



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 211 963**

⑤① Int. Cl.7: **A61K 9/127**, A61K 38/00
A61K 45/00, A61K 47/00
A61K 47/44, A01N 37/18
A61K 9/00, A61K 38/17
A61K 39/00

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **96924371 .6**

⑧⑥ Fecha de presentación: **02.07.1996**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0837672**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **29.04.1998**

⑤④ Título: **Preparaciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades mediadas por células T.**

③⑩ Prioridad: **05.07.1995 IL 11445895**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2004

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2004

⑦③ Titular/es:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co. Ltd.
P.O. Box 95
Rehovot 76100, IL

⑦② Inventor/es: **Cohen, Irun, R.;**
Elias, Dana y
Shinitzky, Meir

⑦④ Agente: **Isern Jara, Jaime**

ES 2 211 963 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparaciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades mediadas por células T.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un tratamiento con vacunas para enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T y, en particular, a preparaciones terapéuticas que comprenden antígenos reconocidos por células T implicados en la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T, y como vehículo biológicamente activo una emulsión lipídica metabolizable.

Antecedentes de la invención

Los trastornos autoinmunitarios, por ejemplo, la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID o diabetes tipo I), la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la tiroiditis, se caracterizan por una reactividad del sistema inmunológico frente a un antígeno endógeno, con el consiguiente daño tisular. Estas respuestas inmunitarias frente a antígenos propios están mantenidas por la activación persistente de los linfocitos T autorreactivos.

Las células T de tipo CD4 “colaborador” se han dividido en dos grupos en función de las citocinas características que secretan cuando están activados (Moermann y Coffman, 1989). Las células TH1 secretan IL-2, que induce la proliferación de células T, y citocinas tales como IFN- γ , que media la inflamación tisular. Por el contrario, las células TH2 secretan IL-4 e IL-10. La IL-4 ayuda a las células T a secretar anticuerpos de ciertos isotipos de IgG y suprime la producción de citocinas inflamatorias TH1 (Banchereau y col., 1994). La IL-10 inhibe indirectamente la activación de TH1 afectando la presentación del antígeno y la producción de citocinas inflamatorias por los macrófagos (Moore y col., 1993). Son las células TH1 las que contribuyen a la patogenia de enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano. Las respuestas de tipo TH1 también parecen estar implicadas en otras enfermedades o trastornos mediados por células T, tales como dermatitis de contacto (Romagnani, 1994).

Los péptidos adecuados para el tratamiento inmunológicamente específico de una enfermedad autoinmunitaria son péptidos que son reconocidos por las células T implicadas en la patogenia de la enfermedad autoinmunitaria. Cada enfermedad autoinmunitaria tendrá su péptido ideal para usar en el tratamiento. Una enfermedad como la esclerosis múltiple que implica a células T reactivas frente a antígenos propios tales como proteína básica de mielina (PBM) (Allegrato y col., 1990) requerirá para su tratamiento un péptido de proteína básica de mielina, como, por ejemplo, los descritos por Ota y col., 1990.

Los presentes inventores han mostrado que las enfermedades autoinmunitarias tales como la diabetes mellitus tipo I pueden tratarse administrando un péptido adecuado en un vehículo oleoso. Los ratones NOD desarrollan de forma espontánea diabetes tipo I causada por células T autoinmunitarias que atacan las células β de los islotes productoras de insulina. El ataque autoinmunitario se asocia con reactividad de las células T frente a una variedad de antígenos propios, incluyendo un péptido de la proteína del shock térmico de 60 kDa (hsp 60) y los péptidos de la ácido glutámico descarboxilasa (GAD). Por tanto, por ejemplo, la diabetes espontánea que se desarrolla en la cepa de ratones NOD/It podría tratarse con un péptido denominado p277, correspondiente a las posiciones 437-460 de la secuencia de la hsp 60 humana (PCT, publicación de patente n° WO90/10449; D. Elias y I.R. Cohen, Peptide therapy for diabetes in NOD mice, The Lancet 343: 704-06, 1994); con variantes del péptido p277 en el que uno o ambos residuos de cisteína en las posiciones 6 y/o 11 se han sustituido por valina y/o el residuo de Thr es la posición 16 está sustituido por Lys (véase la publicación PCT WO96/19236) y con los péptidos denominados p12 y p32 correspondientes a las posiciones 166-185 y 466-485, respectivamente, de la secuencia de la hsp60 humana. Véase la solicitud de patente israelí n° 114.407 del mismo solicitante de la presente solicitud, presentada el 30 de junio de 1995. Véase también la solicitud de patente internacional WO 97/01959 presentada el 1 de julio de 1996, que reivindica prioridad frente a dicha solicitud israelí n° 114.407.

Los presentes inventores han encontrado que la terapia peptídica para el tratamiento de la DMID usando p12, p32, p277 o variantes de los mismos era eficaz cuando el péptido se administró a los ratones por vía subcutánea (s.c.) en un vehículo oleoso tal como una emulsión de aceite mineral conocido como adyuvante incompleto de Freund (AIF). Sin embargo, no está permitido el uso en seres humanos del AFI así como del adyuvante completo de Freund (ACF: una preparación de aceite mineral que contiene cantidades variables de microorganismos muertos de Mycobacterium) porque el aceite mineral no es metabolizable y no puede degradarse en el organismo. Por tanto, sería deseable descubrir un vehículo eficaz para la terapia peptídica que fuera metabolizable.

Durante muchos años se han usado varias emulsiones grasas para la nutrición intravenosa de pacientes humanos. Dos de las emulsiones grasas comercializadas, conocidas como intralipid (“Intralipid” es una marca registrada de Kabi Pharmacia, Suecia, para una emulsión grasa para nutrición intravenosa, descrita en la patente de EE.UU. n° 3.169.094) y Lipofundin (una marca registrada de B. Braun Melsungen, Alemania), contienen aceite de soja como grasa (100 ó 200 g en 1.000 ml de agua destilada: 10% o 20%, respectivamente). En Intralipid se usan fosfolípidos de yema de huevo como emulsionantes (12 g/l de agua destilada) y en Lipofundin lecitina de yema de huevo (12 g/l de agua destilada). La isotonicidad resulta de la adición de glicerol (25 g/l) tanto en Intralipid como en Lipofundin. Estas emulsiones grasas son bastante estables y se han usado para nutrición intravenosa de pacientes con trastornos

gastrointestinales o neurológicos, que les impide recibir nutrición oral y, por tanto, reciben las calorías necesarias para mantener la vida. Las dosis diarias normales son de hasta 1 litro diariamente.

Las patentes de EE.UU. n° 4.073.943 expedida el 14 de febrero de 1978 a Wredind y col. y Re. 32.393 expedida el 29 de mayo de 1990 como patente reexpedida de la patente de EE.UU. n° 4.168.308 expedida el 18 de septiembre de 1979 a Wredind y col., describen un sistema de vehículos para usar en la inducción de la administración parenteral, particularmente intravenosa, de un agente liposoluble farmacológicamente activo que comprende una emulsión estable de aceite en agua que contiene un lipoide farmacológicamente inerte como fase hidrófoba dispersa en una fase hidrófila, estando dicho lípido disperso en la emulsión en forma de partículas finamente divididas de un tamaño medio de partícula inferior a 1 micrómetro, para conseguir en inicio rápido de un efecto terapéutico aceptable, siendo dicho sistema de vehículos usado con una dosis eficaz de dicho agente liposoluble farmacológicamente activo disuelto de forma predominante en dicho lipoide a una relación de la fracción en la fase hidrófoba, atribuyéndose dicho efecto terapéutico a dicha dosis eficaz del agente activo. El sistema de vehículos se dice que es adecuado para la administración de un agente activo farmacológicamente activo liposoluble, hidrosoluble o insoluble en agua, que está disuelto de forma predominante en la fase lipoide. Ejemplos de tales agentes farmacológicamente activos son depresivos, anestésicos, analgésicos, estimulantes, espermolíticos, relajantes musculares, vasodepresivos y agentes diagnósticos, por ejemplo contraste para rayos X. Se dice que el sistema de vehículos aumenta el efecto diagnóstico o terapéutico del agente con un inicio rápido acompañado de una incidencia reducida de daño a los tejidos del organismo.

El documento US-A-5.254.339 describe, para mejorar la inmunidad, el uso de antígenos solubilizados externos formulados como complejos específicos con concentraciones micelares críticas y glucósidos.

El documento US-A-4.474.773 describe una fracción lipídica activa de fuentes naturales, que se usa para el tratamiento, por ejemplo de disfunción causada por el propio sistema inmunológico y los síntomas del síndrome de abstinencia. Ninguno de los documentos US-A-5.254.339 o US-A-4.474.773 describe la emulsión. El documento US-A-4.395.394 describe un adyuvante de vacunas que comprende antígenos externos incluyendo microorganismos patogénicos, virus y alérgenos en combinación con un componente amino lipídico nuevo. Ninguna de las patentes de EE.UU. anteriores sugiere el uso de una emulsión como un vehículo para un antígeno en el tratamiento de las enfermedades mediadas por células T.

Se ha propuesto al Intralipid como vehículo no irritante para varios adyuvantes para usar en vacunas tales como, por ejemplo, 6-O-(2-tetradecilhexadecanoil) y 6-O-(3-hidroxi-2-docosilhexacosanoil)-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (Tsujimoto y col., 1986 y 1989), avridina (Woodard y Jasman, 1985), N,N-dioctadecil-N',N'-bis (2-hidroxiethyl)propanodiamina (CP-20.961) (solicitud de patente alemana n° DE 2945788; Anderson y Reynolds, 1979; Niblack y col., 1979). Kristiansen y Sparman, 1983, han descrito que la inmunogenicidad de la hemaglutinina y la neuraminidasa en ratones está marcadamente aumentada tras la adsorción en las partículas lipídicas que constituyen el Intralipid.

Ninguna de las publicaciones anteriores describe el uso de Intralipid como un vehículo para péptidos en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias ni tampoco ha habido ninguna descripción de que Intralipid podría mediar un cambio en la respuesta inmunitaria de una respuesta de tipo TH1 a una repuesta tipo TH2.

Resumen de la invención

Ahora se ha encontrado que, de acuerdo con la presente invención, las emulsiones lipídicas metabolizables tales como Intralipid y Lipofundin pueden actuar como vehículos para el tratamiento peptídico de enfermedades o trastornos autoinmunitarios mediados por células T. Además se ha encontrado que esta actividad está asociada con un cambio de citocinas de TH1 a TH2.

Por tanto, la presente invención trata de una preparación terapéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno autoinmunitario mediado por células T, que comprende un péptido u otro antígeno y un vehículo lipídico biológicamente activo, en la que el péptido u otro antígeno es reconocido por las células T inflamatorias asociadas con la patogenia de dicha enfermedad o trastorno y en la que el vehículo lipídico biológicamente activo es una emulsión grasa que comprende 10%-20% de triglicéridos de origen vegetal y/o animal, 1,2%-2,4% de fosfolípidos de origen vegetal y/o animal, 2,25%-4,5% osmorregulador, 0%-0,05% de antioxidantes y agua estéril hasta el 100%.

Los triglicéridos y fosfolípidos de origen vegetal o animal pueden derivar de cualquier aceite vegetal adecuado, tal como aceite de soja, aceite de semilla de algodón, aceite de coco o aceite de oliva, o de yema de huevo o de suero bovino. Preferiblemente, los triglicéridos derivan de aceite de soja y los fosfolípidos derivan de aceite de soja o de yema de huevo. Preferiblemente, la proporción en peso de triglicéridos/fosfolípidos es de aproximadamente 8:1.

A la emulsión grasa puede añadirse cualquier osmorregulador adecuado, preferiblemente glicerol, xilitol o sorbitol. La emulsión grasa puede comprender opcionalmente un antioxidante, por ejemplo tocoferol al 0,05%.

En una forma de realización de la invención, la emulsión grasa como se ha definido antes se procesa mediante centrifugación, por ejemplo a 10.000 g o más, formando por tanto una pequeña capa rica en triglicéridos (aproximadamente 90% de triglicéridos) en la parte superior de una dispersión acuosa enriquecida con fosfolípidos que contiene

ES 2 211 963 T3

aproximadamente 1:1 de triglicéridos: fosfolípidos, y esta última dispersión acuosa se usa como vehículo lipídico en las preparaciones de la invención.

En una forma de realización preferida de la invención, la preparación es para el tratamiento de la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y comprende un péptido derivado de la proteína 60 del shock térmico humano (hsp 60) que es reconocida por las células T inflamatorias asociadas con la patogenia de la DMID, en la que dicho péptido se selecciona del grupo de péptidos que aparecen en la siguiente Tabla 1:

TABLA 1

Péptidos	Secuencia ID N°	Secuencia de aminoácidos (código de una letra)
p3	1 (31-50)	KFGADARALMLQGVDLLADA
p10	1 (136-155)	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL
p11	1 (151-170)	VIAELKKQSKPVTTPPEIAQ
p12	1 (166-185)	EEIAQVATISANGDKEIGNI
p14	1 (195-214)	RKGVITVKDGKTLNDELEII
p18	1 (255-274)	QSIVPALEIANHRKPLVITA
p20	1 (286-305)	LVLNRLKVLQVVAVKAPGF
p24	1 (346-365)	GEVIVTKDDAMLLKGGKDKA
p29	1 (421-440)	VTDALNATRAAVEEGIVLGG
p30	1 (436-455)	IVLGGGCALLRCIPALDSLTPANED
p32	1 (466-485)	EIKRTLKIPAMTIKNAGV
p35	1 (511-530)	VNMVEKGIIDPTKVVRTALL
p39	1 (343-366)	GKVGEVIVTKDDAM
p277	1 (437-460)	VLGGGCALLRCIPALDSLTPANED
p277 (Val ⁶)	* 2	VLGGGVALLRCIPALDSLTPANED
p277 (Val ¹¹)	** 3	VLGGGCALLRVIPALDSLTPANED
p277 (Val ⁶ -Val ¹¹)	*** 4	VLGGGVALLRVIPALDSLTPANED
* 437-460 de la SEC ID N° 1 con C-442 cambiado por V		
** 437-460 de la SEC ID N° 1 con C-447 cambiado por V		
*** 437-460 de la SEC ID N° 1 con C-442 y C-447 cambiado por V		

La invención además trata de un procedimiento para el tratamiento de un sujeto con una enfermedad autoinmunitaria u otra enfermedad o trastorno mediado por TH1, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una preparación terapéutica según la invención.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra producción de anticuerpos anti p277 en ratones NOD tratados con el péptido p277 (Val⁶-Val¹¹) en: (i) Intralipid o (ii) suero salino tamponado con fosfato (PBS), como se describe en el Ejemplo 2.

La figura 2 muestra isotipos de anticuerpos dependientes de TH-2 inducidos en ratones NOD mediante tratamiento con el péptido p277 (Val⁶-Val¹¹) en Intralipid, como se describe en el Ejemplo 3.

Las figuras 3A-B muestran que el tratamiento con Intralipid p277 (Val⁶-Val¹¹) induce en ratones NOD un cambio específico en el perfil de las citocinas producidas por las células T reactivas al péptido p277 (Val⁶-Val¹¹), como se describe en el Ejemplo 4. La figura 3A muestra que hay una reducción de las citocinas TH1 (IL-2, IFN- γ) y una elevación de las citocinas TH2 (IL-4, IL-10) tras el tratamiento de los ratones con el péptido p277 (Val⁶-Val¹¹) en Intralipid y la incubación de las células del bazo con p277(Val⁶-Val¹¹); la figura 3B muestra que no hay cambios en las

ES 2 211 963 T3

citocinas tras el tratamiento de los ratones con el péptido p277(Val⁶-Val¹¹) en Intralipid y la incubación de las células del bazo con Con A.

5 La figura 4 muestra que las respuestas espontáneas proliferativas de las células T a p277(Val⁶-Val¹¹) se reduce tras el tratamiento con el péptido p277(Val⁶-Val¹¹) en intralipid, como se describe en el Ejemplo 5.

La figura 5 muestra que el tratamiento de ratas con el péptido proteína básica de mielina p71-90 en Intralipid reduce la gravedad de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), como se describe en el Ejemplo 6.

10 La figura 6 muestra que el tratamiento de ratas con el péptido proteína básica de mielina p71-90 en AIF reduce la gravedad de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), como se describe en el Ejemplo 6.

Descripción detallada de la invención

15 Según la presente invención, se encontró que el tratamiento con el péptido p277(Val⁶-Val¹¹), en un vehículo adecuado, regulaba por disminución las respuestas espontáneas proliferativas de las células T a los epítomos de hsp60 y GAD y eliminaba la producción de autoanticuerpos frente a hsp60, a GAD y a insulina. La parada del proceso de la enfermedad se asoció, no con la tolerancia o anergia de las células T, sino con un cambio en las citocinas producidas por las células T autoinmunitarias reactivas al p277(Val⁶-Val¹¹) de un perfil de tipo TH-1 (IL-2, IFN- γ) a un perfil de tipo TH-2 (IL-4, IL-10). La modulación fue inmunológicamente específica, la respuesta espontánea de las células T de los ratones tratados frente a un péptido hsp60 bacteriano permaneció en el modo TH1. Por tanto, el proceso diabético caracterizado por autoinmunidad a varios antígenos propios puede curarse usando uno de los antígenos, por ejemplo el péptido p277(Val⁶-Val¹¹).

25 La asociación del tratamiento con p277 (Val⁶-Val¹¹) con un cambio en la reactividad a p277(Val⁶-Val¹¹) de la proliferación de células T a anticuerpos indica que el efecto terapéutico resulta de un cambio en las citocinas predominantes producidas por las células T autoinmunitarias en los ratones tratados. Las células TH1 secretan IL-2, que induce la proliferación de células T, y citocinas tales como IFN- γ , que median la inflamación tisular, contribuyendo por tanto a la patogenia de la enfermedad; en cambio, las células TH2 secretan IL-4 e IL-10. La IL-4 ayuda a las células B a secretar anticuerpos frente a ciertos isotipos de IgG y suprime la producción de las citocinas inflamatorias TH1. La IL-10 inhibe indirectamente la activación de TH1 afectando a la presentación antigénica y a la producción de citocinas inflamatorias por los macrófagos. Por tanto, las células TH2 suprimen la actividad TH1 (véase Liblau y col., 1995). El cambio de comportamiento de tipo TH1 a tipo TH2 estaba respaldado por los análisis de los isotipos de los anticuerpos producidos antes y después del tratamiento con p277(Val⁶-Val¹¹).

35 Se ha mostrado que el hecho de que el mecanismo del efecto terapéutico del péptido en un tratamiento con vehículo lipídico implica un cambio de citocinas TH1 \rightarrow TH2 proporciona la posibilidad de usar el cambio TH1 \rightarrow TH2 como prueba de que el tratamiento era eficaz y sí inducía una respuesta beneficiosa. En otras palabras, el cambio TH1 \rightarrow TH2 puede servir como un marcador sustituto de la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, la ausencia del cambio puede indicar una necesidad de un segundo tratamiento. Véase la solicitud de patente israelí nº 114.459, presentada el 5 de julio de 1995.

45 Las emulsiones lipídicas de la presente invención, cuando se usan como un adyuvante de vacunas con la sustancia antigénica a la que las células T implicadas en la enfermedad o trastorno en tratamiento son activas, sirven para mediar un cambio de una respuesta de células T TH1 antes del tratamiento a una respuesta de células T TH2 tras el tratamiento. Este hallazgo establece que tales emulsiones lipídicas son vehículos tolerogénicos biológicamente activos que pueden usarse en vacunas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno mediado por TH1. En tales vacunas, el antígeno proporciona la especificidad inmunológica para un efecto terapéutico mientras que el vehículo biológicamente activo de la presente invención proporciona el resultado biológico, es decir, el cambio TH1 \rightarrow TH2. Debido al cambio mediado por dicho vehículo biológicamente activo de la presente invención, las enfermedades con un espectro de autorreactividades pueden mejorar con una única combinación antígeno/vehículo capaz de inducir un cambio de las citocinas de las células T.

55 Un uso preferido de acuerdo con la presente invención es el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano que están mediadas por células TH1. Tales enfermedades incluyen enfermedades autoinmunitarias tales como DMID, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y tiroiditis. El péptido usado en tal tratamiento es un péptido autoantigénico. Por tanto, por ejemplo, para la DMID el péptido es el péptido p277 mencionado antes o el p277(Val⁶-Val¹¹) análogo sustituido con valina; para la esclerosis múltiple tal péptido deriva de la proteína básica de mielina; para la tiroiditis se piensa que el péptido deriva de tiroglobulina y para la artritis reumatoide el autoantígeno puede derivar de microorganismos de micobacteria, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*.

65 No es crucial que el antígeno sea un péptido. Por tanto, por ejemplo, las respuestas alérgicas mediadas por TH1 que producen sensibilidad cutánea e inflamación, tal como dermatitis de contacto, pueden tratarse con una vacuna que contenga el antígeno irritante y un vehículo biológicamente activo de acuerdo con la presente invención, que causará un cambio en la respuesta de citocinas de un tipo TH1 a un tipo TH2. En consecuencia, mientras que el paciente continuará teniendo niveles elevados de anticuerpos frente al antígeno, la respuesta inflamatoria de las células T que causa la irritación cutánea se verá suprimida.

ES 2 211 963 T3

Por tanto, el vehículo tolerogénico biológicamente activo de la presente invención puede usarse siempre que como se desee para crear tolerancia al antígeno al que las células T están atacando, es decir siempre que se use una vacuna para restringir un trastorno mediado por células T, particularmente un trastorno mediado por células TH1. Si se puede determinar qué antígeno está activando la respuesta en el rechazo a injertos o en la enfermedad injerto contra huésped, sería de esperar que la administración de tal antígeno con un vehículo de acuerdo con la presente invención facilitara el cambio de la respuesta TH1 inflamatoria indeseada a una respuesta TH2 más deseada, al margen de la complejidad global del número de antígenos frente al que las células T están activas en tal trastorno.

Para determinar la secreción por las células T de citocinas tras la activación con péptidos, los linfocitos de la sangre periférica de los pacientes se prueban en un ensayo de activación *in vitro*. Los linfocitos de sangre periférica se aíslan de sangre entera heparinizada en ficol-hypaque y se cultivan con el o los péptidos de prueba a concentraciones de 5-50 pg/ml. Los sobrenadantes de las células T cultivadas se recogen a diferentes puntos de tiempo y se prueban para determinar la actividad de varias citocinas mediante ELISA o bioensayos.

Entre los ejemplos de emulsiones grasas que pueden usarse en las preparaciones de la presente invención se incluyen los comercializados Intralipid y Lipofundin para nutrición intravenosa y las emulsiones grasas descritas en las patentes de EE.UU. mencionadas anteriormente números 3.169.086, 4.073.943 y 4.168.308. Sin embargo, el hallazgo según la presente invención de que estos lípidos metabolizables, administrados previamente para nutrición intravenosa, pueden usarse de forma eficaz como vehículos para tratamiento de enfermedades mediadas por células T, es completamente inesperado. De igual forma, el descubrimiento de que estas preparaciones son vehículos tolerogénicos biológicamente activos que median un cambio TH1 → TH2 también es totalmente inesperado.

Preferiblemente, las emulsiones grasas de la presente invención se usan recién preparadas o tras su conservación en un envase que no está abierto al aire atmosférico. Por ejemplo, el almacenamiento prolongado de Intralipid mientras está expuesto al aire atmosférico causa una disminución del pH y una reducción correspondiente en la actividad biológica.

En una forma de realización, el vehículo biológicamente activo de la invención en una emulsión grasa que comprende 10% de aceite de soja, 1,2% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,5% de glicerol y agua estéril para completar el 100% (Intralipid al 10%). En otra forma de realización, el vehículo es una emulsión grasa que comprende 20% de aceite de soja, 2,4% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,5% de glicerol y agua estéril hasta completar el 100%.

En otra forma más de realización, el vehículo es una emulsión grasa que comprende 5% de aceite de soja y otro 5% de triglicéridos de origen animal, por ejemplo 5% de triglicéridos de cadena media de mantequilla, 1,2% de lecitina de yema de huevo, 2,5% de glicerol y agua destilada hasta completar el 100% (Lipofundin al 10%).

En otra forma de realización de la invención, el vehículo es una emulsión lipídica procesada obtenida mediante centrifugación, por ejemplo, a 10.000 g o más, de la emulsión grasa original definida en la presente memoria descriptiva, donde se forma una pequeña capa rica en triglicéridos (aproximadamente 90% de triglicéridos) encima de una dispersión acuosa rica en fosfolípidos que contiene aproximadamente 1:1 de triglicéridos:fosfolípidos. Se separan las dos fases y la dispersión acuosa rica en fosfolípidos se usa como vehículo.

Las preparaciones de la invención pueden comprender uno o más péptidos. Por tanto, por ejemplo, para el tratamiento de la DMID la preparación puede comprender uno o más de los péptidos p12, p32, p277, p277(Val⁶), p277(Val¹¹), p277(Val⁶-Val¹¹), o cualquiera de los otros péptidos de la Tabla 1. En una forma de realización preferida, la preparación para el tratamiento de la DMID comprende un péptido p277 o p277(Val⁶-Val¹¹) y una emulsión grasa que comprende 10% de aceite de soja, 1,2% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,5% de glicerol y agua estéril hasta completar el 100% (Intralipid al 10%).

Además, la invención trata del uso de una emulsión grasa como se define en la presente memoria descriptiva o de una dispersión acuosa rica en fosfolípidos preparada a partir de ella mediante centrifugación, para preparar una preparación terapéutica que comprende uno o más péptidos u otros antígenos y dicha emulsión grasa o dispersión acuosa procesada como un vehículo en el tratamiento de enfermedades o trastornos autoinmunitarios mediados por células T.

A continuación se ilustra la invención con los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Tratamiento peptídico de diabetes de tipo I usando p277 (Val⁶-Val¹¹) en aceites

Se probó la eficacia de varias preparaciones lipídicas como vehículos para el tratamiento peptídico de la diabetes de ratones NOD. En este modelo, la destrucción autoinmunitaria de las células β productora de insulina en el páncreas está mediada por los linfocitos T. A las 5-8 semanas de edad se desarrolla un infiltrado inflamatorio aproximadamente los islotes pancreáticos y la destrucción de las células β que conduce a la deficiencia de insulina y a diabetes franca se

ES 2 211 963 T3

manifiesta a las 14-20 semanas de edad, afectando a casi al 100% de los ratones NOD hembra hacia las 35-40 semanas de edad.

Los ratones NOD hembra se trataron con 100 μ g de péptido p277(Val⁶-Val¹¹) por ratón s.c. en 0,1 ml de: (I) suero salino tamponado con fosfato (PBS) o (II) una emulsión lipídica al 10% compuesta por 10% de aceite de soja, 1,2% de fosfolípidos de huevo y 2,25% de glicerol (Intralipid, Kabi Pharmacia AB, Suecia).

Se siguió la incidencia de diabetes a los 6 meses de edad y la producción de anticuerpos antip277(Val⁶-Val¹¹). La diabetes se diagnosticó como hiperglucemia persistente, niveles de glucosa en sangre por encima de 11 mmol/l medidos al menos dos veces a intervalos semanales con un analizador de glucosa Beckman. El tratamiento peptídico satisfactorio se analizó mediante el mantenimiento de una concentración normal de glucosa en sangre (menos de 11 mmol/l), la remisión de la inflamación intraislotes de los islotes pancreáticos (insulinitis) y la inducción de anticuerpos frente al péptido terapéutico como un indicador de una respuesta inmunitaria de tipo TH2. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Incidencia de diabetes a 6 meses		
Tratamiento (%)	Diabetes	Incidencia de muerte (%)
p277(Val ⁶ -Val ¹¹)/PBS	90	80
p277(Val ⁶ -Val ¹¹)/intralipid	45#	20#
ninguno	100	90
p<0,01 comparado con los ratones NOD sin tratar		

Como se puede observar en la Tabla 2, el tratamiento peptídico administrado en intralipid fue eficaz reduciendo la incidencia de diabetes y de muerte. Por otro lado, el tratamiento administrado en PBS fue ineficaz.

Ejemplo 2

Producción de anticuerpos antip277 (Val⁶-Val¹¹)

La protección de la diabetes mediante el tratamiento con el péptido p277(Val⁶-Val¹¹) depende de la reactividad inmunológica TH2 al péptido. Por tanto, la producción de anticuerpos en ratones inmunizados con p277 (Val⁶-Val¹¹) se midió mediante ELISA. Placas de microtitulación Maxisorp (Nunc) se recubrieron con péptido p277(Val⁶-Val¹¹), 10 μ g/ml, durante 18 horas y la unión inespecífica se bloqueó con 7% de polvo de leche durante 2 horas. El suero de ratón, diluido a 1:50, se dejó unir durante 2 horas y la unión específica se detectó añadiendo fosfatasa alcalina IgG antiratón (Serotec) durante 2 horas y sustrato de p-nitrofenil-fosfato (Sigma) durante 30 minutos. La intensidad del color se midió mediante un lector de ELISA (Anthos) a una DO=405 nm.

Como se puede observar en la figura 1, los ratones NOD inmunizados frente al p277(Val⁶-Val¹¹) en intralipid desarrollaron anticuerpos específicos del péptido mientras que los ratones inmunizados frente a p277 (Val⁶-Val¹¹) en PBS no mostraron ninguna respuesta de anticuerpos.

Ejemplo 3

Isotipos de anticuerpos inducidos por el tratamiento con p277(Val⁶-Val¹¹)

La asociación del tratamiento con p277(Val⁶-Val¹¹) intralipid con anticuerpos frente a p277(Val⁶-Val¹¹) que se muestra en el Ejemplo 2, sugirió que el efecto terapéutico podría resultar de un cambio en las citocinas predominantes producidas por las células T autoinmunitarias. Las células T de tipo CD4 "colaboradoras" se han dividido en dos grupos en función de las citocinas características que secretan cuando se activan (Mosmann y Coffman, 1989): las células TH1 secretan IL-2, que induce la proliferación de células T, y citocinas tales como IFN- γ , que media la inflamación tisular; en cambio, las células TH2 secretan IL-4, que "ayuda" a las células B a producir ciertos isotipos de anticuerpos, e IL-10 y otras citocinas, que pueden "deprimir" la inflamación tisular. La posibilidad de un cambio de un comportamiento de tipo TH1 o de tipo TH2 se vio respaldada por análisis de los isotipos de los anticuerpos producidos tras el tratamiento con p277 (Val⁶-Val¹¹).

Se trataron grupos de ratones NOD, de 3 meses de edad, con p277 (Val⁶-Val¹¹) o con PBS en aceite, como se describe en el Ejemplo 2. Los sueros de cada uno de los ratones se analizaron para determinar los isotipos de sus anticuerpos frente a p277 (Val⁶-Val¹¹) tras el tratamiento (12-15 ratones por grupo). Los isotipos de anticuerpos se detectaron usando un ensayo de ELISA con reactivos de desarrollo de anticuerpos de isotipo específico (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). Los resultados se muestran en la figura 2, en la que: los círculos abiertos

ES 2 211 963 T3

son los anticuerpos frente a p277 (Val⁶-Val¹¹) en ratones NOD tratados con control; círculos cerrados son los ratones tratados con p277 (Val⁶-Val¹¹). Las columnas de cada experimento muestran los resultados de un número igual de ratones; una aparente reducción del número de círculos se debe a superposición.

5 El análisis de los isotipos de anticuerpos de los anticuerpos anti p277 que se desarrollan tras el tratamiento mostró que eran exclusivamente de las clases IgG1 e IgG2b, dependiente de las células T TH2 productoras de IL-4 (Snapper y col., 1993a) y posiblemente TGF β (Snapper y col., 1993b). No había anticuerpos IgG2a de tipo TH1 inducidos por el tratamiento con p277 (Val⁶-Val¹¹). El desarrollo de anticuerpos frente al péptido específico usado en el tratamiento es un signo de que las respuestas autoinmunitarias de las células T han cambiado de un modo inflamatorio perjudicial
10 denominado TH1 a una respuesta celular TH2 que produce anticuerpos inocuos y suprime la inflamación y el daño tisular (Rabinovitch, 1994).

Ejemplo 4

15 *El tratamiento con el péptido p277(Val⁶-Val¹¹)/Intralipid induce un cambio específico en el perfil de citocinas*

Para confirmar la idea de un cambio de las citocinas, se analizaron las citocinas producidas por las células T reactivas al p277(Val⁶-Val¹¹) en los ratones control y tratados con p277(Val⁶-Val¹¹)/Intralipid. Se usó concanavalina A (ConA), un mitógeno de células T, para activar las células T esplénicas totales como control.

20 Se trataron grupos de 10 ratones NOD de 3 meses de edad con p277(Val⁶-Val¹¹) en Intralipid (barras cerradas) o con PBS en Intralipid (barras abiertas; véase Ejemplo 2). Cinco semanas más tarde se extrajeron los bazo de los ratones y se juntaron las células esplénicas. Las células esplénicas se incubaron con Con A o p277(Val⁶-Val¹¹) durante 24 horas (para la secreción de IL-2 e IL-4) o durante 48 horas (para la secreción de IL-10 e IFN- γ). La presencia de las citocinas en los sobrenadantes del cultivo se cuantificaron mediante ELISA, usando anticuerpos pareados con Pharmigen según el protocolo de ELISA para citocinas Pharmigen. Para las curvas de calibración se usaron citocinas recombinantes de ratón Pharmigen como estándar. Brevemente, placas de microtitulación de 95 pocillos de fondo plano se recubrieron con mAc de citocinas de rata antiratón durante 18 horas a 4°C y se añadieron los sobrenadantes del cultivo o citocinas recombinantes de ratón durante 18 horas a 4°C. Las placas se lavaron y se añadieron mAc de
25 citocinas antiratón de rata durante 45 minutos a temperatura ambiente, después se lavaron de extensamente y se añadió fosfatasa avidin-alcalina. Las placas se lavaron se añadió un sustrato cromógeno (p-nitrofenilfosfato) y las muestras se leyeron a 406 nm en un lector de ELISA. Los resultados se muestran en la figura 3. Las concentraciones de las citocinas se muestran como lecturas de DO. * P<0,01.

35 La figura 3A muestra que las células del bazo de los ratones control secretaron IL-2 e IFN γ tras la incubación con p277(Val⁶-Val¹¹). Al contrario, los ratones tratados con p277(Val⁶-Val¹¹) produjeron significativamente menos (P<0,01) IL-2 e IFN γ en respuesta a la incubación con el péptido p277(Val⁶-Val¹¹). Esta reducción de las citocinas TH1 fue específica: los ratones tratados con p277(Val⁶-Val¹¹) mantenían sus respuestas de citocinas IL-2 e IFN γ a la Con A (figura 3B). Las figuras 3A y 3B muestran las cantidades de IL-10 e IL-4 producidas por las células del bazo de los ratones. Los ratones control produjeron muy poca IL-4 o IL-10 en respuesta a p277(Val⁶-Val¹¹) o Con A. Al contrario, hubo un aumento significativo de las IL-10 e IL-4 en respuesta sólo a p277 (Val⁶-Val¹¹) y sólo en los ratones tratados con p277(Val⁶-Val¹¹)/Intralipid (P<0,01). Una disminución de IL-2 e IFN- γ acoplado con un aumento en IL-10 e IL-4 confirma el cambio de comportamiento de tipo TH1 a comportamiento de tipo TH2. Tal cambio podría ayudar a explicar tanto el descenso de la proliferación de células T en respuesta al p277 mostrado anteriormente por los inventores (Elias y col., 1991) como la aparición de anticuerpos IgG1 e IgG2b en respuesta al p277(Val⁶-Val¹¹) según la presente invención.

Ejemplo 5

50 Las respuestas proliferativas espontáneas de las células T al p277(Val⁶-Val¹¹) se reducen con el tratamiento con p277(Val⁶-Val¹¹)

55 Grupos de 5 ratones hembra de la cepa NOD/Lt se trataron a la edad de 3 meses con 100 μ g del péptido p277 (Val⁶-Val¹¹) en Intralipid o con PBS mezclado con Intralipid, s.c. en el lomo. Cinco semanas después, se extrajeron los bazo de los ratones y se analizaron *in vitro* las respuestas proliferativas de las células T al mitógeno de células T Con A (1,25 μ g/ml) o a p277(Val⁶-Val¹¹) (10 μ g/ml) usando un ensayo estándar. Los resultados se muestran en la figura 4, en la que las barras STRIPPED negras corresponden a la Con A y las barras grises al p277(Val⁶-Val¹¹). Las respuestas de las células T se detectaron mediante la incorporación de timidina [³H] añadida a los pocillos en cultivos por cuadruplicado durante al menos 18 horas de un cultivo de 3 días. El índice de estimulación (IE) se computó como la relación entre las cpm medias de los cultivos de prueba y las cpm medias de los pocillos que contienen antígeno frente a los pocillos control cultivados sin antígenos o Con A- Las desviaciones estándar de las cpm medias siempre fueron inferiores a 10%.

65 Como se muestra en la figura 4, los ratones control en los que se probó PBS/Intralipid mostró respuestas proliferativas de las células T a p277(Val⁶-Val¹¹) y al mitógeno de células T Con A. En cambio, los ratones tratados con p277 (Val⁶-Val¹¹) en Intralipid mostró una disminución de la reactividad proliferativa de las células T a p277(Val⁶-Val¹¹) pero no una disminución frente a Con A. Por tanto, el efecto beneficioso del tratamiento con el péptido p277 (Val⁶-Val¹¹) no se debe a la inactivación de la respuesta autoinmunitaria sino a la activación de la autoinmunidad en

un modo diferente de comportamiento de citocinas (Cohen, 1995). La regulación de la autoinmunidad destructiva está programada en el sistema inmunológico (Cohen, 1992). Sólo necesita activarse por una señal adecuada que requiere el péptido junto con el vehículo lipídico; ni el péptido solo ni el lípido sin el péptido son eficaces, como se muestra en la Tabla 1. Estos resultados indican que las emulsiones lipídicas metabolizables pueden usarse eficazmente como vehículos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Cada enfermedad requerirá su propio péptido específico, pero la emulsión lipídica metabolizable puede usarse para los diversos tratamientos.

Ejemplo 6

10 *La administración de péptido en intralipid afecta al desarrollo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental*

La encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es una enfermedad autoinmunitaria experimental de animales que se piensa que tiene aspectos similares a la esclerosis múltiple (Zamvil y Steinman, 1990). Se puede inducir EAE en cepas de ratas susceptibles, tales como la rata de Lewis, mediante inmunización frente a la proteína básica de mielina (PBM) en adyuvante completo de Freund (ACF), una emulsión de aceite mineral que contiene micobacterias muertas. La enfermedad se desarrolla aproximadamente 12 días después de la inmunización y se caracteriza por varios grados de parálisis debido a la inflamación del sistema nervioso central. La parálisis puede durar hasta 6 ó 7 días y las ratas normalmente se recuperan a menos que mueran durante la fase máxima de la parálisis aguda. La EAE está causada por las células T que reconocen determinantes definidos de la molécula de PBM. El principal determinante de PBM en la rata de Lewis está compuesto por la secuencia peptídica 71-90 (Zamvil y Steinman, 1990).

Por tanto, nosotros realizamos un experimento para probar si la administración del péptido PBM encefalitogénico p71-90 en AIF podría también inhibir el desarrollo de EAE. La figura 5 muestra que la administración de p71-90 en AIF 14 días antes de la inducción de EAE produjo una disminución significativa en el grado máximo de parálisis en comparación con el tratamiento control con PBS emulsificado en AIF, que no tenía ningún efecto sobre la gravedad de la enfermedad. En consecuencia, el p71-90 dado en AIF afecta a la EAE.

Sin embargo, el AIF no se puede administrar, como se ha indicado antes, al ser humano porque no se puede metabolizar en el organismo y causa inflamación local. Por tanto, nosotros tratamos ratas Lewis con p71-90 en intralipid. La figura 6 muestra los resultados. Las ratas que habían recibido p71-90 en intralipid desarrollaron significativamente menos parálisis que las ratas control tratadas con PBS/Intralipid. En consecuencia, puede concluirse que un péptido importante como el p71-90 administrado en Intralipid es capaz de modular EAE en ratas. Así, los efectos del tratamiento con péptido/Intralipid no sólo se limitan a un péptido en una especie ni a sólo una enfermedad autoinmunitaria.

35 Ejemplo 7

Eficacia de una emulsión de intralipid al 10% nueva frente a una envejecida

Se usó una emulsión de Intralipid al 10% para tratar ratones NOD hembras de 12 semanas de edad con p277 (Val⁶-Val¹¹). La emulsión se usó el día que se abrió la botella sellada o 4 meses después, tras la exposición a aire atmosférico. El pH de la emulsión se determinó en el momento de preparar la emulsión + péptido para el tratamiento. La maduración estaba marcada por una reducción del pH de 8,2 a 6,7. En cada experimento se trataron 10 ratones con la preparación de emulsión + péptido, 10 ratones recibieron la emulsión sola y 10 ratones se dejaron sin tratar. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

45 TABLA 3

Grupo	Tratamiento	PH de la emulsión	Diabetes (%)	Mortalidad (%)
1	Péptido + emulsión	8,2	20*	10*
2	Emulsión	"	90	70
3	Péptido + emulsión	6,7	60	40
4	Emulsión	"	80	60
5	Sin tratar	-	90	80

* p < 0,01

Puede observarse que los ratones tratados con placebo (solo la emulsión, grupos 2 y 4) y los ratones sin tratar (grupo 5) desarrollaron una incidencia similar de diabetes, 80%-90% a los 6 meses de edad. Por el contrario, el tratamiento de los ratones con péptido en la emulsión recién abierta protegía al 80% de los ratones de la diabetes. Sin embargo, el uso de la emulsión "envejecida" sólo protegía a un 40%. Por tanto, la emulsión era químicamente inestable tras la exposición al aire, como se muestra por el marcado descenso del valor de pH. Este cambio es importante para su

ES 2 211 963 T3

actividad biológica. En consecuencia, el Intralipid en un vehículo biológicamente activo cuyas propiedades funcionales dependen del pH y no sólo de la presencia de lípido inerte.

Bibliografía

- 5 1. **Allegretta, M., Nicklas, J.A., Sriram. S y Albertini, R.J.**, *Science* 247: 718-721 (1990).
2. **Banchereau, J. Y Rybak, M.E.**, en: *The Cytokine Handbook*, 2ª ed.: A. Thompson Ed. Academic Press New York, pág. 99 (1994).
- 10 3. **Cohen, I. R.**, *Immunology Today* 13: 490-494 (1992).
4. (1995).
- 15 5. **Kristiansen, T., Sparman, M y Heller, L., J.** *Bioscl* 5 (suppl.1): 149-155 (1983).
6. **Liblau, R. S., Singer, S.M. y McDevitt, H.O.**, *Immunology Today* 18: 34-38 (1995).
- 20 7. **Moore, K. V., O'Garra A., de Waal Melefyt, R., Vieira, P y Mosmann, T. R.**, *Ann Rev. Immunol.* 11: 165-190 (1993),
8. **Mosmann, T.R. y Coffman, R.L.**, *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145-173 (1989).
- 25 9. **Ota, K., Matsul, M., Milford, E. L., Mackin, G. A., Weinwe, H. I. Y Hafler, D. A.** *Nature* 346: 183-187 (1990).
10. **Rabinovitch, A., Sorensen, O., Sua-Oinzon, W. K., Rajotta, R. V. Y Bleakley, R. C.**, *Diabetologist* 37: 833-837 (1994).
- 30 11. **Romagnani, S.**, *Ann. Rev. Immunol.* 12: 227-257 (1994).
12. **Snapper, C. M. Y Mond, J. J.**, *Immunology Today* 14: 15-17 (1993).
- 35 13. **Snapper, C. M., Waegell, W., Beernink, H. Y Desch, J. R.**, *J. Immunol.* 151: 4625-36 (1993).
14. **Zarnvill, S. S. Y Steinman, L.**, *Ann. Rev. Immunol.* 8: 579-621 (1990).

ES 2 211 963 T3

REIVINDICACIONES

1. Una preparación terapéutica para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno autoinmunitario mediado por células T, que comprende un antígeno y un vehículo biológicamente activo, en la que el antígeno es un antígeno reconocido por células T inflamatorias asociadas con la patogenia de dicha enfermedad o trastorno y en la que dicho vehículo es una emulsión grasa que comprende 10%- 20% de triglicéridos de origen vegetal y/o animal, 1,2%-2,4% de fosfolípidos de origen vegetal y/o animal, 2,25%-4,5% de osmorregulador, 0%-0,05% de antioxidantes y agua estéril hasta completar el 100%.
2. Una preparación según la reivindicación 1, en la que los triglicéridos son de origen vegetal, preferiblemente derivados de aceite de soja, o de origen animal, preferiblemente derivado de yema de huevo o de suero bovino.
3. Una preparación según la reivindicación 1 ó 2, en la que los fosfolípidos son de origen vegetal, preferiblemente derivados de soja, o de origen animal, preferiblemente derivados de yema de huevo o de suero bovino.
4. Una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el osmorregulador se selecciona del grupo que comprende glicerol, sorbitol y xilitol.
5. Una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende 0,05% de tocoferol como antioxidante.
6. Una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el vehículo biológicamente activo es una emulsión grasa que comprende 10% de aceite de soja, 1%-2% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,5% de glicerol y agua estéril hasta completar el 100%.
7. Una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el vehículo biológicamente activo es una emulsión grasa que comprende 20% de aceite de soja, 2,4% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,5% de glicerol y agua estéril hasta completar el 100%.
8. Una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el vehículo biológicamente activo es una emulsión grasa que comprende 5% de aceite de soja, 5% de triglicéridos de cadena media, 1%-2% de lecitina de yema de huevo, 2,5% de glicerol y agua estéril hasta completar el 100%.
9. Una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que causa el cambio de la respuesta de un individuo de citocinas de las células T de TH1 a TH2, expresado mediante una disminución de la respuesta celular de citocinas IL-2 o IFN- γ y un aumento de la respuesta de las citocinas de las células T IL-4 o IL-10.
10. Una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el tratamiento de la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), en la que dicho antígeno comprende un péptido derivado de la proteína 60 del shock térmico humano (hsp60) que es reconocido por las células T inflamatorias asociadas con la patogenia de la DMID, en la que dicho péptido se selecciona del grupo de péptidos enumerados en la Tabla 1.
11. Una preparación según la reivindicación 10 para el tratamiento de la DMID, que comprende el péptido p277 y una emulsión grasa que comprende 10% de aceite de soja, 1,2% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,5% de glicerol y agua estéril hasta completar el 100%.
12. Una preparación según la reivindicación 11 para el tratamiento de la DMID, que comprende el péptido p277 (Val⁶-Val¹¹) y un vehículo formado por una emulsión grasa que comprende 10% de aceite de soja, 1,2% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,5% de glicerol y agua estéril hasta completar el 100%.
13. Una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el tratamiento de la esclerosis múltiple, en la que dicho antígeno comprende un péptido derivado de la proteína básica de mielina (PBM) que es reconocido por las células T implicadas en la patogenia de la esclerosis múltiple.
14. Uso de una emulsión grasa que comprende 10%-20% de triglicéridos de origen vegetal y/o animal, 1,2%-2,4% de fosfolípidos de origen vegetal y/o animal, 2,25%-4,5% de osmorregulador, 0%-0,5% de antioxidantes y agua estéril hasta completar el 100%, para la fabricación de una preparación terapéutica según la reivindicación 1.
15. Uso de una emulsión grasa que comprende 10% de aceite de soja, 1,2% de fosfolípidos de yema de huevo, 2,5% de glicerol y agua estéril hasta completar el 100%, para la fabricación de una preparación terapéutica según la reivindicación 6.
16. Una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la emulsión grasa es Intralipid al 10%.
17. Una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la emulsión grasa es Lipofundin al 10%.

ES 2 211 963 T3

18. Una preparación según la reivindicación 11 para el tratamiento de la DMID, que comprende el péptido p277 y una emulsión grasa, en la que la emulsión grasa es Intralipid al 10%.

5 19. Una preparación según la reivindicación 12 para el tratamiento de la DMID, que comprende el péptido p277 (Val⁶-Val¹¹) y una emulsión grasa, en la que la emulsión grasa se selecciona entre Intralipid al 10% o Lipofundin al 10%.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

FIG. 1

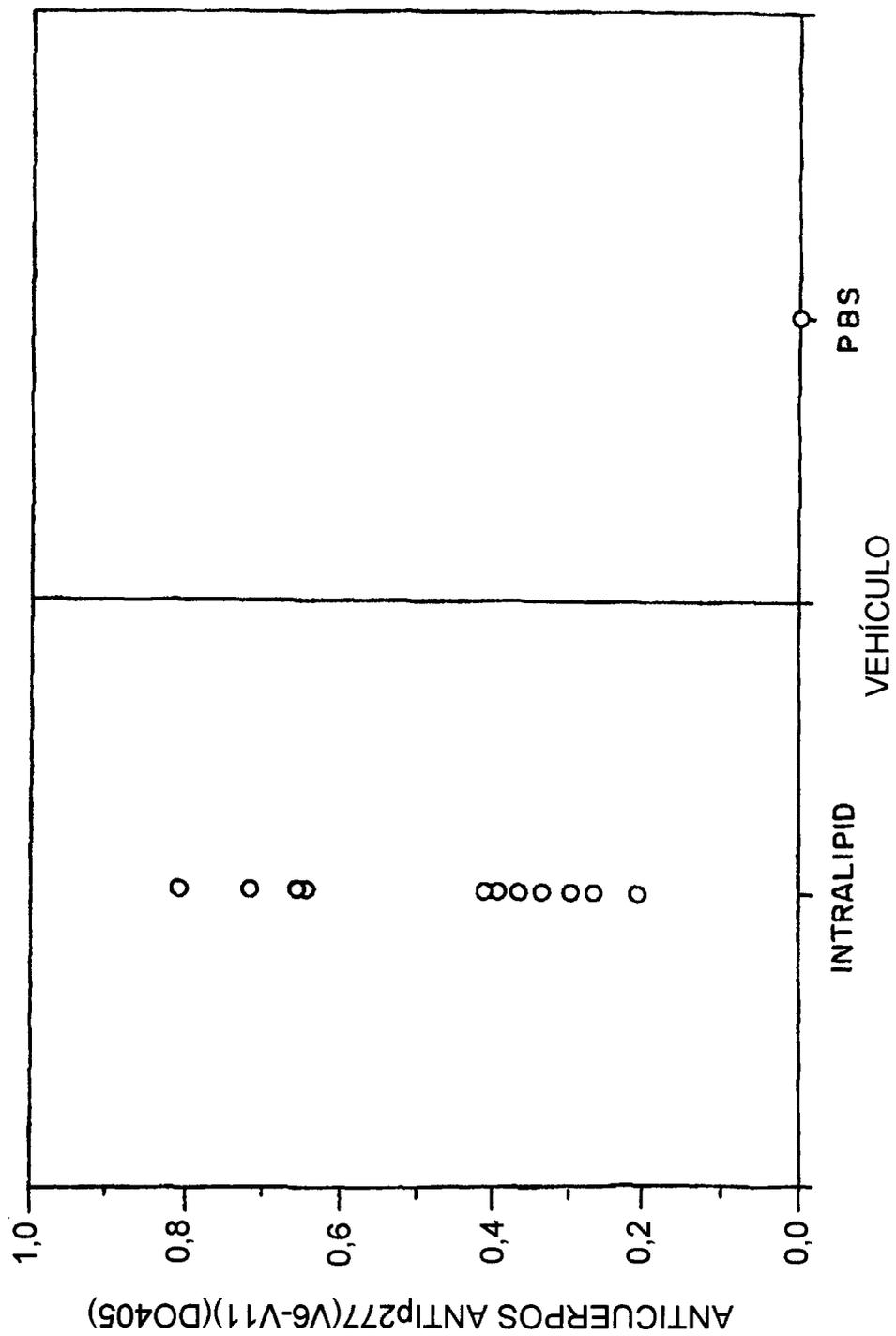


FIG. 3A

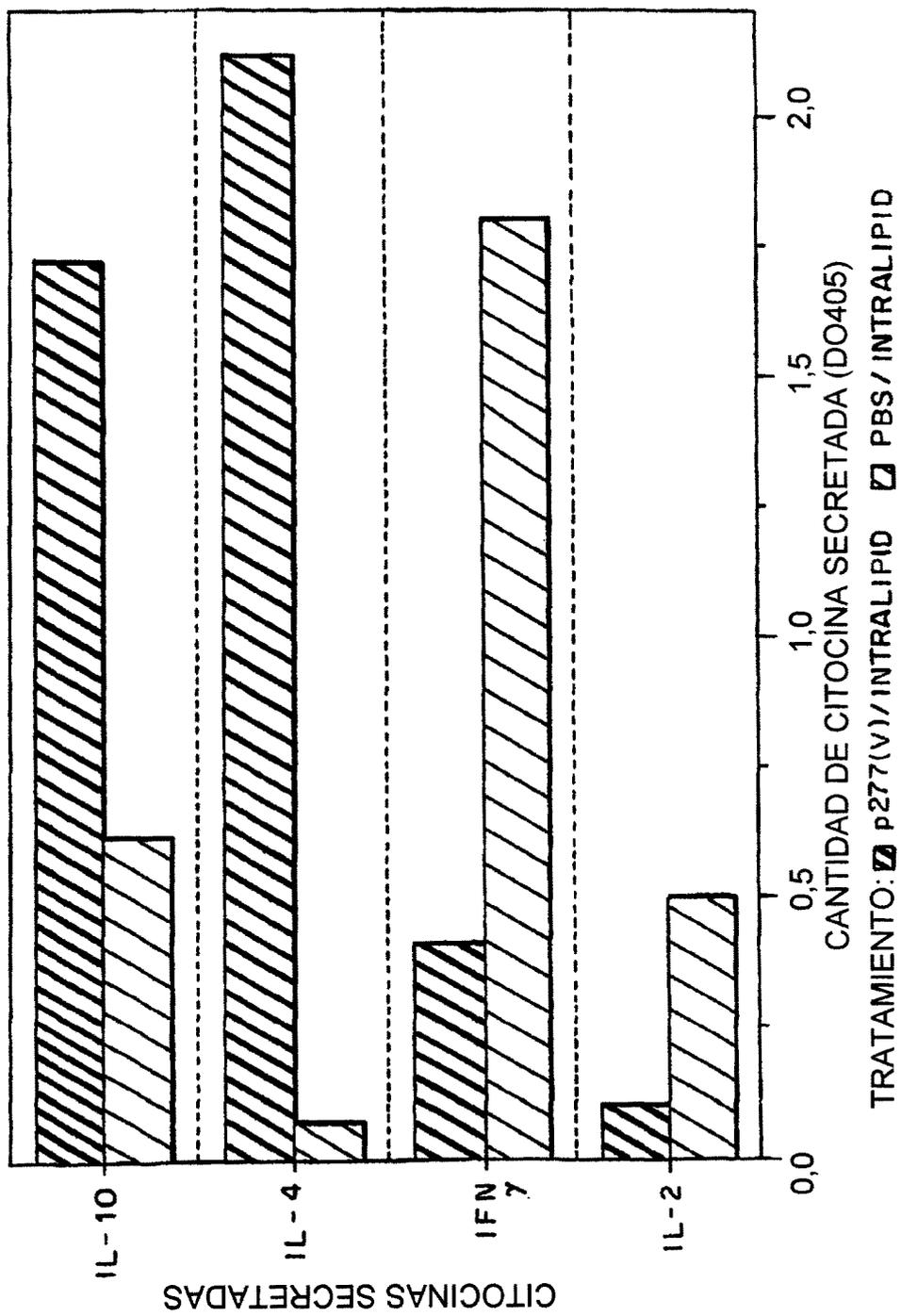


FIG. 3B

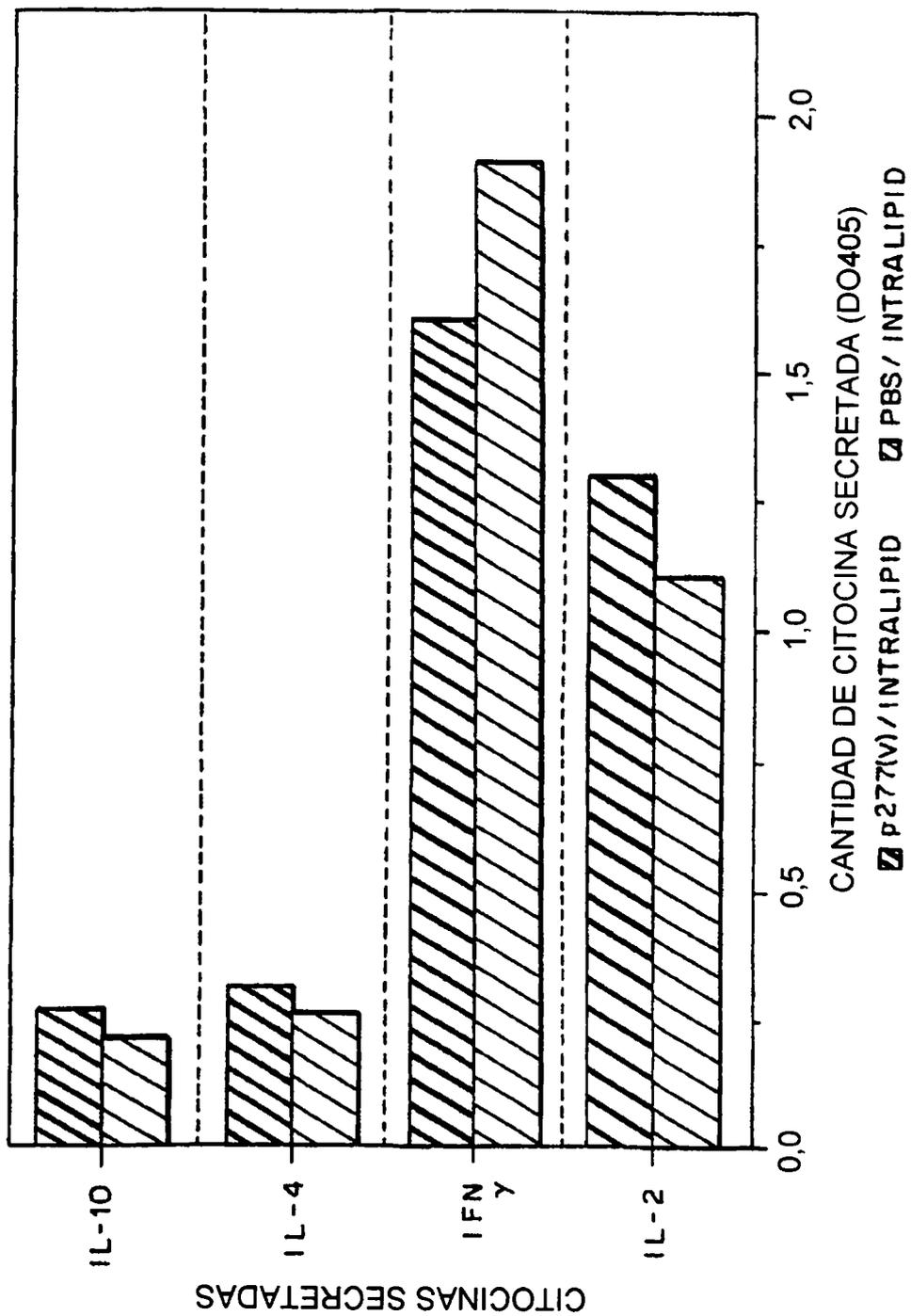


FIG. 4

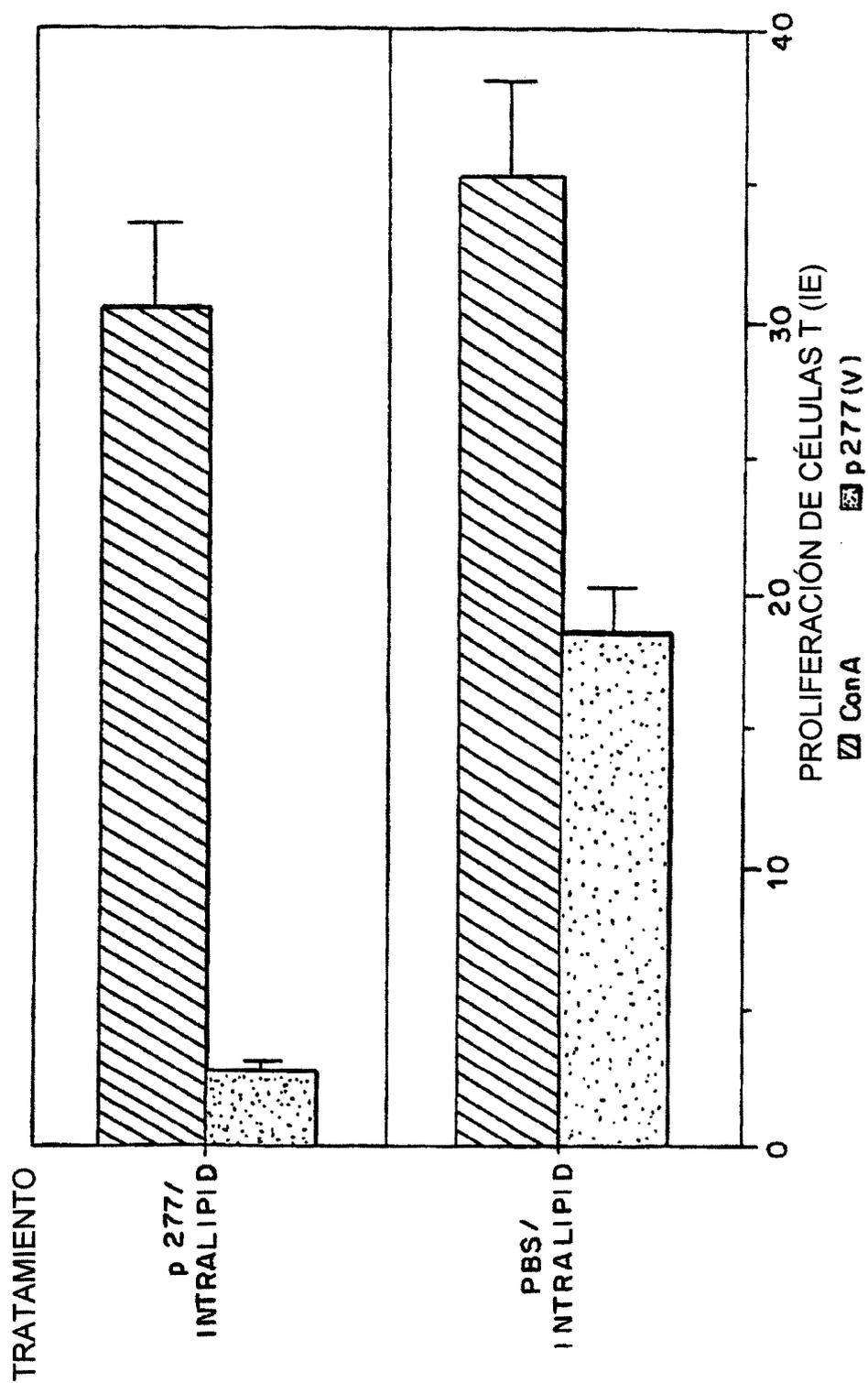


FIG. 5

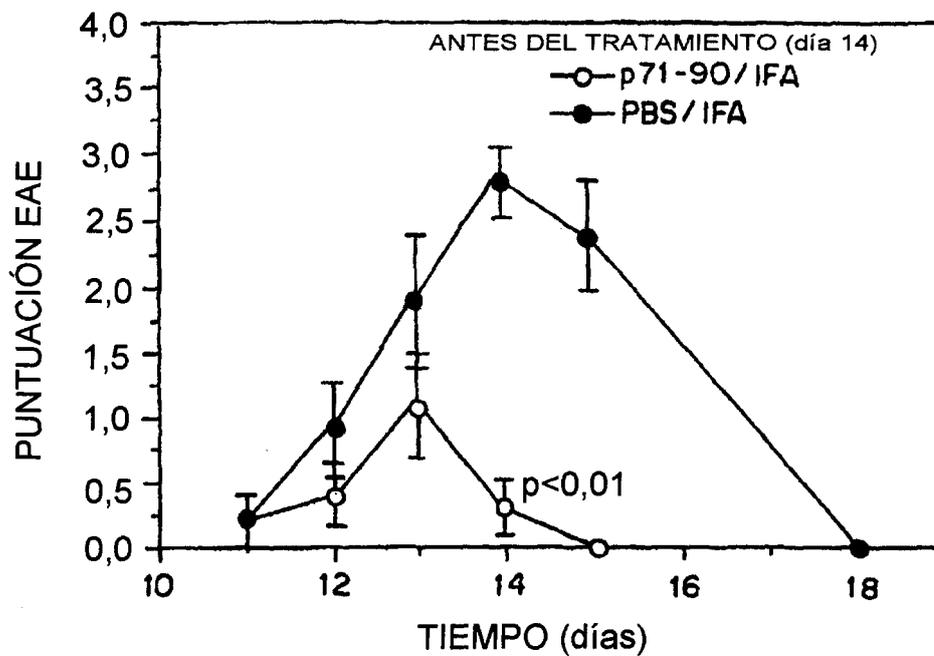
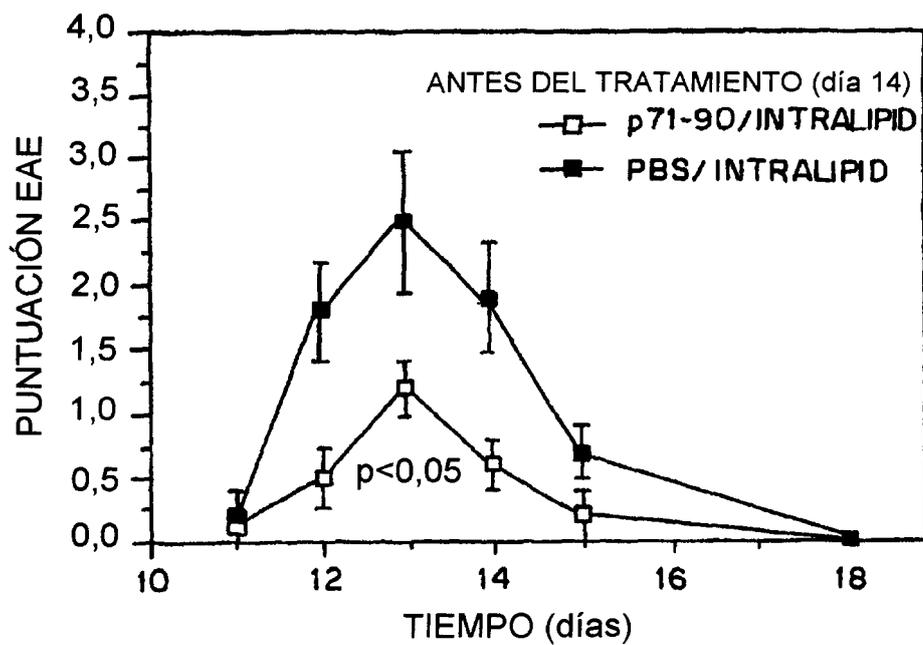


FIG. 6



ES 2 211 963 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: YEDA RESEARCH & DEVELOPMENT CO. LTD en el Weizmann Institute of Science
 - (B) CALLE: P. O. Box 96
 - (C) CIUDAD: Rehovot
 - 10 (E) PAÍS: Israel
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 76100
 - (G) TELÉFONO: 972-8-470739
 - (H) TELEFAX: 972-8-4706178
 - 15 (A) NOMBRE: Irun R. COHEN
 - (B) CALLE: 11 Hankin Street
 - (C) CIUDAD: Rehovot
 - (E) PAÍS: Israel
 - 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 76344
 - (A) NOMBRE: Dana ELIAS
 - (B) CALLE: 57 Derech Yavne
 - 25 (C) CIUDAD: Rehovot
 - (E) PAÍS: Israel
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 76344
 - (A) NOMBRE: Meir SHINITZKY
 - 30 (B) CALLE: 20 Derech Haganim
 - (C) CIUDAD: Kfar Shmaryahu
 - (E) PAÍS: Israel
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 46910
 - 35 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PREPARACIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES MEDIADAS POR CÉLULAS T
 - (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
 - 40 (iv) FORMA DE LECTURA POR ORDENADOR:
 - (A) TIPO DE MEDIO: disquete
 - (B) ORDENADOR: IBM compatible con PC
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - 45 (D) SOFTWARE: Patentin Release nº 1.0. Versión nº 1.30 (EPO) - (vi) FECHA DE SOLICITUD ANTERIOR:
 - (A) NÚMERO DE SOLICITUD: IL 114458
 - 50 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 5-JULIO-1995

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº 1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 573 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 1
- 65 Met Leu Arg Leu Pro Thr Val Phe Arg Gln Met Arg Pro Val Ser Arg
1 5 10 15
Val Leu Ala Pro His Leu Thr Arg Ala Tyr Ala Lys Asp Val Lys Phe
20 25 30

ES 2 211 963 T3

Gly Ala Asp Ala Arg Ala Leu Met Leu Gln Gly Val Asp Leu Leu Ala
 35 40 45
 Asp Ala Val Ala Val Thr Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile
 5 50 55 60
 Glu Gln Gly Trp Gly Ser Pro Lys Val Thr Lys Asp Gly Val Thr Val
 65 70 75 80
 Ala Lys Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys
 10 85 90 95
 Leu Val Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala Gly Asp Gly
 100 105 110
 Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Arg Ser Ile Ala Lys Glu Gly Phe
 115 120 125
 Glu Lys Ile Ser Lys Gly Ala Asn Pro Val Glu Ile Arg Arg Gly Val
 130 135 140
 Met Leu Ala Val Asp Ala Val Ile Ala Glu Leu Lys Lys Gln Ser Lys
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Thr Pro Glu Glu Ile Ala Gln Val Ala Thr Ile Ser Ala
 165 170 175
 Asn Gly Asp Lys Glu Ile Gly Asn Ile Ile Ser Asp Ala Met Lys Lys
 180 185 190
 Val Gly Arg Lys Gly Val Ile Thr Val Lys Asp Gly Lys Thr Leu Asn
 195 200 205
 Asp Glu Leu Glu Ile Ile Glu Gly Met Lys Phe Asp Arg Gly Tyr Ile
 210 215 220
 Ser Pro Tyr Phe Ile Asn Thr Ser Lys Gly Gln Lys Cys Glu Phe Gln
 225 230 235 240
 Asp Ala Tyr Val Leu Leu Ser Glu Lys Lys Ile Ser Ser Ile Gln Ser
 245 250 255
 Ile Val Pro Ala Leu Glu Ile Ala Asn Ala His Arg Lys Pro Leu Val
 260 265 270
 Ile Ile Ala Glu Asp Val Asp Gly Glu Ala Leu Ser Thr Leu Val Leu
 275 280 285
 Asn Arg Leu Lys Val Gly Leu Gln Val Val Ala Val Lys Ala Pro Gly
 290 295 300
 Phe Gly Asp Asn Arg Lys Asn Gln Leu Lys Asp Met Ala Ile Ala Thr
 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Val Phe Gly Glu Glu Gly Leu Thr Leu Asn Leu Glu Asp
 325 330 335
 Val Gln Pro His Asp Leu Gly Lys Val Gly Glu Val Ile Val Thr Lys
 340 345 350
 Asp Asp Ala Met Leu Leu Lys Gly Lys Gly Asp Lys Ala Gln Ile Glu
 355 360 365
 Lys Arg Ile Gln Glu Ile Ile Glu Gln Leu Asp Val Thr Thr Ser Glu
 370 375 380
 Tyr Glu Lys Glu Lys Leu Asn Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ser Asp Gly

