

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 231**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/16** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C07K 14/62** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 14/435** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2004 E 04733537 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 1625148**

54 Título: **Complejo peptídico**

30 Prioridad:

**21.05.2003 US 472131 P**  
**21.05.2003 EP 03011498**  
**23.03.2004 EP 04006900**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.02.2013**

73 Titular/es:

**BIOTECH TOOLS S.A. (100.0%)**  
**Rue de Ransbeek 230, Bloc 5**  
**1120 Bruxelles, BE**

72 Inventor/es:

**HENOT, FREDERIC;**  
**LEGON, THIERRY;**  
**GALY-FAUROUX, ISABELLE y**  
**DUCHATEAU, JEAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 396 231 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

Complejo peptídico

La presente invención se refiere a complejos de proteínas de choque térmico y péptidos tolerogénicos.

5 Se sabe que los complejos de péptidos junto con las proteínas de choque térmico son adecuados para inducir tolerancia.

El documento US 6,312,711 divulga una composición farmacéutica o alimentaria destinada a tratar patologías asociadas con el rechazo de injertos o una reacción alérgica o autoinmunitaria que comprende la administración de un complejo de una proteína de estrés y epítopos de una estructura antigénica.

10 K. Inouye y col. en Journal of the American Chemical Society 101 (1979), 751 -752 describe la semisíntesis asistida por enzimas de la insulina humana.

El documento US 3,907,765 describe un procedimiento para preparar intermedios octapeptídicos para la insulina humana y los intermedios.

El documento US 4,029,642 describe un procedimiento para la fabricación de insulina humana mediante condensación de un octapéptido B<sub>23-30</sub>.

15 I. Auger y col. en Nature Medicine 2 (1996) 306 -310 describen la unión de péptidos a DnaK y el papel en la artritis reumatoide.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han podido aislar péptidos pequeños que, en complejo con las proteínas de choque térmico, son especialmente útiles para la prevención o el tratamiento de alergias, rechazo de injertos o enfermedades autoinmunitarias.

20 Los inventores identificaron las secuencias siguientes

GFFYTPK (insulina 23-29) SEC ID N° 1

GFFYTPKT(insulina 23-30) SEC ID N° 2

Preferentemente, estas secuencias se preparan mediante hidrólisis de péptidos o proteínas naturales.

25 En un aspecto de la invención, la invención proporciona un complejo que comprende al menos una proteína de choque térmico (HSP) y al menos un péptido seleccionado de las SEC ID N°: 1 a 2.

En una realización preferida, la HSP es una HSP bacteriana y, más preferentemente, una HSP bacteriana de una bacteria saprofita. Las HSP adecuadas se pueden seleccionar de las proteínas de unión hsp40, hsp70, grpE, hsp90, CPN60 (hsp60), FK506; , gp96, ca-Irecticulina, hsp110, grp170 y hsp100, solas o combinadas.

30 De acuerdo con la invención se pueden usar HSP completas o fragmentos de las HSP. Un fragmento preferido es el dominio de unión polipeptídico de la proteína de choque térmico.

35 En un aspecto adicional, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica al menos una HSP y al menos un péptido seleccionado de la SEC ID N° 1 a la SEC ID n° 2. Este ácido nucleico se puede usar para expresar el correspondiente péptido in vitro o en una célula o en un paciente. Para la expresión en un paciente sería necesario un vehículo de liberación génico. Por tanto, el vehículo de liberación génico que comprende al menos el ácido nucleico de la invención también forma parte de la invención.

Dicho vehículo de liberación génico transfectaría una célula. Por tanto, una célula aislada transfectada por al menos un vehículo de liberación génico de la invención también forma parte de la invención.

40 El complejo o el vehículo de liberación génico se podrían administrar a un paciente que lo necesite. Por tanto, una composición farmacéutica o alimentaria que comprende el complejo o el vehículo de liberación génico de la presente invención también es un aspecto de la invención.

El complejo de la presente invención se puede preparar mediante hidrólisis in vitro de al menos una proteína con al menos una proteasa para obtener fragmentos hidrolizados y combinar in vitro los fragmentos hidrolizados con al menos una proteína de choque térmico para obtener al menos un complejo.

45 Como alternativa, el complejo de la presente invención se puede preparar sintetizando los péptidos identificados como la SEC ID N° 1 a la SEC ID N° 2 y combinando el péptido sintetizado con al menos una proteína de choque térmico. Procedimientos adecuados se describen en Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149.

En una realización preferida, el complejo péptido-HSP se forma en condiciones reductoras en un tampón que contiene al menos un agente reductor. Agentes reductores adecuados son, por ejemplo, ditioneitol y beta-mercaptoetanol. Las concentraciones más preferidas del agente reductor son de 0,001 mM a 700 mM, y, más

preferentemente, entre 0,1 mM y 50 mM.

5 En otra realización, el complejo péptido-HSP se forma en condiciones oxidantes en un tampón que contiene al menos un agente oxidante. Un agente oxidante adecuado es, por ejemplo, peróxido de hidrógeno. Las concentraciones más preferidas del agente oxidante son de 0,1 mM a 100 mM, y, más preferentemente, entre 0,5 mM y 20 mM.

En otra realización preferida, el complejo péptido-HSP se forma en un tampón que no contiene ni un agente reductor ni un agente oxidante.

10 Un aspecto adicional de la invención es usar el complejo de la presente invención como vehículo para la liberación de moléculas biológicamente activas. Los péptidos se pueden unir a moléculas biológicamente activas, por ejemplo ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, lípidos, fármacos y se pueden después combinar con la proteína de choque térmico.

El complejo de la presente invención o el vehículo de liberación génico de la invención son útiles para la prevención o tratamiento de la alergia, el rechazo de injertos o enfermedades autoinmunitarias.

15 El complejo de la presente invención también se puede usar para la inducción de una respuesta celular in vitro que comprende células capaces de secretar citocinas inmunosupresoras tras la exposición a al menos un antígeno que comprende al menos una secuencia seleccionada de la SEC ID N° 1 a SEC ID N° 2.

El complejo de la invención es, por ejemplo, útil como composición diagnóstica o en un procedimiento para el diagnóstico in vitro de una enfermedad que comprende las etapas de

- 20
- poner en contacto un fluido biológico de un animal que contiene proteínas con la composición diagnóstica de la invención.
  - medir la unión de dichas proteínas con dicha composición diagnóstica

en el que la unión indica una enfermedad del animal.

25 Otro uso del complejo de la invención es proporcionar anticuerpos específicos para al menos un complejo de la presente invención. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o fragmentos de los mismos, tales como, entre otros, Fab y F(ab')<sub>2</sub>.

El anticuerpo se puede usar para la prevención o tratamiento de alergias, rechazo de injertos o enfermedad autoinmunitaria. Asimismo, el anticuerpo se puede usar en un procedimiento para el diagnóstico in vitro de una enfermedad tal como alergia, rechazo de injertos o enfermedad autoinmunitaria.

30 Como alternativa a la administración directa del complejo péptido-proteína de choque térmico, se pueden administrar uno o más constructos polipeptídicos que codifican la proteína de choque térmico y el péptido diana en forma de expresión. Los constructos polinucleotídicos que se pueden expresar se introducen en las células usando procedimientos in vivo o in vitro.

Las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos de HSP y las proteínas diana están en general disponibles en bases de datos de secuencias tales como GenBank y Swiss-Prot.

35 Las secuencias de ADN se pueden amplificar a partir de ADN genómico o ADNc mediante PCR usando cebadores específicos diseñados a partir de secuencias conocidas. "PCR" se refiere a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa como se describe en Saiki, y col., Nature 324:163 (1986); y Scharf y col., Science (1986) 233:1076-1078; y la patente de EE.UU. n° 4,683,195; y la patente de EE.UU. n° 4,683,202. Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de cualquier longitud deseada puede generarse mediante PCR. La PCR se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, el uso de cicladador térmico y una ADN polimerasa termorresistente.

40

Los procedimientos de incorporar los ácidos nucleicos concretos en vectores de expresión son bien conocidos en la técnica, pero se describen con detalle en, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Vols. 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989) o *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Asubel y col. ed. Green Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987). Para construir un polinucleótido de expresión una región codificadora de la proteína de choque térmico y el péptido se prepara como se ha tratado anteriormente y se inserta en un vector de expresión de mamífero unido operativamente a un promotor adecuado tal como el promotor SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV) y el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV). El constructo resultante se puede usar después como vacuna para inmunización genética. El(los) polímero(s) de ácido nucleico también se podrían clonar en un vector viral. Los vectores adecuados incluyen, entre otros, vectores retrovirales, vectores adenovirus, vectores del virus vacunal, vectores del virus de la viruela y vectores asociados con adenovirus.

45

50

Como alternativa, un polinucleótido que contiene una secuencia que codifica la HSP y un gen que codifica un péptido deseado se puede introducir respectivamente en dos vectores diferentes cada uno capaz de coexistir y

replicarse en el mismo huésped.

El procedimiento de transformación usado depende del huésped que se va a transformar. En la técnica se conocen procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación en fosfato cálcico, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, formación de complejos del(los) polinucleótido(s) en liposomas y microinyección del ADN en los núcleos.

En la técnica se conocen numerosas líneas celulares de mamífero como huéspedes para expresión e incluyen, entre otras, muchas líneas de células inmortalizadas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), además de otras.

## Ejemplos

### *Preparación de proteínas*

Antes de las digestiones enzimáticas, las proteínas de interés se lavan extensamente con agua mediante centrifugación a través de un ensamblaje Centricon YM-03 o YM-10 para eliminar cualquier material de peso molecular bajo ligeramente asociado.

### *Digestión con tripsina*

De uno a cinco miligramos de la proteína de interés se disuelven en de 1 a 5 ml de tampón fosfato 40 mM pH 8,0 (concentración final de 1 mg/ml). La solución se incuba durante 10 minutos a 100 °C. La solución se enfría rápidamente a 4 °C y se añaden de 18 a 90 µl de β-mercaptoetanol (1,8 % v/v). La solución resultante se incuba a 37 °C durante 10 minutos y de 20 a 100 µl de solución de tripsina (10 mg/ml de Tris•HCl 40 mM pH 8,0; concentración final ratio (p/p) de proteasa/proteína de 1:100) se añaden a la solución proteica.

La solución resultante se incuba a 37 °C durante seis horas. La solución se centrifuga después a través de un ensamblaje Centricon YM-10 para eliminar los restos de proteína y tripsina.

### *Preparación del complejo DnaK.ATP*

Se añaden 25 µl de la solución de ATPn (4,5 mg/ml de tampón 1 (HEPES 25 mM, KCl 10 mM, cloruro de magnesio 3 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, pH 7,5) a 400 µl de DnaK (2 mg/ml de tampón 1). La solución se incuba a 20 °C durante una hora y después se centrifuga a través de un ensamblaje Centricon YM-10 para cualquier material de peso molecular bajo ligeramente asociado con DnaK. La fracción de peso molecular alto se elimina y se lava exhaustivamente con tampón 1 mediante ultrafiltración usando un Centricon YM-10.

### *Producción in vitro de complejos proteína de estrés-péptido. Aislamiento de los péptidos unidos*

La digestión con tripsina ultrafiltrada se mezcla con DnaK pretratado con ATP para dar una proporción de DnaK:péptidos de 1:1 (p:p). Después se añade ADP (concentración final de 1 mM) y la mezcla se incuba durante al menos una hora a 25 °C en el tampón 1 adecuado. Las preparaciones se centrifugan a través de un ensamblaje Centricon YM-10 para eliminar el resto de los péptidos sin unir. Las fracciones de peso molecular alto y bajo se recuperan. La fracción de peso molecular alto que contiene complejos DnaK-péptido se lava exhaustivamente con tampón 1 que contiene ADP 1 mM mediante ultrafiltración usando un Centricon YM-10. Los péptidos unidos se eluyen mediante incubación de los complejos HSP-péptido en un tampón a pH bajo. Una última ultrafiltración usando un Centricon YM-10 elimina la fracción de peso molecular alto.

### *Análisis por HPLC*

Las fracciones de peso molecular bajo resultantes se fraccionan mediante cromatografía de líquidos de presión alta (HPLC) de fase inversa usando una columna de fase inversa Vydac C18 (HP32, 201TP52 C18, 250/2,1 mm, 5 µm (disponible en Vydac)). La elución de los péptidos se puede seguir a una DO de 214 nm y a una DO de 280 nm.

### *Estudios biológicos*

Es un modelo en el que ratones NOD (No Obesos Diabéticos) son tratados tras el inicio de la enfermedad autoinmunitaria.

Tras el inicio de los primeros signos de diabetes, 500 islotes de Langerhans normales de ratones NOD jóvenes se injertan bajo la cápsula renal de los animales diabéticos. Después, diariamente se controla la glicosuria y la glucemia. Se considera que los ratones son diabéticos cuando se detecta una glucosuria y la glucemia supera los 12 mmol/l (2,16 g/l) durante dos días consecutivos. El primer día de hiperglucemia se considera como el inicio de la recaída.

### *Tratamiento de los ratones*

Todos los tratamientos se iniciaron el primer día tras el inicio de la enfermedad, es decir el día antes del trasplante. Se trató a los ratones mediante inyecciones sublinguales, una dosis cada dos días, hasta alcanzar las dosis totales:

Grupo 1: Péptidos; (1 µg) + HSP (1 µg)

Grupo 2: Péptidos (1 µg)

5 Grupo 3: HSP (1 µg)

Grupo 4: Tampón

#### Resultados clínicos

10 En ratones NOD no tratados, el retraso medio antes de la recaída es de aproximadamente 11 a 12 días. Considerando que un retraso que supera los 14 días es el resultado de un efecto terapéutico, se advierte que, en el grupo tratado con complejos, la proporción de los retrasos que superan los 14 días es de 4/7 (57 %). En el otro grupo, tratados con péptidos, tampón o HSP solo, la proporción es de 2/6 (33 %). Por tanto, existe un efecto terapéutico de la combinación entre una HSP y los péptidos administrados oralmente.

15 Los ARNm de interferón-γ y de la IL-4 se han analizado mediante amplificación por PCR en varios tejidos: el injerto, el bazo y, como control, el riñón. Los resultados se expresan como proporciones de la cantidad de ARNm de interferón-γ frente a la cantidad de ARNm. No se detectó IL-4 en ninguna muestra, mientras que se encontró interferón-γ en el bazo a niveles que eran bastante similares en todos los grupos.

20 En contraste, se observaron algunas diferencias interesantes en los islotes injertados. El nivel de interferón-γ fue significativamente menor en el grupo tratado con los complejos péptidos-HSP. Por tanto, es posible que los complejos hubieran inducido en los linfocitos T reguladores de las placas de Peyer que, tras su migración en el injerto, hubieran inhibido los linfocitos TH1 que contribuyen a la destrucción de los islotes injertados secretando citocinas tales como interferón-γ.

#### Figuras

Figura 1.1: Péptidos (PM < o = 10 kDa) generados mediante digestión con tripsina de Derp1 (no conforme a la invención).

25 Figura 1.2: Péptidos no unidos (PM < o = 10 kDa) a DnaK, de la digestión con tripsina de Derp1. (no conforme a la invención):

Figura 1.3: Péptidos de la digestión con tripsina de Derp1 (PM < o = 10 kDa) que estaban unidos a DnaK (no conforme a la invención).

Figura 2.1: Péptidos (PM < o = 10 kDa) generados mediante digestión con tripsina de la insulina.

30 Figura 2.2: Péptidos no unidos (PM < o = 10 kDa) a DnaK, de la digestión con tripsina de insulina.

Figura 2.3: Péptidos de la digestión con tripsina de insulina (PM < o = 10 kDa) que estaban unidos a DnaK.

Figura 3.1: Proporción de retrasos antes de la recaída superior a 14 días.

Figura 3.2: Expresión de ARNm de IFN-γ en los islotes injertados. A: Grupo 2 (péptidos); B: grupo 1 (HSP + péptidos); C: Tampón

35

**REIVINDICACIONES**

1. Un complejo que comprende al menos una proteína de choque térmico (HSP) y al menos un péptido  
GFFYTPK (insulina 23-29) SEC ID N° 1  
GFFYTPKT(insulina 23-30) SEC ID N° 2
- 5 2. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la HSP es una HSP bacteriana.
3. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la HSP se selecciona de hsp40, hsp70, grpE, hsp90, CPN60 (hsp60), proteínas de unión FK506, gp96, calreticulina, hsp110, grp170 y hsp100.
4. El complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína de choque térmico es el dominio de unión polipeptídico de una proteína de choque térmico.
- 10 5. Un ácido nucleico que codifica al menos una HSP y al menos un péptido seleccionado de la SEC ID N° 1 o 2.
6. Un vehículo de liberación génico que comprende al menos un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Una célula aislada transfectada con al menos un vehículo de liberación génico de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Una composición farmacéutica o alimentaria que comprende el complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un vehículo de liberación génico de acuerdo con la reivindicación 6.
- 15 9. Un procedimiento para preparar un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de:
- hidrolizar in vitro al menos una proteína con una proteasa para obtener fragmentos hidrolizados que tienen las SEC ID N° 1 o 2
  - combinar in-vitro los fragmentos hidrolizados con al menos una proteína de choque térmico para obtener un
- 20 complejo.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que los fragmentos hidrolizados no unidos se separan del complejo.
11. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el vehículo de liberación génico de la reivindicación 6 para usar en la prevención o tratamiento de la alergia, el rechazo de injertos o enfermedades autoinmunitarias.
- 25 12. Uso del complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la inducción in vitro de una respuesta celular que comprende células que secretan citocinas inmunosupresoras tras la exposición a al menos un antígeno que comprende al menos la SEC ID N° 1 o 2.

30

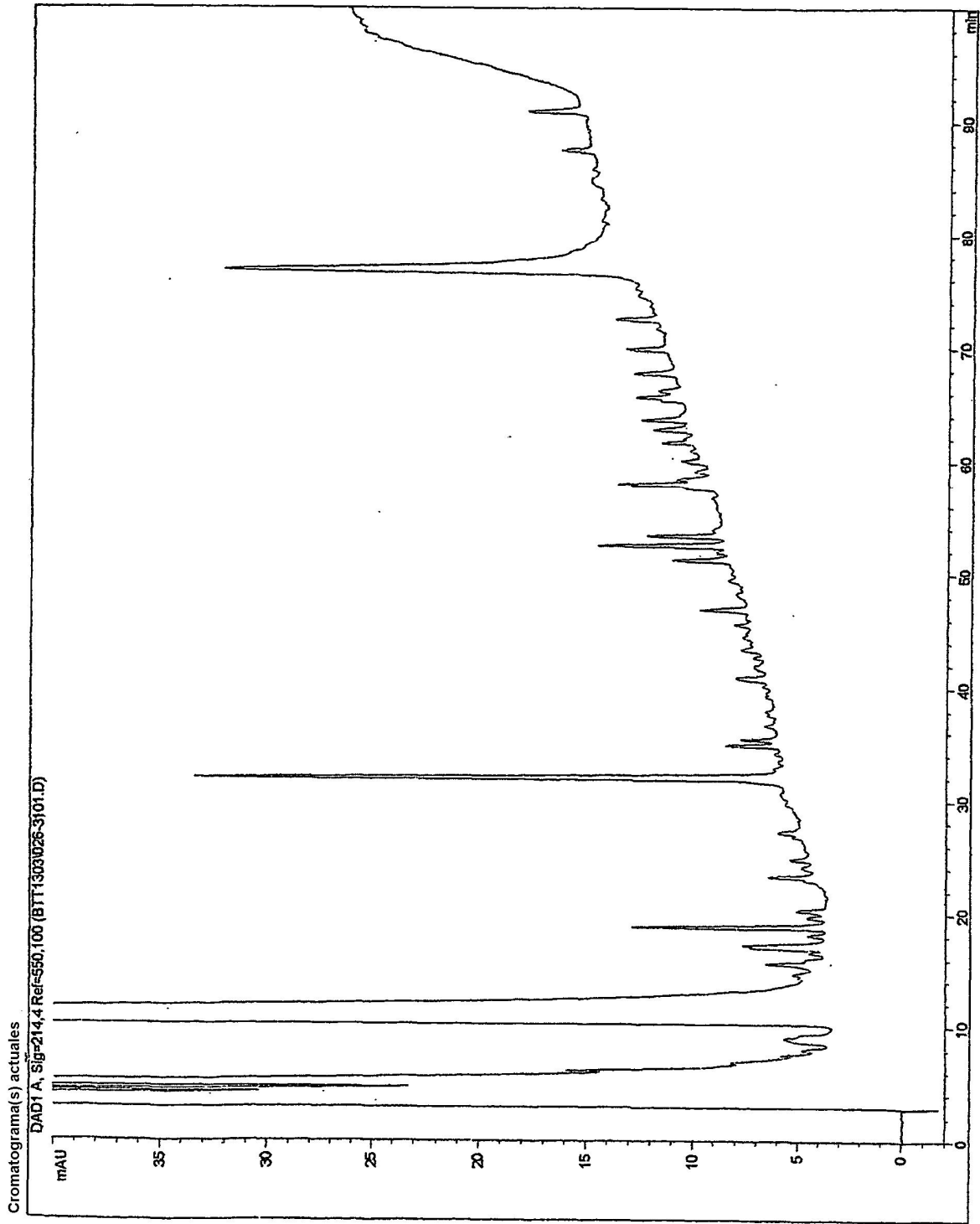
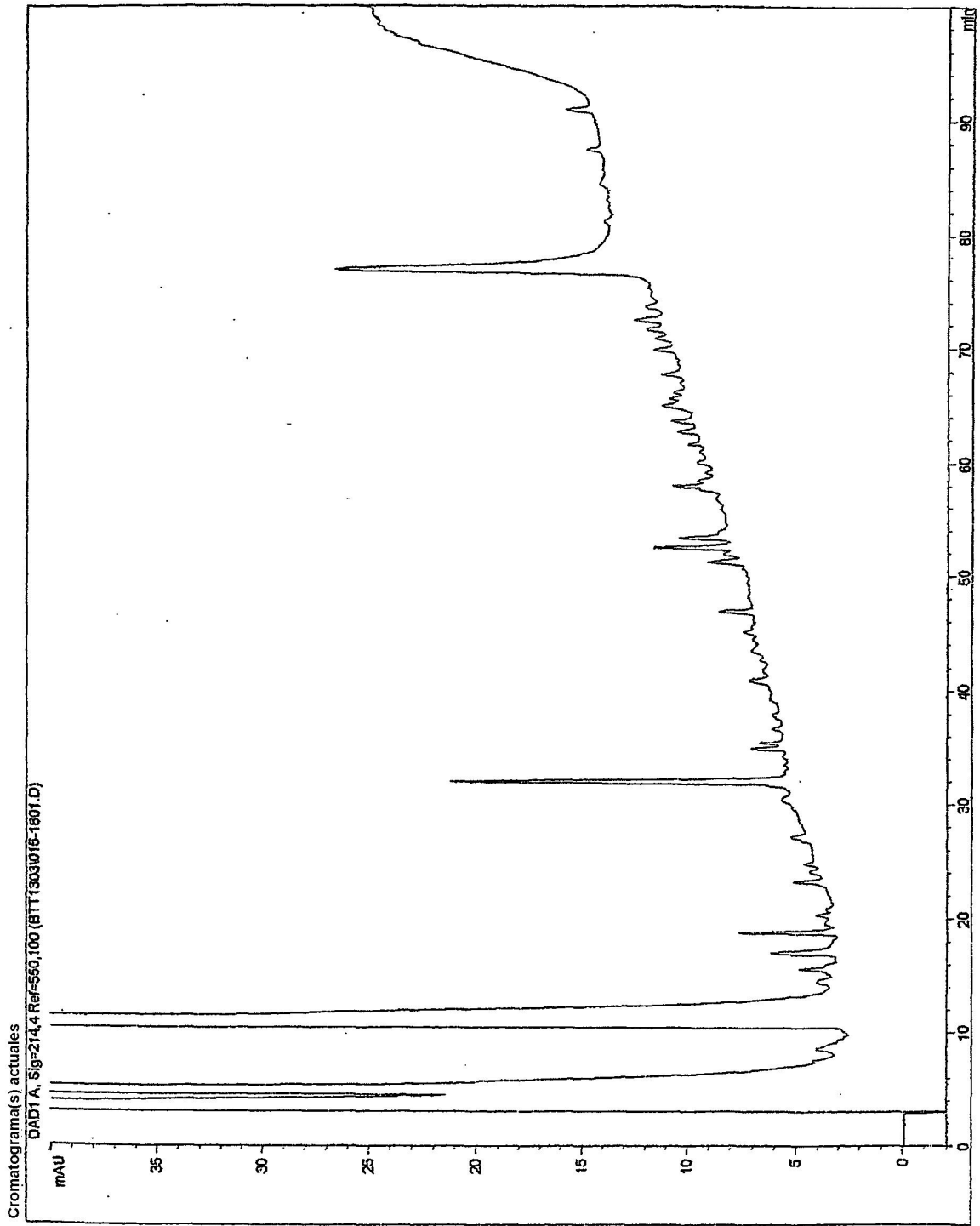


Fig.1.1



**Fig.1.2**



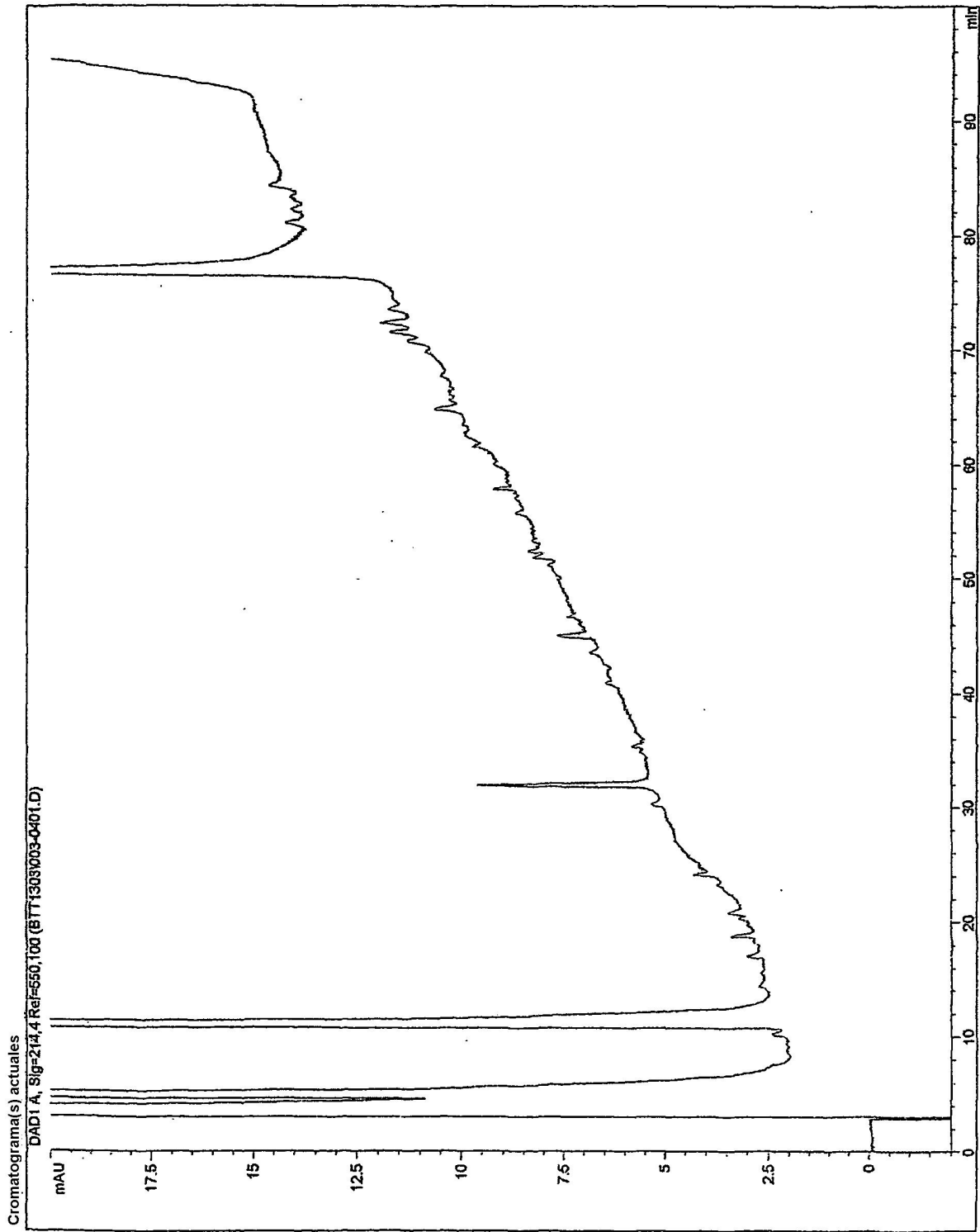
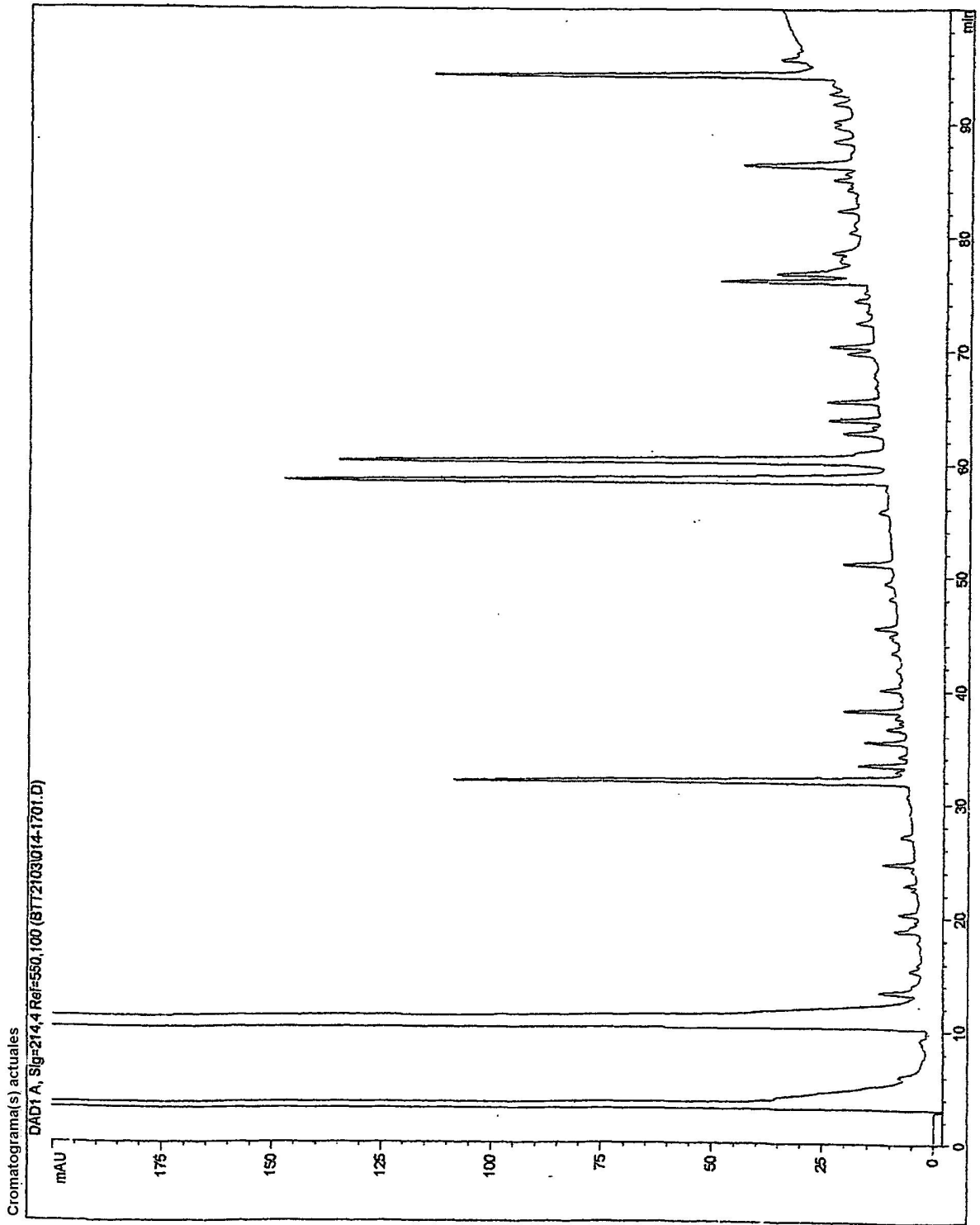


Fig.1.3



**Fig.2.1**

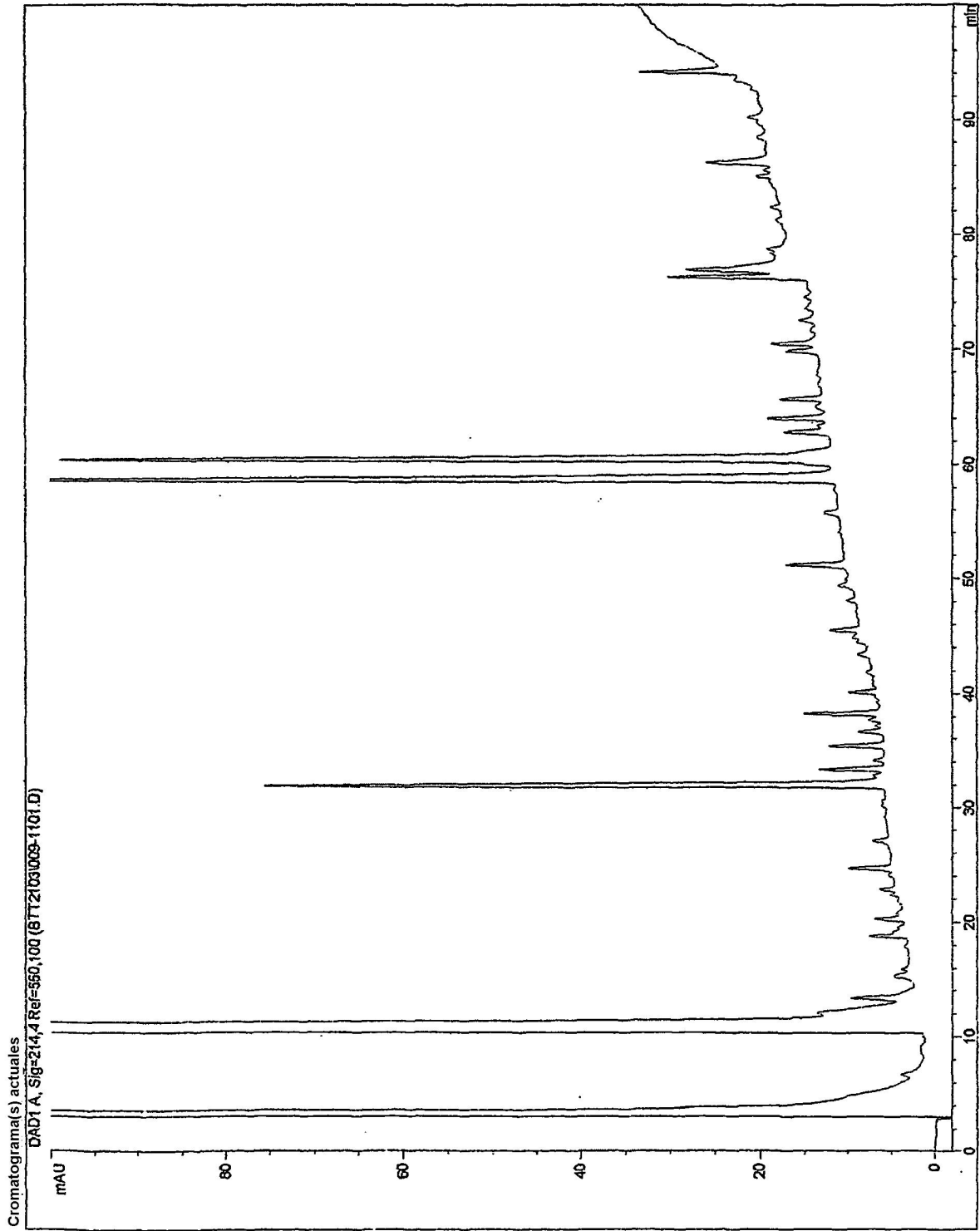


Fig.2.2

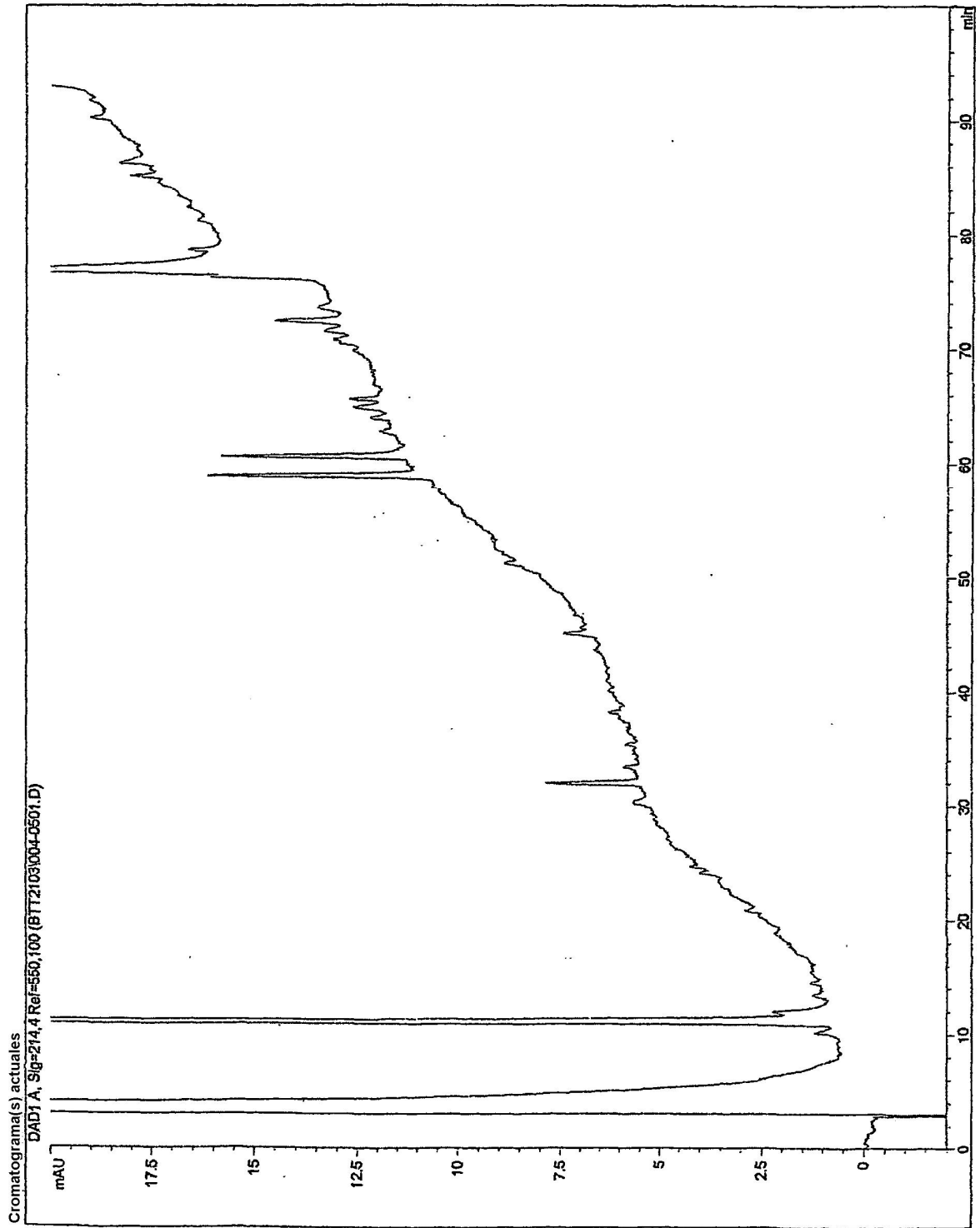
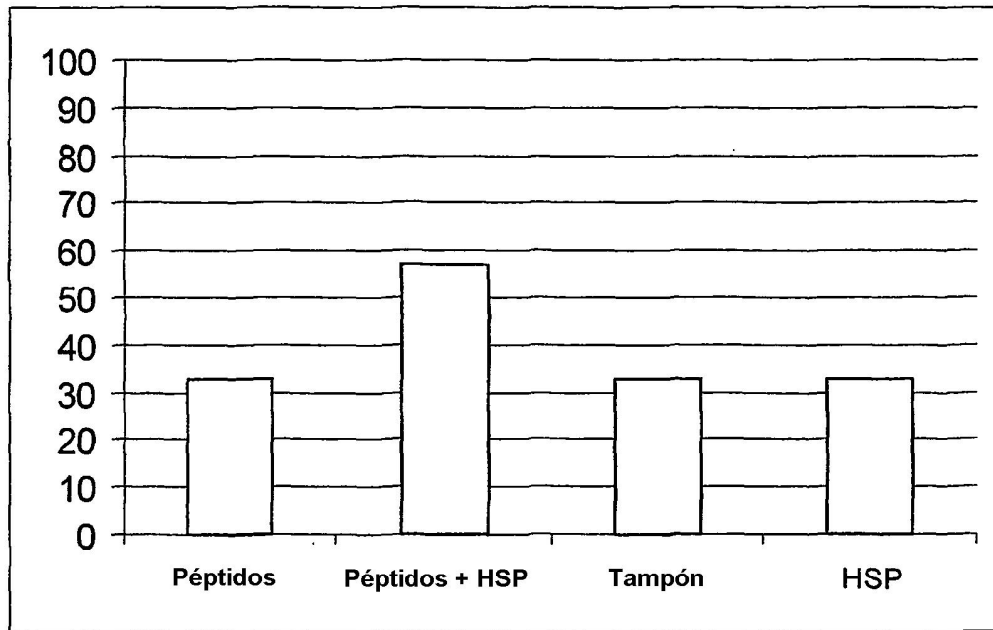
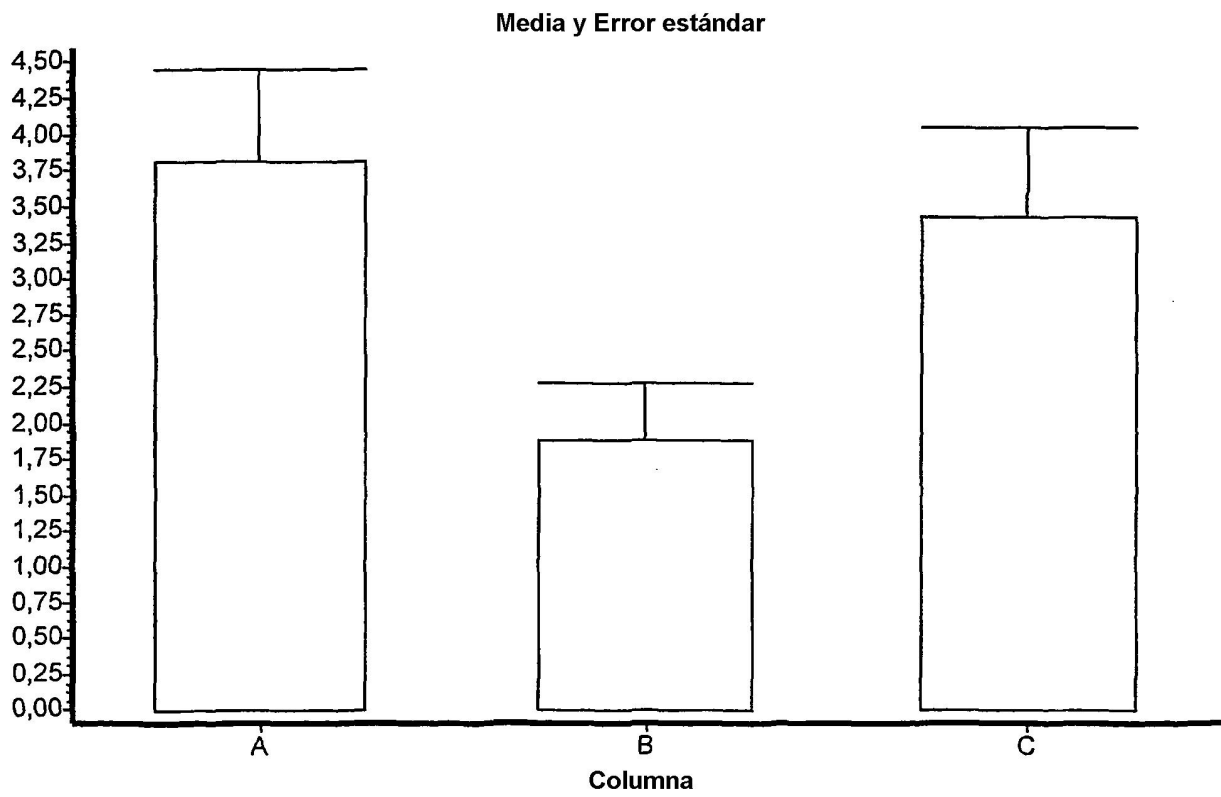


Fig.2.3



**Fig.3.1**



**Fig.3.2**