



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 179**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08016498 .1**

96 Fecha de presentación : **18.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2058005**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2009**

54

Título: **Vacuna para el tratamiento de la celiaquía y método para la producción de la vacuna, uso de una secuencia peptídica conjugada con una toxina bacteriana para la activación del sistema inmune contra prolaminas así como péptido de diseño.**

30

Prioridad: **18.09.2007 DE 10 2007 044 673**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2011

73

Titular/es: **Klaus-Peter Zimmer**
Lonystasse 9
35390 Giessen, DE

72

Inventor/es: **Zimmer, Klaus-Peter**

74

Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 358 179 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

Vacuna para el tratamiento de la celiaquía y método para la producción de la vacuna, uso de una secuencia peptídica conjugada con una toxina bacteriana para la activación del sistema inmune contra prolaminas así como péptido de diseño

- 5 La invención se refiere a una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 y a un método para la producción de esta vacuna para el tratamiento de la celiaquía de acuerdo con la reivindicación 4 y al uso de acuerdo con la reivindicación 6. Por lo demás, la presente invención se refiere a un péptido de diseño, compuesto de la secuencia de aminoácidos Pro Gly Glu Glu Glu Pro Phe Pro Pro Glu Glu Pro Tyr Pro: Glu Pro Glu Pro Phe Pro de la α -gliadina, que está conjugada con el pentámero B de la toxina del cólera.
- 10 La celiaquía es una enfermedad autoinmune crónica de la mucosa del intestino delgado, que aparece en individuos genéticamente predispuestos (HLA-DQ2/DQ8) debido a una autodestrucción mediada inmunológicamente de enterocitos con hipersensibilidad a la proteína gluten, que también se conoce como proteína del gluten. La enfermedad, es decir, la hipersensibilidad al gluten sigue existiendo a lo largo de toda la vida y en parte está determinada genéticamente y actualmente no se puede tratar. Solamente se puede recomendar actualmente una
- 15 dieta sin gluten de por vida como la única posibilidad asegurada para el tratamiento de la celiaquía, por la que vuelve a curarse el intestino y también disminuyen los riesgos de las consecuencias a largo plazo, tales como, por ejemplo, en el peor de los casos, la aparición de un linfoma no Hodgkin o de cáncer de intestino. Sin embargo, también los síntomas que se presentan después de la inflamación y destrucción prolongada de las células epiteliales intestinales, tales como pérdida de peso, diarrea, vómitos, pérdida de apetito y carencia vitamínica conducen por un
- 20 lado a una alteración del desarrollo en la edad infantil y por otro lado tienen como consecuencia que la calidad de vida de los pacientes sensibles al gluten está extremadamente disminuida. Por tanto, actualmente, tal como ya se ha descrito anteriormente, sólo una dieta sin gluten puede conducir a que los pacientes afectados queden libres de síntomas. A este respecto es problemático que el gluten aparece en muchas variedades de cereales, tales como
- 25 trigo, cebada, centeno y avena, al igual que en sus especies ancestrales botánicamente relacionadas espelta, escanda secada en verde, trigo kamut, escaña cultivada y farro, utilizándose particularmente las variedades de cereales habituales de forma aumentada en la industria alimentaria. Por tanto, se tiene que tener en cuenta de forma extrema cómo están compuestos determinados alimentos, ya que incluso pequeñas cantidades de gluten desencadenan el proceso inmunológico de la autodestrucción de los enterocitos en individuos sensibles al gluten. Ya que la prevalencia, es decir, la frecuencia de los casos sintomáticos en el promedio mundial se encuentra en
- 30 aproximadamente 1:270 individuos, la industria alimentaria se ha adaptado entre tanto al grupo de los pacientes que padecen celiaquía, de tal forma que entre tanto existen productos alimentarios sin gluten y también etiquetados como tales en el mercado. Sin embargo, estos productos están disponibles solamente como surtido limitado y pueden sólo contribuir a que los pacientes hipersensibles al gluten vivan libres de síntomas, sin embargo, actualmente mediante estas medidas no se puede conseguir una curación.
- 35 La causa de la hipersensibilidad al gluten son secuencias peptídicas tóxicas, es decir, secciones del gluten que pertenecen a la fracción soluble en alcohol (prolaminas) y que se denominan gliadina, que está compuesta de una secuencia de aminoácidos que presenta una gran cantidad de prolina y glutamina. Particularmente el alto contenido de prolina hace que estos péptidos del gluten o gliadina sean resistentes a la degradación habitual en la digestión, ya que estos péptidos debido a sus restos de prolina sólo se pueden degradar insuficientemente mediante las
- 40 enzimas digestivas habituales. Esto conduce en individuos predispuestos correspondientemente con una hipersensibilidad al gluten a la inflamación que se ha indicado anteriormente de la mucosa intestinal, que se debe a una reacción patógena compleja del sistema inmune. Debido a la hidrólisis incompleta de las proteínas ricas en prolina y glutamina se forman epítomos antigénicos que se transportan mediante transcitosis inespecífica desde el lumen intestinal a la mucosa situada por debajo del epitelio intestinal. Determinadas secciones tóxicas, por ejemplo,
- 45 las secuencias de aminoácidos 31-49 y 57-72 de la α -gliadina, se unen a glucoproteínas ancladas en la membrana celular de los enterocitos, que pertenecen a las inmunoglobulinas y que se denominan complejos mayores de histocompatibilidad (HLA). Esta unión se sigue reforzando debido a que a partir del aminoácido presente en la secuencia peptídica glutamina se forma por mediación de la enzima transglutaminasa tisular ácido glutámico, por lo que el péptido de gliadina-gluten tóxico se ajusta al bolsillo configurado por el complejo mayor de histocompatibilidad. Esto desencadena una producción aumentada de semioquímicos que desencadenan inflamación, tales como interferón- γ , TNF- α , interleucina-6 e interleucina-2, que terminan en la apoptosis de los enterocitos, es decir, la muerte del tejido, por ejemplo, tiene como consecuencia una atrofia de las vellosidades. Actualmente todavía no se comprende por qué se produce esta producción aumentada de semioquímicos que desencadenan la inflamación. Normalmente, los antígenos de bacterias o del alimento conducen a una inflamación
- 55 fisiológica controlada que termina finalmente en una tolerancia al antígeno. Sin embargo, los procesos inflamatorios que se presentan en la celiaquía se desarrollan de forma incontrolada, lo que, como ya se ha mencionado anteriormente, finalmente no está comprendido.

60 Las investigaciones para el tratamiento de la celiaquía se concentran actualmente en la función principal presentadora de antígenos de las células dendríticas positivas a DQ2/DQ8 de la lámina propia, mientras que a los procesos que desencadenan inflamación que se desarrollan en los enterocitos no se les otorga mayor importancia para el desarrollo de productos terapéuticos contra la celiaquía, por no hablar de la consideración del desarrollo de una vacuna contra la celiaquía.

65 El documento WO 99/54452 A1 describe métodos y sustancias para la prevención y tratamiento de una enfermedad autoinmune, proporcionándose una proteína de fusión de la subunidad B de la toxina del cólera no tóxica y un autoantígeno.

Senger S. et al. describen la identificación de un epítomo inmunodominante de α -gliadina en ratones transgénicos HLA-DQ8 después de la inmunización oral (J. Immunol. 2005, páginas 8087 a 8095).

Por tanto, es objetivo de la presente invención proporcionar una vacuna contra la celiaquía y un método para la

producción de dicha vacuna, que con administración a individuos positivos a DQ2/DQ8 predispuestos genéticamente o a individuos sensibles al gluten posibilite reprimir las inflamaciones que se producen con la ingesta de gluten de la mucosa o captar las secuencias peptídicas (antígenos) tóxicas inmunológicamente, es decir, ajustar el sistema inmune de los pacientes celíacos a los antígenos (secuencias peptídicas tóxicas).

5 Un objetivo adicional de la presente invención es el uso de un antígeno que después de la administración a pacientes que están enfermos de celiaquía o que poseen la predisposición a lo mismo provoque una respuesta inmune controlada, de tal forma que los pacientes desarrollan una tolerancia a prolaminas, particularmente a gluten o gliadina.

10 Finalmente es objetivo de la presente invención proporcionar una sustancia que se pueda utilizar para el tratamiento de celiaquía.

De acuerdo con la invención, el anterior objetivo se resuelve mediante una vacuna para la aplicación en el tratamiento de celiaquía con las características de la reivindicación 1.

Por lo demás, el anterior objetivo se resuelve en vista a la producción de una vacuna contra la celiaquía por medio de un método con las características de la reivindicación 4.

15 El objetivo adicional, concretamente el uso de un antígeno que después de la administración a pacientes que están enfermos de celiaquía o que están predispuestos hereditariamente a ello provoque una respuesta inmune controlada, se resuelve mediante el uso de acuerdo con la reivindicación 6.

Finalmente el objetivo, concretamente proporcionar una sustancia que se pueda utilizar para el tratamiento de la celiaquía, se resuelve mediante un péptido de diseño con las características de la reivindicación 7.

20 De forma adecuada se ha observado que, a diferencia del proceder actual para el desarrollo de una terapia contra la celiaquía, que se limita a los mecanismos de la respuesta inmune de las células dendríticas del epitelio intestinal a las secuencias peptídicas tóxicas de gluten o gliadina, un enfoque completamente diferente conduce al éxito, que prevé la presentación de las secuencias peptídicas tóxicas como antígenos a los complejos de MHC de clase II por mediación de un adyuvante sobre la superficie de los enterocitos que captan nutrientes/antígeno, por lo que se desencadena una respuesta inmune, concretamente la formación de anticuerpos o linfocitos T supresores, que están dirigidos contra las secuencias peptídicas tóxicas de gluten o gliadina. Esta medida a primera vista sencilla y en cualquier caso realizable, concretamente la presentación de las secuencias peptídicas tóxicas de gluten o gliadina en los endosomas tardíos a los complejos de MHC de clase II se tiene que considerar a este respecto como particularmente inventiva y nueva y proporciona una posibilidad de tratamiento y primera posibilidad de curación de la celiaquía, ya que, tal como se ha mencionado, por primera vez las secuencias peptídicas tóxicas de la gliadina se pueden presentar a los complejos de MHC de clase II de los endosomas tardíos de enterocitos, por lo que se desencadena una respuesta inmune controlada.

35 Por primera vez es posible de hecho con la vacuna de acuerdo con la invención provocar una respuesta inmune en el sentido de una tolerancia oral a secuencias peptídicas tóxicas del gluten o de la gliadina que conduce a la formación de anticuerpos o linfocitos T supresores contra los péptidos tóxicos a evaluar como causa para la celiaquía.

40 A diferencia de las investigaciones y desarrollos actuales de preparaciones para el tratamiento de la celiaquía que se apoyan en la sintomatología secundaria patógena de la celiaquía, concretamente las reacciones tóxicas y la determinación de las secuencias peptídicas tóxicas del gluten o gliadina en la lámina propia del epitelio intestinal de pacientes afectados de celiaquía, por primera vez se consigue de un modo de acuerdo con la invención conducir las secuencias peptídicas tóxicas en un péptido de diseño, que está compuesto de al menos una parte de una toxina bacteriana conjugada con una secuencia peptídica tóxica de la gliadina, a los endosomas tardíos de los enterocitos del epitelio intestinal para desencadenar una respuesta inmune controlada a las secuencias peptídicas tóxicas, que conduce a la formación de anticuerpos o linfocitos T supresores.

45 De acuerdo con la invención se usa el pentámero B de la toxina del cólera que por sí mismo no conduce a ninguna reacción tóxica del sistema inmune, sin embargo, sirve como soporte de la secuencia peptídica tóxica o inmunodominante para conducir la misma a los endosomas tardíos de los enterocitos del epitelio intestinal. A este respecto se prefiere particularmente el pentámero B de la toxina del cólera sin la fracción tóxica A que se usa como adyuvante de la mucosa; para servir como soporte para las secuencias peptídicas tóxicas o inmunodominantes.

50 Como secuencia peptídica tóxica o inmunodominante se asocia de acuerdo con la invención la secuencia peptídica "Pro Gly Glu Glu Glu Pro Phe Pro Pro Glu Glu Pro Tyr Pro Glu Pro Glu Pro Phe Pro" de la gliadina α (aa 31-49) con una parte de la toxina bacteriana que se conoce como secuencia peptídica tóxica que causa una atrofia de las vellosidades.

55 Mediante la conjugación de la secuencia peptídica de la gliadina con al menos una parte de la toxina bacteriana, la misma se presenta como antígeno y conduce a una respuesta inmune mediante formación de anticuerpos contra prolaminas, es decir, contra celiaquía y representa una vacuna contra la celiaquía.

Para evitar repeticiones, con respecto a las ventajas del método reivindicado con la reivindicación dependiente 4, el uso de acuerdo con la reivindicación 6 y el péptido de diseño reivindicado en la reivindicación 7 se hace referencia a las explicaciones de la vacuna reivindicada en la reivindicación 1.

60 Se explican con más detalle ejemplos de realización mediante el siguiente ejemplo:

Ejemplo

Se tomaron biopsias del yeyuno de pacientes (de 1 a 12 años de edad) con celiaquía no tratada y de pacientes adultos con una dieta sin gluten de al menos 6 meses. Las biopsias de los pacientes con celiaquía no tratada sirven como controles. Las biopsias de los pacientes se incuban con la fracción de Frazer (FF) *in vivo* a 37°C o *in vitro* durante 10, 20 y 30 min y a continuación se fijan con paraformaldehído al 5% en tampón HEPES 250 mM a pH 7,4.

Inmunofluorescencia/Microscopía de láser confocal

Las biopsias intestinales (cortes congelados (0,05 μ m)) se preparan mediante un ultracriomicrotomo de -60°C a -70°C. Éstas se cubren con un vidrio que está revestido con poli-L-lisina. Los cortes se permeabilizan con saponina al 0,05% para aumentar las señales de los sitios de unión intracelulares, se incuban durante 1 hora con un anticuerpo primario y después se incuban durante otra hora más con un segundo anticuerpo a temperatura ambiente. Las muestras se pueden fotografiar, por ejemplo, con un microscopio de fluorescencia Axioskop de Zeiss.

Para la representación de la compartimentalización se incuban células HT29 con los péptidos de gliadina correspondientes de forma conjugada o no conjugada y se marcan con un anticuerpo de gliadina policlonal o monoclonal que está unido a un segundo anticuerpo, que está asociado a Alexa Fluor 568. Las proteínas marcadoras del compartimento endosómico (Catepsina D, LAMP-2) se marcan con una tinción Alexa Fluor 488. Las imágenes confocales se pueden realizar mediante el uso de un microscopio de Leica TCS SP1 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). La evaluación cuantitativa de los péptidos internalizados 31-49 y 31-49-CTB se puede realizar con el programa "ImageJ".

Conjugación del péptido con el aminoácido 31-49 de la α -gliadina con el pentámero B de la toxina del cólera

El péptido aa 31-49 de la α -gliadina se asocia mediante el uso del reactivo de "entrecruzamiento" heterobifuncional m-maleinimidobenzoil-N-hidroxisuccimida (MBS-Pierce) con el pentámero B de la toxina del cólera. Para esto en primer lugar se incuban los grupos amino de la proteína de soporte mediante incubación a temperatura ambiente durante 30 min en un tampón MBS 25 veces molar (MES 25 mM, pH 6,5 y NaCl 150 mM). El exceso de tampón MBS se retira mediante una columna. En una segunda etapa se añaden los péptidos (aa 31-49) en una proporción molar de 20:1 a la proteína de soporte de péptido. La asociación a los restos de cisteína de los péptidos se realiza en el intervalo de 3 horas a temperatura ambiente. Los péptidos no unidos se retiran mediante diálisis frente a PBS. La conjugación exitosa puede realizarse mediante procesos de análisis de transferencia puntual. Los conjugados transferidos a una membrana de nitrocelulosa pueden detectarse con los anticuerpos (WBB y R5) contra gliadina.

El conjugado producido de este modo ahora está preparado para utilizarse con los vehículos conocidos para vacunas como vacuna.

La invención se explica a continuación con más detalle con referencia a los dibujos. A este respecto se muestran ejemplos de realización que no deben limitar el alcance de las reivindicaciones presentadas de ningún modo.

La Figura 1 muestra la reactividad de los anticuerpos monoclonales WB8 y R5 con secuencias parciales de péptidos de gliadina, siendo (a) la secuencia peptídica aa 3-55 de la α -gliadina que con los aminoácidos 31 a 49 se caracteriza como secuencia peptídica tóxica de la α -gliadina y que representa la única secuencia a la que se une WB8. Todas las demás secuencias, la de la α_2 -gliadina (aa 56-88) y la de la γ -gliadina (aa 89-106) se pueden detectar solamente con el anticuerpo R5. En este sentido particularmente el anticuerpo WB8 es adecuado para la determinación de la secuencia peptídica tóxica aa 31-49 de la α -gliadina.

La Figura 2 muestra la distribución endosómica de los péptidos sintéticos en células HT29, observándose que los péptidos tóxicos no alcanzan los endosomas tardíos. Particularmente muestra (A) una co-localización de los péptidos tóxicos (aa 31-49 de la α -gliadina) con LAMP-2, (B) la distribución de las proteínas de HLA de clase II. De forma correspondiente se puede mostrar que los péptidos tóxicos no alcanzan los endosomas tardíos ni las vesículas que contienen HLA de clase II. De este modo no se produce la presentación de antígenos en los endosomas tardíos de los enterocitos y la generación de tolerancia frente a gliadina.

Sin embargo, se puede conseguir una dirección correspondiente con el nuevo péptido de diseño (CTB-secuencia peptídica aa 31-49 de la α -gliadina), que está compuesto de la secuencia peptídica aa 31-49 de la α -gliadina conjugada con el pentámero B de la toxina del cólera, tal como se representa en la Figura 3. Para esto se conjugaron células HT29 durante 2,5 horas con el conjugado asociado químicamente CTB-secuencia peptídica aa 31-49 de la α -gliadina a 37°C. (A) muestra una inmunofluorescencia indirecta con el colorante Alexa Fluor 568 (CTB-secuencia peptídica aa 31-49 de la α -gliadina) y 488 (LAMP-2 y (B) con catepsina D, que son las dos proteínas marcadoras para endosomas tardíos, es decir, marcan los endosomas de los enterocitos). Como se puede observar, la proteína de diseño está colocalizada en estos compartimentos. Esto significa que el pentámero B de la toxina del cólera como proteína de soporte eficaz ha incluido la secuencia peptídica tóxica de la α -gliadina (aa 31-49) en los endosomas tardíos y de este modo se presenta de forma eficaz para una respuesta inmune a las proteínas de MHC de clase II.

Esto prueba que el péptido de diseño, es decir, el conjugado, que está compuesto del pentámero B de la toxina del cólera y la secuencia peptídica tóxica de la α -gliadina (aa 31-49) se puede usar como componente eficaz de una vacuna contra la celiaquía. Como de eficazmente conduce a este respecto el pentámero B de la toxina del cólera la secuencia peptídica tóxica de la α -gliadina (aa 31-49) a los endosomas tardíos muestran (C) y (D) de la Figura 3, ya que la conjugación de la secuencia peptídica tóxica de la α -gliadina (aa 31-49) con el pentámero B de la toxina del cólera conduce a una internalización muy aumentada del péptido tóxico en los endosomas tardíos frente a los péptidos tóxicos no conjugados (C). Además, la eficacia, es decir, la probabilidad de que los péptidos tóxicos alcancen los endosomas tardíos y conduzcan en ese lugar a una respuesta inmune controlada junto con el pentámero B de la toxina del cólera como conjugado está extremadamente aumentada.

5 El ejemplo de realización descrito mediante las figuras prueba que es posible conducir secuencias peptídicas tóxicas de la gliadina, que normalmente no alcanzan los endosomas tardíos de enterocitos y, por tanto, tampoco desencadenan una respuesta inmune controlada con formación de anticuerpos o linfocitos T supresores, como conjugado con una parte de una toxina bacteriana, que funciona como proteína de soporte (adyuvante), a los endosomas tardíos de los enterocitos para presentarse como antígeno a los complejos de MHC de clase II, es decir, se pueden presentar por los enterocitos. De este modo se prueba que la presente invención se puede realizar técnicamente, que existe la posibilidad de usar una vacuna mediante el uso de un péptido de diseño que está compuesto de al menos una parte de una toxina bacteriana y al menos un péptido tóxico conjugado a la misma de gluten o gliadina contra celiaquía y usar la misma para el tratamiento y curación de la celiaquía.

REIVINDICACIONES

1. Vacuna para la aplicación en el tratamiento de celiaquía, que contiene como componente eficaz al menos una secuencia peptídica tóxica no ramificada conjugada con una parte de una toxina bacteriana de una gliadina, siendo la secuencia peptídica tóxica no ramificada Pro Gly Glu Glu Glu Pro Phe Pro Pro Glu Glu Pro Tyr Pro Glu Pro Glu Pro Phe Pro de la α -gliadina y siendo la toxina bacteriana el pentámero B de la toxina del cólera.
- 5 2. Vacuna para el tratamiento de la celiaquía de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la toxina bacteriana sirve como adyuvante para la presentación de antígenos de la secuencia peptídica tóxica en los endosomas tardíos de los enterocitos del epitelio intestinal.
3. Vacuna para el tratamiento de la celiaquía de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizada por que** el tratamiento es una vacunación activa.
- 10 4. Método para la producción de una vacuna para el tratamiento de la celiaquía de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la secuencia peptídica tóxica no ramificada Pro Gly Glu Glu Pro Phe Pro Pro Glu Glu Pro Tyr Pro Glu Pro Glu Pro Phe Pro se asocia con al menos una parte de una toxina bacteriana, siendo la toxina bacteriana el pentámero B de la toxina del cólera.
- 15 5. Método para la producción de una vacuna para el tratamiento de celiaquía de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** una subunidad de la toxina bacteriana, que presenta un efecto tolerogénico de antígenos sin la fracción tóxica de la toxina bacteriana se conjuga con la secuencia peptídica.
6. Uso al menos de la secuencia peptídica tóxica no ramificada Pro Gly Glu Glu Glu Pro Phe Pro Pro Glu Glu Pro Tyr Pro Glu Pro Glu Pro Phe Pro conjugada con el pentámero B de la toxina del cólera para la producción de una vacuna para la activación específica del sistema inmune contra prolaminas.
- 20 7. Péptido de diseño que está compuesto de la secuencia de aminoácidos Pro Gly Glu Glu Glu Pro Phe Pro Pro Glu Glu Pro Tyr Pro Glu Pro Glu Pro Phe Pro de la α -gliadina, que está conjugada con el pentámero B de la toxina del cólera.
8. Péptido de diseño de acuerdo con la reivindicación 7 para la producción de un producto terapéutico o vacuna que se puede utilizar para el tratamiento de la celiaquía.

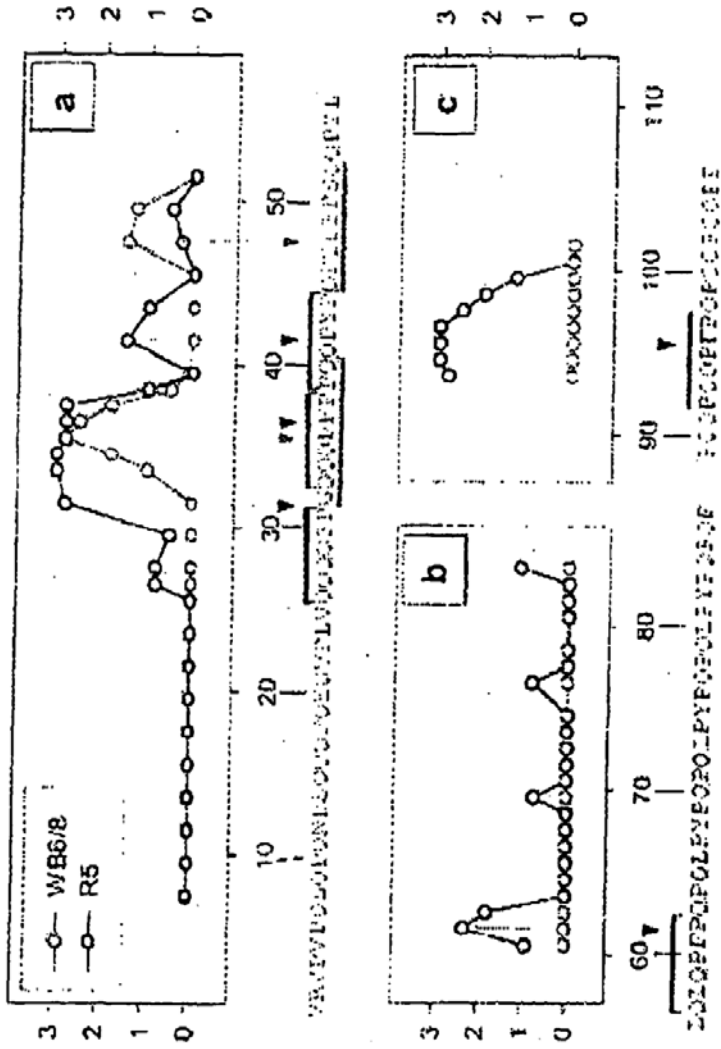


Fig. 1

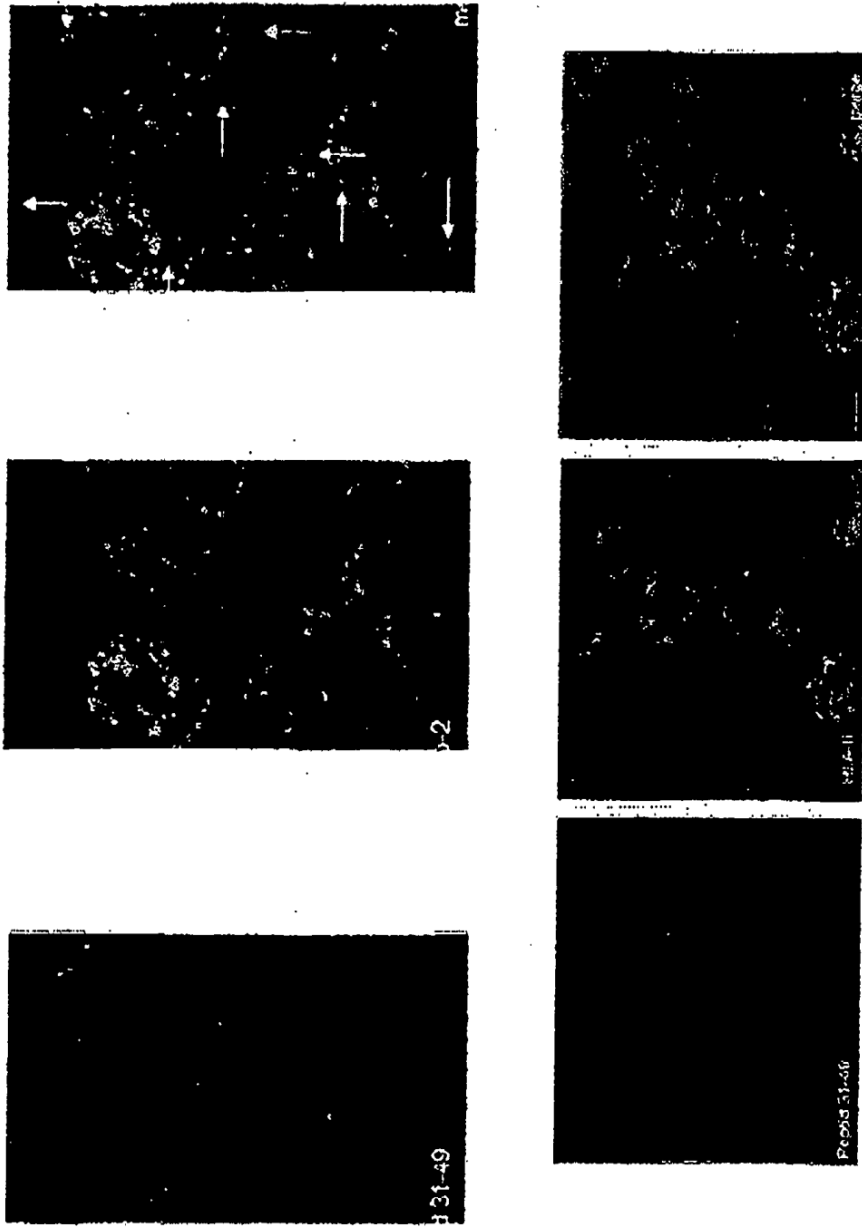


Fig. 2

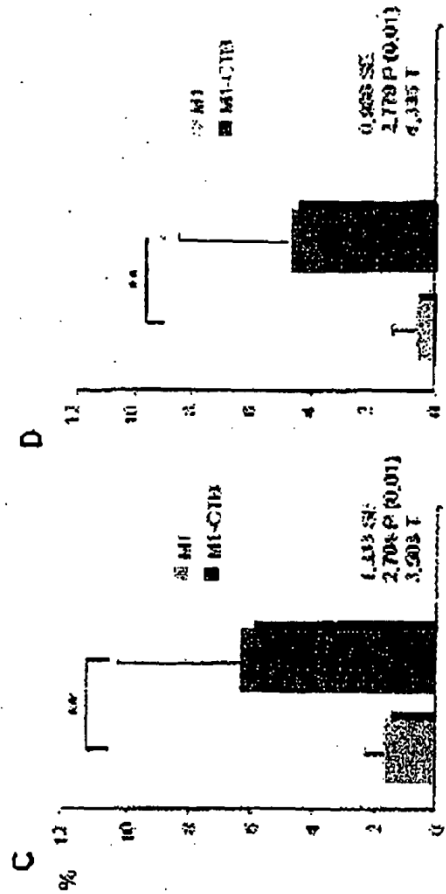
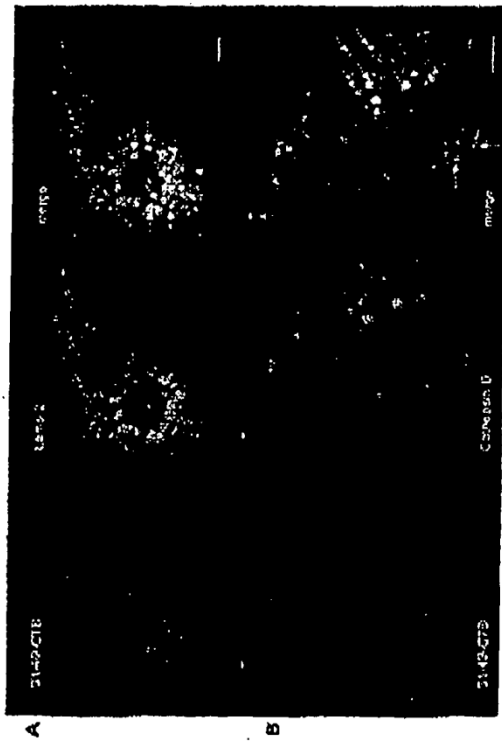


Fig. 3