado del grupo que comprende:

a) péptido de secuencia SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15 o SEC ID NO: 16,

b) péptido que al menos muestra un 80%, preferiblemente un 85%, más preferiblemente un 90%, más preferiblemente un 95% y aún más preferiblemente un 98% de homología con los péptidos descritos en a).

Los términos “péptido consenso” y “homología” en este cuarto aspecto de la invención significan tal como se han definido anteriormente teniendo en cuenta que el péptido no está unido a la MHC.

Los presentes inventores han observado que los epítomos peptídicos consenso (no unidos a una molécula MHC de clase II) diseñados para cada una de las tres regiones, a partir de los péptidos identificados (ver Ejemplo 1, donde la identificación se hace mediante espectrometría de masas), poseen las mismas características de unión a la molécula MHC de clase II DR4 tal y como se muestra en los ensayos realizados, además de que en dichos ensayos se puede delimitar con exactitud cuál puede ser la secuencia de aminoácidos que sirve como “motivo de unión” (Ejemplo 3).

La validez de estos epítomos peptídicos (no unidos a una molécula MHC de clase II), tanto de las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 11 como de los epítomos peptídicos consenso, en el diagnóstico y seguimiento de la diabetes tipo I, se ha demostrado empleando estos últimos (SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 16) en muestras clínicas procedentes de pacientes con T1D. Mediante análisis ELISPOT (Figura 4), se analizó la frecuencia de linfocitos CD4+ productores de interferón-gamma (IFN- γ), interleucina-17 (IL-17) e interleucina-10 (IL-10) en respuesta a dichos péptidos en pacientes sanos y diabéticos (Ejemplo 2), demostrándose la capacidad de los péptidos para discriminar eficazmente entre ambos grupos y por tanto poniendo de relieve la capacidad de diagnóstico de los péptidos en la diabetes tipo I, tanto para diagnosticar la presencia o ausencia de la enfermedad, como para determinar la evolución de la misma en un sujeto. Además, los inventores han demostrado que las secuencias SEQ ID NO: 1-11 son también útiles en la prevención, tratamiento, diagnóstico o seguimiento de la diabetes tipo I, ya que en los ensayos de unión (Figuras 11, 13, 14 y

16), tanto los péptidos consenso como los de SEQ ID NO: 1-11 tienen similares patrones de unión a las moléculas MHC y por tanto tendrán similares capacidades antigénicas.

5 Los péptidos no unidos a una molécula MHC de clase II se pueden utilizar directamente o pueden ser encapsulados en un vehículo, o ser unidos a la superficie externa del mismo. Por tanto, en otra realización preferida, el péptido se encuentra o bien encapsulado en un vehículo, o bien unido a la superficie externa de un vehículo, donde dicho vehículo es seleccionado del grupo que comprende: un liposoma, una
10 micela, una vesícula, una micropartícula, una microcápsula, una microesfera, una nanopartícula, una nanocápsula y una nanoesfera, preferiblemente liposomas, que permiten mejorar la inmunogenicidad de los péptidos frente a la diabetes tipo I.

A continuación se muestran una serie de ejemplos que pretenden ilustrar la
15 presente invención pero que en ningún caso deben interpretarse como limitantes de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de los epítomos peptídicos derivados de
20 **S100-beta unidos a MHC de clase II**

Metodología

El sistema empleado para la identificación de epítomos peptídicos derivados de S100-beta se esquematiza en la Figura 5. Resumiendo, la proteína S100-beta humana
25 fue expresada en bacterias conteniendo una secuencia de biotinización en su extremo carboxilo-terminal, secuencia empleada para biotinar *in vitro* S100-beta empleando la enzima BirA o biotín ligasa (EC 6.3.4.15), y una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino-terminal para poder purificarla empleando resinas de níquel. Una vez purificada y biotinilada, S100-beta fue incubada con células Priess, una línea
30 linfoblastoide homocigota para la molécula MHC de clase II DR4, que habían sido preincubadas con los demás elementos del sistema de internalización (en primer lugar, una lectina obtenida a partir de *Phytolacca americana* (*pokeweed mitogen*, nombre en inglés) biotinilada y en segundo lugar, avidina). Una vez incubadas con S100-beta, las células fueron incubadas a 37°C para permitir la entrada de S100-beta, su
35 procesamiento y la presentación de epítomos en la superficie celular unidos a moléculas

MHC de clase II DR4. Como células control se usaron las mismas células Priess que habían sido incubadas con todos los elementos del sistema excluyendo S100-beta.

Una vez pasado el periodo de incubación, las células Priess incubadas con S100-beta o control sin S100-beta, fueron recogidas y se purificaron de forma específica mediante cromatografía de afinidad las moléculas MHC de clase II DR4, empleando columnas de Sepharosa conteniendo el anticuerpo monoclonal L243 conjugado. Los epítomos peptídicos unidos a estas moléculas MHC fueron eluidos mediante pH ácido, filtrados empleando filtros con un punto de corte de 10.000 daltons, secados para reducir su volumen y fraccionados mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) empleando una columna de fase reversa C-18 (Figura 6). Cada una de las fracciones obtenidas en el HPLC fue analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y los espectros de masas del repertorio peptídico obtenido a partir de las moléculas MHC DR4 purificadas de células Priess incubadas con S100-beta fue comparado con los espectros de masas del repertorio peptídico obtenido de células Priess control, no incubadas con S100-beta, para identificar valores m/z únicos correspondientes a péptidos derivados de S100-beta. Los valores m/z únicos fueron comparados con la secuencia lineal de S100-beta mediante el programa FindPept (<http://www.expasy.ch/tools/findpept.html>) para identificar la secuencia de aminoácidos correspondiente en la proteína.

20

Resultados

De este análisis, 9 valores m/z fueron identificados como únicos, que se corresponden con tres conjuntos solapantes de péptidos, conjuntos donde existe al menos un motivo de unión a la molécula DR4 (Figura 7). Una vez identificados estos epítomos peptídicos se sintetizaron 4 epítomos peptídicos consenso (Figura 8) que representasen a cada uno de los tres conjuntos de epítomos peptídicos solapantes y que pudiesen ser empleados en la identificación específica de linfocitos T CD4+ autoreactivos en pacientes diabéticos e individuos sanos.

30 **Ejemplo 2: capacidad de diagnóstico de los péptidos/complejos MHC-péptido en diabetes tipo I**

Metodología

El fundamento de la técnica de ELISPOT se describe esquemáticamente en la Figura 4. Para la identificación de linfocitos CD4+ en sangre periférica de pacientes

con T1D (28 pacientes) e individuos sanos (24 personas), se añadió durante 1 hora a 37°C a distintos pocillos de placas Maxisorp una solución de anticuerpo monoclonal específico para tres citocinas: interferón-gamma (IFN- γ), interleucina-17 (IL-17) e interleucina-10 (IL-10). Una vez lavadas, se añadió a las placas una solución de albúmina bovina para bloquear los lugares donde no hubiese anticuerpo y, después de 1 hora de incubación a 37°C y de haber retirado la solución de albúmina, se añadieron por triplicado linfocitos periféricos obtenidos de pacientes con T1D o sujetos sanos añadiendo los antígenos y controles correspondientes. Las células fueron incubadas 37°C durante 72 horas y, una vez pasado el periodo de incubación, las placas fueron lavadas e incubadas a 37°C durante 1 hora con un anticuerpo monoclonal específico correspondiente para cada una de las tres citocinas conjugado a biotina (anticuerpo de revelado). Lavado el exceso de anticuerpo de revelado, la presencia de IFN- γ , IL-17 o IL-10 fue revelada empleando un anticuerpo dirigido contra biotina (GABA) y conjugado a una enzima, que una vez añadido el correspondiente sustrato, lo transforma en una sustancia insoluble que se deposita sobre la placa en forma de mancha (“spot”).

Resultados

La frecuencia de linfocitos CD4+ productores de IFN- γ , IL-17 e IL-10 medida como Índice de Estimulación (número de “spots” en presencia de antígeno / número de “spots” en presencia de DMSO) en respuesta a los epítomos peptídicos consenso se muestran en las Tablas 1, 2 y 3, respectivamente. Un índice de estimulación superior a 3 se considera significativo y en las Tablas donde se indica un índice de estimulación >3 es debido a que existe una respuesta positiva pero en DMSO el número de “spots” es cero. Como se desprende de los resultados mostrados en dichas Tablas, los linfocitos CD4+ de pacientes con T1D responden con mayor frecuencia sintetizando IFN- γ (Tabla 1) e IL-17 (Tabla 2) contra alguno de los epítomos peptídicos consenso, los cuales discriminan de forma eficaz entre individuos sanos y pacientes diabéticos, poniendo de relieve su utilidad en el diagnóstico de la diabetes tipo I humana. Es de resaltar el hecho de que mientras algunos pacientes diabéticos responden contra alguno de los epítomos peptídicos consenso secretando IL-10 (Tabla 3), en especial contra el epítomo peptídico consenso S100 68-92 (SEQ ID NO: 15), todos los individuos sanos analizados responden contra dicho epítomo sintetizando grandes cantidades de esta citocina (Tabla 3 y Figura 9) cuyo papel inmunoregulatorio está ampliamente estudiado. Además, en la Tabla se incluyen toda una serie de antígenos que sirvan tanto como

controles positivos (forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)) para comprobar la viabilidad celular y como controles negativos (dimetilsulfóxido (DMSO) o un péptido correspondiente a una proteína de *Plasmodium falciparum* (Pf), éste último siempre que se hubiesen aislado células suficientes) para comprobar la especificidad de la
5 respuesta.

Ejemplo 3. Ensayos de unión a la molécula MHC de clase II DR4 de los epítomos peptídicos y delimitación del “motivo de unión”

10 Metodología

Los ensayos de unión han sido realizados por la empresa ProImmune Ltd (<http://www.proimmune.com>) empleando tecnología propiedad de la empresa. Los experimentos realizados consisten en mezclar un péptido con la molécula MHC de clase II DR4 purificada de forma que, en función de su afinidad, dicho péptido pueda
15 unirse a la molécula DR4 y esta unión péptido-DR4 se detecta mediante el empleo de un anticuerpo específico. La afinidad y la estabilidad de unión de cada péptido se midió como la cantidad de señal generada a las 0 horas después de mezclar los componentes y después de incubar las mezclas durante 24 horas a 37°C, midiéndose posteriormente la cantidad de péptido-DR4 remanente. Como controles para comparar
20 la compañía emplea dos epítomos peptídicos de afinidad conocida por la molécula MHC de clase II DR4, uno con alta afinidad y otro con afinidad media.

En un intento de acotar el posible “motivo de unión” a la molécula MHC de clase II DR4 de los péptidos consenso empleados en los experimentos de ELISPOT, se sintetizaron nuevos péptidos de 15 aminoácidos de longitud (15-mer) y desplazados
25 entre sí un solo aminoácido hasta cubrir la longitud del epítomo peptídico consenso correspondiente. Una vez sintetizados, la afinidad de unión por DR4 de cada uno de los péptidos de la librería fue determinada.

Resultados

30 La Región 1 incluye tres epítomos peptídicos identificados mediante espectrometría de masas (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3) y un epítomo peptídico consenso (SEQ ID NO: 12) (Figura 10). A partir de SEQ ID NO: 12 se sintetizaron seis péptidos de 15 aminoácidos de longitud y desplazados entre sí un solo aminoácido (15-mer #1, 15-mer #2, 15-mer #3, 15-mer #4, 15-mer #5 y 15-mer #6)
35 (Figura 10). Los ensayos de unión para cada uno de los epítomos peptídicos de esta

Región 1 se muestran en la Figura 11. Como puede verse en la Figura 11, los epítomos peptídicos de esta región poseen una afinidad de unión a la molécula MHC de clase II DR4 intermedia, similar al epítomo de afinidad intermedia empleado como control. Además, el epítomo peptídico consenso (SEQ ID NO: 12) posee una afinidad similar a los tres epítomos peptídicos identificados mediante espectrometría de masas (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3).

La Región 3 incluye cuatro epítomos peptídicos identificados mediante espectrometría de masas (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11) a partir de los cuales se sintetizaron dos epítomos peptídicos consenso (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14). A partir de SEQ ID NO: 13 se sintetizaron dos péptidos de 15 aminoácidos de longitud y desplazados entre sí un solo aminoácido (15-mer #1 y 15-mer #2) (Figura 12) mientras que a partir de SEQ ID NO: 14 se sintetizaron ocho péptidos de 15 aminoácidos de longitud y desplazados entre sí un solo aminoácido (15-mer #3, 15-mer #4, 15-mer #5, 15-mer #6, 15-mer #7, 15-mer #8, 15-mer #9, 15-mer #10) (Figura 12).

Los ensayos de unión del epítomo peptídico consenso SEQ ID NO: 13 muestran que éste no posee afinidad por la molécula de histocompatibilidad MHC de clase II DR4, circunstancia que ocurre con algunos epítomos implicados en autoinmunidad (Figura 13). De la misma manera, ninguno de los dos péptidos de 15 aminoácidos de longitud sintetizados a partir de SEQ ID NO:13 posee afinidad por dicha molécula DR4 (Figura 13). Los ensayos de unión del epítomo peptídico consenso SEQ ID NO: 14 muestran que, de la misma forma que SEQ ID NO: 13 derivado de la misma región de S100-beta, tampoco posee afinidad por la molécula de histocompatibilidad MHC de clase II DR4 (Figura 14). De la misma manera, ninguno de los ocho péptidos de 15 aminoácidos de longitud sintetizados a partir de SEQ ID NO:14 posee afinidad por dicha molécula DR4 (Figura 14).

La Región 2 incluye cuatro epítomos peptídicos identificados mediante espectrometría de masas (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7) y un epítomo peptídico consenso (SEQ ID NO: 15) (Figura 15). A partir de SEQ ID NO: 15 se sintetizaron once péptidos de 15 aminoácidos de longitud y desplazados entre sí un solo aminoácido (15-mer #1, 15-mer #2, 15-mer #3, 15-mer #4, 15-mer #5, 15-mer #6, 15-mer #7, 15-mer #8, 15-mer #9 15-mer #10 y 15-mer #11) (Figura 15). Los ensayos de unión para cada uno de los epítomos peptídicos de esta Región 2 se muestran en la Figura 16. Como puede verse en esta Figura, los epítomos peptídicos descritos para esta región son los que posee mayor afinidad de unión por la molécula

MHC de clase II DR4, característica que es replicada por el epítipo peptídico consenso (SEQ ID NO: 15) diseñado para esta región y empleado en los ensayos de ELISPOT para cuantificar linfocitos autoreactivos. De los ensayos de unión a la molécula MHC de clase II DR4 empleando la librería de once péptidos de 15 aminoácidos de longitud
5 sintetizados a partir de SEQ ID NO: 15 puede deducirse que el “motivo de unión” de SEQ ID NO: 15 a la molécula de clase II DR4 parece encontrarse en la secuencia de aminoácidos MAFVAMVTTACHEFFEH (SEQ ID NO: 16) ya que los péptidos de 15 aminoácidos de longitud que poseen esta secuencia en su totalidad o en parte (15-mer #8, 15-mer #9, 15-mer #10) son los que poseen mayor afinidad y estabilidad de unión
10 a la molécula de clase II DR4.

Tabla 1. Frecuencia de linfocitos CD4+ productores de IFN- γ frente a epítomos peptídicos derivados de S100-beta

Sujeto	DMSO*	PMA**	S100 6-25 (SEQ ID NO: 12)	S100 21-36 (SEQ ID NO: 13)	S100 25-46 (SEQ ID NO: 14)	S100 68-92 (SEQ ID NO: 15)
Individuos sanos						
C14	3	>10	17,67			18,33
C15	147	>10				
C16	7	>10	3,64			
C17	300	>10				
C18	26	>10				
C19	220	>10				
C20	96	>10				
C21	11	>10				
C22	102	>10				
C23	145	>10				
C24	81	>10				
Respuestas positivas (%)		100	18,2	0	0	9,1
Pacientes diabéticos tipo 1						
D17	2	>10				8,50
D18	3	>10				
D19	2	>10	4,50			5,00
D20	1	>10				11,00
D21	2	>10				
D22	2	>10				
D23		>10				
D24		>10				
D25	0	>10			>3	
D26	0	>10	>3		>3	
D27	0	>10	>3			>3
D28	0	>10	>3		>3	
Respuestas positivas (%)		100	44,44	0,00	30,00	44,44

5 *En DMSO los resultados se indican como número de *spots* por cada millón de células
 **Los resultados para PMA y los epítomos peptídicos se indican como Índice de Estimulación (número de spots muestra / número de spots DMSO). Un índice de estimulación superior a 3 se considera positivo.

10 Un índice de estimulación >3 indica que hay una respuesta positiva pero el número de spots en DMSO es cero.

Tabla 2. Frecuencia de linfocitos CD4+ productores de IL-17 frente a epítopos peptídicos derivados de S100-beta

Sujeto	DMSO*	Pf*	PMA**	S100 6-25 (SEQ ID NO: 12)	S100 21-36 (SEQ ID NO: 13)	S100 25-46 (SEQ ID NO: 14)	S100 68-92 (SEQ ID NO: 15)
Individuos sanos							
C1	0		>10				
C2	2		>10				
C3	0	0	>10				
C4	0		>10				
C5	1	1	>10				
C6	0	0	>10				
C7	2	4	>10				
C8	2	2	>10				
C9	1	0	>10				
C10	0	1	>10				
C11	1	0	>10				
C12	0	0	>10				
C13	0	0	>10				
Respuestas positivas (%)			100	0	0	0	0
Pacientes diabéticos tipo 1							
D1	0		>10		>3	>3	>3
D2	0		>10	>3	>3	>3	>3
D3	1	0	>10				3,1
D4	2		>10				
D5	4		>10				
D6	1		>10				
D7	6		>10				
D8	0	1	>10	>3			
D9	0	0	>10		>3	>3	>3
D10	0	0	>10		>3		
D11	0	8	>10				
D12	1	4	>10				
D13	0		>10				
D14	1	0	>10				
D15	0	0	>10				
Respuestas positivas (%)			100	13,3	26,7	20	26,7

*En DMSO los resultados se indican como número de *spots* por cada millón de células

5 **Los resultados para PMA y los epítopos peptídicos se indican como Índice de Estimulación (número de spots muestra / número de spots DMSO). Un índice de estimulación superior a 3 se considera positivo. Un índice de estimulación >3 indica que hay una respuesta positiva pero el número de spots en DMSO es cero.

Tabla 3. Frecuencia de linfocitos CD4+ productores de IL-10 frente a epítomos peptídicos derivados de S100-beta

Sujeto	DMSO*	PMA**	S100 6-25 (SEQ ID NO: 12)	S100 21-36 (SEQ ID NO: 13)	S100 25-46 (SEQ ID NO: 14)	S100 68-92 (SEQ ID NO: 15)
Individuos sanos						
C14	8	>10				>10
C15	18	>10				>10
C16						>10
C17	7,5	>10	>10			>10
C18	6	>10				>10
C19	8	>10	8,1			>10
C20	4	>10	>10			>10
C21	8	>10	4,4			>10
C22	9	>10				>10
C23	16	>10				>10
C24	1	>10				>10
Respuestas positivas (%)		100	40	0	0	100
Pacientes diabéticos tipo 1						
D17	2	>10				
D18		>10				
D19	7	>10				6,9
D20	3	>10				
D21	5	>10				6,6
D22	2	>10				9
D23	0	>10	>3			
D24	0	>10		>3	>3	
D25		>10				
D26	2	>10			4	
D27	1	>10				
D28	2	>10				>10
Respuestas positivas (%)		100	11	11	22	50

*En DMSO los resultados se indican como número de *spots* por cada millón de células

5 **Los resultados para PMA y los epítomos peptídicos se indican como Índice de Estimulación (número de spots muestra / número de spots DMSO). Un índice de estimulación superior a 3 se considera positivo.

Un índice de estimulación >3 indica que hay una respuesta positiva pero el número de spots en DMSO es cero.

10

REIVINDICACIONES

- 5
1. Tetrámero que comprende una molécula MHC de clase II y un péptido antigénico aislado derivado de la proteína S100-beta.

 2. Tetrámero según la reivindicación 1, en el que el péptido se localiza en la región 1 de la proteína S100-beta y en el que dicho péptido comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

10

 3. Tetrámero según la reivindicación 1, en el que el péptido se localiza en la región 2 de la proteína S100-beta y en el que dicho péptido comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7.

15

 4. Tetrámero según la reivindicación 1, en el que el péptido se localiza en la región 3 de la proteína S100-beta y en el que dicho péptido comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

20

 5. Tetrámero según la reivindicación 1, en el que el péptido es un péptido consenso para cada una de las regiones 1, 2 y 3, seleccionado del grupo que comprende:
 - a) péptido de secuencia SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16,
 - b) péptido que al menos muestra un 80% de homología con los péptidos descritos en a).

25

 6. Tetrámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la molécula MHC de clase II es DR4.

30

 7. Tetrámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el péptido además se encuentra unido a una o más citocinas, una o más toxinas, una o más nanopartículas magnéticas y/o uno o más compuestos fluorescentes.

35

8. Procedimiento para la obtención del tetrámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende:
- 5 a) purificación de la molécula de histocompatibilidad de clase II,
b) elución de los péptidos unidos a la molécula de histocompatibilidad de clase II; e
c) identificación de los péptidos eluidos en la etapa b).
9. Procedimiento para la obtención del tetrámero según la reivindicación 8, en el
10 que en la etapa c) la identificación de los péptidos se lleva a cabo mediante HPLC y espectrometría de masas.
10. Uso del tetrámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para
15 identificar y cuantificar linfocitos CD4+ específicos para epítopos peptídicos de S100-beta.
11. Uso del tetrámero según la reivindicación 10, en el que dicha identificación y cuantificación se lleva a cabo mediante tomografía axial o citometría de flujo.
- 20 12. Uso del tetrámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para la prevención, tratamiento, diagnóstico y/o seguimiento de la diabetes tipo I.

Figura 1

```

    FSWSTKAFKYCYVRR
    TFSWSTKAFKYCYVR
    YTFSSWSTKAFKYCYV
    TFSWSTKAFKYCYVRRVAT
    YTFSSWSTKAFKYCYVRRVATAGVL
    TFSWSTKAFKYCYVRRVATAGVLC
    SWSWSTKAFKYCYVRRVATAGVLCKM
    
```

5 Figura 2

```

    MCGKTINYGAHPNVVDCFSLHRHY
    MCGKTINYGAHPNVV
    KTINYGAHPNVVDCF
    NYGAHPNVVDCFSLH
    AHPNVVDCFSLHRHY
    
```

Figura 3

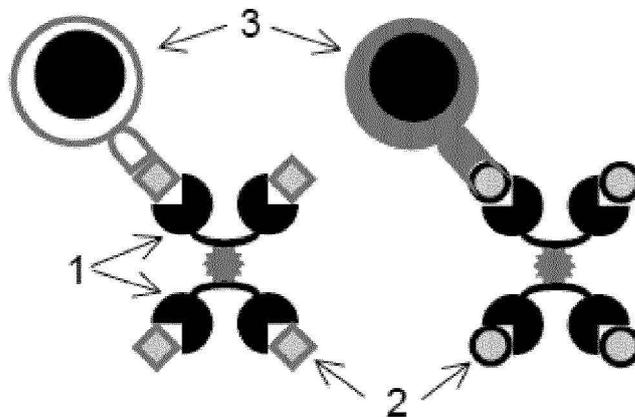


Figura 4

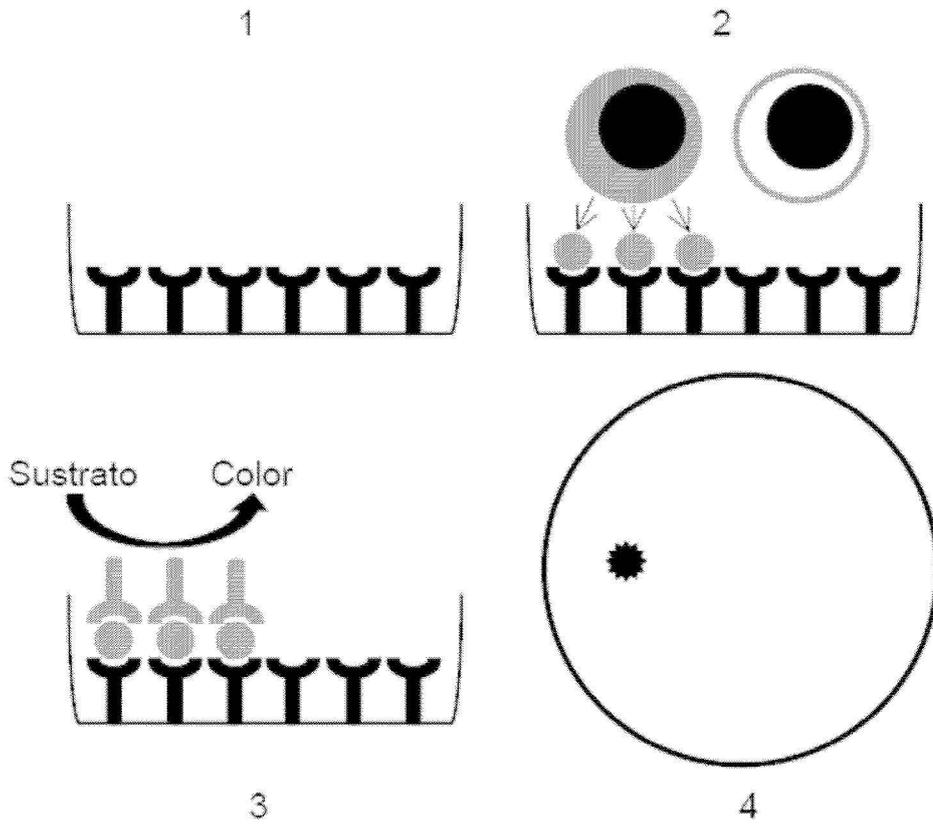


Figura 5

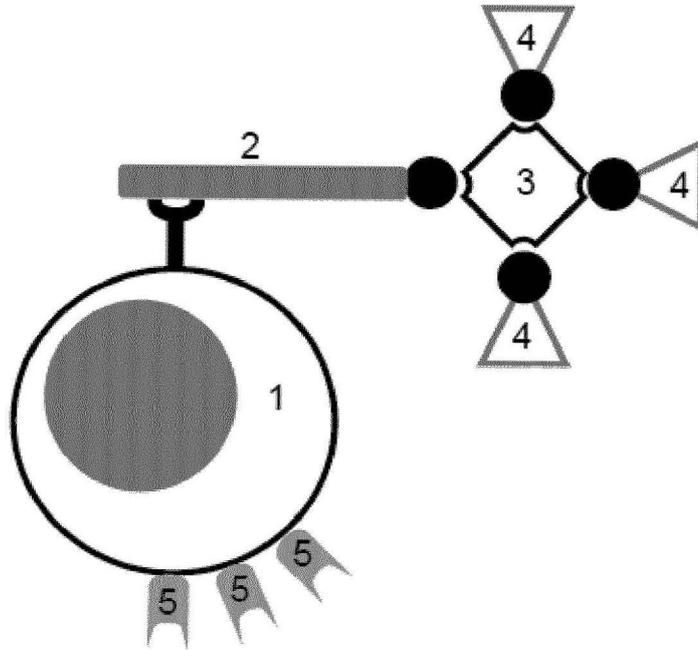


Figura 6

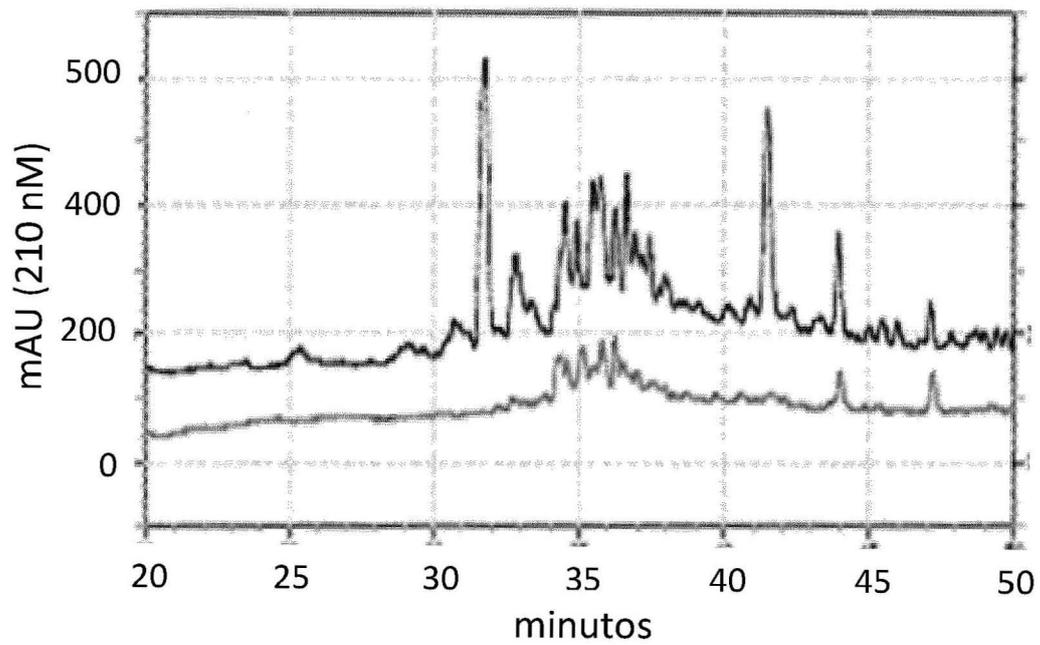


Figura 7

A KAMVALIDVFHQYSGREGD
AMVALIDVFHQYSGREGDK
SELEKAMVALIDVFHQYSG

B TLDNDGDGECDFQEFMAFVAMVTTACH
FQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE
EFMAFVAMVTTAC
FQEFMAFVAMVT

C REGDKHKLKKS
HKLKSELKEL
KHKLKSELKELINNELSHFLE
SGREGDKHKLKSELKELINN

Figura 8

KAMVALIDVFHQYSGREGDK
REGDKHKLKKSELKEL
KHKLKKSELKELINNELSHFLE
ECDFQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE

Figura 9

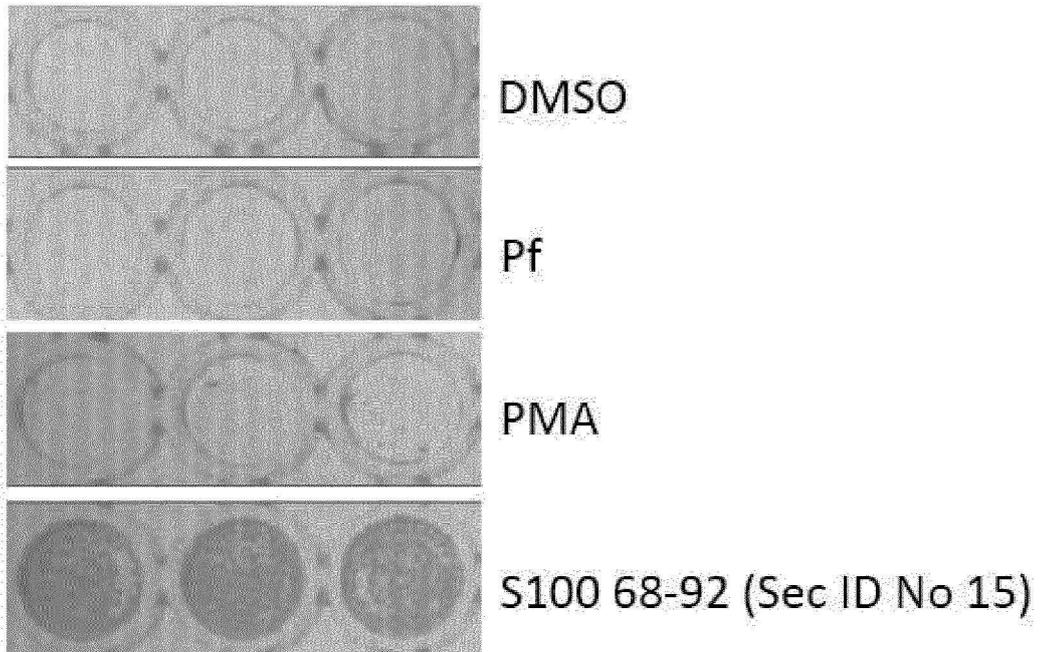


Figura 10

Sec ID No. 12	KAMVALIDVFHQYSGREGDK
15-mer #1	KAMVALIDVFHQYSG
15-mer #2	AMVALIDVFHQYSGR
15-mer #3	MVALIDVFHQYSGRE
15-mer #4	VALIDVFHQYSGREG
15-mer #5	ALIDVFGQYSGREGD
15-mer #6	LIDVFGQYSGREGDK
Sec ID No. 1	KAMVALIDVFHQYSGREGD
Sec ID No. 2	AMVALIDVFHQYSGREGDK
Sec ID No. 3	SELEKAMVALIDVFHQYSG

Figura 11

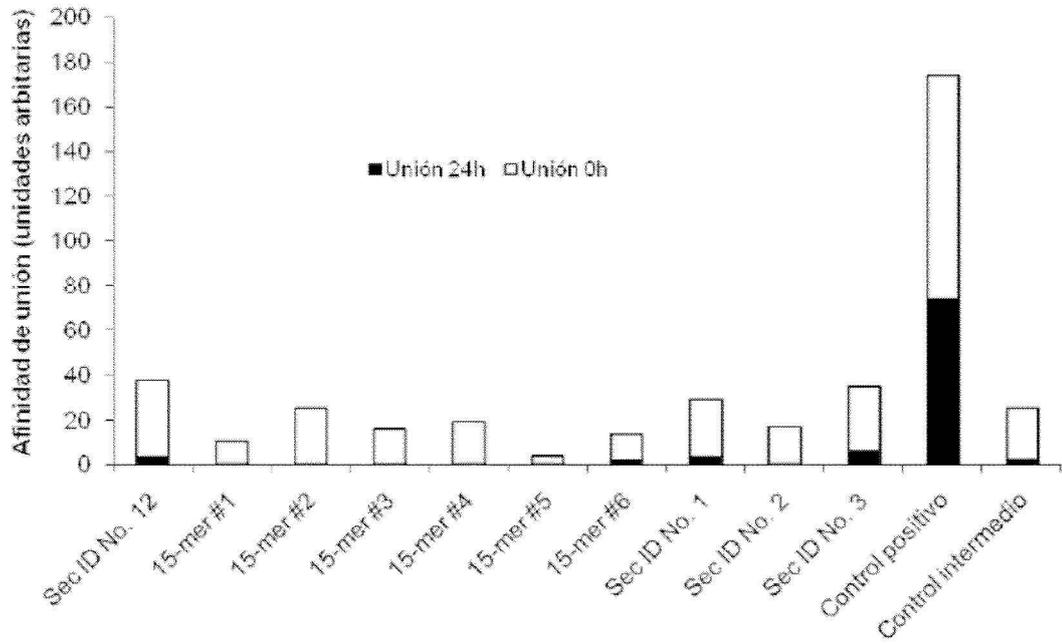


Figura 12

Sec ID No. 13	REGDKHKLKKSELKEL
15-mer #1	REGDKHKLKKSELKE
15-mer #2	EGDKHKLKKSELKEL
Sec ID No. 8	REGDKHKLKKS
Sec ID No. 9	HKLKKSELKEL
Sec ID No. 10	KHKLKKSELKELINNELSHFLE
Sec ID No. 11	SGREGDKHKLKKSELKELINN
Sec ID No. 14	KHKLKKSELKELINNELSHFLE
15-mer #3	KHKLKKSELKELINN
15-mer #4	HKLKKSELKELINNE
15-mer #5	KLKKSELKELINNEL
15-mer #6	LKKSELKELINNELS
15-mer #7	KKSELKELINNELSH
15-mer #8	KSELKELINNELSHF
15-mer #9	SELKELINNELSHFL
15-mer #10	ELKELINNELSHFLE
Sec ID No. 8	REGDKHKLKKS
Sec ID No. 9	HKLKKSELKEL
Sec ID No. 10	KHKLKKSELKELINNELSHFLE
Sec ID No. 11	SGREGDKHKLKKSELKELINN

Figura 13

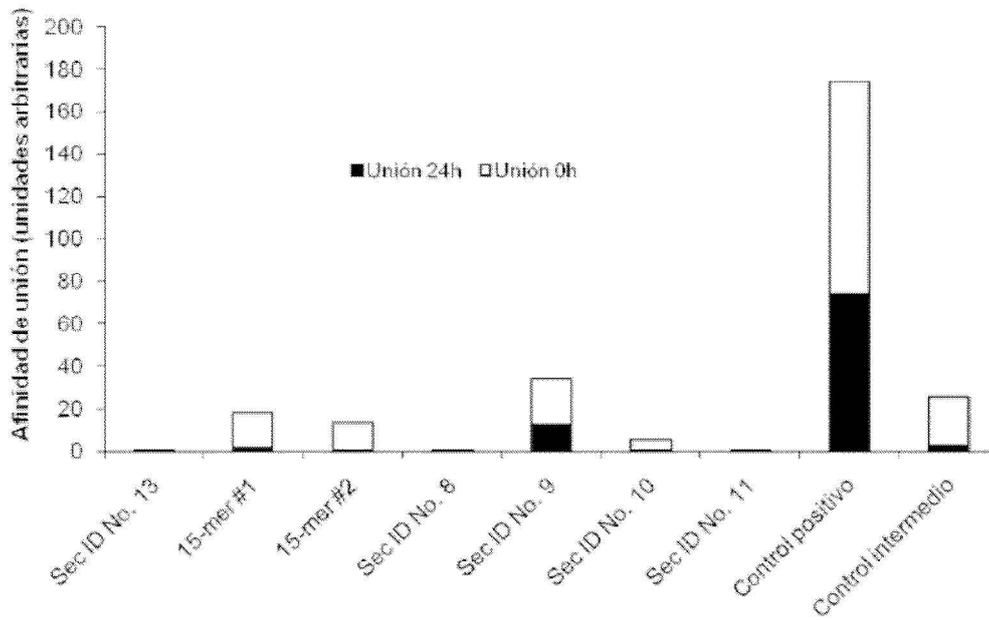


Figura 14

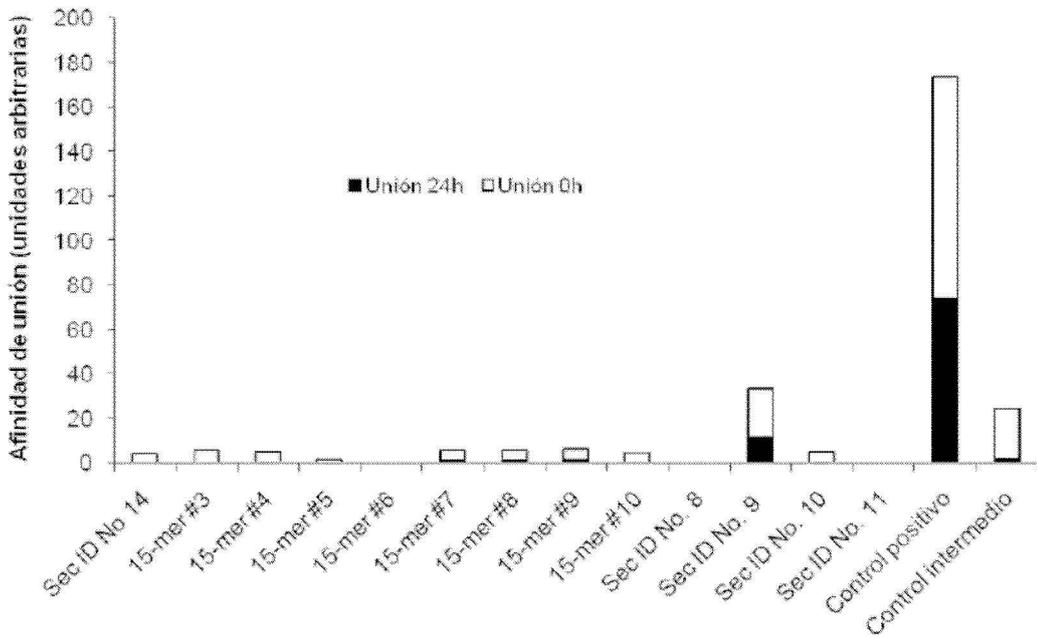


Figura 15

Sec ID No. 15	ECDFQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE
15-mer #1	ECDFQEFMAFVAMVT
15-mer #2	CDFQEFMAFVAMVTT
15-mer #3	DFQEFMAFVAMVTTA
15-mer #4	FQEFMAFVAMVTTAC
15-mer #5	QEFMAFVAMVTTACH
15-mer #6	EFMAFVAMVTTACHE
15-mer #7	FMAFVAMVTTACHEF
15-mer #8	MAFVAMVTTACHEFF
15-mer #9	AFVAMVTTACHEFFE
15-mer #10	FVAMVTTACHEFFEH
15-mer #11	VAMVTTACHEFFEHE
Sec ID No. 4	TLDNDGDGECDFQEFMAFVAMVTTACH
Sec ID No. 5	FQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE
Sec ID No. 6	EFMAFVAMVTTAC
Sec ID No. 7	FQEFMAFVAMVT

Figura 16

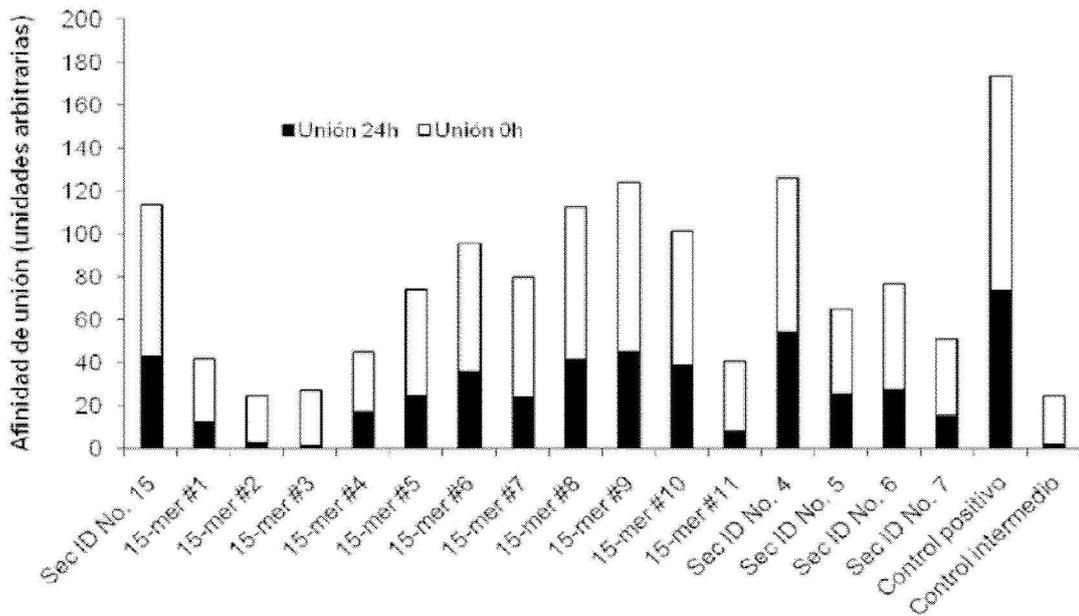


Figura 17

Nº secuencia	Secuencia	Longitud	Homología con 1 aminoácido de diferencia (%)*	Homología con 2 aminoácidos de diferencia (%)*	Homología con 3 aminoácidos de diferencia (%)*
SEQ ID No 12	KAMVALIDVFHQYSGREGDK	20	$19/20 * 100 = 95$	$18/20 * 100 = 90$	$17/20 * 100 = 85$
SEQ ID No 13	REGDKHKLKKSELKEL	16	$15/16 * 100 = 93,75$	$14/16 * 100 = 87,5$	$13/16 * 100 = 81,25$
SEQ ID No 14	KHKLKKSELKELINNELSHFLE	22	$21/22 * 100 = 95,45$	$20/22 * 100 = 90,9$	$19/22 * 100 = 86,36$
SEQ ID No 15	ECDLQERMAFVAMVTTACHEFFEHE	25	$24/25 * 100 = 96$	$23/25 * 100 = 92$	$22/25 * 100 = 88$

Figura 18

Nº secuencia (invención)	Secuencia (invención)	Longitud	Nº secuencia de WO 98101471 con la que se compara	Secuencia (WO 98101471)	Longitud	Nº aminoácidos idénticos	Homología (%)
SEQ ID No 12	KAMVALIDVTHQYSGREGDK	20	SEQ ID No 2	SELEKAMVALIDVTHQYSGREGDKHKLKSE LKEINN	38	20	20/38*100=52,6
SEQ ID No 13	REGDKHKLKSELKEL	16	SEQ ID No 4	AMVALIDVTHQYSGREGDKHKLKSELKELIN N	33	19	19/33*100=57,5
SEQ ID No 14	KHKLKKSELKELINNELSHFLE	22	SEQ ID No 2	SELEKAMVALIDVTHQYSGREGDKHKLKSE LKEINN	38	16	16/38*100=42,1
SEQ ID No 15	ECDFOERMAFVAMVTTACHEF FEHE	25	SEQ ID No 4	AMVALIDVTHQYSGREGDKHKLKSELKELIN N	33	16	16/33*100=48,48
			SEQ ID No 2	SELEKAMVALIDVTHQYSGREGDKHKLKSE LKEINN	38	15	15/38*100=39,47
			SEQ ID No 4	AMVALIDVTHQYSGREGDKHKLKSELKELIN N	33	15	15/33*100=45,45
			SEQ ID No 3	TACHEFFEHE	10	10	10/25*100=40



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131016

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.06.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9801471 A1 (AB SANGTEC MEDICAL [SE/SE]) 15.01.1998, página 3, línea 11 – página 5, línea 6; reivindicaciones 1-6; SEQ ID NO: 2-6.	1-12
A	TSUI H. et al. Targeting of pancreatic glia in type 1 diabetes. Diabetes. 2008, Vol. 57(4), páginas: 918-928, todo el documento.	1-12
A	US 2003054414 A1 (JACKOWSKI et al.) 20.03.2003, todo el documento.	1-12
A	WINER S. et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. Nature Medicine. 2003, Vol. 9(2), páginas: 198-205, todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
19.07.2012

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/543 (2006.01)

G01N33/564 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR, EBI.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.07.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 9801471 A1	15.01.0098
D02	TSUI H. et al. Diabetes. 2008, Vol. 57(4), páginas: 918-928.	2008
D03	US 2003054414 A1	20.03.2003
D04	WINER S. et al. Nature Medicine. 2003, Vol. 9(2), páginas: 198-205.	2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga un tetrámero que comprende una molécula MHC de clase II, preferentemente DR4, y un péptido antigénico derivado de la proteína S100-beta (reivindicaciones 1-7). Se refiere también a un procedimiento para la obtención de dicho tetrámero (reivindicaciones 8-9) y a su uso para identificar y cuantificar linfocitos CD4+ específicos para epítomos peptídicos de S100-beta, así como para elaborar un medicamento para diagnóstico, prevención y tratamiento de la diabetes tipo I.

El documento D01 divulga unos epítomos de utilidad para generar anticuerpos que permitan detectar la presencia de la proteína S100-beta en muestras de pacientes con melanoma (ver página 3, línea 11 - página 5, línea 6; reivindicaciones 1-6; SEQ ID NO: 2-6).

El documento D02 divulga el desarrollo de epítomos de GFAP, remarcando la importancia de la identificación de los epítomos en el desarrollo de tetrámeros; así como su utilidad para tratamiento de la diabetes tipo 1 (ver todo el documento).

El documento D03 divulga el uso de las proteínas GFAP para el diagnóstico y el tratamiento de diabetes tipo 1; por otra parte, en la reivindicación 5 incluye una referencia a que el marcador de diagnóstico puede ser también S100 (ver todo el documento).

El documento D04 divulga un estudio sobre el efecto del tratamiento de inmunoterapia con GFAP o S100 beta en el desarrollo de la diabetes tipo 1, que muestra un retraso y una reducción significativa del desarrollo de la enfermedad (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

La presente invención divulga un tetrámero que comprende una molécula MHC de clase II, preferentemente DR4, y un péptido antigénico derivado de la proteína S100-beta y a su uso para identificar y cuantificar linfocitos CD4+ específicos para epítomos peptídicos de S100-beta, así como para elaborar un medicamento para diagnóstico, prevención y tratamiento de la diabetes tipo I.

1.1. REIVINDICACIONES 1-12

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa un péptido antigénico derivado de la proteína S100-beta; por otra parte, los epítomos descritos en este documento, correspondientes a las SEQ. ID NO: 2-6, presentan una gran homología con los epítomos de la presente invención.

La diferencia entre el documento D01 y la presente invención radica en la unión de los péptidos derivados de S100-beta a moléculas MHC de clase II, que forma el tetrámero de la invención, y que no se ha encontrado en el estado de la técnica, ni tampoco el uso de estas moléculas para diagnóstico y el tratamiento de diabetes tipo 1. La formación de tetrámeros con otras proteínas relacionadas con S100-beta, como son las GFAP es anticipado en el documento D02, así como su uso para el diagnóstico y el tratamiento de diabetes tipo 1.

Aunque a la vista de los documentos D01 y D02, la formación de tetrámeros de S100-beta y MHC-II podría resultar evidente de acuerdo a la información disponible para el experto en la materia, sin embargo, al tratarse de un uso específico de otra proteína para diagnóstico y tratamiento de la diabetes tipo 1, se considera que la presente invención proporciona unas composiciones para diagnóstico, prevención y tratamiento de esta enfermedad distintas a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-12 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D03 - D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.