

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 417**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 35/12** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C12N 5/02** (2006.01)

**A61P 25/18** (2006.01)

**A61P 25/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2004 E 04801601 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1701730**

54 Título: **Composiciones para su uso en el tratamiento de trastorno psiquiátricos**

30 Prioridad:

**09.12.2003 US 527763 P**

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

**19.12.2013**

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,  
LTD. (100.0%)  
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.  
BOX 95  
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**EISENBACH-SCHWARTZ, MICHAL y  
KIPNIS, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

**LAHIDALGA DE CAREAGA, José Luis**

ES 2 435 417 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**

Composiciones para su uso en el tratamiento de trastorno psiquiátricos

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente idea inventiva se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento de trastorno psiquiátricos y, en particular, al copolímero 1 y péptidos y polipéptidos relacionados y células T tratadas para uso en dichas composiciones y métodos.

10 Abreviaturas: AMPH: D-anfetamina sulfato; ASR: respuesta de sobresalto acústico; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; CBC: criterio de comportamiento de corte, CFA: adyuvante de Freund completo; CNS: sistema nervioso central; COP-1: copolímero 1; EPM: laberinto en cruz elevado; MBP: proteína básica de mielina; MK-801: (+) maleato de dizocilpina; MWM: laberinto de agua de Morris; PNS: sistema nervioso periférico; PPI: inhibición de prepulso; PTSD: trastorno por estrés post-traumático; SCID: deficiencia inmune combinada grave; Teff: células T efectoras; Treg: células T reguladoras; WT: tipo silvestre.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

20 Los trastornos mentales son ahora conocidos para caracterizarse no solamente por las anormalidades del comportamiento sino también por manifestaciones somáticas. En varios trastornos psiquiátricos, se ha identificado un componente neurodegenerativo. En la esquizofrenia, a modo de ejemplo, existe pérdida de volumen hipocampal y muerte de neuronas hipocampales (Lieberman et al, 2001; Velakoulis et al, 1999), así como anormalidades moleculares y anatómicas de neuronas excitatorias en la corteza prefrontal dorsolateral (McCullumsmith et al., 2002; Lewis et al., 1999). La etiología y la patogénesis de la esquizofrenia son todavía poco conocidas a fondo, aunque existe un acuerdo general de que la predisposición genética es un factor significativo (Brzustowicz et al., 2002; Falkai et al., 2003).

30 Los síntomas de la esquizofrenia pueden clasificarse como positivo, negativo y cognitivo, utilizando escalas de clasificación estándar tales como la escala de síntomas positivos y negativos (Javitt et al., 1999). Los síntomas positivos incluyen alucinaciones, agitación y paranoia; los síntomas negativos reflejan la pérdida de la actitud interpersonal e interés normal en el medio ambiente; y los síntomas cognitivos incluyen la desorganización conceptual y la desorientación (Javitt et al., 1999). Mientras los síntomas positivos suelen responder bien a los antagonistas receptores de dopamina (que, no obstante, tienen efectos secundarios significativos y devastadores tales como inducción de la enfermedad de Parkinson), los síntomas negativos y los déficit cognitivos suelen persistir, dando lugar a una morbilidad crónica y a un resultado deficiente a largo plazo (Rummel et al., 2003).

40 Hasta bastante recientemente, las respuestas adaptativas principales del cuerpo humano a los estímulos estresantes eran atribuidas al eje hipotalámico, pituitario-adrenocortical (de Kloet, 2003). Una asociación entre el sistema inmune y el comportamiento cognitivo, ansiedad y disfunción sensorimotora observadas en trastornos mentales o estrés psicológico agudo se han considerado, por lo general, improbables o de pequeña importancia, a pesar de un cuerpo creciente de evidencia que indica que dicha asociación no solamente existe, sino que podría ser una consideración importante en el diseño de la terapia (Raison et al., 2001).

45 Contrariamente a la creencia largo tiempo mantenida, el efecto del sistema inmune sobre el sistema nervioso puede ser también beneficioso. Recientes estudios han demostrado que el sistema nervioso central CNS dañado puede beneficiarse de la presencia de una inmunidad adaptativa bien controlada (Schwartz et al., 1999a, 1999b; Wekerle, 2002). Las células T específicamente reactivas a las proteínas, que residen en el emplazamiento de la supervivencia neuronal post-lesión promotora de agresiones y restablecimiento de función (Hauben et al., 2000; Mizrahi, 2002). Fue demostrado, además, que esta respuesta beneficiosa post-lesión de las células T autoinmunitarias a las proteínas específicas del emplazamiento es evocada espontáneamente (Yoles et al., 2001; Kipnis et al., 2002).

50 Anormalidades inmunes han sido informadas en pacientes con esquizofrenia y han existido numerosos intentos de encontrar una relación entre la esquizofrenia y la enfermedad autoinmunitaria. Sin embargo, los estudios, durante los 60 últimos años, que tenían como objetivo identificar la esquizofrenia como una enfermedad autoinmunitaria han sido hasta ahora insatisfactorios (Amital y Shoenfeld, 1993 y Rothermundt et al. 2001).

60 Un vínculo entre el mantenimiento del cerebro y la inmunidad adaptativa periférica fue sugerido por los recientes hallazgos de que la capacidad para superar las condiciones neurodegenerativas depende de las células T CD4<sup>+</sup> (Moalem et al., 1999; Kipnis et al., 2001; Yoles et al., 2001). El efecto beneficioso de las células T CD4<sup>+</sup> en la eliminación de mediadores de degeneración fue encontrada específica para antígenos residentes en el sitio de la lesión. Las células T reguladoras (Treg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, que se presentan naturalmente, suelen suprimir la capacidad para solicitar espontáneamente esta respuesta neuroprotectora, que es susceptible de usarse para reforzar por debilitamiento de Treg (Kipnis et al., 2002) o mediante una vacunación bien controlada con autoantígenos o con agonistas débiles de autoantígenos (Kipnis et al., 2000) tal como copolímero 1.

El copolímero 1, también denominado Cop 1, es un copolímero sintético no patógeno aleatorio, una mezcla heterogénea de polipéptidos que contienen los cuatro aminoácidos ácido L-glutámico (E), L-alanina (A), L-tirosina (Y) y L-lisina (K) en una relación aproximada de 1,5: 4,8: 1:3,6, pero sin ninguna secuencia uniforme. Aunque este modo de acción permanece controvertido, el copolímero 1 Cop 1 ayuda claramente a retardar la progresión de la

5 esterosis múltiple humana (MS) y la condición autoinmunitaria relacionada estudiada en ratones, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE, Teitelbaum et al. 1997). Una forma de copolímero Cop 1, conocida como acetato de gratiramero ha sido autorizada en varios países para el tratamiento de esclerosis múltiple bajo la marca registrada Copaxone® (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Petach Tikva, Israel).

10 Vacunación con copolímero Cop 1 o células T activadas con Cop 1 ha sido mostrada por los presentes inventores para reforzar la autoinmunidad protectora, después de la agresión del sistema nervioso central (CNS) traumático, con lo que se reduce todavía más el daño inducido por lesión y pueden proteger, además, a las células del CNS contra la toxicidad del glutamato. Se hace referencia a las solicitudes de patentes internacionales publicadas del

15 solicitante, números WO 01/52878, WO 01/93893, WO 2005/046719 y US 2002/0037848, que dan a conocer que el copolímero Cop 1, péptidos y polipéptidos relacionados con Cop 1 y células T activadas impiden o inhiben la degeneración neuronal y promueven la regeneración nerviosa en el CNS o en el sistema nervioso periférico (PNS) y protegen a las células del CNS contra la toxicidad del glutamato.

El inventor principal, Prof. Schwartz y sus colegas han demostrado que el copolímero 1 Cop 1 actúa como un antígeno de baja afinidad que activa una amplia gama de células T auto-reactivas, que da lugar a una autoinmunidad neuroprotectora que es efectiva contra la degeneración de la materia blanca y de la materia gris del sistema nervioso central CNS (Kipnis and Schwartz, 2002). El efecto neuroprotector de la vacunación del copolímero Cop 1 fue demostrado, por los inventores, en modelos animales de trastornos neurológicos agudos y crónicos, tales como lesión del nervio óptico (Kipnis et al, 2000), trauma de la cabeza (Kipnis et al., 2003), glaucoma (Schori et al., 2001), esclerosis lateral amiotrófica (Angelov et al., 2003) y en las solicitudes de patentes del solicitante WO

20 01/52878, WO 01/93893 y WO 03/047500.

Se hace referencia a la solicitud internacional copendiente del mismo solicitante titulada "Composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos psiquiátricos", presentada en la misma fecha en la Oficina de Patentes de Israel/Oficina receptora, en donde está excluida explícitamente la presente invención.

La citación de cualquier documento en esta solicitud de patente no está prevista como una admisión de que dicho documento sea una técnica anterior pertinente o material considerado para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier declaración en cuanto al contenido o una fecha de cualquier

35 documento está basada en la información disponible para el solicitante en el momento de la presentación y no constituye una admisión en cuanto a la corrección de dicha declaración.

## SUMARIO DE LA INVENCION

40 La presente invención se refiere a las formas de realización según se define en las reivindicaciones. Se ha encontrado ahora, en conformidad con la presente idea inventiva, que la vacunación con el copolímero 1 puede disminuir las anomalías del comportamiento y mejorar la función cognitiva en los ratones a partir del desequilibrio de la dopamina inducido por MK-801 o anfetamina.

45 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, preferentemente una vacuna, para uso en el tratamiento, de trastornos, enfermedades o condiciones patológicas psiquiátricas que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un agente seleccionado de entre el grupo constituido por (i) copolímero 1, (ii) un péptido relacionado con el copolímero 1, (iii) un polipéptido relacionado con el copolímero 1 y (iv) células T tratadas con (i), (ii) o (iii), en donde el trastorno, enfermedad o condición patológica psiquiátrica se selecciona de

50 entre un trastorno por estrés post-traumático (PTSD), una depresión, un trastorno bipolar y la esquizofrenia.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente seleccionado de entre el grupo constituido por (i) copolímero 1, (ii) un péptido relacionado con el copolímero 1, (iii) un polipéptido relacionado con el copolímero 1 y (iv) células T tratadas con (i), (ii) o (iii) para la preparación de una composición farmacéutica, preferentemente una

55 vacuna, para el tratamiento de trastornos, enfermedades o condiciones patológicas psiquiátricas, en donde el trastorno, enfermedad o condición patológica psiquiátrica se selecciona de entre el trastorno por extremidad post-traumático (PTSD), una depresión, un trastorno bipolar y la esquizofrenia.

Los trastornos, enfermedades o condiciones patológicas psiquiátricas, que se tratan según la idea inventiva, incluye: (i) trastorno por estrés post-traumático (PTSD), (ii) una depresión, trastornos bipolares y (iii) esquizofrenia y trastornos relacionados tales como breve trastorno psicótico, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo y trastorno delirante;

En la forma de realización más preferida, el paciente que sufre de un trastorno, enfermedad o condición patológica psiquiátrica es inmunizado con copolímero 1.

Según la idea inventiva, el copolímero 1 tratará también la disfunción cognitiva causada por la esquizofrenia o por un trastorno bipolar.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 Las Figuras 1a-1e representan el restablecimiento de la inhibición prepulso insuficiente (PPI) de la respuesta de reflejo de sobresalto acústico (ASR) en ratones C57BL/6J por inmunización del copolímero Cop 1, los ratones C57BL/6J fueron inmunizados con Cop 1/CFA o con PBS/CFA. Ratones, sin previa experiencia en el tratamiento, fueron utilizados como controles. Una semana más tarde los ratones inmunizados fueron inyectados con MK-801 (0,1 mg/kg, i.p.; 1b, 1c) o con sulfato de D-anfetamina (AMPH) (2,5 mg/kg i.p.; 1d y 1c). La inhibición PPI de la  
10 respuesta ASR, en ratones de control, sirvió como una línea base de referencia (1a). Los ratones inmunizados con el excipiente, inyectados con MK-801, mostraron una PPI notablemente perturbada (1b). En los ratones inmunizados con Cop 1/CFA, el valor de PPI fue aumentado, de forma monotonía, como una función de la intensidad prepulso (1c;  $F(1,9) = 14,05$ ,  $P < 0,005$ ). Los ratones inmunizados con el excipiente, inyectados con AMPH, mostraron también un valor de PPI notablemente perturbado (1d). En los ratones inmunizados con Cop 1/CFA, el valor de PPI fue incrementado de forma monotonía como una función del estímulo de baja intensidad o prepulso (4e;  $F(1,10) = 8,6$ ,  $P < 0,15$ ).

Las Figuras 2a-2f muestran que la actividad cognitiva es afectada por la integridad del sistema inmunitario. Los ratones de tipo silvestre (WT) de la cepa BALB/c/OLA y los ratones SCID fueron controlados mientras se intentaba una tarea de memoria de aprendizaje espacial en la prueba de comportamiento de laberinto de agua de Morris (MWM) (2a-2c) comparación de WT y ratones SCID. Durante la adquisición (2a), la extinción (2b) y las fases de reversión (2c) de la tarea, los ratones de SCID tardaron bastante más que los ratones WT en adquirir el aprendizaje espacial necesario (ANOVA de 3 vías, medidas repetidas: grupos  $df(1,20)$ ,  $F = 23,0$ ,  $P < 0,0001$ ; ensayos  $df(3,60)$ ,  $F = 10,995$ ,  $P < 0,00001$ ; días,  $df(1,60)$ ,  $F = 4,6$ ,  $P < 0,006$ , para la fase de adquisición y grupos  $df(1,20)$ ,  $F = 7,9$ ,  $P < 0,01$ ; ensayos  $df(3,60)$ ,  $F = 10,77$ ,  $P < 0,00001$ ; días,  $df(1,20)$ ,  $F = 34,4$ ,  $P < 0,001$ , para la fase de reversión). Los resultados presentados proceden de uno de dos experimentos con 10 ratones por grupo en cada experimento (2d-2f). Se realizó la comparación de ratones atímicos con ratones atímicos que fueron reconstituidos con células T, tres semanas antes de someterse al ensayo en el MWM. Durante las fases de adquisición (2d), extinción (2e) y reversión (2f) de la tarea, los ratones atímicos no reconstituidos tardaron bastante más tiempo en adquirir el aprendizaje espacial que los ratones atímicos reconstituidos con células T de ratones de tipo silvestre sin previa experiencia en el tratamiento (ANOVA de 3 vías, medidas repetidas: grupos,  $df(1,18)$ ,  $F = 32,3$ ,  $P < 0,00001$ ; ensayos,  $df(3,54)$ ,  $F = 10,1$ ,  $P < 0,00001$ ; días,  $df(3,54)$ ,  $F = 20,56$ ,  $P < 0,00001$ , para la fase de adquisición y grupos,  $df(1,18)$ ,  $F = 58,6$ ,  $P < 0,00001$ ; ensayos,  $df(3,54)$ ,  $F = 12,6$ ,  $P < 0,00001$ ; días,  $df(1,18)$ ,  $F = 19,2$ ,  $P < 0,0004$ , para la fase de inversión). Los resultados presentados son a partir de uno de dos experimentos realizados con 10 ratones por grupo en cada experimento.

Las Figuras 3a-3i muestran el efecto de la vacunación del copolímero Cop-1 sobre el comportamiento con ratones C57BL/6J de una tarea de memoria/aprendizaje espacial en el MWM después de la inyección de un fármaco psicotomimético. La adquisición de la tarea de aprendizaje espacial en el MWM tardó bastante más en los ratones inyectados con MK-801 (0,1 mg/kg i.p.) o AMPH (2,5 mg/kg i.p.) que en ratones C57BL/6J (inyectados con PBS) en las fases de adquisición (3a) y de reversión (3b). La inmunización con Cop-1/CFA dio lugar a latencias de escape disminuidas en las fases de adquisición y de reversión después de la inyección de [MK-801 (3c, 3d) o anfetamina (3e, 3f). MK-801 (3c, 3d); ANOVA de 3 vías, medidas repetidas: grupos,  $df(1,9)$ ,  $F = 56,6$ ,  $P < 0,0001$ ; ensayos,  $df(3,27)$ ,  $F = 54,0$ ,  $P < 0,00001$ ; días,  $df(3,27)$ ,  $F = 15,6$ ,  $P < 0,00001$ , para la fase de adquisición y grupos,  $df(1,9)$ ,  $F = 42,7$ ,  $P < 0,0001$ ; ensayos,  $df(3,27)$ ,  $F = 24,4$ ,  $P < 0,00001$ ; días,  $df(1,9)$ ,  $F = 7,9$ ,  $P < 0,02$ , para la fase de reversión o AMPH (3e, 3f); ANOVA de 3 vías, medidas repetidas, grupos,  $df(1,10)$ ,  $F = 9,8$ ,  $P < 0,01$ ; ensayos,  $df(3,30)$ ,  $F = 29,9$ ,  $P < 0,00001$ ; días,  $df(1,30)$ ,  $F = 21,3$ ,  $P < 0,00001$ , para la fase de adquisición y grupos,  $df(1,10)$ ,  $F = 53,7$ ,  $P < 0,00003$ ; ensayos,  $df(3,30)$ ,  $F = 16,1$ ,  $P < 0,00002$ ; días,  $df(1,10)$ ,  $F = 5,0$ ,  $P < 0,05$  para la fase de reversión]. El comportamiento de ratones inmunizados con Cop-1 no presentó una diferencia significativa respecto al comportamiento normal. (3h). La disminución en el tiempo de estancia en un cuadrante de adiestramiento, obtenido en los ratones de control, fue eliminado con la inyección de MK-801 (3g); sin embargo, los ratones inmunizados con Cop-1 se comportaron de forma similar a los ratones WT (3i).

La Figura 4 ilustra el seguimiento de ratones inmunizados con Cop-1 y ratones de control en el laberinto de agua de Morris después de la inyección de MK-801 y muestra que Cop-1 actuó en contra del impedimento inducido por MK-801 de aprendizaje y de memoria. La Figura ilustra las estrategias de natación en piscina de ratones de la cepa C57BL/6J que fueron inmunizados con Cop-1/CFA o PBS/CFA e inyectados una semana después con MK-801. Los ratones sin previa experiencia en el tratamiento sirvieron como controles para el comportamiento en el MWM. En el segundo día después de la administración del fármaco, el comportamiento fue probado en cuatro ensayos consecutivos a intervalos de 5 minutos. Los ratones vacunados con Cop-1, lo mismo que los ratones sin previa experiencia en el tratamiento, aprendieron a nadar, alejándose de la pared, para la búsqueda de la plataforma, en el 50% interior de la piscina y para utilizar la plataforma como un refugio cuando la encontraron. Una estrategia bastante menos eficiente fue utilizada por los ratones inyectados con MK-801 inmunizados con el excipiente.

Las Figuras 5a-5f muestran la dependencia de la cepa y la dependencia de las células T con respecto a la capacidad para soportar un estrés psicológico (Figuras 5a-5d). Los esfuerzos de los ratones difieren en su

capacidad para adaptarse al estrés psicológico. Una exposición de 10 minutos única al olor de un depredador causó cambios de comportamiento en un 36,8% de los ratones C57BL/6J macho pero en solamente un 10,5% de los ratones BALB/c machos. ( $\chi^2=3,7$ ,  $P<0,05$ ). (Figuras 5b, 5e) en el esfuerzo de BALB/c, la adaptación deficiente fue bastante más predominante en ratones de SCID (61,9%) que en los ratones de tipo silvestre (17,2%;  $\chi^2=10,6$ ,  $P<0,001$ ). (Figuras 5c, 5f). La adaptación deficiente fue similarmente más predominante en ratones atímicos sin pelo (desprovistos de células T maduras solamente) que en los ratones de tipo silvestre (70% y 17,2%, respectivamente; ensayo  $\chi^2$ :  $P<0,0002$ ), que verifica que las diferencias observadas eran atribuibles a la ausencia de células T maduras.

10 La Figura 6 muestra la capacidad de ratones inmunizados con Cop-1 para soportar el estrés psicológico en comparación con los ratones tratados con PBS (control), después de una exposición única de 10 minutos al olor de un depredador.

15 Las Figuras 7a-7c muestran que las células T reguladoras CD4+CD25+ que ocurren de forma natural, suprimen la capacidad para soportar el estrés psicológico (Figura 7a). Una exposición única de 10 minutos al olor de un depredador dio lugar a una adaptación deficiente en el 70% de los ratones de cepa BALB/c machos atímicos (véase Figura 6). La prevalencia de la adaptación deficiente disminuyó en alguna medida (50%) en los ratones atímicos que fueron reconstituidos con esplenocitos normales a partir de ratones BALB/c de tipo silvestre. En los ratones atímicos que fueron reconstituidos con una población de esplenocitos con disminución de Treg, la prevalencia de la adaptación deficiente (20%) fue bastante más baja que la de los ratones atímicos (no reconstituidos) de control ( $\chi^2=6,7$ ,  $P<0,009$ ). (Fig. 7b) La respuesta de sobresalto (media  $\pm$  SD) de ratones atímicos, reconstituidos con esplenocitos con disminución de Treg, fue bastante más débil que la de los ratones atímicos reconstituidos con una población de esplenocitos normal ( $P<0,03$ ) o que la de los ratones atímicos de control ( $F(df=2,37)=9,2$ ,  $P<0,0006$ ). (Fig. 7c). Los ratones atímicos reconstituidos con esplenocitos agotados de Treg necesitaron bastante menos tiempo para explorar los brazos cerrados del laberinto en cruz elevado que los ratones sin pelo recuperados con una población de esplenocitos normal ( $P<0,02$ ) o que los ratones sin pelo de control ( $F(df=2,37)=8,7$ ,  $P<0,0008$ ).

30 Las Figuras 8a-8c son micrográficos que ilustran que la inmunohistoquímica de las células T en el cerebro está en correlación con la adaptación al estrés psicológico. Los animales deficientemente adaptados del grupo de ratones atímicos reconstituidos con una población de esplenocitos normal a partir de ratones de tipo silvestre y animales bien adaptados del grupo de los ratones atímicos reconstituidos con esplenocitos de ratones de tipo silvestre con disminución de Treg fueron sacrificados y sus cerebros fueron extraídos, objeto de perfusión, embebidos en parafina y troceados para histología. Los trozos de cerebro del área hipocampal y franja del hipocampus fueron coloreados para axones mielinados con Luxol y contracolorados con eosina o colorados con anticuerpos anti-CD3 para la presencia de células T y contracolorados con hematoxilina (Figura 8a). Los trozos de cerebro de los ratones deficientemente adaptados no mostraban ninguna coloración para células T (ii e iv) (Figura 8b). Los trozos de cerebro de los ratones bien adaptados mostraban una actividad de células T en áreas hipocampales (ii e iv) correspondientes a la reactividad de mielina (Luxol-áreas positivas; i e iii) (Figura 8c). Los ratones de tipo silvestre que no estuvieron expuestos a esfuerzo mostraron, como estaba previsto, ninguna reactividad de células T en trozos de cerebro. Los micrográficos muestran resultados representativos de al menos 6 trozos de cerebro de cada ratón y de al menos 3 ratones en cada grupo.

45 La Figura 9 muestra que el copolímero Cop-1 alivia la actividad supresora mediada por Treg (CD4+CD25+). La proliferación de células T fue ensayada por incorporación de [ $^3$ H]-timidina en células T efectoras (Teff) co-cultivadas con Treg. Los valores registrados son de un experimento representativo de entre 3 y se expresan como medias replicadas de  $\pm$  SD de 4 (SD = desviación estándar).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

50 La presente invención se refiere al tratamiento de un trastorno, enfermedad o condición patológica psiquiátrica que comprende la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento, de una cantidad efectiva de un agente seleccionado de entre el grupo constituido por: (i) Copolímero 1, (ii) un péptido relacionado con el copolímero 1, (iii) un polipéptido relacionado con el copolímero 1 y (iv) células T tratadas con (i), (ii) o (iii) en donde el trastorno, enfermedad o condición patológica psiquiátrica se selecciona de entre un trastorno por estrés post-traumático (PTSD), una depresión, un trastorno bipolar y la esquizofrenia.

60 Examinamos si una inmunidad adaptativa desempeña un papel importante en las más altas funciones del cerebro, tanto bajo condiciones normales como en las situaciones anormales generadas por un desequilibrio neurotransmisor. Se demuestra, en este caso, que la inmunodeficiencia sistémica dio lugar a un impedimento cognitivo que podría revertirse por la reposición con células T. Además, la vacunación con Cop-1, un agonista de baja afinidad sintético de una amplia gama de clones de células T auto-reactivas, presumiblemente reforzando el número de células T capaces de una reacción cruzada con antígenos de CNS pertinentes, impidieron la psicosis inducida por el fármaco y el impedimento cognitivo reducido.

65 Los resultados, en este caso, demuestran también que otra función cerebral afectada, de forma crítica, por la integridad del sistema inmune adaptativo periférico es la cognición. Cuando se realizó el ensayo en el MWM (en una

tarea que genera esfuerzo), los ratones inmunodeficientes mostraron una función cognitiva deteriorada, que fue evitada por el restablecimiento de la integridad del sistema inmune. El deterioro observado de la actividad cognitiva, que ocurrió, en este caso, cuando el sistema inmune estaba intacto pero el cerebro estaba sufriendo de un desequilibrio neurotransmisor, sugiere que el sistema inmune periférico puede contener pequeñas fluctuaciones en los niveles neurotransmisor que ocurren diariamente y permitir un rendimiento cognitivo normal, pero es incapaz de superar un desequilibrio patológico que causa un deterioro cognitivo. En esta última situación, por lo tanto, las células T pertinentes necesitan reforzarse. Dicho refuerzo fue conseguido por vacunación con Cop-1, que impidió, de forma significativa, el deterioro cognitivo inducido por fármacos psicotomiméticos. Anormalidades del comportamiento y cognitivas fueron observadas en nuestro modelo de ratón transcurridos quince minutos desde la administración de MK-801 o AMPH y fueron contrarrestados por los efectos de la vacunación con Cop-1 dada con una semana de anterioridad. Debido al inicio rápido de síntomas que ocurren en el paradigma experimental aquí utilizado, los ratones tuvieron que vacunarse antes de que la psicosis fuera inducida. Conviene señalar, sin embargo, que la vacunación según la presente idea inventiva abarca no solamente el uso preventivo, sino también una fisioterapia para pacientes crónicos, en los que la intervención en cualquier etapa de la enfermedad sería beneficiosa.

La rapidez de las células T reactivas con Cop-1 en contrarrestar los efectos psicóticos de los fármacos sugiere que las células T ya elicítadas por la inmunización fueron circulando por el cerebro sano. Fue recientemente demostrado que la vacunación con Cop-1 en animales sanos da lugar, en realidad, a un aumento de la acumulación de células T en el sistema nervioso central CNS y la producción local de BDNF (Kipnis et al, 2000). También es posible que, como resultado de la inmunización precoz, un número importante de células T reactivas con Cop-1 circulen en la sangre y que se alojen en el lugar pertinente solamente cuando se está bajo estrés, causado, a modo de ejemplo, por una alteración patológica al nivel del cerebro con dopamina (mediante inyección de AMPH) o de glutamato (mediante inyección de MK-801). Haciendo caso omiso de si las células T efectoras circulan en la sangre o residen en el cerebro, la rapidez de la respuesta de células T al desequilibrio neurotransmisor ratifica la importancia de la inmunidad adaptativa de funcionamiento adecuado en el mantenimiento diario del cerebro (Kipnis y Schwartz, 2002). Estos resultados podrían explicar también la razón por la que, en la población de edad avanzada, que se conoce que sufre una reducción desproporcionada en la inmunidad y un incremento en el desequilibrio neurotransmisor y metabólico en el cerebro, se aumenta la incidencia de la demencia (Wick et al., 2003).

El trauma psicológico, tales como agresiones físicas al sistema nervioso central CNS, pueden causar amplios cambios a largo plazo en el funcionamiento neurológico y neurohormonal, que parecen estar relacionados con los cambios morfológicos (Markowitsch et al, 1998). Parece razonable suponer que la exacerbación de las manifestaciones de comportamiento y cognitivas de la esquizofrenia, en el transcurso del tiempo, puede estar en correlación con la neurodegeneración que ocurre en algunas zonas del cerebro (Deutsch et al., 2001). El presente descubrimiento de que las células T, reactivas con Cop-1, en ratones efectuaba una mediación de la prevención de la psicosis inducida por MK-801 o inducida por anfetamina, cuyos síntomas mímicos en parte de la esquizofrenia en seres humanos, acoplada con el reconocimiento creciente de que la neurodegeneración desempeña un papel importante en la esquizofrenia y otras enfermedades mentales, sugiere que el desarrollo de la neuroprotección inmunitaria podría proporcionar un remedio global con respecto a los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia y posiblemente también de otras condiciones psiquiátricas, incluyendo las demencias relacionadas con la VIH relacionadas con la edad.

En este caso, se demuestra que una relación cruzada entre el cerebro y el sistema inmune adaptativo (células T) afecta a las consecuencias de una instancia única de trauma psicológico. La deficiencia de células T completa fue encontrada aquí para establecer una correlación con la adaptación deficiente al estrés psicológico, mientras que la eliminación de solamente una subpoblación de células T, células T reguladoras naturales (Treg), mejoraban la capacidad para la adaptación al estrés. Esto indica que, en animales normales, sometidos a un estrés mental traumático, la respuesta mediada por células T no puede alcanzar su pleno potencial terapéutico, puesto que se suprime por la presencia de las células T reguladoras, que se presentan de forma natural. La denominada regulación a la baja de Treg por Cop-1, según aquí se demuestra, es beneficiosa y puede mejorar la capacidad de una persona para soportar y superar condiciones de fuerte estrés.

Nuestros resultados actuales muestran, en realidad, que el refuerzo de una respuesta de células T para el antígeno autosimilar Cop-1 redujo, de forma significativa, el deterioro cognitivo y facilitó la psicosis en modelos de animales con síntomas asociados con la esquizofrenia. Las anormalidades de comportamiento y cognitivas fueron observadas en nuestro modelo de ratón transcurridos 15 minutos desde la adquisición de los fármacos psicotomiméticos MK-801 y AMPH y fueron contrarrestados por los efectos de la vacunación de Cop-1 administrada una semana antes. La rapidez de las células T reactivas con Cop-1 en contrarrestar los efectos psicóticos de los fármacos sugiere que las células T han sido ya elicítadas por la inmunización y estuvieron circulando por el cerebro sano en un estado no activado, aunque en situación de alerta y preparadas para la acción en caso de necesidad. Como alternativa, es posible que como resultado de la inmunización, un número importante de células T reactivas con Cop-1, todavía no activadas, circularan por la sangre, dispuestas para alojarse en el lugar de la amenaza cuando fuera necesario. Una alteración patológica a nivel del cerebro de dopamina (mediante inyección de anfetamina) o de glutamato (mediante inyección de MK-801) podría activar estas células T, permitiendo una rápida protección contra los efectos devastadores del desequilibrio neurotransmisor.

El efecto observado del copolímero Cop-1 sobre el alivio de la psicosis inducida por fármacos psicomiméticos indica que es un candidato adecuado a elegir para el desarrollo de una nueva generación de fármacos antipsicóticos.

5 El desequilibrio glutamatérgico es una característica común para los trastornos neurodegenerativos y mentales. Después de una lesión en el sistema nervioso central CNS, las células T dirigidas a autoantígenos relacionados con el CNS participan en el mantenimiento del sistema nervioso central CNS, que incluye la protección contra la toxicidad del glutamato. Este efecto neuroprotector puede reforzarse por agonistas de autoantígenos, tales como el copolímero Cop-1. Según aquí se da a conocer, se demuestra que un mecanismo dependiente de las células T  
10 similar es protector contra el desequilibrio neurotransmisor en el cerebro, lo que da lugar a una anomalía funcional cognitiva y de comportamiento. La vacunación con Cop-1 protegió a los ratones contra el deterioro cognitivo y comportamiento psicótico inducido por MK-801 o anfetamina (simulando los síntomas de la esquizofrenia). También es aquí demostrado que las células T reactivas con Cop-1, al encontrarse con autoantígenos pertinentes (MBP), producían un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), una neurotrofinina conocida por ser protectora en el cerebro esquizofrénico, a enlazarse con el desarrollo de un trastorno bipolar y relacionada con la actividad nerviosa, la  
15 función de la memoria y del estado emocional.

Tal como aquí se utilizan, los términos "Copolímero 1" y "copolímero 1" se utilizan de forma intercambiable. Para la finalidad de la presente invención, el término de "péptido relacionado con el copolímero 1 o polipéptido relacionado con el copolímero 1" está previsto para incluir cualquier péptido o polipéptido, incluyendo un copolímero aleatorio que tiene una reacción cruzada funcionalmente con la proteína básica de mielina (MBP) y es capaz de competir con MBP en la clase II de MHC en la presentación de antígenos.  
20

La composición o vacuna, aquí dada a conocer, puede comprender como agente activo un copolímero aleatorio que comprende una cantidad adecuada de aminoácidos con carga positiva, tales como lisina o arginina, en combinación con un aminoácido con carga negativa (preferentemente en una menor cantidad) tal como ácido glutámico o ácido aspártico, opcionalmente en combinación con un aminoácido neutro no cargado tal como alanina o glicina, que sirve como un relleno y de forma opcional, con un aminoácido adaptado para conferir las propiedades inmunogénicas de los copolímeros, tales como un aminoácido aromático tal como tirosina o triptófano. Dichas composiciones pueden incluir cualquiera de los copolímeros dados a conocer en el documento WO 00/05250.  
25  
30

Más concretamente, la composición aquí dada a conocer comprende al menos un copolímero seleccionado del grupo constituido por copolímeros aleatorios que comprende un aminoácido seleccionado de cada uno de al menos tres de los grupos siguientes: (a) lisina y arginina; (b) ácido glutámico y ácido aspártico; (c) alanina y glicina y (d) tirosina y triptófano.  
35

Los copolímeros, aquí dados a conocer, pueden estar constituidos por aminoácidos L o D o sus mezclas. Como es conocido por los expertos en esta materia, los aminoácidos L están presentes en la mayoría de las proteínas naturales. Sin embargo, los aminoácidos D están comercialmente disponibles y pueden sustituir a algunos o la totalidad de los aminoácidos utilizados para obtener los terpolímeros u otros copolímeros aquí dados a conocer. La presente idea inventiva contempla el uso de copolímeros que contienen aminoácidos D y L así como copolímeros constituidos esencialmente por aminoácidos L o D.  
40

En una forma de realización más preferida, una composición farmacéutica o vacuna, aquí dada a conocer, comprende el copolímero 1, una mezcla de polipéptidos aleatorios que consisten esencialmente en los aminoácidos L-ácido glutámico (E), L-alanina (A), L-tirosina (Y) y L-lisina (K) en una relación aproximada 1.5:4.8:1:3.6, que tienen una carga eléctrica positiva global neta y un peso molecular de aproximadamente 2 KDa a 40 KDa. En una forma de realización preferida, el copolímero Cop-1 tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2 KDa a 20 KDa, más preferentemente de aproximadamente 4,7 KDa a 13 KDa y todavía más preferentemente de 4 KDa a 8,6 KDa, de 5 KDa a 9 KDa o de 6,25 KDa a 8,4 KDa. En otra forma de realización preferida, el copolímero Cop-1 tiene un peso molecular medio de aproximadamente 13 KDa a 20 KDa, más preferentemente de 13 KDa a 16 KDa o de aproximadamente 15 KDa a 16 KDa. Otros pesos moleculares medios para el copolímero Cop-1, menores que 40 KDa, son también abarcados por la presente idea inventiva. El copolímero 1 de dichas gamas de peso moleculares puede prepararse por métodos conocidos en esta técnica, a modo de ejemplo, por los procesos descritos en la patente de Estados Unidos número 5.800.808..  
45  
50  
55

El copolímero 1 puede ser un polipéptido que comprende desde aproximadamente 15 a 100, preferentemente de 40 a 80, aminoácidos en longitud. En una forma de realización preferida, el copolímero Cop-1 está en la forma de su sal de acetato conocida bajo el nombre genérico de acetato de glatiramer, que ha sido autorizado en varios países para el tratamiento de la esclerosis múltiple (MS) bajo el nombre comercial de Copaxone® (una marca registrada de Teva Pharmaceuticals Ltd., Petach Tikva, Israel). La actividad del copolímero 1 para la vacuna aquí dada a conocer se espera que permanezca si se realiza una o más de las sustituciones siguientes: ácido aspártico por ácido glutámico, glicina por alanina, arginina por lisina y triptófano por tirosina.  
60

En otra forma de realización, el péptido o polipéptido relacionado con Cop-1 es un copolímero de tres aminoácidos diferentes cada uno de ellos de uno de diferente de tres grupos de los grupos (a) a (d). Estos copolímeros son aquí  
65

referidos como terpolímeros. En una forma de realización, el péptido o polipéptido relacionado con Cop-1 en un terpolímero que contiene tirosina, alanina y lisina en adelante designado como YAK, en el que la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: la tirosina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,05 – 0,250; la alanina en una fracción molar de aproximadamente 0,3 – 0,6 y la lisina en una fracción molar de aproximadamente 0,1 – 0,5. Más preferentemente, las relaciones molares de tirosina, alanina y lisina son aproximadamente 0,10: 0,54:0,35, respectivamente. Es posible sustituir la arginina por lisina, glicina por alanina y/o triptófano por tirosina.

En otra forma de realización, el péptido o polipéptido relacionado con el copolímero 1 es un terpolímero que contiene tirosina, ácido glutámico y lisina, en adelante designado YAK, en donde la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: el ácido glutámico puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,05 – 0,300, la tirosina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 – 0,250 y la lisina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,3 – 0,7. Más concretamente, las relaciones molares de ácido glutámico, tirosina y lisina son de aproximadamente 0,26: 0,16: 0,58, respectivamente. Es posible sustituir ácido aspártico por ácido glutámico, arginina por lisina y/o triptófano por tirosina.

En otra forma de realización preferida, el péptido o polipéptido relacionado con el copolímero 1 es un terpolímero que contiene lisina, ácido glutámico y alanina, en adelante designado KEA; en donde la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: el ácido glutámico puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 – 0,300, la alanina en una fracción molar de aproximadamente 0,005 – 0,600 y la lisina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,2 – 0,7. Más concretamente, las relaciones molares de ácido glutámico, alanina y lisina son aproximadamente 0,15: 0,48: 0,36, respectivamente. Es posible sustituir ácido aspártico por ácido glutámico, glicina por alanina y/o arginina por lisina.

En una forma de realización, el péptido o polipéptido relacionado con el copolímero 1 es un terpolímero que contiene tirosina, ácido glutámico y alanina, en adelante designado YEA, en donde la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: la tirosina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 – 0,250, el ácido glutámico en una fracción molar de aproximadamente 0,005 – 0,300 y la alanina en una fracción molar de aproximadamente 0,005 – 0,800. Más concretamente, las relaciones molares de ácido glutámico, alanina y tirosina son de aproximadamente 0,21: 0,65 : 0,14, respectivamente. Es posible sustituir triptófano por tirosina, ácido aspártico por ácido glutámico, glicina por alanina y/o arginina por lisina.

El peso molecular medio de los terpolímeros YAK, YEK, KEA y YEA puede variar entre aproximadamente 2 KDa a 40 KDa, preferentemente entre aproximadamente 3 KDa a 35 KDa y más preferentemente, entre aproximadamente 5 KDa a 25 KDa.

Los péptidos y polipéptidos relacionados con el copolímero 1 puede prepararse por métodos conocidos en esta técnica, a modo de ejemplo, bajo condiciones de condensación utilizando la relación molar deseada de aminoácidos en solución o mediante procedimientos sintéticos en fase sólida. Las condiciones de la condensación incluyen las condiciones adecuadas de temperatura, pH y disolvente para condensar el grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otros aminoácidos para formar un enlace de péptido. Los agentes de condensación, a modo de ejemplo, dicitclohexilcarbodiimida, puede utilizarse para facilitar la formación del enlace de péptidos. Los grupos de bloqueo pueden utilizarse para proteger grupos funcionales, tales como las mitades de cadenas secundarias y algunos de los grupos amino o carboxilo contra reacciones secundarias indeseadas.

A modo de ejemplo, los copolímeros pueden prepararse por el proceso dado a conocer en la patente de Estados Unido 3,849,550, en donde los N-carboxianhidridos de tirosina, alanina, glutamato de  $\gamma$ -bencilo y N  $\epsilon$ -trifluoroacetil-lisina están polimerizados a temperaturas ambiente (20°C – 26°C) en dioxano anhidro con dietilamina como un iniciador. El grupo de  $\gamma$ -carboxilo del ácido glutámico puede desbloquearse por bromuro de hidrogeno en ácido acético glacial. Los grupos de trifluoroacetilo se eliminan de la lisina por una solución 1M de piperidina. Un experto en esta materia entiende fácilmente que el proceso puede ajustarse para obtener péptidos y polipéptidos que contengan los aminoácidos deseados, es decir, tres de los cuatro aminoácidos en copolímero 1, eliminado, de forma selectiva, las reacciones que se relacionan con cualquiera de entre ácido glutámico, alanina, tirosina o lisina.

El peso molecular de los copolímeros puede ajustarse durante la síntesis de polipéptidos o después de que se hayan obtenido los copolímeros. Para ajustar el peso molecular durante la síntesis de polipéptidos, las condiciones sintéticas o las cantidades de aminoácidos se ajustan de modo que se interrumpa la síntesis cuando el polipéptido alcanza la longitud aproximada que es deseable. Después de la síntesis, los polipéptidos con el peso molecular deseado pueden obtenerse por cualquier procedimiento de selección de tamaño disponible, tal como cromatografía de los polipéptidos en un gel o columna de dimensionamiento del peso molecular y la recogida de las gamas de pesos moleculares deseadas. Los copolímeros pueden también hidrolizarse parcialmente para eliminar las especies de alto peso molecular, a modo de ejemplo, mediante hidrólisis enzimática o ácida y luego, purificarse para eliminar el ácido o las enzimas.

En una forma de realización, los copolímeros, con un peso molecular deseado, pueden prepararse mediante un proceso, que incluye reaccionar un polipéptido protegido con un ácido hidrobromico para formar un trifluoroacetil-



polipéptido que presenta el perfil de peso molecular deseado. La reacción se realiza durante un tiempo y a una temperatura que se predetermina por una o más reacciones de ensayo. Durante la reacción de ensayo, el tiempo y la temperatura se varían y se determina la gama de pesos moleculares de un lote dado de polipéptidos de ensayo. Las condiciones de ensayo que proporcionan la gama de peso molecular óptima para ese lote de polipéptido se utilizan para el lote. De este modo, un polipéptido de trifluoroacetilo, que tenga el perfil de peso molecular deseado, puede obtenerse mediante un proceso, que incluye la reacción del polipéptido protegido con ácido hidrobromico durante un tiempo y a una temperatura que se predetermina por una reacción de ensayo. El trifluoroacetil-polipéptido, con el perfil molecular deseado, se trata, a continuación, con una solución acuosa de piperidina para formar un polipéptido de baja toxicidad que tenga el peso molecular deseado.

En una forma de realización preferida, una muestra de prueba de polipéptido protegido, procedente de un lote dado, se hace reaccionar con ácido hidrobromico durante aproximadamente 10 a 50 horas a una temperatura aproximada de 20 a 28°C. Las mejores condiciones para ese lote se determinan realizando varias reacciones de ensayo. A modo de ejemplo, en una forma de realización, el polipéptido protegido se hace reaccionar con ácido hidrobromico durante aproximadamente 17 horas a una temperatura aproximada de 26°C.

Como son conocidos los denominados motivos de enlace de las moléculas de HLA-DR asociadas con MS al copolímero Cop-1(Fridkis-Hareli et al, 1999), los polipéptidos derivados de Cop-1 que tengan una secuencia definida pueden prepararse fácilmente y ensayarse para enlace a la ranura de enlace de péptidos de las moléculas de HLA-DR según se describe en la publicación de Fridkis-Hareli et al (1999). Ejemplos de dichos péptidos son los dados a conocer en los documentos WO 00/05249 y WO 00/05250 que incluyen los péptidos de SEQ ID números 1-32 a continuación.

**Tabla 1**  
**Secuencia de péptidos**

Nº ID Sec.	Secuencia de péptidos
1	AAAYAAAAAAAAKAAAA
2	AEKYAAAAAAAAKAAAA
3	AKEYAAAAAAAAKAAAA
4	AKKYAAAAAAAAKAAAA
5	AEAYAAAAAAAAKAAAA
6	KEAYAAAAAAAAKAAAA
7	AEEYAAAAAAAAKAAAA
8	AAEYAAAAAAAAKAAAA
9	EKAYAAAAAAAAKAAAA
10	AAKYAAAAAAAAKAAAA
11	AAKYAEAAAAAAAAKAAAA
12	EAAAYAAAAAAAAKAAAA
13	EKKYAAAAAAAAKAAAA
14	EAKYAAAAAAAAKAAAA
15	AEKYAAAAAAAAAAAAA
16	AKEYAAAAAAAAAAAAA
17	AKKYAAAAAAAAAAAAA
18	AKKYAEAAAAAAAAAAAAA
19	AEAYKAAAAAAAAAAAAA
20	KEAYAAAAAAAAAAAAA
21	AEEYKAAAAAAAAAAAAA
22	AAEYKAAAAAAAAAAAAA
23	EKAYAAAAAAAAAAAAA
24	AAKYAAAAAAAAAAAAA
25	AAKYAEAAAAAAAAAAAAA
26	EKKYAAAAAAAAAAAAA
27	EAKYAAAAAAAAAAAAA
28	AEYKAAAAAAAAAAAAA
29	AEKAYAAAAAAAAAAAAA
30	EKYAAAAAAAAAAAAA
31	AYKAEAAAAAAAAAAAAA
32	AKYAEAAAAAAAAAAAAA

Dichos péptidos y otros péptidos similares derivados de Cop-1, se esperaría que tuvieran una actividad similar a la de Cop-1. Dichos péptidos, y otros péptidos similares, se consideran también como que están dentro de la definición de péptidos o polipéptidos relacionados con Cop-1 y su uso se considera como siendo parte de la presente invención.

La definición o "péptido o polipéptido relacionado con el copolímero 1" según la invención, se considera que abarca otros copolímeros de aminoácidos sintéticos tales como los copolímeros de cuatro aminoácidos aleatorios descritos en Fridkis-Hareli et al., 2002 (como candidatos para tratamiento de la esclerosis múltiple), a saber, copolímeros (14-

35- y 50-meros) que contienen los aminoácidos de fenilalanina, ácido glutámico, alanina y lisina (poli FEAk) o tirosina, fenilalanina, alanina y lisina (poli YFAk) y cualquier otro copolímero similar a descubrirse que pueda considerarse como un antígeno universal similar a Cop-1.

5 En otra forma de realización, la presente invención se refiere al transferencia de una enfermedad, trastorno o condición patológica psiquiátrica que comprende la administración a un paciente en necesidad de células T que haya sido activado preferentemente en la presencia de Cop-1 o por un péptido o polipéptido relacionado con el copolímero 1, en donde el trastorno, enfermedad o condición patológica psiquiátrica, se selecciona de entre el trastorno por estrés post-traumático (PTSD), una depresión, un trastorno bipolar y la esquizofrenia. Dichas células T son preferentemente autólogas, más preferentemente de los fenotipos de CD4 y/o CD8, pero pueden ser también células T halogénicas procedentes de donadores relacionados, p.e., hermanos, padres, hijos o donantes semi-halogénicos o completamente halogénicos adaptados en HLA o parcialmente adaptados. Las células T, para esta finalidad, se describen en los documentos USSN 09/756,301 y USSN 09/765,644, correspondientes al documento WO 01/93893.

15 La dosificación de Cop-1 a administrarse se determinará por el médico en función de la edad del paciente y de la etapa de la enfermedad y puede elegirse de entre una gama de 1-80 mg, preferentemente 20 mg, aunque cualquier otra dosificación adecuada está dentro del alcance de la invención. El tratamiento debe realizarse preferentemente por la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo adecuados, preferentemente cada 1, 4 o 6 semanas, pero cualquier otro intervalo adecuado entre las inmunizaciones se considera en función de la enfermedad psiquiátrica que se va a tratar, la edad y la condición del paciente.

20 Componentes farmacéuticas, según aquí se dan a conocer, pueden formularse en manera convencional utilizando uno o más portadores fisiológicamente aceptables o excipientes. Los portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la composición y no perjudiciales para su destinatario.

25 Según aquí se da a conocer, la composición que comprende copolímero 1 o un péptido o polipéptido relacionado con el copolímero 1 se administra en un régimen que confiere una autoinmunidad protectora (también, a veces, referida como una vacuna para vacunación neuroprotectora). Dicha vacuna, si se desea, puede contener copolímero 1 emulsificado en un adyuvante adecuado para el uso clínico humano.

30 De este modo, en conformidad con el agente presente, el agente activo puede administrarse sin ningún adyuvante o puede emulsificarse en un adyuvante adecuado para el uso clínico humano. El adyuvante se selecciona de entre hidróxido de aluminio, gel de hidróxido de aluminio e hidroxifosfato de aluminio o cualquier otro adyuvante que se encuentre adecuado para el uso clínico humano. En una forma de realización preferida, el adyuvante de la vacuna es hidroxifosfato de aluminio amorfo que presenta un punto isoeléctrico ácido y una relación Al:P de 1:1 (aquí referida como Alum-phos). Es evidente que esto se proporciona, a modo de ejemplo, solamente y que la vacuna puede variarse con respecto a los constituyentes y proporciones relativos de los constituyentes.

35 Los métodos de administración incluyen, sin limitación, rutas parenterales, p.e., intravenosas, intraperitoneal, intramuscular, mucosal subcutánea (p.e., oral, intranasal, bucal, vaginal, rectal, intraocular), intratecal, tópica e intradérmica. La administración puede ser sistémica o local.

40 Según aquí se da a conocer, Cop-1 o un péptido o polipéptido relacionado con el copolímero 1 puede utilizarse como una terapia única o en combinación con uno o más fármacos para el tratamiento del trastorno, enfermedad o condición patológica psiquiátrica. Cuando se administran juntos con otro fármaco o fármacos adecuados para el tratamiento del trastorno, enfermedad o condición patológica psiquiátrica, el fármaco o fármacos adicionales se administran en el mismo día de la vacunación y diariamente o en cualquier otro intervalo sucesivo, según las instrucciones del fabricante, sin ninguna asociación con el régimen de la vacuna.

45 La invención se ilustrará a continuación mediante los ejemplos no limitadores siguientes.

## EJEMPLOS

### 55 Materiales y métodos

(i) Animales. Ratones de cepas BALB/c y C57B1/6J nu/nu y de tipo silvestre machos adultos, ratas Lewis hembras adultas y ratones de cepas BALB/c/OLA así como ratones BALB/c/OLA con grave inmunodeficiencia combinada (SCID) (debido al denominado RAG 1/2 *knockout*) y ratones atímicos (deficientes en células T maduras), todos de 8 a 12 semanas de edad, fueron suministrados por el Centro de Cría Animal de Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel). Los animales fueron alojados en un recinto con control de la luz y de la temperatura y adaptados por edad en cada experimento. Los animales fueron tratados en conformidad con los reglamentos formulados por el IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee).

65 (ii) Antígenos. El copolímero 1 (Cop-1) fue adquirido a través de Teva Pharmaceuticals Ltd. (Petach Tikva, Israel).

- (iii) Inmunización. Cada animal fue inyectado con un total de 100 µg de Cop-1 emulsificado en un volumen igual de adyuvante de Freund completo (CFA) que contiene 5 mg/ml de microbacteria H37 RA (Difco). La emulsión, en un volumen total de 0,1 mL, fue inyectada en el costado 1 semana antes de que el ratón fuera inyectado por primera vez con un fármaco psicotomimético. Los ratones de control fueron inyectados con un volumen igual de fosfato en solución tamponada salina (PBS) emulsificado en CFA.
- (iv) Líneas de células T. Diez días después de la inmunización con Cop-1, se generaron líneas de células T a partir del drenaje de células de ganglios linfáticos obtenidas de ratas de Lewis inmunizadas con Cop-1 emulsificado en CFA. Los nodos linfáticos fueron eliminados por métodos quirúrgicos, disociados, lavados y luego activados con el antígeno (10 µg/ml) en un medio de estimulación según se informó con anterioridad (Kipnis et al., 2000). Las líneas de células T fueron expandidas mediante estimulación y propagación repetidas.
- (v) Ensayo inmunosorbente vinculado con enzimas. Las células de Cop-1 reactivas con células T fueron cultivadas durante una semana en un medio de propagación y luego, lavadas con PBS y resuspendidas en un medio de estimulación. Las células T cultivadas ( $0,5 \times 10^6$  células/mL) fueron luego incubadas, en la presencia de timocitos irradiados ( $10^7$  células/mL) con concanavalina A (Con A; 1,25 µg/mL), proteína básica de mielina (MBP; 10 µg/mL), Cop-1 (10 µg/mL), ovoalbúmina (OVA; 10 µg/mL) o sin antígeno, en un medio de estimulación. Transcurridas 48 horas, las células fueron centrifugadas y sus supernatantes fueron recogidos y muestreados. Las concentraciones del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), en las muestras, fueron determinadas con un denominado sándwich ELISA sensible. En resumen, 96 placas de fondo plano se recubrieron con un anticuerpo BDNF antihumano de embrión de pollo (Promega, Madison, WI) en 0,025 M en  $\text{NaHCO}_3$  y 0,025 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 8.2). Un BDNF humano recombinante (utilizado como un estándar; Research Diagnostics, Flanders, NJ) fue utilizado en diluciones serie en solución de bloqueo que contiene 3% de albúmina de suero bobino, 0,05% de monolaurato de polioxietileno-sorbitano (Tween-20) y 1% de suero bovino fetal en PBS (pH 8.2). BDNF ligado fue detectado incubando las placas con un anticuerpo de BDNF antihumano de ratón (Research Diagnostics) y luego con conjugado anti +IgG de ratón con peroxidasa de cabra (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) en solución de bloqueo. Las placas fueron desarrolladas utilizando un sistema de sustrato líquido de 3,3', 5,5'-etrametilbenzidina (Sigma-Aldrich). La reacción fue interrumpida añadiendo una solución 1 M de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y la densidad óptica fue determinada a 450 nm. Los resultados para cada experimento fueron calculados como la cantidad de BDNF secretada por 1 mL de muestra, después de la sustracción de niveles básicos de los timocitos irradiados, incubados con el medio de estimulación.
- (vi) Soluciones de fármacos. Soluciones recientes de maleato de dizocilpina (MK-801; Sigma-Aldrich) fueron preparados en solución salina fisiológica (0,9% de NaCl en agua destilada estéril) para cada lote de ratones. Una solución salina fisiológica fue también utilizada como un excipiente para sulfato D-anfetamina (AMPH; Sigma), MK-801 (0,1 mg/kg) o AMPH (2,5 mg/kg) o solución salina fue inyectada i.p (intraperitoneal) en un volumen total de 5 ml por kg de peso corporal. Los ratones fueron inyectados con MK-801, AMPH o durante 15 minutos con excipiente antes de someterse a ensayos de comportamiento.
- (vii) Ensayo de comportamiento de laberinto de agua de Morris (MWM). La condición de aprendizaje /memoria espacial fue evaluada por el comportamiento en una tarea de aprendizaje visuoespacial dependiente de hipocampal en el laberinto MWM. A los ratones se les realizó cuatro pruebas por día, durante cuatro días consecutivos, para encontrar una plataforma oculta situada 1,5 cm por debajo de la superficie del agua en una piscina de 1,4 m de diámetro. Dentro de la sala de ensayos, solamente pistas visuoespaciales distales estaban disponibles para los ratones para la localización de la plataforma sumergida. La latencia de escape, esto es, el tiempo requerido por el ratón para encontrar y subir a la plataforma, fue registrado durante hasta 60 segundos. A cada ratón se le permitió permanecer en la plataforma durante 30 segundos y fue luego desplazado desde el laberinto a su jaula propia. Si el ratón no encontró la plataforma transcurridos 120 segundos, fue manualmente colocado sobre la plataforma y devuelto a su jaula después de 30 segundos. El intervalo inter-pruebas fue de 30 segundos. En el día 5, la plataforma fue retirada de la piscina y cada ratón fue sometido a un ensayo de sonda durante 60 segundos. En los días 6 – 7, la plataforma fue colocada en el lugar opuesto y el ratón fue realizado en cuatro sesiones. Los datos fueron registrados utilizando un sistema de seguimiento automatizado de EthoVision (Noldus Information Technology, Wageningen, Países Bajos).
- (viii) Inhibición prepulso (PPI). Todas las sesiones para los ensayos de PPI consistían en ensayos de sobresalto (pulso solo), ensayos de prepulso (prepulso más pulso) y ensayos sin estímulo (*no-stim*). El ensayo de pulso solo consistía en un pulso de 40 ms, 120 dB de ruido de banda ancha. La PPI acústica fue medida por los ensayos de prepulso más pulso constituidos por un prepulso de 20 ms, un retardo de 100 ms y luego, un pulso de sobresalto de 40 ms y 120 dB. El intervalo del principio al final fue de 120 ms. Las intensidades de prepulsos acústicos fueron 4, 8, 13 y 16 dB por encima del ruido de fondo de 65 dB (esto es, 69, 73, 78 y 81 dB). El ensayo sin estímulo consistía en ruido de fondo solamente. La sección acústica de la sesión de ensayo comenzó y finalizó con cinco presentaciones del ensayo de pulso solo; en el intermedio, cada tipo de ensayo acústico o sin estímulo fue presentado 20 veces en un orden pseudo-aleatorio. El tiempo medio entre ensayos fue de 15 segundos (gama: 12 a 30 segundos). Después de que los ratones fueran colocados en las cámaras de sobresalto, un ruido de fondo de 65 dB fue generado durante un periodo de aclimatación de 5 minutos y luego, a través de la sesión del ensayo. El valor de PPI fue calculado como una puntuación porcentual para cada tipo de ensayo de prepulso acústico: % PPI = 100 – {(respuesta de

sobresalto para pre-impulso + pulso)/(repuesta de sobresalto para pulso solo)] x 100}. La magnitud de la respuesta de sobresalto acústica fue calculada como la respuesta media a la totalidad de los ensayos de pulso solo, excluyendo el primero y el último bloque de ensayos solos de cinco pulsos cada uno. Para mayor brevedad, los principales efectos de la intensidad del prepulso (que fueron siempre significativos) no se presentan en esta descripción. Los datos procedentes de los ensayos sin estímulo no están incluidos en los ejemplos porque los valores obtenidos fueron despreciables en relación con los valores de los ensayos que contienen estímulos de sobresalto.

(ix) Inducción de estrés psicológico. Los ratones en los grupos experimentales fueron expuestos, durante 10 minutos, a un lecho de gato con gran suciedad (utilizado por un gato durante 2 días y lleno de heces). Los ratones de control (WT) fueron expuestos durante el mismo tiempo a un lecho no utilizado.

Ensayos del comportamiento:

(x) Laberinto en cruz elevado (EPM). El laberinto que utilizamos fue una plataforma de perspex opaca negra con cuatro brazos en la forma de una cruz, con una elevación de 78 cm por encima del nivel del suelo, según se describe por File (Griebel et al., 1995). Cada brazo tenía 24 cm de longitud y 7,5 cm de anchura. Un par de brazos opuestos estaba "cerrado" esto es, los brazos estaban encerrados por paredes de perspex de 20,5 cm de altura en ambos lados y en los bordes exteriores de la plataforma y el otro par estaba "abierto", rodeado solamente por un reborde de perspex de 3 mm de altura, que servía como una guía táctil para los animales en las zonas abiertas. El aparato estaba iluminado por una luz roja sumergida que proporcionaba 40 – 60 lux en los brazos abiertos y en los brazos cerrados. Los ratones fueron colocados, uno a uno, en la plataforma central, mirando hacia diferentes brazos en diferentes días en un orden aleatorizado. Entre cada sesión de ensayo, el laberinto fue limpiado con una solución acuosa del 5% de etanol y secado a fondo.

El comportamiento en el EPM fue registrado utilizando programas de EthoVision (Noldus) que registraron la posición del ratón durante el periodo de ensayo de 5 minutos. Para garantizar que el software proporcionara un control exacto de los diversos parámetros seleccionados para análisis, la reproducción en cinta de vídeo del comportamiento de ratones aleatoriamente elegidos fue objeto de escrutinio por un observador experimentado.

Se evaluaron cinco parámetros del comportamiento: (1) tiempo de estancia en los brazos abiertos; (2) tiempo de estancia en los brazos cerrados; (3) número de entradas en los brazos abiertos; (4) número de entradas en los brazos cerrados; (5) número total de entradas en todos los brazos. Los ratones fueron registrados como habiendo entrado en un brazo abierto o cerrado solamente cuando las cuatro ramas habían pasado a través de la línea de división entre los brazos abiertos y cerrados. El número de entrada/salida en cualquier brazo del laberinto (entradas en brazos totales) fue definido como "actividad de exploración".

(xi) Respuesta de sobresalto acústico (ASR). Pares de ratones fueron sometidos a ensayo en cámaras de sobresalto. La inhibición de prepulso y ASR fueron medidas utilizando dos cámaras de sobresalto ventiladas (sistema SR-LAB, San Diego Instruments, San Diego, CA). Cada cámara consiste en un cilindro de Plexiglas que se apoya sobre una plataforma en el interior de una cámara de sonido atenuado ventilada. Un altavoz de alta frecuencia, en el interior de la cámara, produce un ruido de fondo de banda ancha continua de 68 dB y diferentes estímulos acústicos. El desplazamiento en el interior del tubo se detecta por un acelerómetro piezoeléctrico situado por debajo del bastidor. La amplitud de la respuesta ASR del cuerpo completo a un pulso acústico fue definida como la media de 100 lecturas del acelerómetro, con intervalos de 100 ms, recogidos desde el principio del pulso. Estas lecturas (señales) fueron digitalizadas y memorizadas en un ordenador. Los niveles acústicos dentro de cada cámara de ensayo se miden, de forma rutinaria, utilizando un medidor de nivel acústico (Radio Shack, San Diego Instruments) para garantizar una presentación coherente. Una unidad de calibración SR-LAB fue utilizada, de forma rutinaria, para garantizar la coherencia de la sensibilidad del estabilímetro entre cámaras de ensayo y en el transcurso del tiempo (Swer-dlow y Geyer, 1998). Los ratones fueron colocados en el interior del tubo y la sesión de sobresalto se inició con un periodo de 5 minutos de aclimatización para el nivel de ruido de fondo de 68 dB, que fue mantenido a través de toda la sesión.

(xii) Diseño de estudio para determinación de "criterios de comportamiento de corte" (CBC)

Los estudios fueron diseñados en dos etapas:

Etapla I – Antes de intentar distinguir los subgrupos diferencialmente afectados, realizamos, de forma rutinaria, una evaluación preliminar de la respuesta global de la población expuesta prevista para averiguar la exactitud de nuestra hipótesis cero, esto es, para demostrar que la exposición al estresante tenía, de hecho, efectos de comportamiento globales significativos sobre los animales expuestos como un grupo en comparación con los animales de control, en cada uno de nuestros estudios. Los datos son también averiguados para demostrar una gama de grados variables de cambios en el comportamiento.

Los cambios en el comportamiento, tales como comportamiento exploratorio muy comprometido en el laberinto en cruz y aumentado notablemente la reacción de sobresalto que no se sometió a cualquier reflejo de adaptación de

comportamientos como de ansiedad, esto es, temor y una hipervigilancia, en conformidad con el trabajo de Blanchard y Blanchard (Blanchard et al., 1990; Blanchard et al., 1993; Blanchard et al., 1998), Adamec (Adamec et al., 1998; Adamec et al., 1999a) y Cohen (Cohen et al., 1996; Cohen et al., 2000; Cohen et al., 2003) los comportamientos observados, en este punto en el tiempo, se considera que reflejan síntomas relativamente a largo plazo, cambios tales como estos, que persisten a través del espacio de una semana o más, se considera que representan un modelo adecuado de los síntomas como PTSD en términos de modelos animales.

Etapa II – El CBC aplicado a animales expuestos:

Habiendo establecido que el estresante tenía un efecto sobre los animales y que no todos los animales respondían en la misma manera, nos concentramos solamente en animales que demuestran extremos de cambio de comportamiento por un lado o prácticamente ningún lado por el otro.

Con el fin de hacer máxima la claridad de qué animales se definen como “afectados” y por ello, para reducir al mínimo la posibilidad de incluir “positivos falsos”, definimos un criterio de corte del comportamiento para representar el grado más extremo de perturbación del comportamiento en cada uno de dos paradigmas de comportamiento consecutivos. Para poder definirse como “afectado”, el animal individual ha de estar conforme con ambos conjuntos de criterios, de forma consecutiva. Por el contrario, para poder considerarse como teniendo una respuesta difícil en absoluto, los animales deben estar conformes con criterios igualmente extremos para comportamientos “cerca de normales”. La validez de los criterios son reafirmados en cada estudio averiguando que la amplia mayoría de animales de control no expuestos están conformes con los últimos y ninguno, o casi ninguno, con los anteriores. Los CBCs determinados en la forma anteriormente descrita, fueron como sigue: (a) mal adaptados: 1) cinco minutos dedicados en los brazos cerrados y cero (0) entradas en los brazos abiertos; 2) Amplitud media de la respuesta de sobresalto (a 110 Db) > 800 unidades y no habituación de la respuesta de sobresalto acústico; (b) Bien adaptados: 1) 0 – 1 minutos dedicados en los brazos cerrados y  $\geq 8$  entradas en brazos abiertos; 2) Amplitud media de la respuesta de sobresalto (en 110 Db) < 600 unidades y habituación normal de la respuesta de sobresalto acústico.

(xiii) Información suplementaria. El resultado del comportamiento en ratones expuestos al olor de un depredador ha sido utilizado como un modelo para PTSD (Adamec et al., 1999b; Cohen et al., 2003). En resumen, la exposición escapable de ratones o ratas a un olor de gato o la presencia de un gato aumenta los comportamientos defensivos observados en un sistema de la madriguera visible durante numerosas horas después de la retirada de la amenaza (Rodgers et al., 1990). La anormalidad del comportamiento de larga duración está siendo considerada como una mala adaptación al estrés por la presencia de un depredador (esto es, PTSD). El estresante y la escala de tiempos utilizada en el estudio actual podría justificar la consideración de los resultados como importantes para PTSD en conformidad con los criterios siguientes (Yehuda y Antelman, 1993): (a) El estresante es fuerte y transitorio y proporciona un establecimiento más natural que el ofrecido por otros tipos de estresantes, tales como sacudidas eléctricas en el rabo (Adamec et al., 1997). (b) La reducción observada en el tiempo de estancia por los ratones estresados en los brazos abiertos del EPM es reminiscente del comportamiento de evitación observado en pacientes con PTSD. Los ratones estresados no mostraban menos entradas totales en el EPM que los ratones no estresados este resultado es coherente con la ansiedad más bien que con el deterioro no específico de locomoción. El DSM-IV define este síntoma como la evitación persistente de recordatorios del trauma y entumecimiento de sensibilidad. Puesto que la incidencia traumática en estos ratones tuvo lugar en un espacio abierto, está en conformidad con esta definición. (c) 7 días en la vida de un ratón que normalmente vive 3 años es aproximadamente equivalente a 6 meses en un intervalo de vida humano de 72 años (Adamec et al., 1997). Por ello, parece ser que nuestra evaluación de ratones 7 días después del trauma señala, en realidad, hacia el PTSD más que una reacción de estrés agudo.

(xiv) Anticuerpos y reactivos. Recombinante de ratón IL-2 (mrIL-2) y anti-ratones  $\zeta$ -CD3 (anti-CD3; clon 145-2C11) fueron adquiridos de R&D Systems (Minneapolis, MN). Anticuerpo de CD25 conjugado (PE) ficoeritrina anti-ratones (PC61) fue adquirida de Pharmingen (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

(xv) Histología e inmunohistoquímica de secciones de cerebro embebidas en parafina. Los tejidos cerebrales embebidos en parafina de ratones atímicos deficientemente adaptados reconstituidos con una población normal de esplenocitos de tipo silvestre o de ratones atímicos, bien adaptados, reconstituidos con esplenocitos de tipo silvestre agotados de células Treg, fueron cortados en secciones coronarias de 4  $\mu$ m de espesor, desparafinados con xileno y deshidratados con una serie graduada de soluciones de etanol. Las secciones fueron luego coloreadas con azul rápido de Luxol (Sigma-Aldrich, Israel) y contracoloreadas con Fast Red (Sigma, Israel). Para análisis inmunohistoquímicos, secciones desparafinadas y deshidratadas fueron sumergidas (durante 30 minutos) en metanol conteniendo 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 1% de HCl concentrado para bloquear la actividad de peroxidasa endógena, tratado (durante 1 hora) con solución tamponada salina de fosfato (PBS), pH 7,4, que contiene un 20% de suero de conejo normal y 0,3% de Triton X-100 e incubada durante la noche a temperatura ambiente con anticuerpos anti-CD3 (Serotec, Oxford, Reino Unido, diluido a 1:50 en PBS conteniendo un 2% de suero de conejo normal). Las secciones fueron lavadas con PBS e incubadas durante 30 minutos, primero con IgG anti-conejo biotinilada y luego, con un complejo de peroxidasa biotinilada, avidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La actividad de peroxidasa en una solución de 3,3'-diaminobenzidina fue visualizada por microscopía de luz.

(xvi) Preparación de esplenocitos. Esplenocitos de donantes de ratas (con edad de hasta 10 semanas) fueron

obtenidos mediante ruptura del bazo y con los procedimientos convencionales siguientes. Los esplenocitos fueron lavados con solución tamponada hipotónica (ACK) para la lisis de hematíes.

5 (xvii) Preparación de linfocitos. Nodos de linfocitos de ratones donantes (axilares, inguinales, cervicales superficiales, mandibulares y mesentéricos), fueron objeto de ruptura a través de mallas. Los linfocitos fueron lavados con solución tamponada hipotónica (ACK) para lisis de hematíes.

10 (xviii) Purificación de células T de  $CD4^+CD25^+$  y  $CD4^+CD25^-$ . Nodos linfáticos fueron recogidos y pasados por mallas. Las células T fueron enriquecidas por la selección negativa y purificadas en columnas de células CD3 (MTCC-25; R&D Systems). Las células T enriquecidas fueron incubadas con microperlas anti-CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y células T negativamente seleccionadas  $CD4^+$  fueron incubadas con células anti-CD25 conjugada con PE (30 pg/ $10^9$  células) en suero bovino fetal al 2%/PBS. A continuación, fueron lavadas e incubadas con microperlas anti-PE (Miltenyi Biotec) y sometidas a separación magnética con AutoMACS (Miltenyi Biotec). Las células retenidas fueron eluidas desde la columna como células  $CD4^+CD25^+$  purificadas. La fracción negativa constituida por células T  $CD4^+CD25^-$ . La pureza de las células fue comprobada por FACSort (Becton-Dickinson) y variaron normalmente desde el 88% al 95%. Las células purificadas fueron cultivadas en placas de 24 pocillos (1 ml).

20 (xix) Activación de células T reguladas de  $CD4^+CD25^+$ . Las células T reguladas purificadas (Treg;  $0,5 \times 10^6$ /ml) fueron activadas en un medio de RPMI suplementado con L-glutamina (2 mM), 2-mercaptoetanol ( $5 \times 10^{-5}$  M), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 IU/ml), estreptomina (100 µg/ml), aminoácidos no esenciales (1 ml/100 ml) y esplenocitos de suero autólogos al 2% (vol/vol) en la presencia de mLL-2 (5 ng/ml) y anticuerpos anti-CD3 solubles (1 ng/ml). Esplenocitos irradiados (2500 radio de curvatura) ( $1,5 \times 10^6$  ml) fueron añadidos al cultivo. Las células fueron activadas durante 24 o 96 horas.

25 (xx) Ensayo de inhibición (co-cultivo de Teff con Treg). Células T efectoras sin previa experiencia en el tratamiento (Teff;  $50 \times 10^3$ /pocillo) fueron co-cultivadas con un número decreciente de Treg activado durante 72 horas en placas de fondo plano de 96 pocillos en la presencia de esplenocitos irradiados ( $10^6$ /ml) suplementados con anticuerpos anti-CD3. [ $^3$ H]-timidina (1 µCi) fue añadida a las últimas 16 horas de cultivo. Después de que fueran recogidas las células, su contenido en [ $^3$ H]-timidina analizado fue objeto de análisis por el uso de un contador de gamma.

Ejemplo 1. La vacunación con Cop-1 tiene un efecto antipsicótico y protege contra la disfunción sensorimotora inducida por agentes psicotomiméticos

35 El maleado de dizocilpina ((+)MK-801, un antagonista del canal de conector de N-metil-D-aspartato (NMDA) y AMPH actúan como agentes psicotomiméticos, que inducen, a través del desequilibrio neurotransmisor, síntomas psicóticos en personas sanas y exacerbando los síntomas psicóticos en pacientes esquizofrénicos (Lahti et al., 2001). Por lo tanto, utilizamos estos dos compuestos en un modelo animal para inducir un comportamiento psicótico que simula anomalías de comportamiento y celulares asociadas con la esquizofrenia (Tenn et al., 2003).

40 El desequilibrio neurotransmisor inducido por MK-801 o AMPH causa también una disfunción sensorimotora, otra característica distintiva de los pacientes con esquizofrenia. Puesto que (según se indica a continuación), la terapia basada en células T contrarrestaba el efecto de estos fármacos sobre la cognición, supusimos que otras funciones perjudicadas por estos fármacos serían afectadas de forma similar. La función sensorimotora puede evaluarse experimentalmente por PPI inducida por fármacos de la respuesta de sobresalto acústico. Una semana antes de la administración de MK-801 o AMPH, los ratones C57B1/6J fueron inoculados con Cop-1/CFA o con PBS/CFA. Los fármacos psicotomiméticos fueron inyectados 15 minutos antes de la medición del valor de PPI (Van den Buuse et al., 2003). Como estaba previsto, el valor de PPI en ratones normales, no tratados aumentó con la intensidad de prepulso creciente (Figura 1a) mientras que, en los ratones inyectados con MK-801 (C57B1/6J) o AMPH (Figura 1d), la respuesta de PPI era anormal. La vacunación con Cop-1 /CFA, pero no con PBS/CFA, impidió el comportamiento anormal inducido por MK-801 (Figuras 1b, 1c). Resultados similares se obtuvieron con AMPH con (Figura 1d) y sin inmunización de Cop-1 (Figura 1e). De este modo, la disfunción sensorimotora, inducida por la administración de dichos agentes psicotomiméticos, fue impedida o restablecida parcialmente mediante vacunación con Cop-1/CFA.

55 Debido al rápido inicio de síntomas que se produce en el paradigma experimental aquí utilizado, los ratones tuvieron que vacunarse antes de que fuera inducida la psicosis. Otros experimentos con una más amplia ventana para la intervención terapéutica han demostrado, en realidad, que la vacunación con Cop-1 después de la exposición de ratas a los fármacos psicotomiméticos fue beneficiosa (no ilustrada).

60 Ejemplo 2. Las funciones cognitivas son perjudicadas en ausencia de células T

65 Para establecer si los procesos de aprendizaje y de memoria son dependientes de la integridad del sistema inmune, comparamos la función del aprendizaje espacial/memoria de ratones de tipo silvestre y ratones SCID BALB/c/OLA, utilizando el MWM, una tarea de aprendizaje visuo-espacial/memoria dependiente de hipocámpal: Los ratones SCID manifestaron un impedimento significativo de la memoria espacial en comparación con sus contrapartidas de tipo silvestre (Figuras 2a – 2c). Durante las fases de adquisición (Figura 2a), extinción (Figura 2b) y reversión (Figura 2c)

de la tarea de MWM, los ratones desprovistos de inmunidad adaptativa mostraron un incremento importante de la latencia al buscar la plataforma oculta en comparación con los ratones de tipo silvestre (Figuras 2a – 2c). A diferencia del tipo silvestre, los ratones inmunodeficientes (SCID) dejaban de recordar datos de la prueba de adiestramiento del día anterior (Figuras 2a, 2c). Además, los ratones SCID iniciaron su actividad a un nivel más bajo de rendimiento que los del tipo silvestre, lo que indica que sus aptitudes generales en la realización de la tarea fueron deterioradas, al menos en alguna medida (Figura 2a). Los dos grupos no mostraron diferencias en su comportamiento con respecto a la realización de la tarea de la plataforma visual o en un ensayo en el que se eliminaron las pistas distales y los ratones se sometieron a ensayo una vez al día durante 4 días o en sus estrategias de natación, distancia o velocidad (datos no ilustrados).

Conviene señalar que, en el conjunto anterior de experimentos, utilizamos ratones SCID (deficientes en las respuestas de células T y de células B) en lugar de ratones atímicos (deficientes solamente en células T maduras) para excluir diferencias que podrían ser atribuibles a la ausencia de piel (en ratones atímicos) en lugar de las simples diferencias en la actividad del sistema inmune. La inmunodeficiencia de ratones SCID, sin embargo, es un resultado de la knockout/de generaciones RAG 1/2. Puesto que RAG1 se expresa en cerebros de ratones normales (Kim et al., 2003) (aunque sus funciones sean todavía desconocidas), era necesario fundamentar todavía más nuestra conclusión de que la diferencia observada entre los ratones SCID y los ratones de tipo silvestre era atribuible a la inmunidad de células T. Por lo tanto, comparamos a los ratones sin pelo reconstituidos con una población de células T normal con ratones atímicos no reconstituidos (Figura 2). Reforzamos a los ratones sin pelo con células T procedentes de ratones de tipo silvestre adaptados y los sometimos a ensayo 3 semanas después sobre la tarea de MWM (Figuras 2d – 2f). Durante las fases de adquisición y de reversión, los ratones atímicos reconstituidos con células T mostraron una latencia notablemente más corta en la búsqueda de la plataforma oculta que los ratones sin pelo sin reconstituir. En la fase de extinción, los ratones reconstituidos necesitaban dedicar menos tiempo que los ratones sin reconstituir en el cuadrante de adiestramiento para los ensayos. Además, los ratones no reconstituidos eran notablemente menos capaces de recordar datos del ensayo de adiestramiento del día anterior y presentaban aptitudes de aprendizaje más lentas que sus contrapartidas reconstituidos (Figuras 2d – 2f).

Ejemplo 3. La vacunación de Cop-1 es protectora contra el deterioro cognitivo inducido por agentes psicotomiméticos

Los resultados anteriores nos estimularon para examinar la posibilidad de que, en ratones con funciones cognitivas deterioradas causadas, por ejemplo, por el desequilibrio neurotransmisor, el refuerzo de las células T pertinentes (p.e., mediante vacunación basada en células T) podría tener un efecto terapéutico.

Como se indicó con anterioridad, MK-801 y AMPH inducen síntomas psicóticos. En los ratones, dichos síntomas simulan evidentemente el deterioro cognitivo y las anormalidades en el comportamiento, asociadas con la esquizofrenia (Tenn et al., 2003). Varios autores han informado de un déficit inducido por MK-801 en la adquisición de memoria espacial (Whishaw et al., 1989; Ahlander et al., 1999) y en las tareas de memoria no espacial (Griesbach et al., 1998).

Para examinar si la vacunación basada en células T puede superar las anormalidades en el comportamiento y el deterioro cognitivo resultante del desequilibrio neurotransmisor, inmunizamos a ratones con Cop-1. Este antígeno sintético actúa evidentemente como un agonista débil de una amplia gama de células T auto-reactivas, con lo que se estimula una respuesta que es objeto de mediación por las células T que tienen una reacción cruzada con los antígenos de CNS y se necesita para superar las condiciones neurodegenerativas (Kipnis et al., 2000). Conviene señalar que, a diferencia de los antígenos asociados con la mielina y otros antígenos asociados con CNS, los antígenos (tales como ovoalbúmina) que no tienen una reacción cruzada con las proteínas específicas del CNS dejan de acumularse en el cerebro sano y no tienen ningún efecto protector (Kipnis et al., 2000; Moalem et al., 2000).

Una semana antes de recibir la administración del fármaco psicotomimético, los ratones C57B1/6J fueron inmunizados con el copolímero Cop-1 emulsificado en CFA o con PBS emulsificado en CFA. En relación con el comportamiento en ratones normales sin previa experiencia en el tratamiento, el rendimiento de una tarea que requiere aprendizaje y memoria espacial en el MWM fue notablemente deteriorada en ratones inyectados con MK-801 o AMPH (Figuras 3a, 3b), según se indica por sus latencias de escape notablemente más altas. Durante las fases de adquisición (Figuras 3c, 3c) y de reversión (Figuras 3d, 3f) de la tarea de MWM, los ratones inyectados con PBS/CFA, que habían recibido uno u otro de los fármacos psicotomiméticos, tardaron notablemente más tiempo que los correspondientes ratones vacunados con Cop-1/CFA en adquirir la tarea de navegación espacial, si eran capaces de adquirirla en absoluto. En la fase de extinción, los ratones normales sin previa experiencia en el tratamiento mostraron un decremento a través de ensayos sucesivos en el tiempo de estancia en el cuadrante de adiestramiento (Figura 3g). La inyección de MK-801 debilitó esta característica distintiva en ratones inmunizados con PBS/CFA (Figura 3h) pero no en ratones inmunizados con Cop-1/CFA (Figura 3i). Resultados similares se obtuvieron en ratones inyectados con anfetamina (datos no ilustrados).

Los ratones vacunados con Cop-1/CFA, inyectados con cada uno de los fármacos psicotomiméticos, aprendieron a nadar hacia la plataforma oculta y a hacer uso de ella como un refugio trepando y permaneciendo sobre la

plataforma, según se indica por las latencias decrecientes en ensayos sucesivos. Por el contrario, cuando los ratones inyectados con PBS/CFA correspondientes encontraron la plataforma oculta, se comportaron en una manera anormal y deficientemente adaptativa. Incluso cuando se colocaron directamente sobre la plataforma oculta después de un ensayo en el que habían fallado en su localización, estos ratones andaban con rapidez o saltaban fuera y continuaban nadando de una manera aleatoria y desorganizada. En todas estas tareas el comportamiento de los ratones normales sin previa experiencia en el tratamiento y de los ratones inyectados con CFA/PBS normales fue idéntico (datos no ilustrados).

La Figura 4 ilustra el comportamiento de los ratones normales sin previa experiencia en el tratamiento y de los ratones tratados con MK-801 inmunizados con Cop-1/CFA o PBS/CFA y demuestra que los ratones inmunizados con Cop-1/CFA, a diferencia de los ratones inmunizados con PBS/CFA adoptaron estrategias de natación metódicas similares a las observadas en ratones normales. En consecuencia, los ratones vacunados con Cop-1/CFA, inyectados con un fármaco psicotomimético, aprendieron a nadar alejándose de la pared para buscar la plataforma en la parte interior de la piscina y para utilizar la plataforma como un refugio cuando la encontraban. Por el contrario, el comportamiento de los ratones tratados con PBS/CFA, inyectados con un fármaco psicotomimético, mostraron perturbaciones graves, incluyendo hiperactividad, natación sobre la plataforma y natación sin objetivo en círculos. Su rendimiento subsiguiente en la tarea de laberinto en cruz elevado indicó, sin embargo, que las diferencias observadas en la capacidad de aprendizaje espacial en el MWM entre estos dos grupos de ratones no eran causadas por una diferencia en ansiedad. Además, en el ensayo de comportamiento social, los ratones que estaban vacunados con Cop-1 mostraron también un mejor comportamiento comunicativo que los ratones de control (datos no ilustrados).

Ejemplo 4. La dependencia de las cepas y dependencia de células T sobre la capacidad para soportar el estrés psicológico

La protección contra las condiciones neurodegenerativas en el sistema nervioso central CNS es dependiente de las células T. El trauma psicológico, como la agresión física del CNS, puede causar amplios cambios a largo plazo en el funcionamiento neurológico y neurohormonal y parece estar relacionados con los cambios estructurales (Markowitsch et al., 1998; Myhrer, 1998). Existe evidencia de que el estado mental/emocional afecta directamente al estado del sistema inmune (de Groot et al., 2002; McEwen, 2002; Dhabhar y McEwen, 1999). Por lo tanto, es de interés examinar el efecto de las células T CD4<sup>+</sup> (inmunidad adaptativa) sobre la capacidad para soportar el trauma psicológico.

En este caso, examinamos si las células T desempeñan también una función importante en la capacidad de los ratones para soportar el estrés psicológico (causado, por ejemplo, por el olor del depredador) asociado con cambios en el comportamiento reminiscentes del trastorno por estrés post-traumático (PTSD). Estudios anteriores han demostrado que la exposición de ratas o ratones a un depredador (gato) o al olor de un depredador (lecho de gato con alto grado de suciedad) durante 10 minutos causa un importante estrés en estos animales (Adamec et al., 1997, 1999a, 1999b; Cohen et al., 1996, 2000, 2003). Este modelo de estrés fue utilizado en este caso.

La medición de la adaptación del comportamiento (respuesta de sobresalto acústico y comportamiento de evitación) en ratones después de su exposición al olor del depredador puso de manifiesto que la adaptación deficiente era bastante más predominante ( $\chi^2=10.6$ ,  $P<0,001$ ) en ratones inmunodeficientes (62%) que en sus contrapartidas del tipo silvestre (17%). La prevalencia de la adaptación deficiente en los ratones normales se redujo con la retirada de células Treg de presentación natural, que suelen suprimir la autoinmunidad. La capacidad para superar el estrés estaba en correlación con la obtención de células T en el cerebro. Estos resultados sugieren que un diálogo dependiente de células T, bien controlado, entre el cerebro y el sistema inmune se necesita para la denominada *mens sana in corpore sano*.

Expusimos primero ratones adultos, sin previa experiencia en el tratamiento, de dos cepas (C57B1/6J y BALB/c) al olor de un gato, según se describió anteriormente (Cohen et al., 2003). Transcurridos (7) días, evaluamos sus respuestas de comportamiento para dos pruebas de comportamiento secuencialmente administradas, el laberinto en cruz elevado (EPM) y la respuesta de sobresalto acústico (ASR), que juntas proporcionan un marco de trabajo para los criterios de comportamiento de corte seleccionados (CBC). Clasificando los ratones sometidos a ensayo como "mal adaptados" o "bien adaptados", podríamos determinar la predominancia de los animales más gravemente afectados.

Las dos cepas (C57B1/6J y BALB/c) presentaron diferencias en su adaptación global al trauma psicológico impuesto (Figuras 5a – 5c). La incidencia de la adaptación deficiente en los ratones C57B1/6J fue del 36,8%, mientras que en los ratones BALB/c fue solamente del 10,5% ( $\chi^2=3.7$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 5a). Las diferencias fueron significativamente manifestadas en la respuesta ASR (Figura 5b), pero no en el tiempo de estancia en los brazos cerrados del EPM (Figura 5c). Este resultado está en conformidad con las observaciones anteriores en relación con la capacidad relacionada con las cepas de ratones para soportar la toxicidad del glutamato y la lesión del nervio óptico (Kipnis et al., 2001).

Los resultados obtenidos nos estimularon a investigar si el sistema inmune adaptativo (representado por las células



T de CD4<sup>+</sup>) afecta a las consecuencias en el comportamiento del estrés mental traumático y la adaptación a dicho estrés. Por lo tanto, examinamos la capacidad para la adaptación al estrés psicológico en la ausencia del sistema inmune de funcionamiento adecuado. Debido a la incidencia relativamente baja de la adaptación deficiente en los ratos BALB/c (Figura 5a), utilizamos esta cepa para comparar la respuesta al estrés en los ratones de tipo silvestre (WT) a las que tienen los ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) con el mismo fundamento genético. Un número bastante mayor de ratones mostraron síntomas de adaptación deficiente en el ratón SCID en el WT (61, 9% en comparación con el 17,2%;  $\chi^2 = 10,6$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 5d). La misma comparación entre ratones sin pelo (desprovistos de células T maduras solamente) y los datos de WT proporcionaron resultados similares (70% en comparación con el 17,2%;  $\chi^2 = 13,9$ ,  $P < 0,0002$ ; Fig. 5d, lo que verifica que las diferencias observadas se debía a la ausencia de células T maduras. Las diferencias entre los ratones WT y los ratones SCID así como los ratones sin pelo se manifestaron, de forma significativa, en el ASR (Figura 5e) así como en el tiempo de estancia en los brazos cerrados del EPM (Figura 5f).

Ejemplo 5. Adaptación del comportamiento al estrés psicológico

La Figura 6 ilustra la capacidad de los ratones inmunizados con Cop-1 para soportar el estrés psicológico en comparación con los ratones tratados con PBS (ratones de control), después de una exposición única de 10 minutos al olor de un depredador. Puede observarse que esta exposición única causó cambios en el comportamiento en el 40,8% de ratones de control C57B1/6J machos (inmunizados con PBS emulsificado en CFA) y en solamente un 14,8% de ratones inmunizados con Cop-1. La adaptación deficiente, junto con los síntomas de PTSD, fueron más predominantes en los ratones de control que en los ratones inmunizados con Cop-1 ( $P < 0,05$ ), lo que verifica que las diferencias observadas eran atribuibles a la presencia de células T reactivas con Cop-1 protectoras.

Ejemplo 6. Producción de BDNF por células T reactivas con Cop-1 al encontrar proteínas cerebrales

Varios grupos de investigación han informado que las células T reactivas a Cop-1 existen en sitios de patología en el sistema nervioso central CNS (Kipnis et al., 2000; Aharoni et al., 2002) y que las células T reactivas con Cop-1 activadas, que son capaces de una reacción cruzada con varios autoantígenos relacionados con el sistema nervioso central CNS, pueden producir factores neurotróficos tales como BDNF (Kipnis et al., 2000; Aharoni et al., 2002; Kerschensteiner et al., 2003), que es conocido por su capacidad para conferir neuroprotección para tejidos del CNS lesionados. La deficiencia de BDNF ha sido informada en pacientes con esquizofrenia (Weickert et al., 2003, Egan et al., 2003); no está claro, sin embargo, si la deficiencia es una causa o un efecto y si será beneficioso el tratamiento basado en BDNF.

La producción de factores neurotróficos por las células T depende del estado de actividad de las células T (Moalem et al., 2000). La producción de factores neurotróficos por células T reactivas con Cop-1, por lo tanto, requiere evidentemente una señal local procedente de células residentes, que presentan antígenos, que estas células T pueden reconocer. Por lo tanto, realizamos un experimento *in vitro* para determinar si las células T reactivas con Cop-1, al encontrar la mielina del CNS, pueden producir BDNF.

Las células T reactivas con Cop-1 fueron cultivadas durante 48 horas con Cop-1, MBP, ovoalbúmina o concanavalina A en un medio de estimulación. Supernatantes de células T fueron recogidos y sometidos a ELISA tipo sándwich. La tabla 2 indica que la producción de BDNF por las células T reactivas con Cop-1, fue aumentada cuando estas células T encontraron no solamente su antígeno específico (Cop-1) sino también el auto-antígeno MBP relacionado con CNS. En comparación con las células T no estimuladas, la secreción de BDNF por las células T reactivas con Cop-1 aumentó notablemente después de la estimulación de las células T con un antígeno específico (Cop-1) o con un auto-antígeno (MBP) que tiene una reacción cruzada con Cop-1. Los valores son valores medios (pg/ml)  $\pm$  SE (de tres experimentos independientes) de las cantidades de BDNF secretadas por células T específicas de Cop-1 en respuesta a la estimulación por varios antígenos.

Tabla 2. ELISA de BDNF secretado por células T reactivas con Cop-1

Antígeno	-	Cop-1	MBP	OVA	Con A
pg/ml	400 +/- 45	1220 +/- 100	1500 +/- 150	440 +/-50	1100 +/- 120

Ejemplo 7. Las células T reguladoras de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg), de ocurrencia natural, suprimen la capacidad para soportar el estrés psicológico

La capacidad espontánea para eliminar las secuelas de una lesión mecánica (p.e., aplastamiento) o un insulto bioquímico (p.e., de toxicidad del glutamato) para el sistema nervioso central CNS (Kipnis et al., 2002) se suprime por Treg de ocurrencia natural, que comprende aproximadamente un 10% de la población de células T de CD4<sup>+</sup> (Shevach, 2000). Estas células se demostró que suprimen la capacidad para la eliminación de las condiciones degenerativas en el sistema nervioso central CNS impuestas, a modo de ejemplo, por lesión axonal (Kipnis et al., 2002).

Para utilizar la posibilidad de que estas células controlen la capacidad espontánea para eliminar el estrés mental, comparamos con una población de esplenocitos normal (esto es, incluyendo Treg) en ratones sin pelo reconstituidos con esplenocitos libres de Treg, la preponderancia de la adaptación deficiente fue notablemente más baja (20%) que en ratones reconstituidos con una población de células T normal que contiene Treg y células T efectoras (50%) ( $\chi^2=4,0$ ,  $P<0,046$  (Fig. 7a). Diferencias significativas entre los dos grupos se observaron tanto en el ASR (Figura 7b) y en el tiempo de estancia en los brazos cerrados del EPM (Figura 7c).

Ejemplo 8. Acumulación de células T en los cerebros de ratones estresados en correlación con la adaptación del comportamiento

En ratones y ratas que sufren de condiciones neurodegenerativas, el efecto beneficioso de las células T está en correlación con la acumulación de células T en el lugar de la lesión (Butovsky et al., 2001; Hauben et al., 2000). Para determinar la relación entre el efecto beneficioso observado de la respuesta de células T y las consecuencias de la exposición a condiciones psicológicas estresantes, examinamos si estaba implicada la presencia de células T para el sistema nervioso central CNS. Esta tarea fue realizada comparando la coloración inmunocitoquímica para las células T en segmentos cerebrales obtenidos de ratones reconstituidos con esplenocitos agotados de Treg con los procedentes de ratones reconstituidos con una población de esplenocitos total. La coloración de segmentos cerebrales con hematoxilina y eosina no revelaron ninguna alteración estructural en el hipocampo o amígdala (datos no ilustrados) entre estos dos grupos y los ratones WT. La coloración azul rápida de Luxol para la reactividad de mielina tampoco mostró diferencias entre los ratones deficientemente adaptados (Figuras 8ai, 8aii) y ratones bien adaptados (Figuras 8bi, 8biii) en comparación con ratones WT (Figura 8ci). La coloración con anticuerpos anti-CD3, sin embargo, reveló grandes números de células T en estas zonas cerebrales de ratones bien adaptados (Figuras 8aii, 8aiv) y a penas en cualesquiera ratones mal adaptados (Figuras 8bii, 8biv) o ratones WT normales (Figura 8cii), lo que sugiere que la presencia de células T en el cerebro está en correlación con la resistencia al estrés mental. Deseamos, sin embargo, resaltar que la acumulación de células T juntas es de escasa importancia y en consecuencia, no implican que el PTSD pueda beneficiarse de la inflamación, en lugar de la inmunidad adaptativa bien controlada que sirve de ayuda en la resistencia a las consecuencias del estrés mental, de forma similar al estrés físico y por intermedio del mismo mecanismo.

Ejemplo 9. El copolímero Cop-1 alivia la actividad supresora con la mediación por Treg

Las células Teff sin previa experiencia en el tratamiento ( $50 \times 10^3$  células/pocillo) fueron co-cultivadas con números decrecientes ( $50$ ,  $25$ ,  $12,5$  y  $6,5 \times 10^3$  células/pocillo) de células Treg que han sido activadas durante 24 horas con anti-CD3 y mRL-2. La actividad de las células Treg fue realizada en la ausencia del copolímero Cop-1 (control) o, transcurridas 24 horas, las células Treg activadas fueron cultivadas durante 2 horas con Cop-1 ( $20 \mu\text{g/ml}$  en PBS) antes de su co-cultivo con Teff y luego, se añadió Cop-1 ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) a los co-cultivos de Teff y Treg (Tregcop+cop) y los co-cultivos fueron incubados todavía más. La Figura 9 ilustra que la incubación del Treg (reg) activado durante 2 horas con Cop-1 antes de su co-cultivo con Teff (eff) y la incubación adicional del co-cultivo con Cop-1 alivió la supresión de Teff en comparación con el control. La proliferación de Teff aumentó también con concentraciones decrecientes de Treg activado. La proliferación de células T fue ensayada mediante la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina en células T efectoras co-cultivadas con Treg. Los valores registrados son procedentes de un experimento representativo de entre tres y se expresan por los valores medios  $\pm$  SD (desviación estándar) de 4 repeticiones.

## REFERENCIAS

- 5 Adarriec RE, Shallow T, Budgell J. Bloqueo de receptores CCK(B) pero no CCK(A) antes y después del estrés de la exposición al depredador impide aumentos duraderos en el comportamiento como de ansiedad, repercusiones para la ansiedad asociadas con el trastorno de estrés post-traumático. *Behav Neurosci* 111:435-49 (1997).
- 10 Adamec R, Kent P, Anisman H, Shallow T, Merali Z. La plasticidad neural, los neuropéptidos y la ansiedad en animales – repercusiones para conocer y tratar el trastorno afectivo después del estrés traumático en seres humanos. *Neurosci Biobehav Rev* 23:301-18 (1998).
- 15 Adamec RE, Burton P, Shallow T, Budgell J. Los receptores de NMDA efectúan una mediación de los aumentos duraderos en el comportamiento como de ansiedad producida por el estrés de la exposición a la depreciación – repercusiones para la ansiedad asociada con el trastorno por estrés post-traumático. *Physiol Behav* 65: 723-37 (1999a).
- 20 Adamec RE, Burton P, Shallow T, Budgell J. El bloque unilateral de receptores de NMDA en la amígdala impide los incrementos duraderos, inducidos por el estrés de la presencia del depredador, en el comportamiento a modo de ansiedad y el hemisferio de reflejo de sobresalto - efectivo no condicionado depende del comportamiento. *Physiol. Behav.* 65: 739-51 (1999b)
- 25 Aharoni, R., Meshorer, A., Sela, M. & Arnon, R. El tratamiento oral de ratones con el copolímero 1 (acetato de glatiramero) da lugar a la acumulación de células Th2 específicas en el sistema nervioso central. *J Neuroimmunol* 126, 58-68 (2002).
- 30 Ahlander, M., Misane, I., Schott, P.A. & Ogren, S.O. Un análisis del comportamiento del déficit de aprendizaje espacial inducido por el antagonista de receptor NMDA MK-801 (dizocilpina) en la rata. *Neuropsicofarmacología* 21, 414-26 (1999).
- 35 Amital, H. & Shoenfeld, Y. ¿Un epifenómeno o una etiología?. *Isr J Med Sci* 29,593-7 (1993).
- 40 Angelov, D.N. et al. Vacuna terapéutica para enfermedades de neuronas motoras agudas y crónicas: repercusiones para la esclerosis lateral amiotrófica. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4790-5 (2003).
- 45 Blanchard RJ, Blanchard DC, Rodgers J, Weiss SM. La caracterización y creación de modelos del comportamiento defensivo antidepredador. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 463-72 (1990).
- 50 Blanchard RJ, Shepherd JK, Rodgers RJ, Magee L, Blanchard DC. Atenuación del comportamiento defensivo antidepredador en ratas que siguen un tratamiento crónico con imipramina. *Psychopharmacology (Berl)* 110: 245-53 (1993).
- 55 Blanchard RJ, Nikulina JN, Sakai RR, McKittrick C, McEwen B, Blanchard DC. Cambio endocrino y del comportamiento después de un estrés predatorio crónico. *Physiol. Behav.* 63: 561-9 (1998).
- 60 Brzustowicz, L.M., Hayter, J.E., Hodgkinson, K.A., Chow, E.W. & Bassett, A.S. Cartografía de precisión del locus de susceptibilidad de esquizofrenia en el cromosoma 1q22. *Hum Hered* 54, 199-209. (2002).
- 65 Butovsky, O., Hauben, E. & Schwartz, M. Aspectos morfológicos de la neuroprotección inmunitaria de la médula espinal: co-localización de células T con B7-2 (CD86) y prevención de formación quística. *Faseb J* 15, 1065-7 (2001).
- 70 Cohen H, Friedberg S, Michael M, Kotler M, Zeev K. Interacción de la ansiedad inducida por CCK-4 y la ansiedad por exposición post-gato en ratas. *Depress Anxiety* 4: 144-5 (1996).
- 75 Cohen H, Kotler M, Matar M, Kaplan Z. Normalización de la variabilidad de la frecuencia cardíaca en pacientes con trastorno por estrés post-traumático según los resultados preliminares del tratamiento con fluoxetina. *Isr. Med. Assoc. J.* 2: 296-301 (2000).
- 80 Cohen H, Zohar J, Matar M. La importancia de la respuesta diferencial al trauma en un modelo de animal de trastorno por estrés post-traumático. *Biol. Psychiatry* 53: 463-73 (2003).
- 85 de Groot, J., Boersma, W.J., Scholten, J.W. & Koolhaas, J.M. Estrés social en ratones machos perjudica la inmunidad antiviral a largo plazo, de forma selectiva, en sujetos heridos. *Physiol. Behav.* 75, 277-85 (2002) de Kloet, R.E. Hormonas, cerebro y estrés. *Endocr Regul* 37, 51-68 (2003).
- 90 Deutsch, S.I., Rosse, R.B., Schwartz, B.L. & Mastropaolo, J. Una hipótesis excitotóxica revisada de repercusiones terapéuticas de esquizofrenia: repercusiones terapéuticas. *Clin Neuropharmacol* 24, 43-9 (2001).

- Dhabhar, F.S. & McEwen, B.S. Mejora respecto a los efectos supresores de hormonas del estrés sobre la función inmunitaria de la piel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 1059-64 (1999).
- 5 Egan, M.F., Weinberger, D.R. & Lu, B. Esquizofrenia, III: Factor neurotrópico derivado del cerebro y riesgo genético. *Am J Psychiatry* 160, 1242 (2003).
- Falkai, P. et al. Influencia de la carga genética, repercusiones obstétricas y ajuste premórbido sobre la morfología del cerebro en esquizofrenia: un estudio de MRI. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 253, 92-9 (2003).
- 10 Fridkis-Hareli M, Aharoni R, Teitelbaum D, Amon R, Sela M, Strominger JL. Motivos de enlace del copolímero 1 para moléculas de HLA-DR asociadas con la artritis reumatoide y esclerosis múltiple reumatoide. *J Immunol.* 162(8):4697-4704 (1999).
- 15 Fridkis-Hareli M, Santambrogio L, Stem JN, Fugger L, Brosnan C, Strominger JL. Nuevos copolímeros de aminoácidos sintéticos que inhiben las respuestas de células específicas de autoantígenos y suprimen la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental. *J Clin Invest.* 109(12):1635-43 (2002).
- Griebel G, Blanchard DC, Jung A, Blanchard RJ. Un modelo de defensa 'antidepredador' en ratones Swiss-Webster: efectos de ligandos de receptores de benzodiazepina con diferentes actividades intrínsecas. *Behav. Pharmacol.* 6: 732-745 (1995).
- 20 Griesbach, G.S., Hu, D. & Amsel, A. Efectos de MK-801 sobre el efecto empírico experimentado por otros y reversión del aprendizaje por discriminación olfativa en ratas enfermas. *Behav Brain Res* 97, 29-38 (1998).
- 25 Hauben E, Butovsky O, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov G, et al. La inmunización pasiva o activa con proteína básica de mielina favorece la recuperación desde la contusión de la médula espinal. *J. Neurosci.* 20: 6421-6430 (2000).
- 30 Javitt, D.C. Tratamiento de síntomas negativos y cognitivos. *Curr Psychiatry Rep* 1, 25-30 (1999).
- Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. Interferencia cruzada neurotrópica entre los sistemas nervioso e inmunitario: repercusiones para enfermedades neurológicas. *Ann. Neurol.* 53: 292-304 (2003)
- 35 Kim S. K, Wang K. C, Hong S. J, Chung C. K, Lim S. Y, Kim Y. Y, Chi G, Kim C. J, Chung Y. N, Kim H. J. & Cho B. K. *Epilepsy Res.* 56, 175-183 (2003).
- Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR, Schwartz M.: La inmunidad de las células T para copolímero 1 confiere neuroprotección sobre el nervio óptico dañado: posible herapia para neuropatías ópticas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 7446-51 (2000).
- 40 Kipnis J, Yoles E, Schori H, Hauben E, Shaked I, Schwartz M. La supervivencia neuronal después de la agresión al sistema nervioso central CNS se determina por una respuesta inmunitaria con codificación genética. *J. Neurosci.* 21, 4564-71 (2001).
- 45 Kipnis, J. & Schwartz, M. Acción doble del acetato de gratiramero (Cop-1) en el tratamiento de los trastornos neurodegenerativos y autoinmunitarios del CNS. *Trends Mol. Med.* 8, 319-23 (2002).
- Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M. Autoinmunidad neuroprotectora: las células T reguladoras naturales CD4+CD25+ suprimen la capacidad para soportar una lesión al sistema nervioso central. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 99: 15620-5. (2002).
- 50 Kipnis J, Nevo U, Panikashvili D, Alexandrovich A, Yoles E, Akselrod S, Shohami E, Schwartz M. La vacunación terapéutica para traumatismo craneal cerrado. *J. Neurotrauma* 20(6):559-69, (2003).
- 55 Lahti, A.C., Weiler, M.A., Tamara Michaelidis, B.A., Parwani, A. & Tamminga, C.A. Efectos de la ketamina en voluntarios normales y esquizofrénicos. *Neuropsychopharmacology* 25, 455-67 (2001).
- Lewis, D.A., Pierri, J.N., Volk, D.W., Melchitzky, D.S. & Woo, T.U. Neurotransmisión de GABA anterada y disfunción cortical prefrontal en esquizofrenia. *Biol Psychiatry* 46, 616-26 (1999).
- 60 Lieberman, J. et al. Estudio longitudinal de la morfología del cerebro en esquizofrenia de primer episodio. *Biol Psychiatry* 49, 487-99(2001).
- 65 Markowitsch, H.J. et al. Trauma psíquico que causa una gran reducción en el metabolismo cerebral y deterioro cognitivo. *Neuropsychologia* 36, 77-82 (1998).

- 5 McEwen, B.S. Efectos protectores y perjudiciales de los mediadores del estrés: los lados positivos y negativos de la respuesta al estrés. *Metabolism* 51, 2-4 (2002).
- 10 Mizrahi T, Hauben E, Schwartz M. El autopatógeno específico de los tejidos es el auto-antígeno protector: el caso de uveítis. *J. Immunol.* 169: 5971-7 (2002).
- 15 Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. Las células T auto-inmunes protegen a las neuronas contra la degeneración secundaria después de la axotomía del sistema nervioso central. *Nat. Med.* 5: 49-55 (1999).
- 20 Moalem G, Gdalyahu A, Shani Y, Otten U, Lazarovici P, Cohen IR, et al. Producción de neurotrofinas por células T activadas: Repercusiones para la autoinmunidad neuroprotectora. *J. Autoimmun* 20: 6421-6430 (2000).
- Myhrer, T. Impacto psicológico adverso, disfunción glutamatérgica y factores de riesgo para la enfermedad de Alzheimer. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 131-9 (1998).
- Raison, C.L. & Miller, A.H. La neuroinmunología del estrés y de la depresión. *Semin Clin Neuropsychiatry* 6, 277-94(2001).
- 25 Rodgers RJ, Blanchard DC, Wong LK, Blanchard RJ. Efectos de escopolamina sobre las reacciones de defensa antidepredador de ratas silvestres y de laboratorio. *Pharmacol Biochem Behav* 36: 575-83 (1990).
- Rothermundt M, Arolt V, Bayer TA. Revisión de los resultados inmunológicos e inmunopatológicos en la esquizofrenia. *Brain Behav. Immun.* 15: 319-339 (2001).
- 30 Rummel, C., Hamann, J., Kissling, W. & Leucht, S. Antipsicóticos de nueva generación para esquizofrenia de primer episodio. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004410 (2003).
- 35 Schori, H. et al. Vacunación para protección de las células ganglionares retinales contra la muerte por hipertensión ocular y citotoxicidad del glutamato: Repercusiones para glaucoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 3398-403 (2001).
- 40 Schwartz, M., Cohen, I., Lazarov-Spiegler, O., Moalem, G. & Yoles, E. El remedio puede radicar en nosotros mismos: Perspectivas para la terapia de células inmunes en la protección del sistema nervioso central y subsanamiento. *J Mol Med* 77, 713-7 (1999a).
- Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R. & Cohen, I.R. Las respuestas inmunitarias Innatas y adaptativas pueden ser beneficiosas para la curación del CNS. *Trends Neurosci* 22, 295-9 (1999b).
- 45 Schwartz M & Kipnis J. La autoinmunidad en alerta: células T reguladoras naturales CD4(+)/CD25(+) como parte del compromiso evolucionario entre una 'necesidad' y un 'riesgo'. *Trends Immunol.* 23: 530-4 (2002).
- 50 Schwartz M, Shaked I, Fisher J, Mizrahi T, Schori H. La autoinmunidad protectora contra el enemigo situado dentro: lucha contra la toxicidad del glutamato. *Trends Neurosci.* 26:297-302 (2003).
- Shevah EM. Células T reguladoras en la autoinmunidad. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 423-49 (2000).
- 55 Titelbaum D, Arnon R, Sela M. Copolímero 1: desde la investigación de base a la aplicación clínica. *Cell. Mol. Life Sci.* 53: 24-28(1997).
- Tenn, C.C., Fletcher, P.J. & Kapur, S. Los animales sensibilizados con la anfetamina muestran una reacción sensorimotora y una anomalía neuroquímica similar a la de esquizofrenia. *Schizophr Res* 64, 103-14 (2003).
- 60 Van den Buuse, M., Garner, B. & Koch, M. Modelos de animales de desarrollo reológico de esquizofrenia: efectos sobre la inhibición prepulso. *Curr Mol Med* 3, 459-71 (2003).
- Velakoulis, D. et al. Volumen hipocampal en psicosis de primer episodio y esquizofrenia: un estudio con imágenes de resonancia magnética de alta resolución. *Arch Gen Psychiatry* 56, 133-41 (1999).
- 65 Weickert, C.S. et al. Factor neurotrófico derivado de cerebro reducido en la corteza prefrontal de pacientes con esquizofrenia. *Mol Psychiatry* 8, 592-610 (2003).

Wekerle, H. Protección inmunitaria del cerebro-eficiente y delicada. J. Infect. Dis. 186 Suppl 2, S140-4 (2002).

5 Wishaw, I.Q. & Auer, R.N. Efectos inmediatos y de larga duración de MK-801 sobre la actividad motora, navegación espacial en una piscina y EEG en la rata. Psychopharmacology (Berl) 98, 500-7 (1989).

Wick G, Berger P, Jansen- A Darwinian-concepto evolucionario de enfermedades relacionadas con la edad. Durr, P. & Grubeck-Loeben-stein B. Exp. Gerontol. 38, 13-25 (2003).

10 Yehuda R, Antelman SM. Criterios para la evaluación racional de modelos de animales de trastorno por estrés post-traumático. BiolPsychiatry 33: 479-86 (1993).

15 Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gothilf A, Cohen A, et al. La autoinmunidad protectora es una respuesta fisiológica al trauma del CNS. J. Neurosci. 21:3740-8(2001).

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD. EISENBACH-SHWARTZ, Michal KIPNIS, Jonathan

20 <120> MÉTODO Y VACUNA QUE COMPRENDEN EL COPOLÍMERO 1 PARA TRATAMIENTO DE TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS

<130> YEDA-053 PCT

25 <150> US 60/527,763  
<151> 2003-12-09

<160> 32

30 <170> Patente en versión 3.2

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40 <400> 1

**Ala Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

<210> 2

45 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Péptido sintético

<400> 2

**Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

55 <210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 3

**Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

5

<210> 4  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Péptido sintético

15

<400> 4

**Ala Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

20

<210> 5  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Péptido sintético

<400> 5

**Ala Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

30

<210> 6  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Péptido sintético

<400> 6

**Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

40

<210> 7  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Péptido sintético

50

<400> 7

**Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

55

<210> 8  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

5 <400> 8

**Ala Ala Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

10 <210> 9  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 9

**Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

20 <210> 10  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 10

30 **Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

35 <210> 11  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 11

**Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

45 <210> 12  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 12

55 **Glu Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

<210> 13



<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 13

10            **Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
                  1                                  5    10    15

<210> 14  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

20 <400> 14

**Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala**  
                  1                                  5    10    15

<210> 15  
 25 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Péptido sintético

<400> 15

**Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
                  1                                  5    10    15

<210> 16  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 16

45            **Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
                  1                                  5    10    15

<210> 17  
 <211> 15  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

55 <400> 17

**Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

5 <210> 18  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223>  
 <400> 18

**Ala Lys Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

15 <210> 19  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 19

**Ala Glu Ala Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

25 <210> 20  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético  
 35 <400> 20

**Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

40 <210> 21  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 21

**Ala Glu Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

50 <210> 22  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 22

Ala Ala Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
1 5 10 15

5

<210> 23  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Péptido sintético

<400> 23

15

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
1 5 10 15

<210> 24  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Péptido sintético

25

<400> 24

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
1 5 10 15

30

<210> 25  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Péptido sintético

<400> 25

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
1 5 10 15

40

<210> 26  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Péptido sintético

<400> 26

50

Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
1 5 10 15

55

<210> 27  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

5 <400> 27

**Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

10 <210> 28  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 28

**Ala Glu Tyr Ala Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

20 <210> 29  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 29

30 **Ala Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

<210> 30

35 <211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 30

**Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

45 <210> 31  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 31

55 **Ala Tyr Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5 10 15**

ES 2 435 417 T3

<210> 32  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Péptido sintético

10

<400> 32

Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
1 5 10 15

15

**REIVINDICACIONES**

- 5      **1.** Un agente seleccionado en el grupo constituido por (i) el Copolímero 1, (ii) un péptido relacionado con el copolímero 1, (iii) un polipéptido relacionado con el copolímero 1 y (iv) células T activadas con (i), (ii) o (iii), destinado a utilizarse en el tratamiento de un trastorno, de una enfermedad o de un estado patológico psiquiátrico seleccionado entre un estado de estrés post-traumático (PTSD), la depresión, un trastorno bipolar y la esquizofrenia.
- 10     **2.** Un agente seleccionado del grupo constituido por (i) el copolímero 1, (ii) un péptido relacionado con el copolímero 1, (iii) un polipéptido relacionado con el copolímero 1 y (iv) células T activadas con (i), (ii) o (iii), para uso en la inmunización de un paciente individual que sufre de un trastorno, enfermedad o condición patológica psiquiátrica, seleccionada desde entre un estado de estrés post-traumático (PTSD), una depresión, un trastorno bipolar y la esquizofrenia.
- 15     **3.** Un agente para utilizarse en la inmunización según la reivindicación 2, en donde dicha inmunización comprende el uso de un agente sin un adyuvante.
- 20     **4.** Un agente destinado a utilizarse en la inmunización según la reivindicación 2, en donde dicha inmunización comprende la utilización de un agente emulsificado en un adyuvante adecuado para uso clínico humano.
- 25     **5.** Un agente destinado a utilizarse en la inmunización según la reivindicación 4, en donde dicho adyuvante se selecciona dentro del grupo constituido por hidróxido de aluminio, un gel de hidróxido de aluminio y el hidroxifosfato de aluminio.
- 30     **6.** Un agente destinado a utilizarse en el tratamiento según la reivindicación 1, o a utilizarse en la inmunización según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde dicho agente es el copolímero 1.
- 35     **7.** Un agente destinado a utilizarse en el tratamiento según la reivindicación 1, o para utilizarse en la inmunización según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde dicho agente es un péptido relacionado con el copolímero 1 o un polipéptido relacionado con el copolímero 1.
- 40     **8.** Un agente destinado a utilizarse en el tratamiento según la reivindicación 1, en donde dicho trastorno, enfermedad o estado patológico psiquiátrico es un trastorno de estrés post-traumático (PSTD) y dicho agente es el copolímero 1.
- 9.** Un agente destinado a utilizarse en la inmunización o el tratamiento según la reivindicación 1, en donde dicho trastorno, enfermedad o estado patológico psiquiátrico se selecciona entre la depresión y los trastornos bipolares.
- 10.** Un agente destinado a utilizarse en la inmunización o el tratamiento según la reivindicación 1, en donde dicho trastorno, enfermedad o estado patológico psiquiátrico es la esquizofrenia y dicho agente es el copolímero 1.

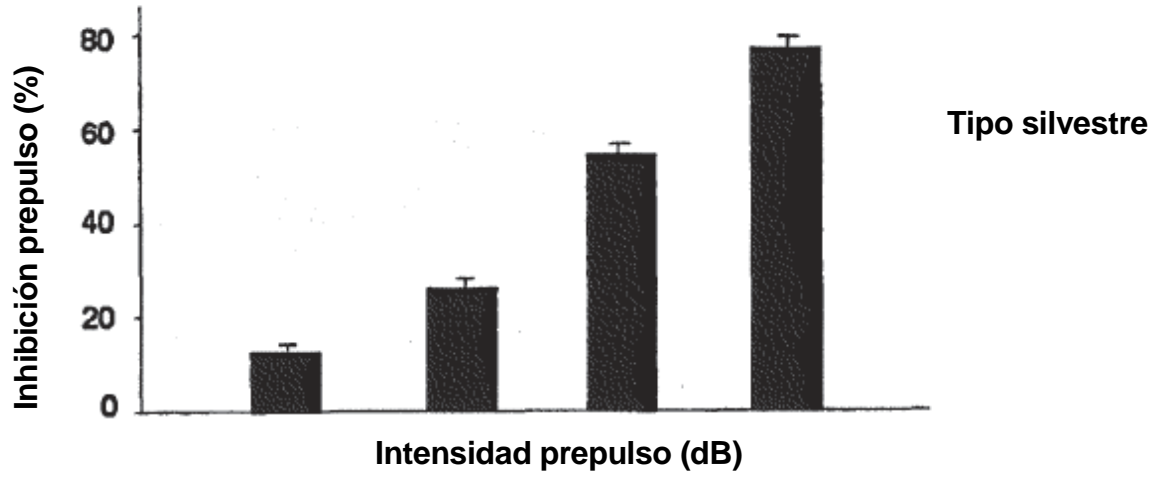


Fig. 1a

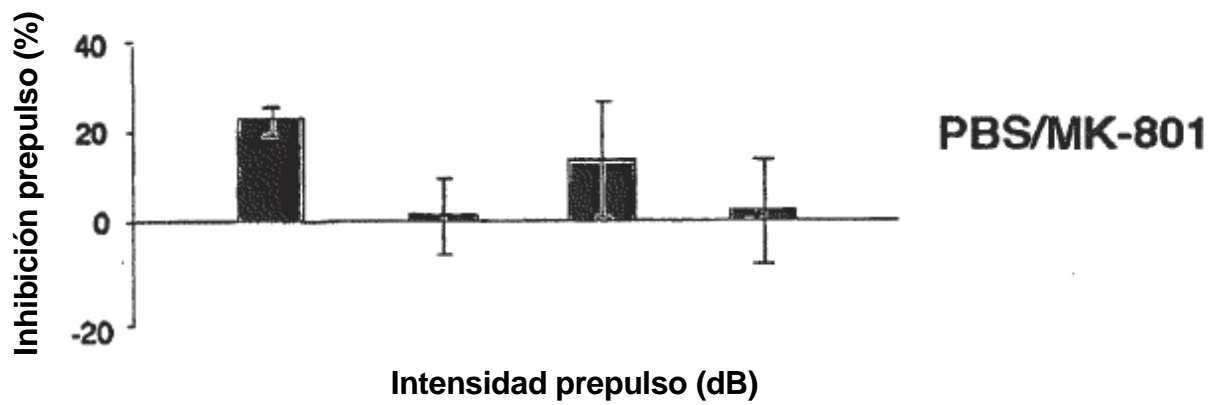


Fig. 1b

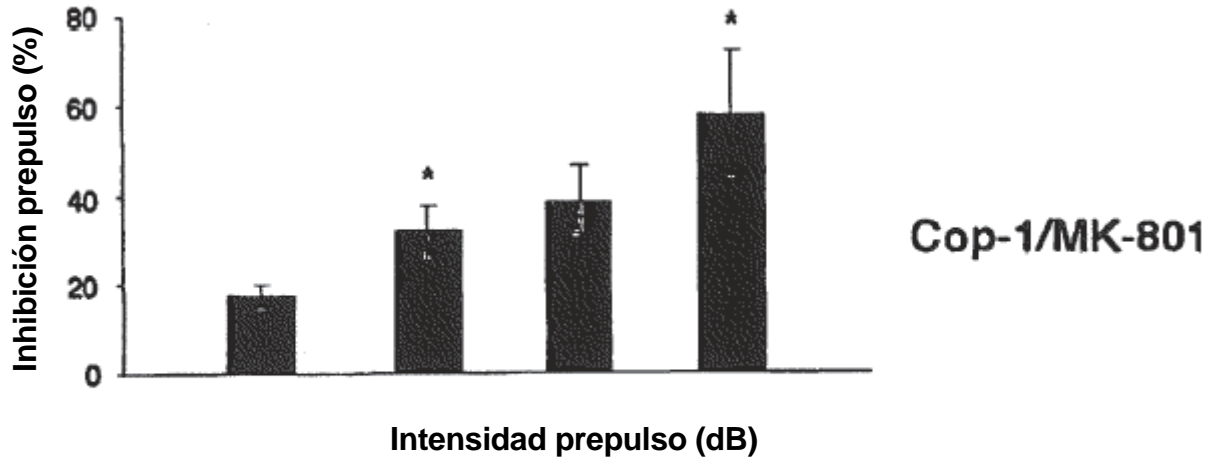


Fig. 1c

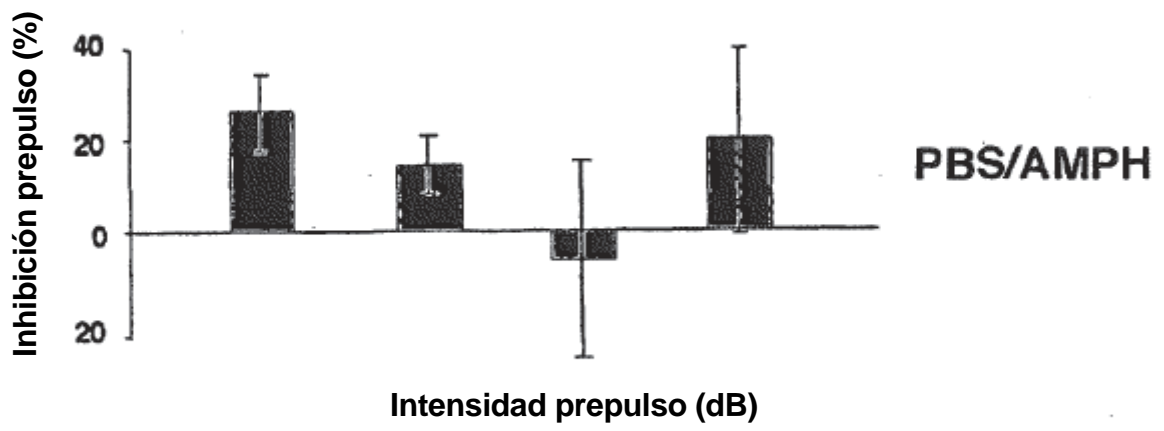
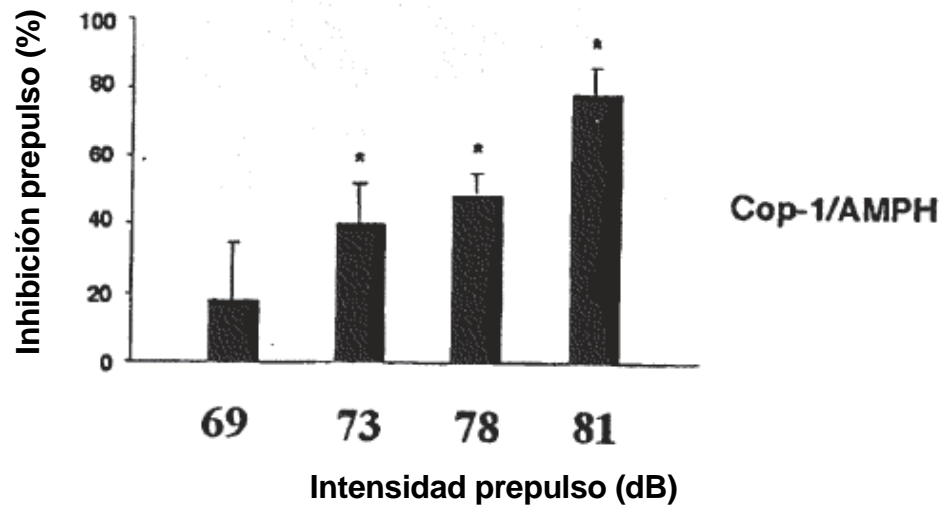


Fig. 1d





**Fig. 1e**

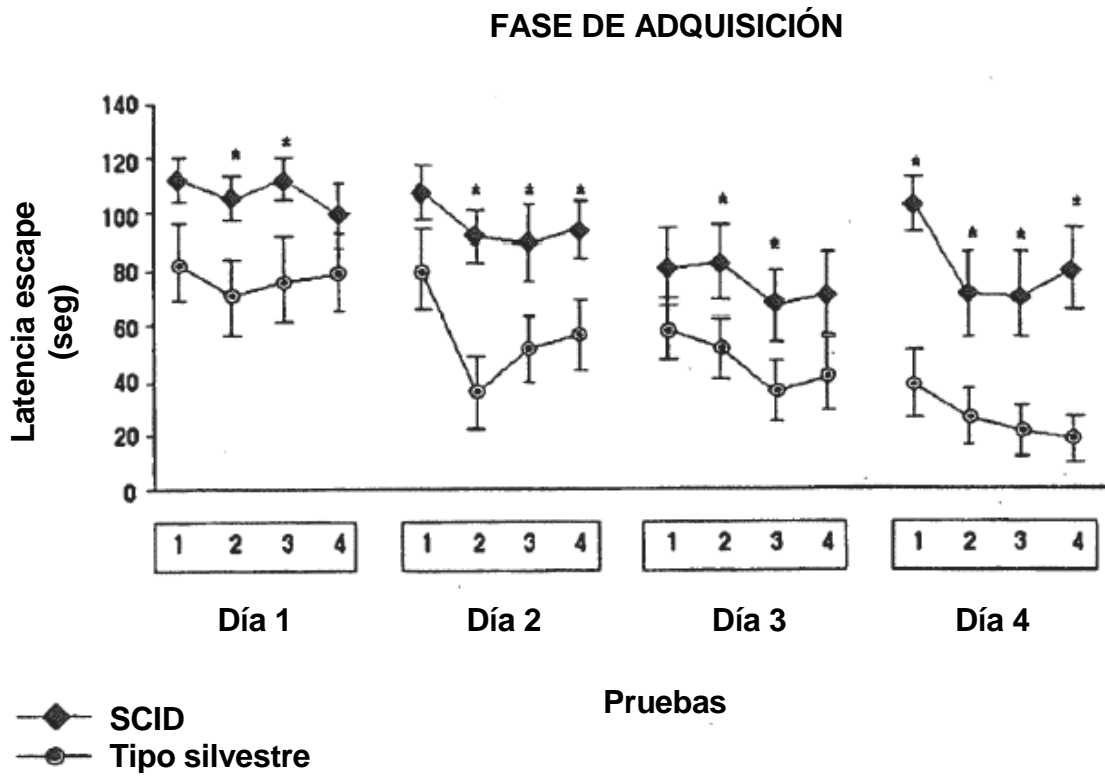


Fig. 2a

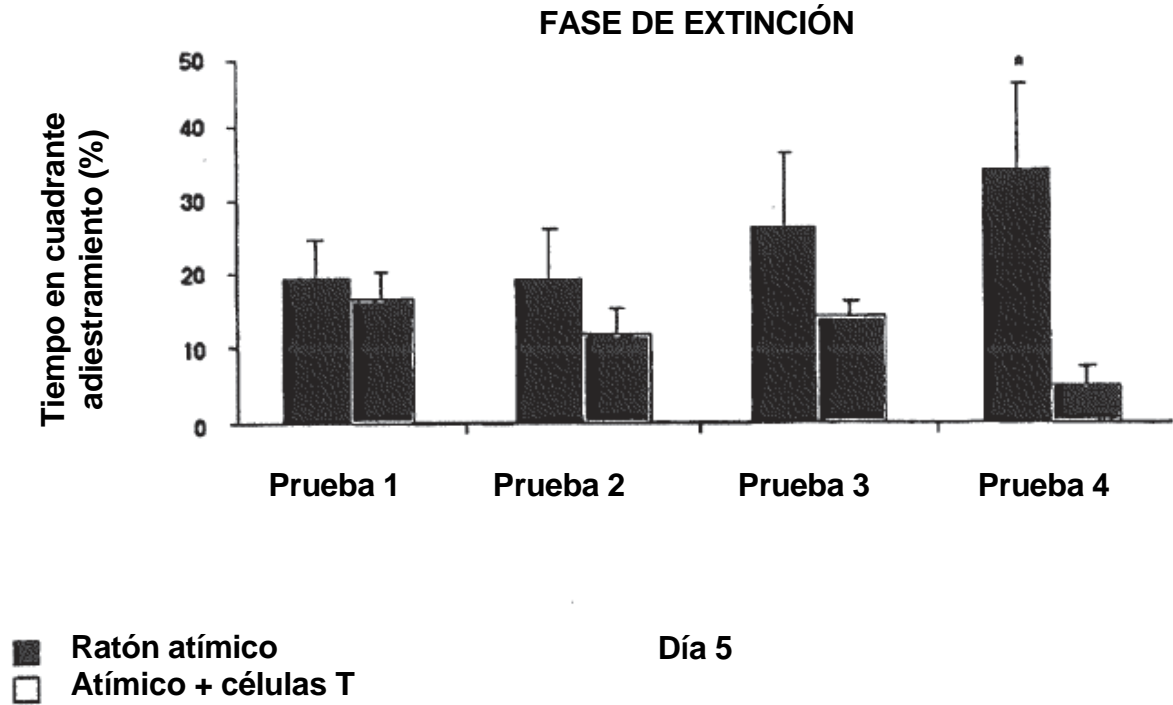


Fig. 2b

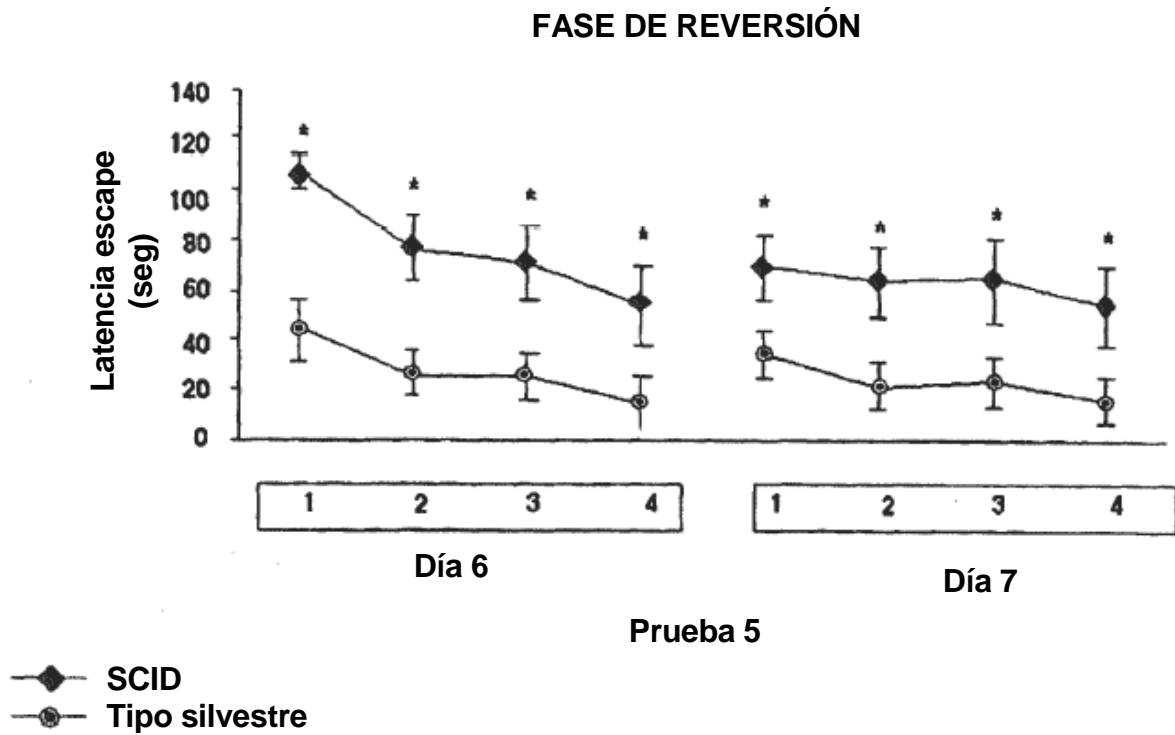


Fig. 2c

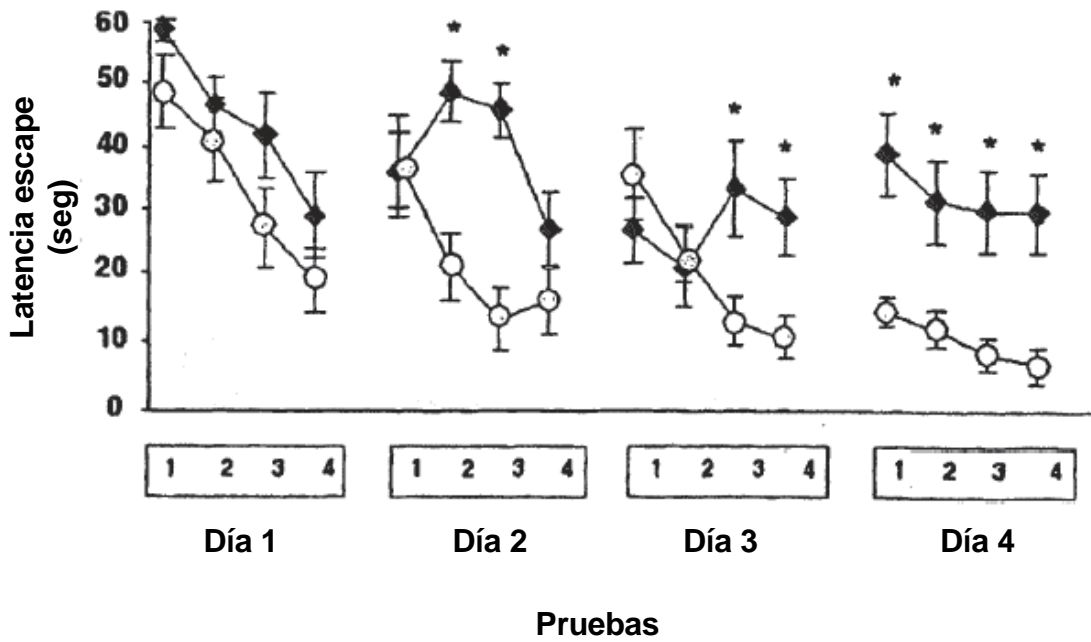
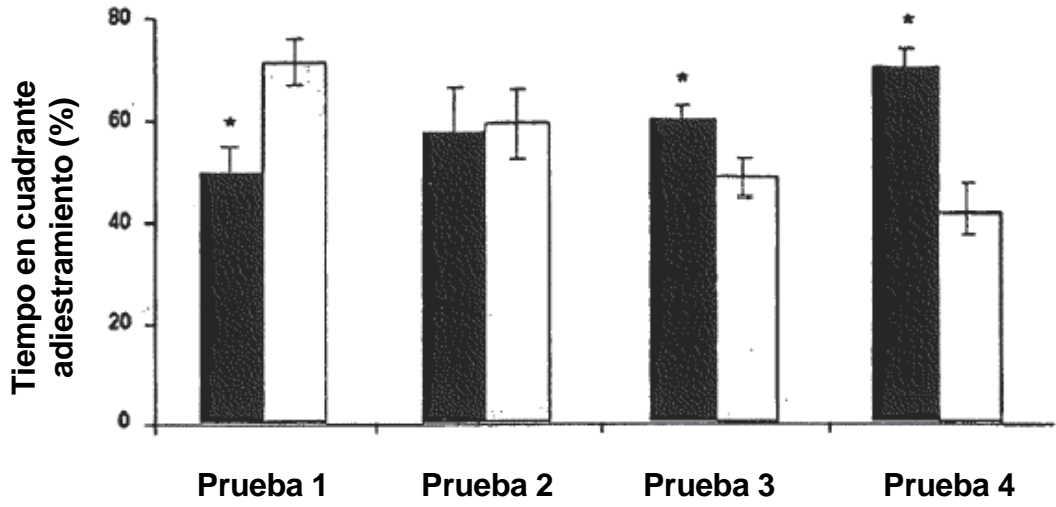


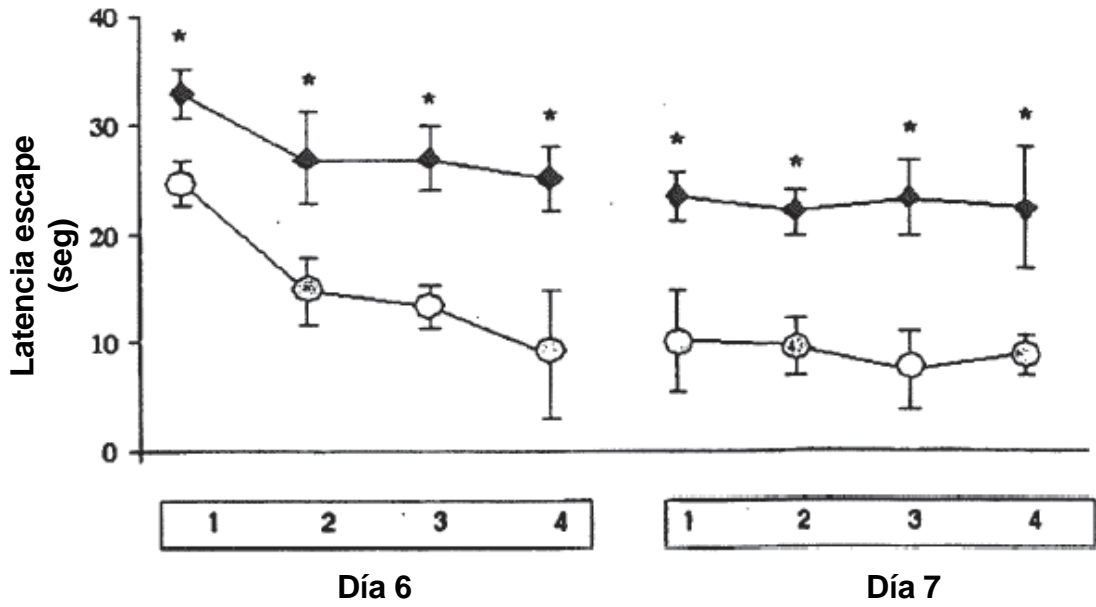
Fig. 2d



■ Ratón atímico  
 □ Atímico + células T

Día 5

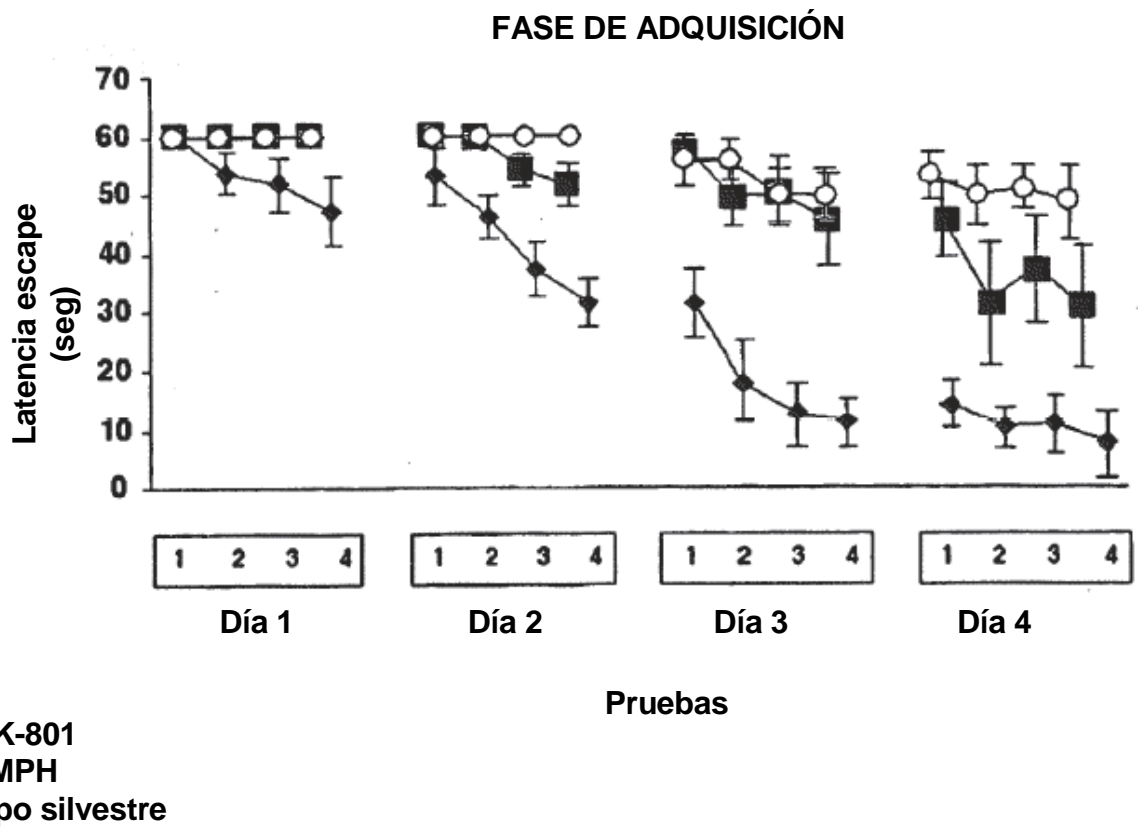
Fig. 2e



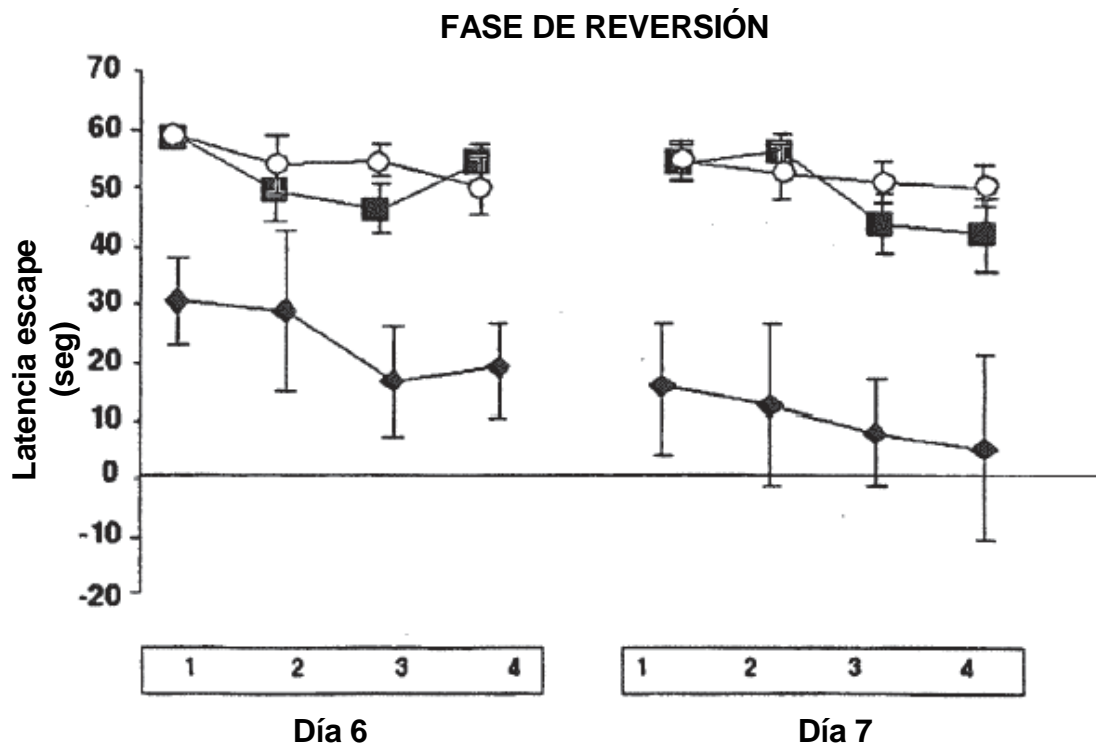
◆ SCID  
 ● Tipo silvestre

Prueba 5

Fig. 2f

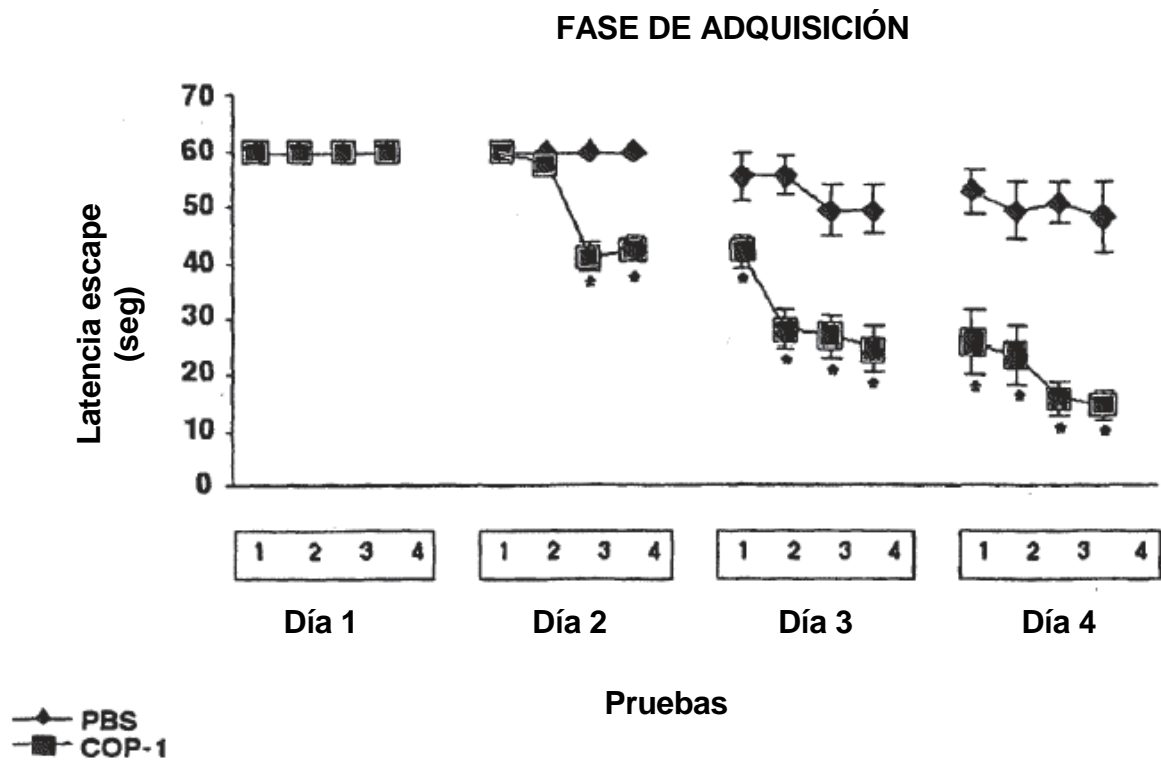


**Fig. 3a**

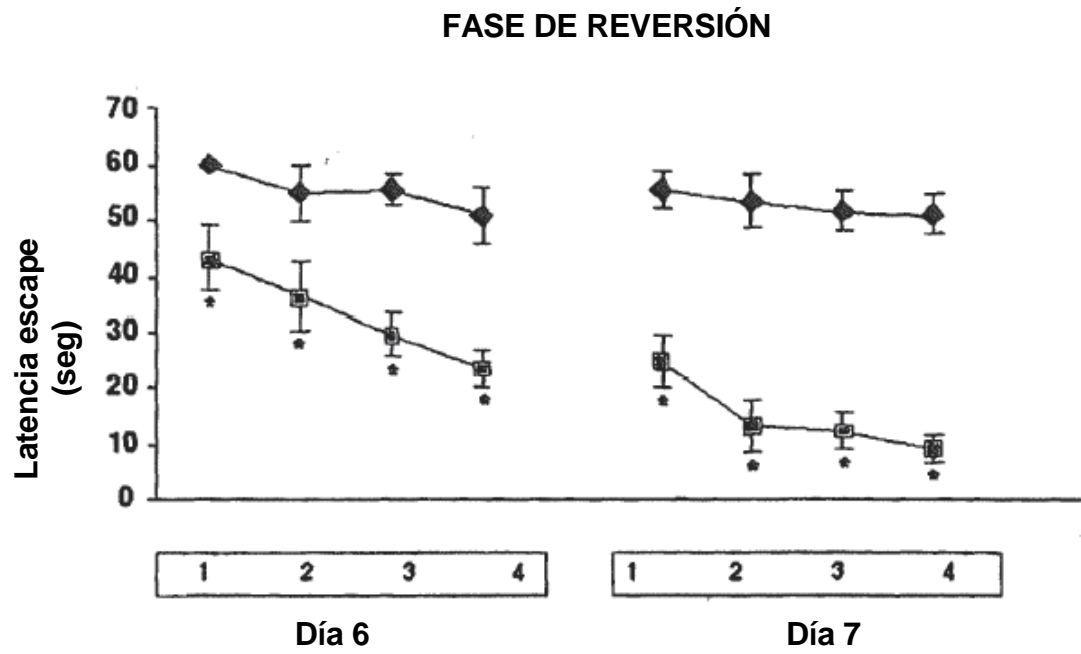


Prueba 5

**Fig. 3b**



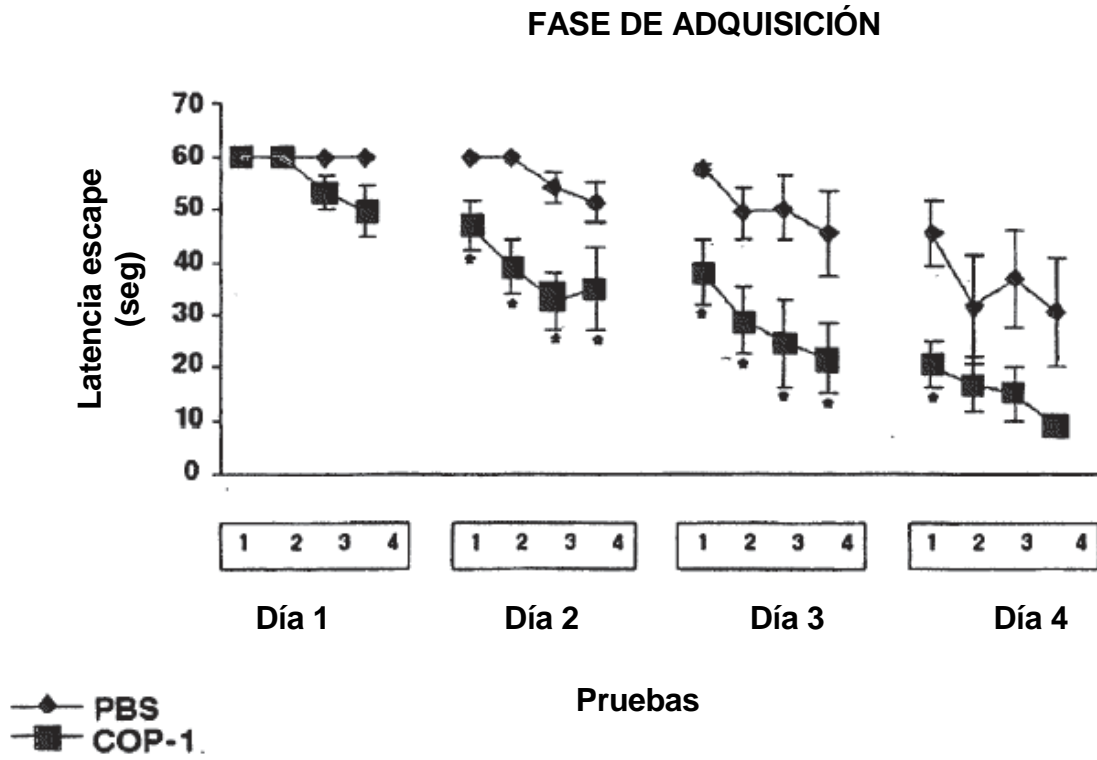
**Fig. 3c**



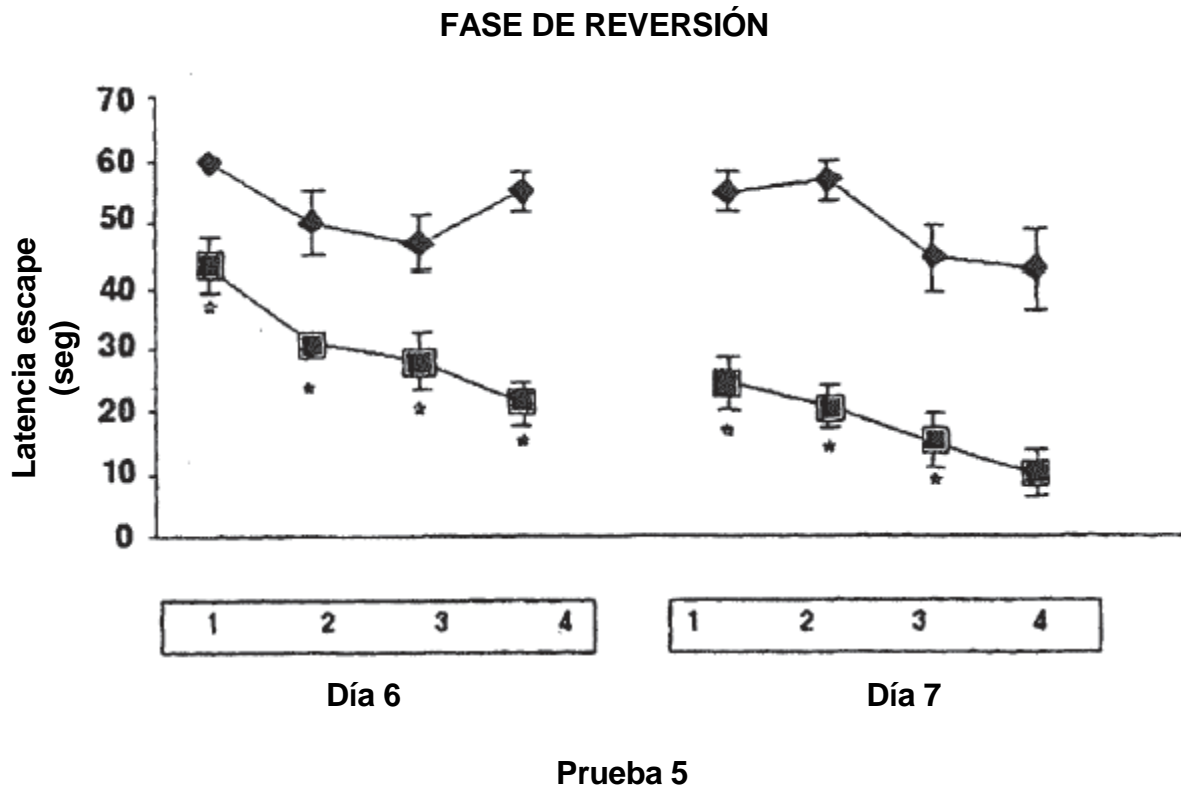
Prueba 5

Fig. 3d

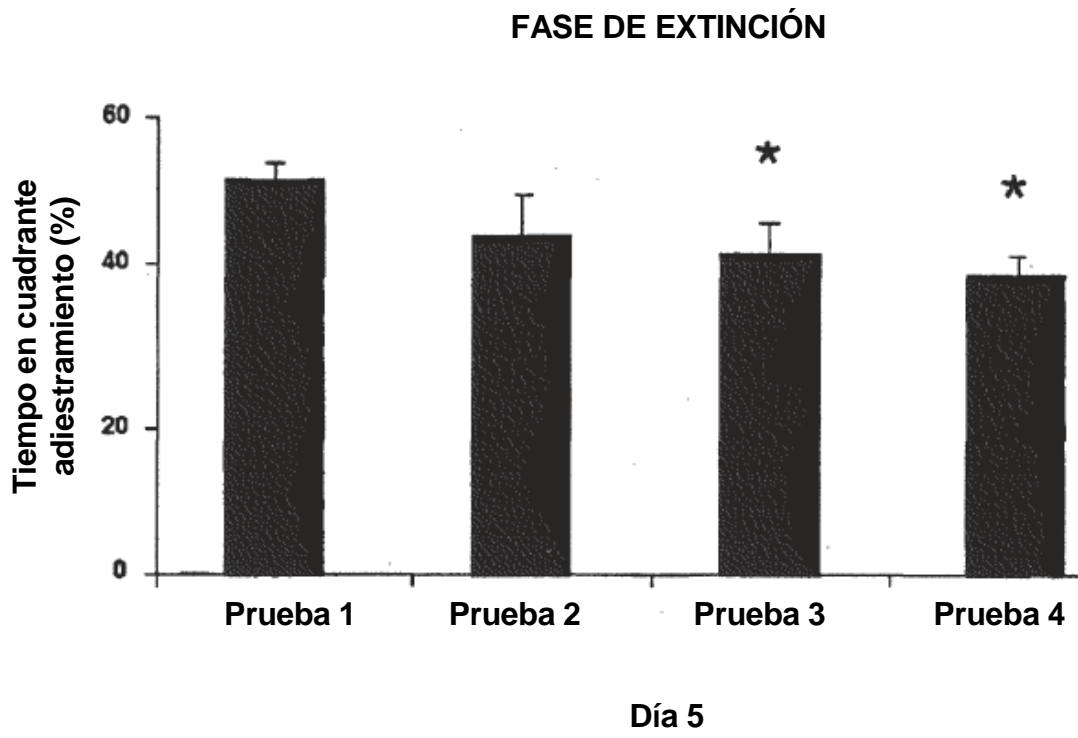




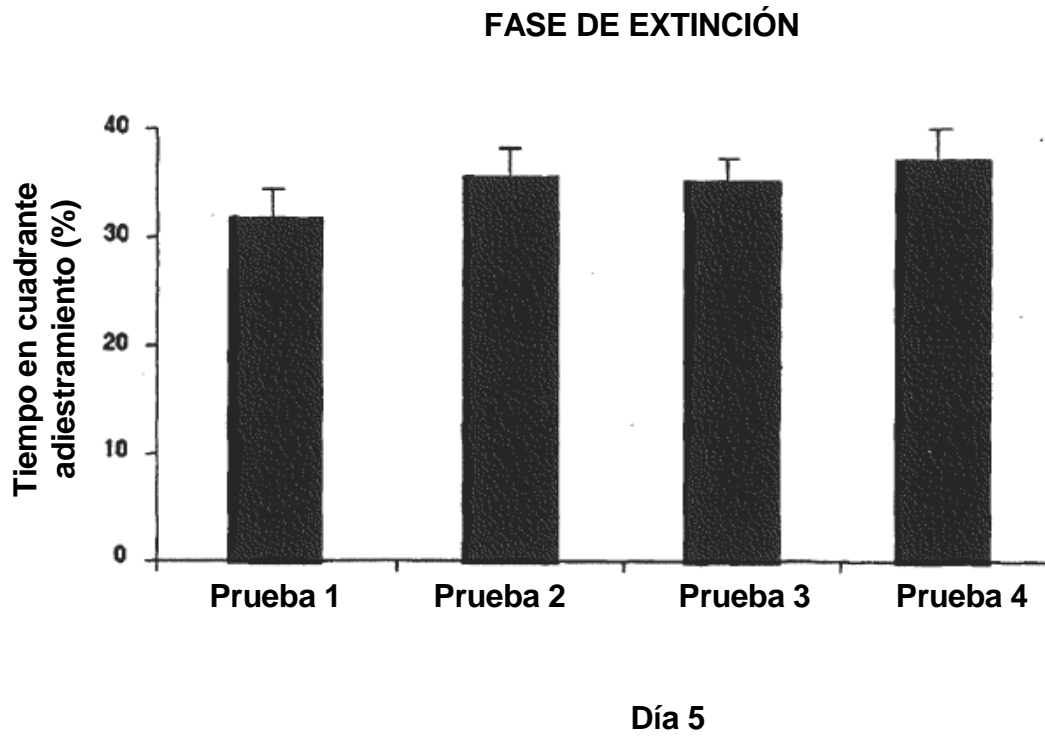
**Fig. 3e**



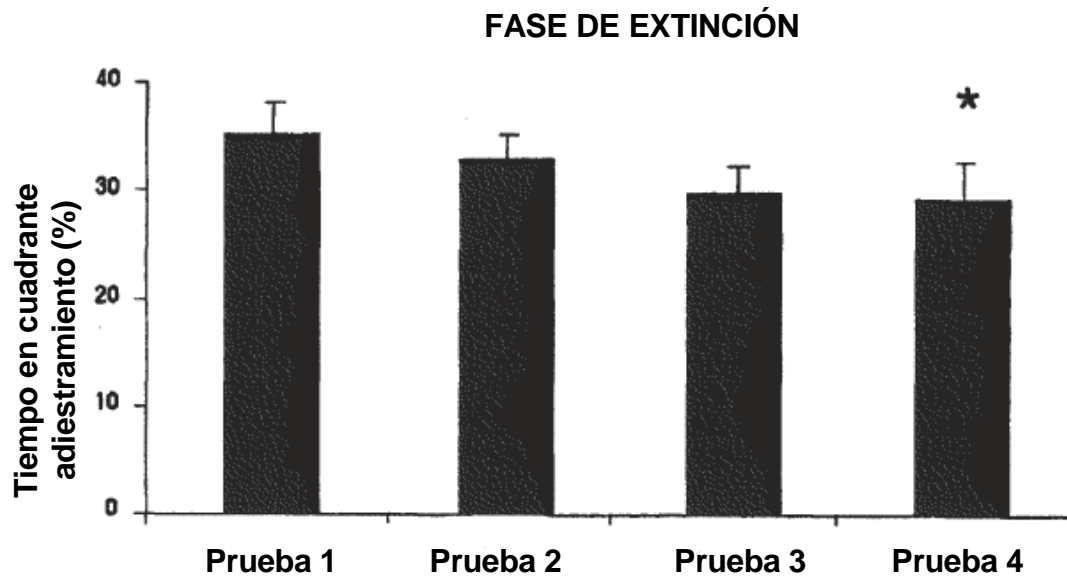
**Fig. 3f**



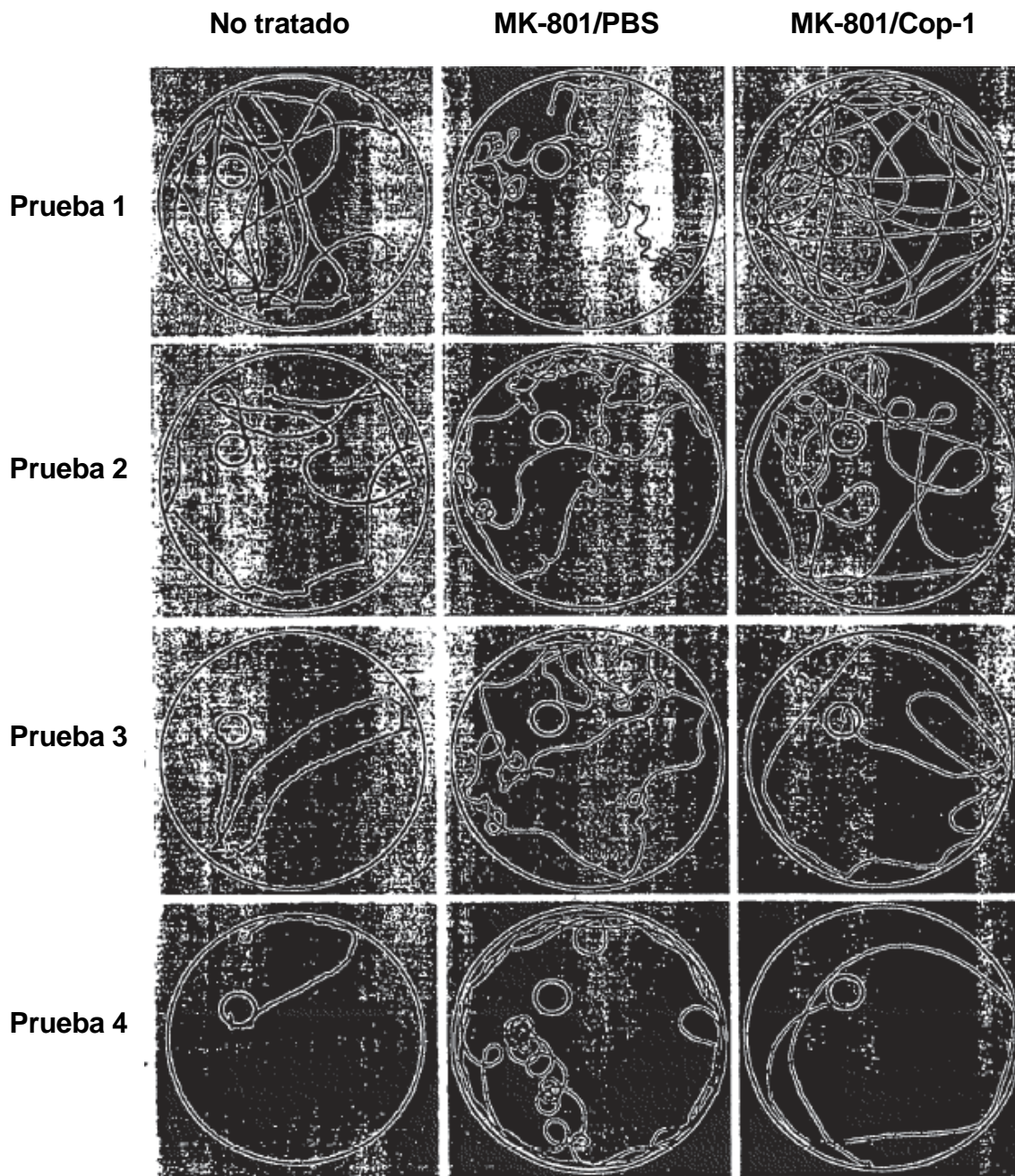
**Fig. 3g**



**Fig. 3h**



**Fig. 3i**



**Fig. 4**

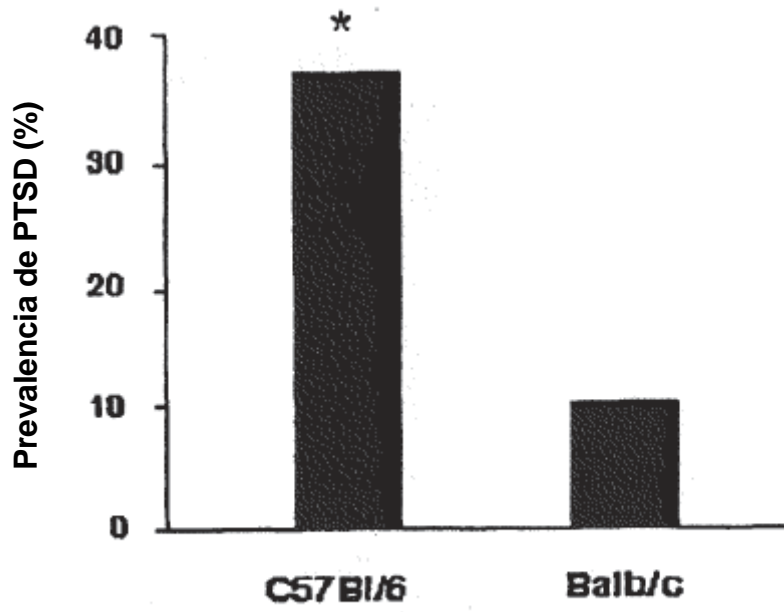


Fig. 5a

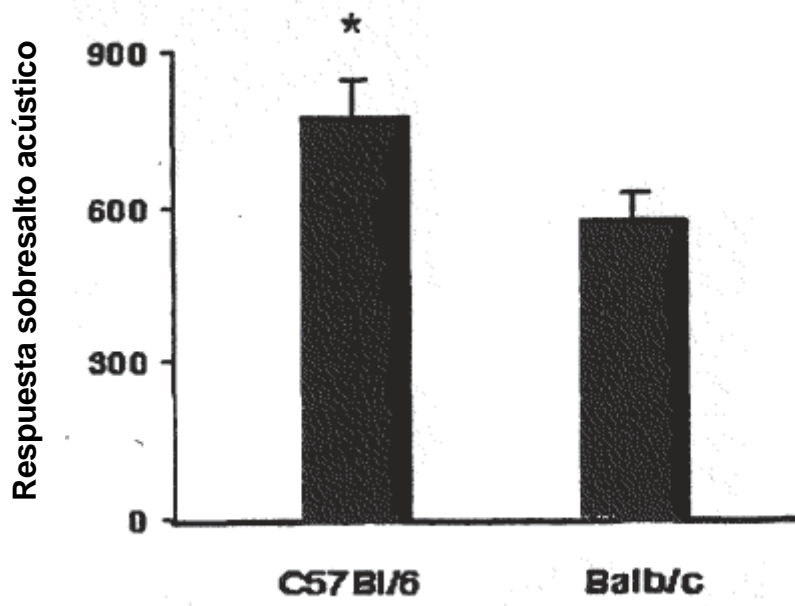


Fig. 5b

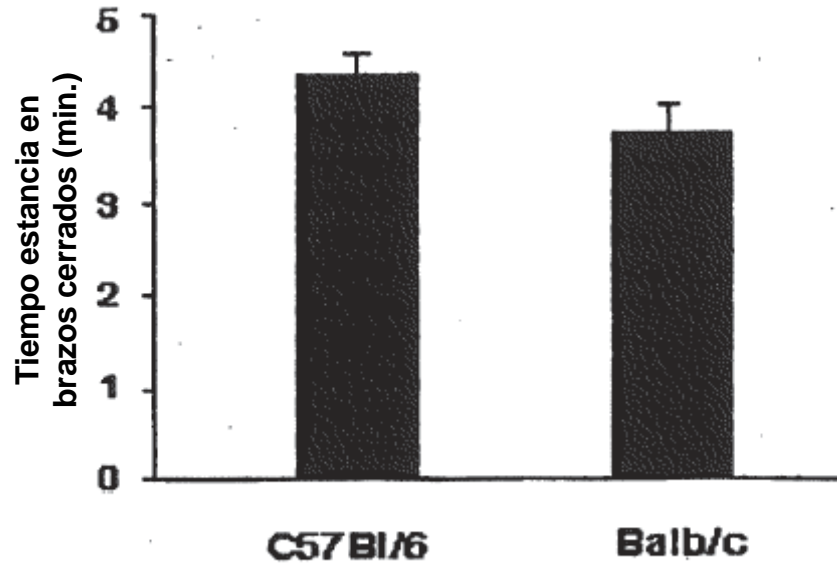


Fig. 5c



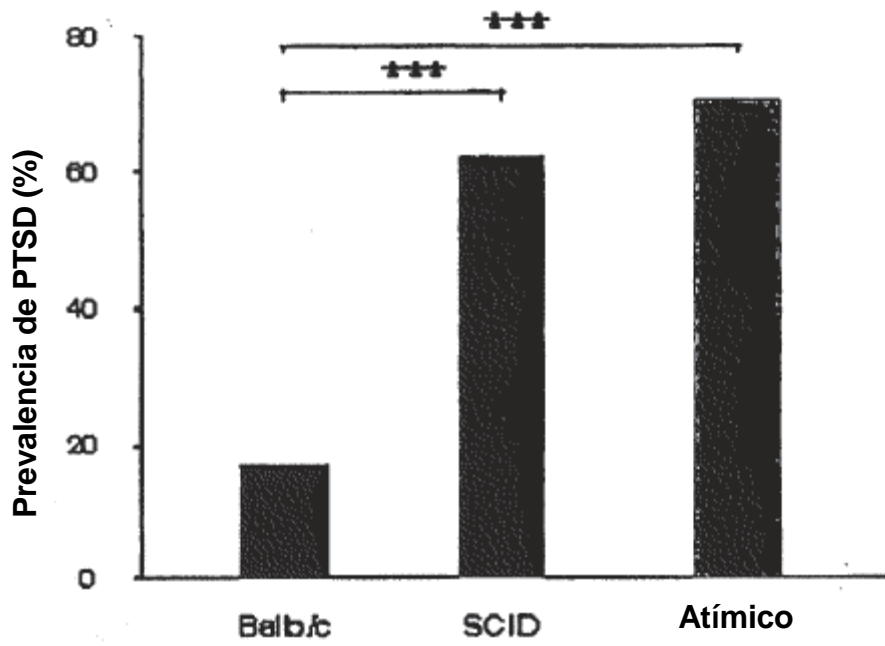


Fig. 5d

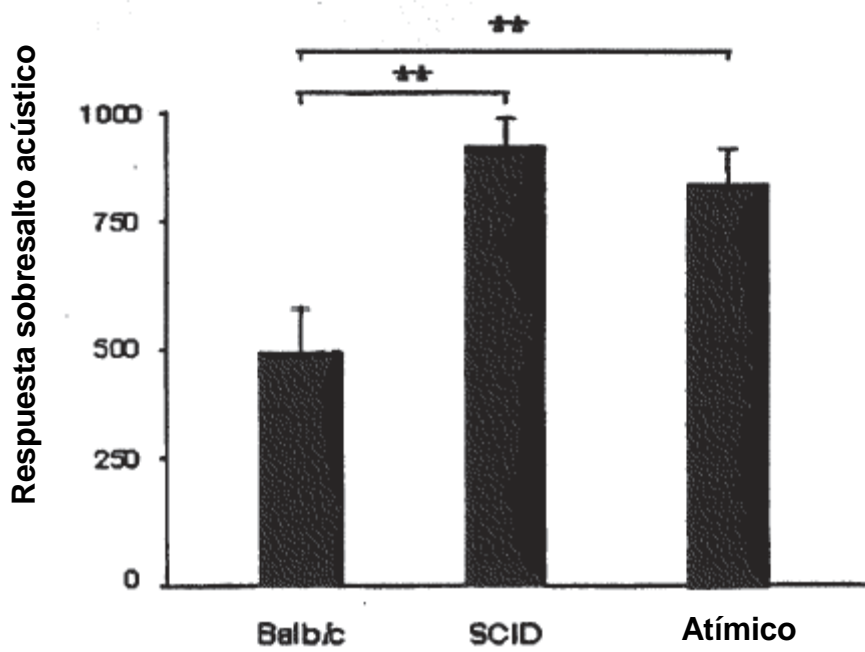


Fig. 5e

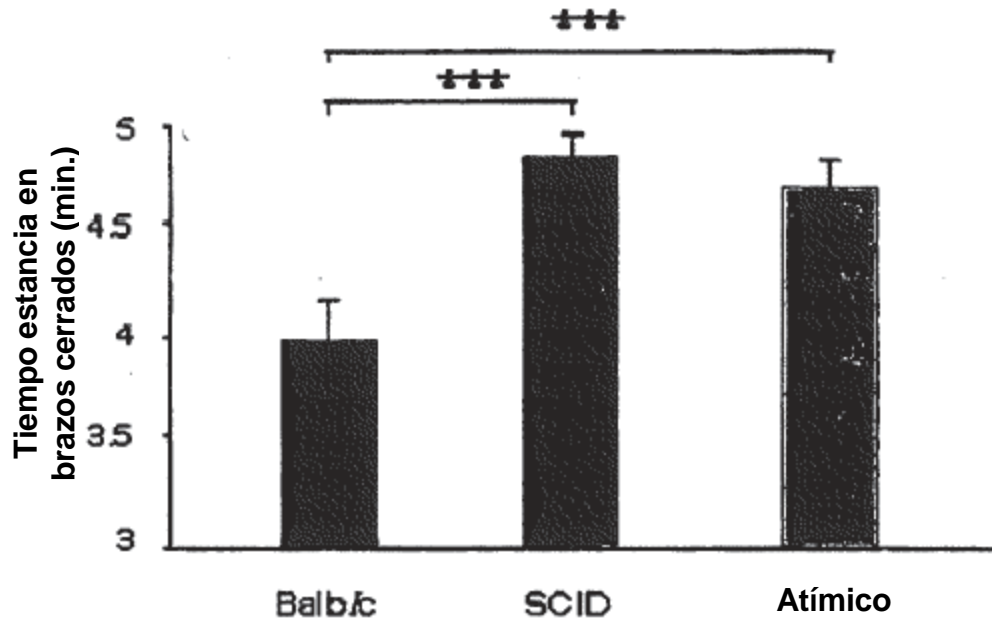


Fig. 5f

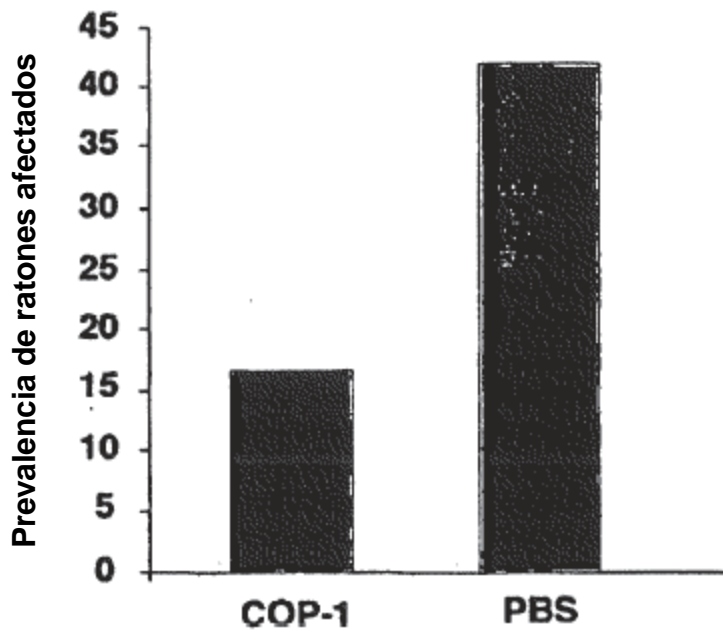


Fig. 6

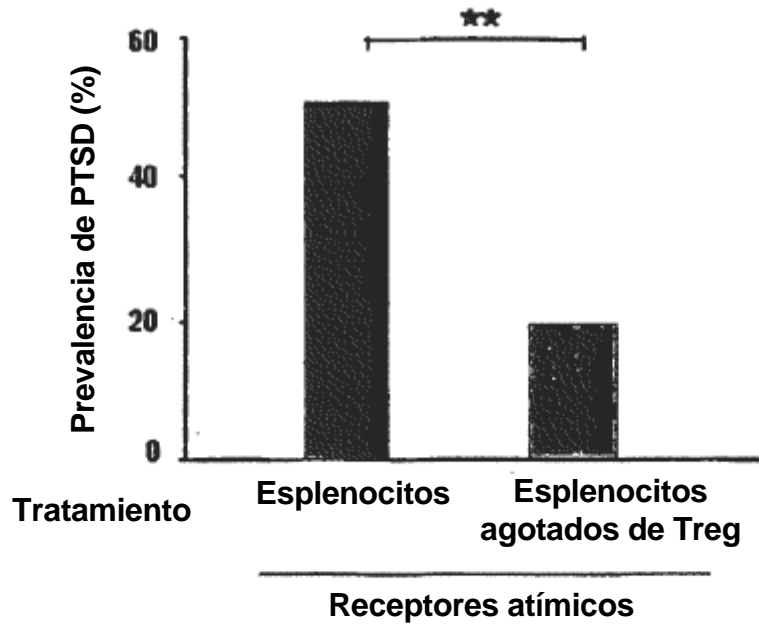


Fig. 7a

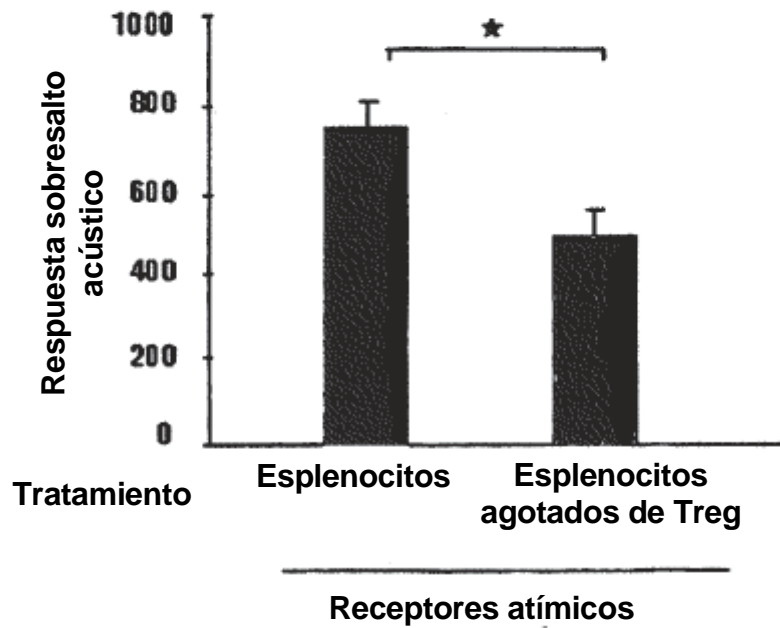
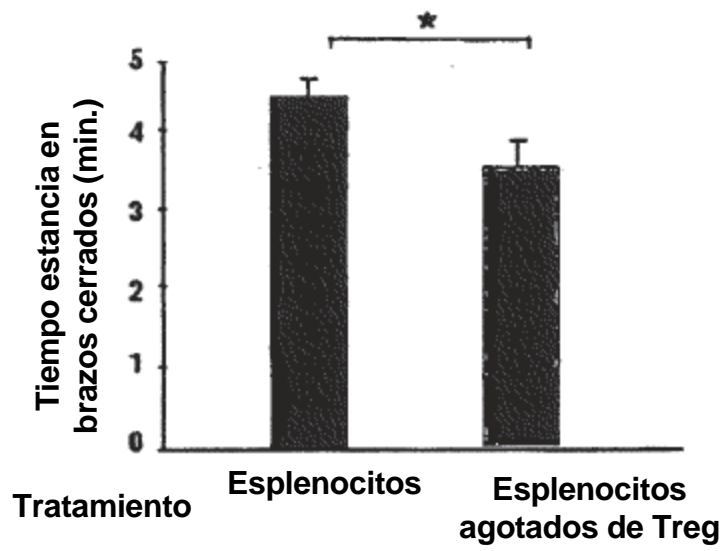
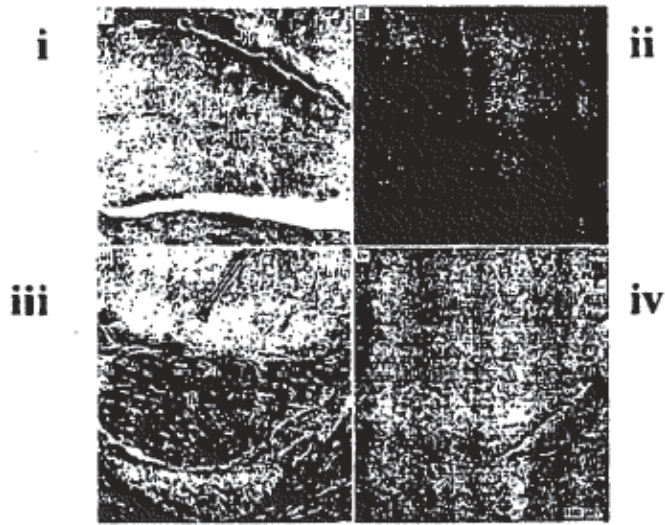


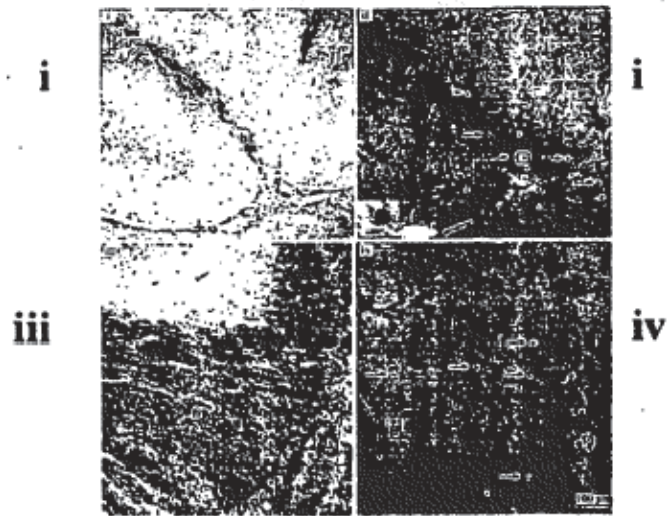
Fig. 7b



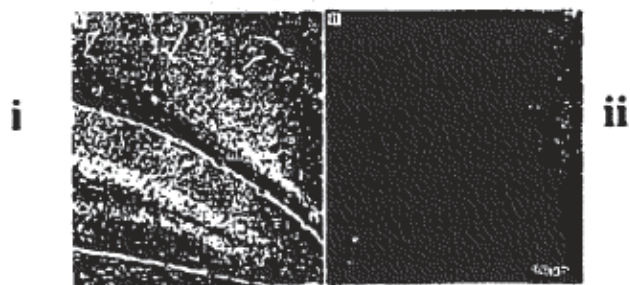
**Fig. 7c**



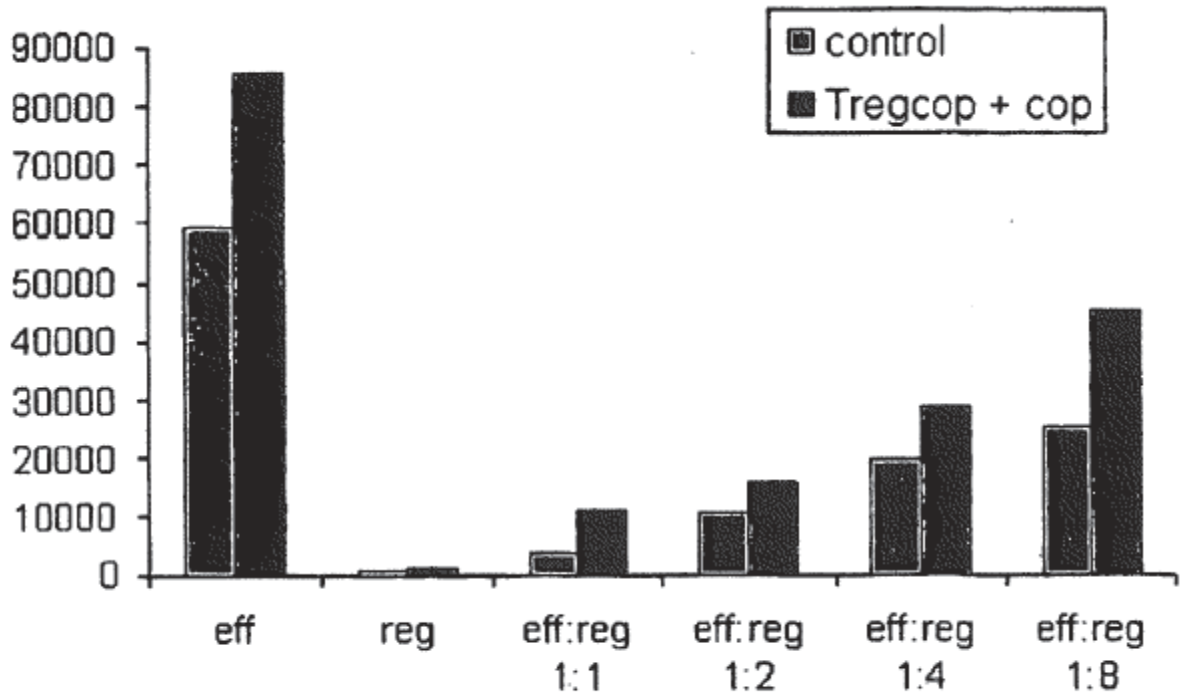
**Fig. 8a**



**Fig. 8b**



**Fig. 8c**



**Fig. 9**