

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 096**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 1/04** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2009 E 09804226 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2374468**

54 Título: **Utilización de péptidos tipo LPA para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales y diabetes tipo 1**

30 Prioridad:

**29.12.2008 CU 20080254**

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

**15.01.2014**

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (100.0%)  
Avenida 31 entre 158 y 190 Cubanacán, Playa Ciudad de la Habana 10600, CU**

72 Inventor/es:

**BARBERÁ BETANCOURT, ARIANA;  
DOMÍNGUEZ HORTA, MARÍA DEL CARMEN;  
LORENZO PEREZ, NORAILYS;  
PADRÓN PALOMARES, GABRIEL RAMÓN;  
FALCÓN CAMA, VIVIANA y  
MENÉNDEZ VALDÉS, IVÓN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 438 096 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**

Utilización de péptidos tipo LPA para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales y diabetes tipo 1

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la medicina, particularmente con el uso de un péptido LPA (Ligando Peptídico Alterado, abreviado como LPA) o sus análogos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa) y la diabetes mellitus tipo 1.

**Técnica anterior**

10 Las enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, son el resultado de la activación de los linfocitos T de la lámina propia intestinal con potentes funciones efectoras contra la flora comensal. Sin embargo, el mecanismo exacto que conduce a la activación crónica de estos linfocitos permanece incierto (Balfour R (2006) Mechanism of Disease: Pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nature clinical practice. Gastroenterology and Hepatology 3 (7): 390-407).

15 En el tracto gastrointestinal residen aproximadamente  $2 \times 10^4$  bacterias, y esta presión inmunológica representa un desafío extraordinario para el sistema inmunitario, que tiene que conseguir actuar equilibradamente entre la respuesta apropiada contra los organismos patógenos y la tolerancia con los organismos inofensivos. El sistema inmunitario de la mucosa tiene varios mecanismos para evitar una respuesta inflamatoria innecesaria y descontrolada, tales como la disminución de los linfocitos T activados por medio de la apoptosis (Peppelenbosch MP y van Deventer SJH (2004) T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. Gut 53: 1556-1558).

20 Bajo condiciones normales, el sistema inmunitario acaba rápidamente con las infecciones por bacterias entéricas invasivas, regula negativamente las respuestas inmunitarias innatas y cura la mucosa dañada sin estimular las respuestas efectoras de los linfocitos T. Por el contrario, el sistema inmunitario de huéspedes genéticamente susceptibles es incapaz de alcanzar una repuesta innata apropiada y/o generar una respuesta inmunitaria tolerogénica con los agentes microbianos comensales y evoluciona hacia la inflamación intestinal crónica (Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 347: 417-29).

25 Por tanto, las enfermedades inflamatorias intestinales se producen como resultado del fracaso de los mecanismos que controlan apropiadamente los procesos inflamatorios iniciados por un desencadenante ambiental, tal como una infección intestinal aguda. La resistencia de los linfocitos T a la apoptosis, la falta de respuesta a las señales reguladoras negativas y la exposición continua a antígenos y adyuvantes lumenales ayudan al sostenimiento de esta respuesta inflamatoria (Mudter J y Neurath MF (2007) Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. Gut 56: 293- 303).

30 La enfermedad de Crohn se caracteriza por un aumento del reclutamiento de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T en el intestino, lo que conduce a un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión, así como de citoquinas proinflamatorias relacionadas con TH1 (Linfocito T auxiliar, abreviado como TH1), por ejemplo: interleucina (IL)-6 (IL-6) y factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y respuestas celulares de TH17 (linfocito T auxiliar 17, abreviado como TH17) como: IL-12, IL-23 e IL-27 (Balfour R (2006) Mechanism of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nature clinical practice. Gastroenterology and Hepatology 3 (7): 390-407).

35 El número de células inflamatorias en el intestino está determinado por el reclutamiento celular, la proliferación y la muerte por necrosis o apoptosis. Los linfocitos T de la lámina propia de la mucosa intestinal normal son susceptibles a la muerte celular inducida por la activación (por medio de un sistema Fas/FasL), que es capaz de controlar la proliferación de linfocitos (Bu P y col. (2001) Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. J Immunol 166: 6399-6403). Sin embargo, los datos indican que los linfocitos T de la lámina propia en los pacientes con enfermedad de Crohn son resistentes a la apoptosis lo que podría conducir a una expansión de la población de células TH1 efectoras activadas que podría contribuir a la perpetuación de la enfermedad y la inflamación crónica (Boirivant M y col. (1999) Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathroute-induced apoptosis. Gastroenterology 116: 557-565).

40 La deficiencia en la apoptosis en los linfocitos T de la mucosa de los pacientes con enfermedad de Crohn se ha atribuido a un desequilibrio entre las proporciones de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 y las moléculas pro-apoptóticas como Bax, lo que prolonga la supervivencia de estas células y da lugar a resistencia a las señales apoptóticas (Ina K y col. (1999) Resistance of Crohn's disease T cells of multiple apoptotic signals is associated with Bcl2/Bax mucosal imbalance. J Immunol 163:1081-90; Itoh J y col. (2001) Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. Gut 49: 35-41). Por otro lado, Sturm y colaboradores estudiaron las propiedades del ciclo celular de los linfocitos T de la mucosa en pacientes con enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y controles sanos. Estos autores demostraron que los linfocitos T de la mucosa en los pacientes con enfermedad de Crohn tienen una capacidad impresionante para la expansión celular debido a un ciclo más rápido en comparación con las células de la mucosa de pacientes con colitis ulcerosa o las de los controles sanos, probablemente como resultado de una deficiencia de la apoptosis dependiente de la activación. Esto podría explicar

por qué la mucosa de los pacientes con enfermedad de Crohn contiene un exceso de linfocitos T que indica un estado de hiperreactividad y también la pérdida de tolerancia a las bacterias comensales (Sturm A y col. (2004) Divergent cell cycle kinetics underlies the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53:1624-1631).

- 5 Estas pruebas experimentales sostienen el hecho de que la enfermedad de Crohn es un trastorno en el que los sucesos de proliferación celular sobrepasan la muerte por apoptosis conduciendo a la acumulación de linfocitos T reactivos en el sitio de la inflamación, lo que podría ser un factor importante en la patogénesis de la enfermedad. En este sentido, los productos biológicos más potentes que se han utilizado en el tratamiento de esta enfermedad parecen ser aquellos que inducen la apoptosis en monocitos y en linfocitos T, por ejemplo: los anticuerpos contra el
- 10 TNF- $\alpha$ , IL-12 o receptor de IL-6 (Lügering y col. (2001) Infiximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic Crohn's disease by using it activates to caspase dependent pathroute. *Gastroenterology* 121: 1145-57), (Stallmach y col. (2004) An interleukin 12 p40-IgG2b coalition protein abrogates T cell mediated inflammation: anti-inflammatory activity in Crohn's disease and experimental colitis in alive. *Gut* 53: 339-45), (Atreya R y col. (2000) Blockade of interleukin 6 trans-signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in alive. *Nat Med* 6: 583-588). En particular, los anticuerpos contra TNF- $\alpha$  son una opción importante para inducir la remisión a largo plazo en pacientes con enfermedad de Crohn refractarios a los esteroides.

El Infiximab es un anticuerpo monoclonal quimérico (AcM) que contiene la región variable murina y la región constante de una molécula de inmunoglobulina G1 (IgG1) humana que se une y neutraliza los efectos de TNF- $\alpha$  tanto libre como unido, con una afinidad y especificidad enormes (Knight DMK y col. (1993) Construction and initial characterization of a mousehuman chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 30: 1443-1453).

El Etanercept es una proteína recombinante que contiene dos cadenas monoméricas de la porción soluble del receptor 2 del factor de necrosis tumoral humano (TNFR2), fusionadas con la porción Fc de una IgG1 humana (Mohler KM y col. (1993) Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 151: 1548-1561). Esta molécula se ha utilizado satisfactoriamente en el tratamiento de otras enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide (AR) (Moreland LW y col. (1999) Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. To randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 130: 478-486). Sin embargo el Etanercept contrariamente al infiximab, no ofrece beneficios clínicos en la enfermedad de Crohn. Van den Brande y colaboradores han demostrado que la diferencia de eficacia entre ambos fármacos, en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, es debida a la capacidad del infiximab para producir apoptosis en los monocitos y los linfocitos T activados de la lámina propia (Van de Brande JMH y col. (2003) Infiximab but not Etanercept induces apoptosis in lamina propria T - Lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 124: 1774-1785). Como se ha sugerido, el etanercept no induce la apoptosis celular, como el infiximab que es eficaz en la enfermedad de Crohn debido a sus efectos pro-apoptóticos.

- 35 Los resultados clínicos obtenidos en los pacientes con enfermedad de Crohn tratados utilizando Infiximab y otros fármacos que inducen la apoptosis celular sugieren que la restauración de la apoptosis en el compartimiento de linfocitos T de la mucosa puede ser un factor importante para el tratamiento con éxito de la enfermedad de Crohn.

Hasta el momento, el infiximab es la terapia más eficaz para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Crohn. Esta terapia también se ha aplicado con resultados esperanzadores en pacientes con colitis ulcerosa. Sin embargo, el uso de esta terapia produce una serie de reacciones adversas en pacientes con colitis ulcerosa, debido a la inmunosupresión generalizada que tiene lugar (Kooloos WM. (2007) Potential role of pharmacogenetics in anti-TNF treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Drug Discovery Today* 12: 125-31). En consecuencia, el principal reto en este momento es el desarrollo de estrategias terapéuticas que puedan eliminar las células patógenas con especificidad, sin causar una inmunosupresión generalizada.

Con este propósito, en los últimos años se han aplicado estrategias de antígeno específico con la intención de regular la respuesta inmunitaria, no de suprimirla. En este sentido, se han utilizado péptidos nativos autoantigénicos o LPA, administrados bajo ciertas condiciones con el fin de inducir mecanismos de tolerancia periférica (Prakken B y col. (2004) Epitopespecific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in RA. *PNAS* 12 (101): 4228-33; Ben- David H y col. (2005) Down-regulation of myasthenogenic T cell response by to dual altered peptide ligand via CD4+CD25+-regulated events leading to apoptosis. *PNAS* 102 (6): 2028-33; Paas-Rozner M y col. (2001) The nature of the active suppression of responses associated with experimental autoimmune myasthenia gravis by a dual altered peptide ligand administered by different routes. *PNAS* 98 (22): 12642-7).

Los LPA son análogos de péptidos inmunogénicos con una o varias sustituciones en las posiciones esenciales de contacto con el receptor de linfocitos T o Complejo Mayor de Histocompatibilidad, que interfieren o modifican la cascada de sucesos necesarios para la activación completa de los linfocitos T (Bielekova B y Martin R (2001) Antigen-specific immunomodulation via altered peptide ligands. *J Mol Med* 79: 552-65). La capacidad de modificar experimentalmente las propiedades intrínsecas de los ligandos peptídicos permite alterar apropiadamente la naturaleza, curso y potencia de la respuesta inmunitaria celular. En la solicitud de patente internacional N° WO2006/032216, se reivindican los péptidos LPA derivados de la proteína humana de choque térmico de 60 kDa

(abreviado como Hsp60), así como el uso de una composición farmacéutica de tales péptidos para el tratamiento de la AR. La diabetes mellitus tipo 1, es una enfermedad autoinmune específica de órgano que está mediada por los linfocitos T que destruyen las células  $\beta$  del páncreas que producen insulina, conduciendo a una desregulación del metabolismo de la glucosa (Brown L y Eisenbarth GS (1990) Type 1 diabetes: A chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. Annu Rev Immunol 8: 647-79). Los síntomas clínicos de esta enfermedad aparecen después de que el sistema inmunitario haya inactivado cerca del 80-90% de las células pancreáticas. La terapia actual está dirigida a encontrar un procedimiento seguro, específico y eficaz para interrumpir el proceso autoinmune antes de que se produzca un daño permanente en las células pancreáticas con el fin de preservar la producción endógena de insulina. La inducción de tolerancia ha sido un concepto que se ha extendido para el tratamiento de la diabetes tipo 1. Irun Cohen y colaboradores han protegido el uso de péptidos Hsp60 humanos, para el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad (Patente de Estados Unidos N° US 6682897).

### **Descripción de la invención**

La presente invención resuelve el problema mencionado anteriormente proporcionando una nueva opción terapéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa) y la diabetes mellitus tipo 1. La esencia de la invención es el uso de un péptido LPA inmunomodulador o sus análogos, derivados de la hsp60 humana para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales y la diabetes mellitus tipo 1. Este péptido, cuya secuencia es SIDLKDKYKNIGAKLVQLVANNTNEEA, se identifica en la Lista de Secuencias como Sec ID N° 1.

Este péptido promueve la inducción de apoptosis de los linfocitos T activados de la lámina propia intestinal y de la sangre periférica de los pacientes con enfermedad de Crohn, dando como resultado la inhibición de los clones de linfocitos T implicados en la patogénesis de la enfermedad, sin producir una inmunosupresión inespecífica como ocurre con el uso de anticuerpos contra TNF- $\alpha$ .

El uso de este péptido LPA inmunomodulador o sus análogos, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, se dirige a neutralizar los clones de los linfocitos T que contribuyen al proceso inflamatorio característico de la enfermedad.

La preparación farmacéutica de la invención se caracteriza por su alta especificidad, debido a la neutralización de los linfocitos T activados patógenos. Este hecho contribuye de manera notable a la seguridad de esta preparación, ya que se minimizan las reacciones adversas como las infecciones oportunistas que causan tuberculosis y micoplasmosis, que se asocian con la inmunosupresión generalizada producida por el uso de fármacos como el infliximab, o el desarrollo de procesos neoplásicos, como los linfomas, debido al uso de metotrexato.

El uso del péptido inmunomodulador mencionado anteriormente en la producción de un fármaco para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales también tiene la ventaja de que independientemente de su administración por vía parenteral (por ejemplo, intradérmica, subcutánea o intravenosa), su principio activo se biodistribuye esencialmente en el tracto gastrointestinal: estómago, intestino delgado y colon. También, el péptido permanece en estos órganos el tiempo necesario para ejercer sus mecanismos biológicos. Como se describió anteriormente, en la enfermedad intestinal la activación incontrolada de los linfocitos T efectores contra la flora comensal tiene lugar en el tracto intestinal. La biodistribución de este péptido y la capacidad de inducir apoptosis de los linfocitos T lumbinales patógenos, justifica razonablemente la utilización de este péptido LPA para el tratamiento de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. El uso de la preparación farmacéutica de la invención se puede extender a otras enfermedades inflamatorias caracterizadas por episodios de recaída-remisión, en los que tengan también un papel importante los linfocitos T autorreactivos, como en la diabetes tipo 1.

El LPA identificado en la Lista de Secuencias como Sec ID N° 1 se reivindica para el uso de una preparación farmacéutica del péptido para el tratamiento de AR en la solicitud de patente internacional WO 2006/032216. Sin embargo, esta solicitud de patente ni reivindica ni sugiere que este péptido se pueda utilizar para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales y la diabetes mellitus tipo 1.

Las enfermedades inflamatorias intestinales no se consideran enfermedades autoinmunes, debido a que la respuesta inmunitaria contra autoantígenos no es la responsable del inicio y el mantenimiento de la inflamación, y al menos hasta el momento no se conocen autoantígenos que se relacionen causativamente, lo que las diferencia de las enfermedades autoinmunes. El origen de estas enfermedades depende de la presencia de flora comensal y la respuesta inmunitaria dirigida contra los organismos comensales. Una de las pruebas experimentales que sostienen este hecho es que bajo condiciones libres de gérmenes no se puede inducir enfermedad EII experimental, a menos que se reconstituya la flora intestinal (Chandran y col. (2003) Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (II). Surgeon 1:125-136; Strober y col. (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. Annu. Rev. Immunol 20:495-549). Por lo tanto, supuestamente, los antígenos bacterianos deben desencadenar la inducción de la enfermedad.

En la Patente de Estados Unidos N° US 6682897, Irun Cohen y colaboradores revelaron el uso de péptidos Hsp60 humanos para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes tipo 1. La secuencia identificada como Sec ID N° 1 no está incluida en esta patente y tampoco se considera una actividad biológica similar para el péptido de la Sec ID N° 1.

Contrariamente a estos autores, en la presente invención se desvela el uso del péptido de la Sec ID N° 1, un péptido LPA derivado de la Hsp60 humana, para inducir la apoptosis de los linfocitos T patógenos involucrados en el desarrollo de esta patología.

5 Los ejemplos de la presente invención muestran por primera vez las propiedades del péptido de la Sec ID N° 1 en relación con su biodistribución en el tracto gastrointestinal y su capacidad para inducir apoptosis de los clones patógenos de linfocitos T lo que hace posible el uso de este péptido en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y diabetes tipo 1. Para los expertos en la técnica no fue posible predecir la nueva utilización del péptido reivindicado en la presente invención basándose en los elementos dados en la solicitud de patente internacional N° WO 2006/032216.

10 El péptido de la secuencia identificada como Sec ID N° 1 o sus análogos se pueden producir por procedimientos rutinarios de síntesis de péptidos y se pueden evaluar por el nivel y la calidad de la respuesta inmunitaria inducida en experimentos como los que se describen en los ejemplos que se presentarán a continuación.

15 En el contexto de la presente invención, el término análogo se refiere a péptidos LPA que incluyen una o más desviaciones de la secuencia descrita (Sec ID N° 1), pero que conservan la misma actividad biológica que el péptido descrito. La modificación puede ser una sustitución, deleción o inserción de un único aminoácido, preferentemente una sustitución. El análogo incluirá menos de 9 modificaciones, más preferentemente menos de 6 modificaciones y más preferentemente menos de 2 modificaciones del péptido descrito.

20 También es un objeto de la invención una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales y diabetes tipo 1 que comprende un péptido LPA derivado de la Hsp60 humana identificado como Sec ID N° 1 o sus análogos. Las cantidades de péptido en las composiciones farmacéuticas de la presente invención son aquellas que producen una respuesta inmunitaria eficaz en el huésped. La cantidad eficaz es la cantidad administrada que produce la inducción de apoptosis en los linfocitos T que disminuye significativamente los signos inflamatorios de la enfermedad de Crohn y revierte los focos inflamatorios del tracto intestinal que son característicos del curso de esta enfermedad. En el curso del tratamiento, la cantidad administrada de la  
25 composición farmacéutica a un paciente puede variar según ciertos factores como: la edad, el sexo, estado general de salud, así como el nivel de respuesta inmunitaria en general.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa) y la diabetes tipo 1, que incluye la administración a un paciente de cantidades eficaces de las composiciones farmacéuticas que comprenden el péptido identificado  
30 como Sec ID N° 1 o sus análogos. De acuerdo con la presente invención, en el curso del tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa) y la diabetes tipo 1, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral o vía mucosa. De acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica se administra por una vía parenteral seleccionada de entre el grupo que incluye la vía intradérmica, la vía subcutánea, la vía intramuscular y la vía intravenosa. En otra realización, la composición  
35 farmacéutica se administra por una vía mucosa seleccionada de entre el grupo que incluye la vía rectal y la vía oral. Debido a la naturaleza de estas enfermedades, el péptido LPA o sus análogos pueden ser parte de formulaciones administradas en forma de enema o como formas farmacéuticas apropiadas para su administración por vía oral.

### **Breve descripción de las figuras**

40 **Figura 1.** Efecto del péptido de la Sec ID N° 1 sobre la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn activa (A) y donantes sanos (B). Las letras diferentes indican las diferencias estadísticas significativas entre el control negativo (0 ug/ml) y cada una de las dosis del péptido evaluado en este grupo.

45 **Figura 2.** Microscopía electrónica de transmisión para la demostración de la apoptosis inducida por el péptido de la Sec ID N° 1 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn. **Paneles A, B: Células sin tratar (control negativo). Paneles C-H: Células tratadas con el péptido de la Sec ID N° 1 (40 µg/ml).** Vacuolización abundante (AV); fragmentación nuclear (FN); condensación perinuclear y migración de la cromatina (CMC); orgánulos citoplasmáticos intactos (ICO); cuerpos apoptóticos (AB); fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (P AB).

50 **Figura 3.** Microscopía electrónica de transmisión para la demostración de apoptosis inducida por el péptido de la Sec ID N° 1 en células mononucleares de la lámina propia intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn. **Paneles A, B: Células sin tratar (control negativo). Paneles C, D: Células tratadas con el péptido de la Sec ID N° 1 (40 µg/ml).** Fragmentación nuclear (NF); condensación perinuclear y migración de la cromatina (CMC); cuerpo apoptótico (AB).

55 **Figura 4.** Efecto del péptido de la Sec ID N° 1 sobre la viabilidad de células mononucleares de un paciente con enfermedad de Crohn inactiva. En el eje X, **A: Células no activadas con el anticuerpo anti-CD3, B: Células activadas con el anticuerpo anti-CD3.** Las diferentes letras indican las diferencias estadísticas significativas entre el control negativo (0 ug/ml) y cada una de las dosis del péptido evaluado en este grupo.

60 **Figura 5.** Microscopía electrónica de transmisión para la demostración de apoptosis inducida por el péptido de la Sec ID N° 1 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diabetes mellitus tipo 1. **Paneles A, B: Células no tratadas (control negativo). Paneles C-D: Células tratadas con el péptido de la Sec ID N° 1**

(40µg/ml). Fragmentación nuclear (NF); condensación perinuclear y migración de la cromatina (CMC); cuerpo apoptótico (AB); fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (P AB).

**Figura 6.** Estudio de biodistribución del péptido de la Sec ID N° 1 en ratas Lewis. **A:** vía intravenosa 0,25 mg/kg de peso corporal. **B:** vía intravenosa 1 mg/kg de peso corporal. **C:** vía intradérmica 0,25 mg/kg de peso corporal. **D:** vía intradérmica 1 mg/kg de peso corporal. Los tejidos analizados son **1.** Hígado; **2.** Bazo; **3.** Riñones; **4.** Corazón; **5.** Pulmones; **6.** Ganglios cervicales; **7.** Ganglios axilares braquiales; **8.** Ganglios de la cadena mesentérica; **9.** Ganglios pélvicos; **10.** Tiroides; **11.** Estómago; **12.** Intestino delgado; **13.** Intestino grueso.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Efecto del péptido LPA sobre la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn activa y donantes sanos.

Se extrajo sangre de pacientes con enfermedad de Crohn y de donantes sanos por venopunción y se recogió en tubos estériles que contenían una solución anticoagulante (citrato sódico 123 mM, fosfato sódico monobásico 18,5 mM, ácido cítrico 17 mM y glucosa 141,5 mM). La sangre de cada paciente se diluyó 1:2 en solución salina tamponada con fosfato 1X (abreviado como PBS1X) y se añadieron 5 ml de esta dilución a 3 ml de Ficoll-Paque™ Plus (Amersham, Biosciences AB, Suecia) en tubos de centrifugación de 15 ml y se centrifugaron durante 30 min a 1200 rpm. Se extrajo el anillo correspondiente a las células mononucleares. A continuación, las células se lavaron dos veces con 15 ml de PBS 1X y tras cada lavado, se centrifugaron a 900 rpm. Finalmente, el sedimento de células se suspendió en PRMI 1640 que contenía un 10% de suero fetal bovino y estaba suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml), HEPES 25 mM/l y L-glutamina 2 mM (todo ello adquirido en Gibco BRL). Se contaron las células de la suspensión celular diluida (dilución 1:20 en RPMI suplementado y 1:2 en azul tripán (Boehringer Mannheim, Alemania) utilizando una cámara de recuento de Neubauer.

Las células mononucleares se sembraron con una densidad de  $10^5$  células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar, EE.UU.) con un volumen final de 100 µl y se trataron por triplicado con diferentes concentraciones del péptido LPA (Sec ID N° 1): 10, 40 y 160 µg/ml durante 72 horas. Las células sin tratar se utilizaron como control del crecimiento basal.

El efecto del péptido LPA sobre la viabilidad celular se determinó utilizando el procedimiento del bromuro de 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio (MTT, Sigma, EE.UU.), siguiendo el protocolo descrito por los proveedores. El MTT se reduce por la acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales que se encuentran en las células metabólicamente activas en un producto formazán que no es soluble en el medio de cultivo tisular. La cantidad del producto formazán medido por absorbancia a 562 nm es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. Después de cultivar las células a 37 °C, en atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5% durante 72 horas, se añadieron 20 µl de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo. Después las placas se incubaron durante 4 horas en iguales condiciones de cultivo. A continuación, se añadieron 100 µl de solución de 2-butanol (dodecilsulfato sódico (SDS) al 20%, 2- butanol al 50% y 5 ml de ácido clorhídrico 2 N) y se homogenizó cada pocillo por pipeteado suave. Después, las placas se mantuvieron en agitación continua durante 30 minutos a 37 °C con el fin de disolver completamente el producto formazán. Finalmente, se registró la absorbancia a 562 nm utilizando un lector de placas de 96 pocillos.

Se utilizó el programa de Software GraphPad Prism para el análisis estadístico. Los datos se expresaron como la media +/- ET. El ensayo estadístico que se utilizó fue el Kruskal-Wallis, que es un ensayo no paramétrico para comparaciones múltiples. Luego se utilizó el ensayo de Dunn para identificar los grupos cuya media difería estadísticamente. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo.

Como se muestra en la Figura 1, el tratamiento con el péptido LPA reduce significativamente la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn activa a todas las dosis del péptido al compararse con las células no tratadas ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, el tratamiento con este péptido no afectó a la viabilidad de las células mononucleares de los donantes sanos (a ninguna de las dosis de péptido LPA evaluadas en el experimento). Este resultado sugiere la especificidad del mecanismo de muerte celular inducido por este péptido en células de pacientes con enfermedad de Crohn. Estos resultados son representativos de cinco pacientes con enfermedad de Crohn activa y cinco donantes sanos.

### Ejemplo 2. Identificación del mecanismo de muerte celular inducido por el péptido LPA en células mononucleares en sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn por microscopía electrónica de transmisión.

Con el objetivo de identificar si el mecanismo de muerte celular inducido por el péptido LPA (identificado como Sec ID N° 1 en la presente invención) en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn activa está mediado por apoptosis, las muestras se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta técnica permite la visualización de las características morfológicas de las células apoptóticas que es un criterio irrefutable de que se produce apoptosis. Estas características son: núcleo electrón-denso (migración perinuclear de la cromatina en la fase temprana), fragmentación nuclear, orgánulos citoplasmáticos desorganizados e intactos, grandes vacuolas distinguibles, cambios en la superficie celular y desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos. También se puede observar con esta técnica el proceso de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por

las células adyacentes (White M y col. (2004) A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol* 285: 105-11).

Las células mononucleares, aisladas de la sangre periférica ( $10 \times 10^6$  células) de los pacientes con enfermedad de Crohn, se cultivaron con y sin el péptido LPA a una concentración de 40 ug/ml durante 72 horas. Las células no tratadas se utilizaron como control del ensayo. Después de 72 horas de incubación, las muestras se fijaron utilizando una solución de glutaraldehído al 1% y paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M durante 1 hora. Luego, las células se lavaron en PBS 1X y se trataron con una solución de tetraóxido de osmio al 2% durante 1 h. A continuación, las células se lavaron dos veces con tampón cocodilato 0,1 M y las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcoholes (30-100%). Posteriormente, las células se infiltraron utilizando una resina epoxy Spurr (Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Head* 26(1): 31-43) y se llevó a cabo la polimerización a 70 °C durante 24 h. Se cortaron secciones ultrafinas (40 nm) utilizando un ultramicrotomo (Nova, LKB) y se montaron en rejillas de níquel. A continuación las muestras se tiñeron con una solución de acetato de uranilo supersaturado en metanol durante 5 minutos. El análisis se llevó a cabo en un Microscopio Electrónico JEOL/JEM 2000 EX (JEOL, Japón).

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos por TEM en células mononucleares de pacientes con enfermedad de Crohn activa. Como se observa, las células no tratadas tienen una morfología normal (A, B). Sin embargo, en las células tratadas con el péptido LPA (Sec ID N° 1) se pueden observar los cambios morfológicos característicos de un proceso apoptótico (C-H). En particular, se puede observar la condensación y migración de la cromatina hacia la periferia del núcleo (CMC), que es uno de los cambios morfológicos más tempranos que tienen lugar durante la apoptosis en el núcleo (N) de las células. También se observaron en estas muestras, fragmentación nuclear (NF) y cuerpos apoptóticos (AB). Incluso, se puede apreciar que se produjo fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (P AB) por la presencia de restos celulares. Como se observa en la Figura 2F, los orgánulos citoplasmáticos permanecen intactos (ICO), lo que es una característica de la muerte celular por apoptosis. Estos resultados demuestran que el mecanismo de muerte celular inducido por este péptido LPA en las células mononucleares de pacientes con enfermedad de Crohn activa es mediante apoptosis.

El análisis de estas células del paciente llevado a cabo por TEM también permitió la identificación de la población celular entre las células mononucleares que entran en apoptosis. Este resultado fue posible debido a que los diferentes tipos de leucocitos de la sangre (monocitos, linfocitos y polimorfonucleares) tienen morfologías diferentes. Entre las células mononucleares, los inventores identificaron que los linfocitos son la población que entra en apoptosis. Desde el punto de vista morfológico, los linfocitos son más pequeños que los monocitos, también tienen un núcleo redondo y menos citoplasma. Además, los linfocitos no presentan cromatina laxa en el núcleo o con forma de herradura, lo que es característico de los monocitos (Junqueira LC y Carneiro J (2005) *Basic Histology*. Sexta edición. Editorial Masson, Barcelona, España).

### **Ejemplo 3. Identificación del mecanismo de muerte celular inducido por el péptido LPA sobre las células de la lámina propia intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn.**

Se obtuvieron muestras de tejido intestinal correspondientes a las áreas inflamadas con consentimiento por escrito. Las muestras se mantuvieron refrigeradas, en una solución salina equilibrada de Hank libre de magnesio y calcio (HBSS). Las células de la lámina propia se aislaron de estos tejidos utilizando el procedimiento del Ditiotreitól / Ácido etilendiamina tetraacético / Colagenasa descrito por Bull y Bookman (Bull DMK y Bookman MA (1977) Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J Clin Invest* 59: 966-974) con las modificaciones llevadas a cabo por Van Tol y colaboradores (Van Tol EA y col. (1992) The CD56 adhesion molecule is the major determinant for detecting non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxic mononuclear cells from the intestinal lamina propria. *Eur J Immunol* 22: 23-29).

Las células mononucleares de la lámina propia de pacientes con enfermedad de Crohn ( $10 \times 10^6$  células) se cultivaron con y sin el péptido LPA (Sec ID N° 1) (40 ug/ml) durante 72 horas. El análisis, que se llevó a cabo por TEM (Figura 3), reveló que este péptido induce la muerte por apoptosis de gran parte de esta población, como se puede observar en las células tratadas con el péptido LPA, por algunas de las características morfológicas de este tipo de muerte celular (C-E) tales como: la migración de la cromatina a la periferia del núcleo (CMC), fragmentación nuclear (NF) y cuerpos apoptóticos (AB). Las células no tratadas tienen una morfología normal (A-B).

### **Ejemplo 4. Descenso de la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn inactiva después de activarse con un anticuerpo anti-CD3.**

Las células mononucleares de la sangre periférica de un paciente con enfermedad de Crohn inactiva se activaron con un anticuerpo anti-CD3 (e-Biosciences) durante 72 h a 37 °C, en atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5%. La adición del anticuerpo anti-CD3 produce una activación policlonal de linfocitos T en la población celular. Los linfocitos activados se lavaron con solución PBS 1X y luego se incubaron ( $1 \times 10^5$  células) durante 1 h con diferentes concentraciones (10, 40 y 160 ug/ml) del péptido LPA (Sec ID N° 1). Las células mononucleares de sangre periférica cultivadas durante 72 horas sin el anticuerpo anti-CD3 se utilizaron como control del ensayo de activación (células no activadas). Tras este tiempo, estas células se cultivaron con las mismas concentraciones del péptido LPA.

La viabilidad celular se determinó utilizando el procedimiento MTT, como se describió en el ejemplo 1. Como se puede observar en la Figura 4A, el péptido LPA no redujo la viabilidad de las células mononucleares de un paciente con enfermedad de Crohn inactiva. Sin embargo, este péptido redujo significativamente la viabilidad de estas células activadas previamente con el anticuerpo anti-CD3 (B). Este resultado, junto con los que se muestran en los Ejemplos 1 y 2, en los que este péptido no afecta a la viabilidad de las células mononucleares de donantes sanos (Ejemplo 1) y la identificación de los linfocitos como la población más importante de células mononucleares de pacientes con enfermedad de Crohn activa que entran en apoptosis (Ejemplo 2), sugiere que este péptido LPA (Sec ID N° 1) es capaz de inducir apoptosis de los linfocitos T activados patógenos con alta especificidad.

#### **Ejemplo 5. Evaluación del efecto del péptido LPA sobre la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diabetes mellitus tipo 1.**

Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 se aislaron por centrifugación en el Ficoll – Plaque™ PLUS, como se ha descrito en el ejemplo 1. Para llevarlo a cabo, se trataron  $10 \times 10^6$  células con el péptido LPA (40 ug/ml) durante 72 horas. Las células no tratadas se utilizaron como control del ensayo. Como se muestra en la Figura 5, las células tratadas con este péptido tienen la morfología descrita anteriormente (en el Ejemplo 2) de las células con apoptosis (Paneles C-D). Por otra parte, las células no tratadas (Paneles A-B) tienen una morfología normal. Este resultado demuestra que este péptido LPA induce apoptosis en las células mononucleares de pacientes con diabetes mellitus tipo 1.

#### **Ejemplo 6. Estudio de biodistribución del péptido LPA (identificado como Sec ID N° 1) en ratas Lewis.**

El péptido LPA (identificado como Sec ID N° 1) se marcó con el isótopo  $^{125}$  y se administró a ratas Lewis a dosis de 0,25 mg y 1 mg/kg de peso corporal, por vía intravenosa e intradérmica. Se sacrificaron 6 animales de cada grupo experimental, a las 4 y 24 h tras la inoculación del péptido. Se determinaron los niveles de radiactividad en diferentes órganos. Los resultados se expresaron en % de dosis de radiactividad/g de tejido.

Este estudio indicó que este péptido se biodistribuye en el tracto gastrointestinal: estómago, intestino delgado y colon, permaneciendo en estos órganos el tiempo necesario para ejercer sus mecanismos biológicos. Este resultado respalda el uso de este péptido en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Además, este péptido puede aplicarse para el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo 1, debido a que el tracto gastrointestinal es el sitio por excelencia para la inducción de la tolerancia periférica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Centro de ingeniería genética y biotecnología

<120> Utilización de péptidos tipo LPA para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales y diabetes tipo 1

5 <130> APL en EII y Diabetes

<140>  
<141>

<150> CU 2008- 0254  
<151> 29-12-2008

10 <160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 27  
<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido APL

<400> 1

```

Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Val
  1           5           10           15

Gln Leu Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala
          20           25
    
```

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido LPA derivado de la hsp60 humana, e identificado como Sec ID N° 1, o sus análogos para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal y/o Diabetes tipo 1, en el que dichos análogos tienen una actividad de inducción de apoptosis de linfocitos T patógenos, en el que dichos análogos comprenden menos de 9 modificaciones de la SEC ID N° 1, y en el que dicha modificación es una sustitución, deleción o inserción de un único aminoácido.
2. El péptido LPA para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona de entre el grupo que comprende la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.
- 10 3. Un péptido LPA, derivado de la hsp60 humana e identificado como Sec ID N° 1, o sus análogos para su uso en la inducción de apoptosis de clones patógenos de linfocitos T en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y Diabetes tipo 1, en el que dichos análogos comprenden menos de 9 modificaciones de la SEC ID N° 1, y en el que dicha modificación es una sustitución, deleción o inserción de un único aminoácido.
4. El péptido LPA para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona de entre el grupo que comprende la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.
- 15 5. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal y Diabetes tipo 1 que comprende un péptido LPA derivado de la hsp60 humana, e identificado como Sec ID N° 1, o sus análogos, en la que la composición farmacéutica además comprende un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que dichos análogos tienen una actividad de inducción de apoptosis de los linfocitos T patógenos y en la que dichos análogos comprenden menos de 9 modificaciones de la SEC ID N° 1, y en la que dicha modificación es una sustitución, deleción o inserción de un único aminoácido.
- 20 6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica se administra por vía parenteral o mucosa.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica se administra por una vía parenteral seleccionada de entre el grupo que comprende la vía intradérmica, la vía subcutánea, la vía intramuscular y la vía intravenosa.
- 25 8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica se administra por una vía mucosa seleccionada de entre el grupo que comprende la vía rectal y la vía oral.
- 30 9. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 5, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona de entre el grupo que comprende la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

Figura 1

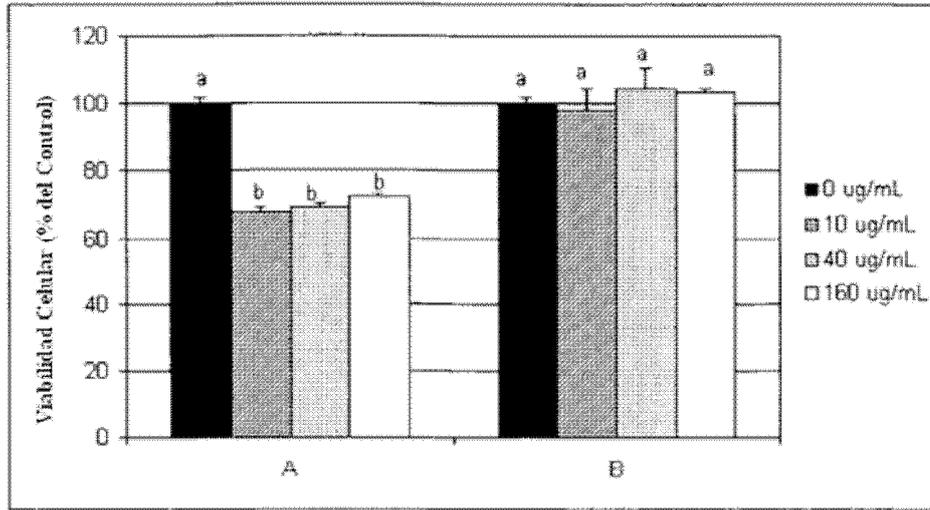


Figura 2

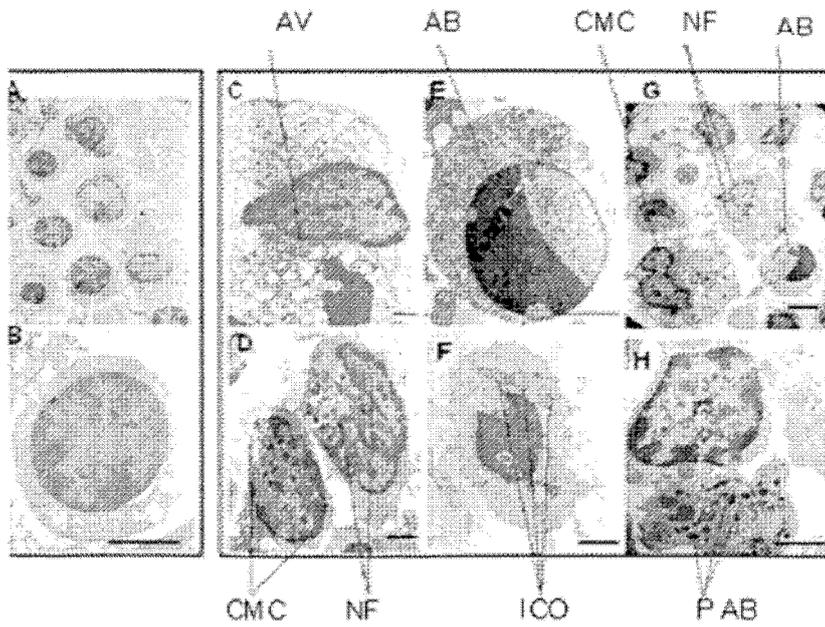


Figura 3

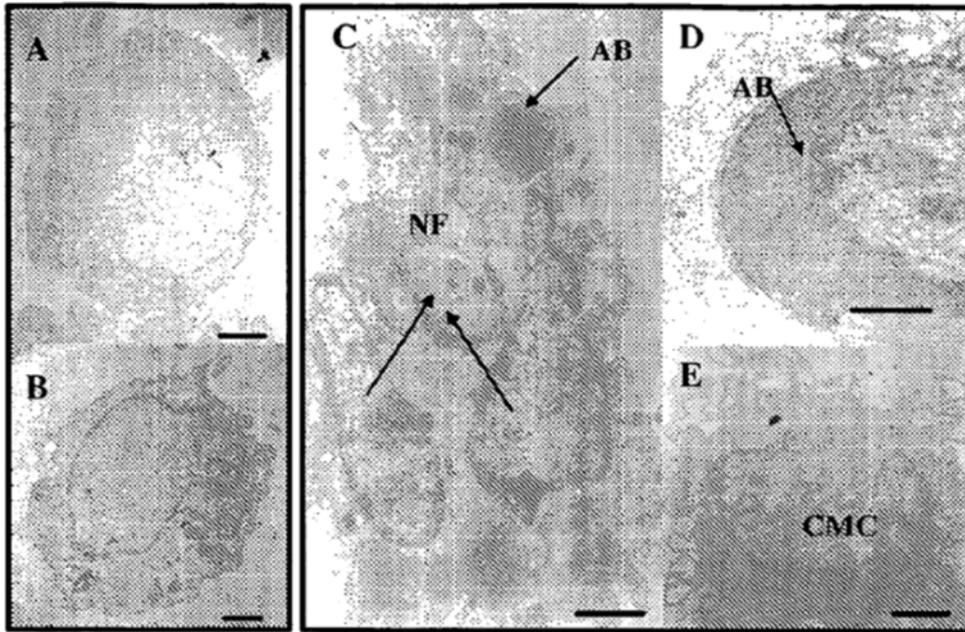


Figura 4

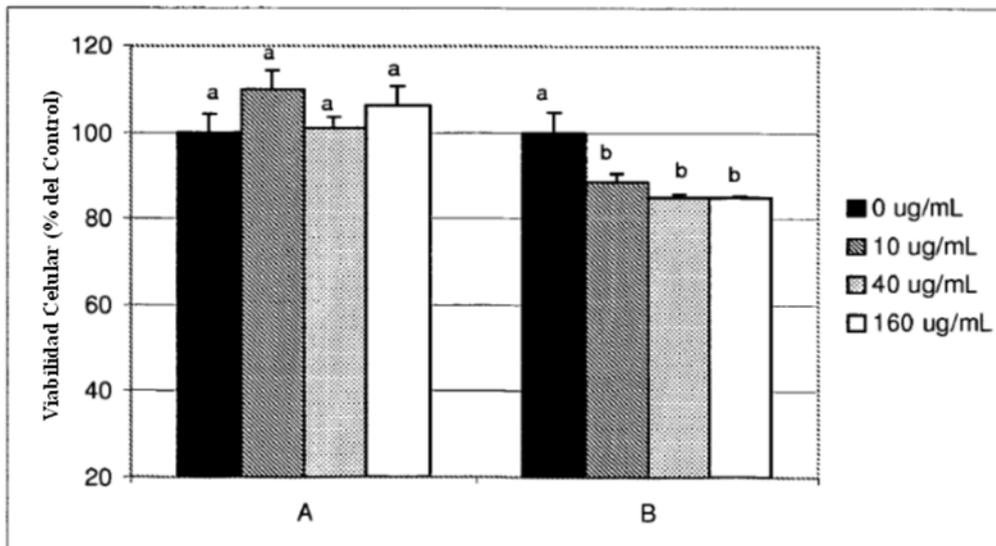


Figura 5

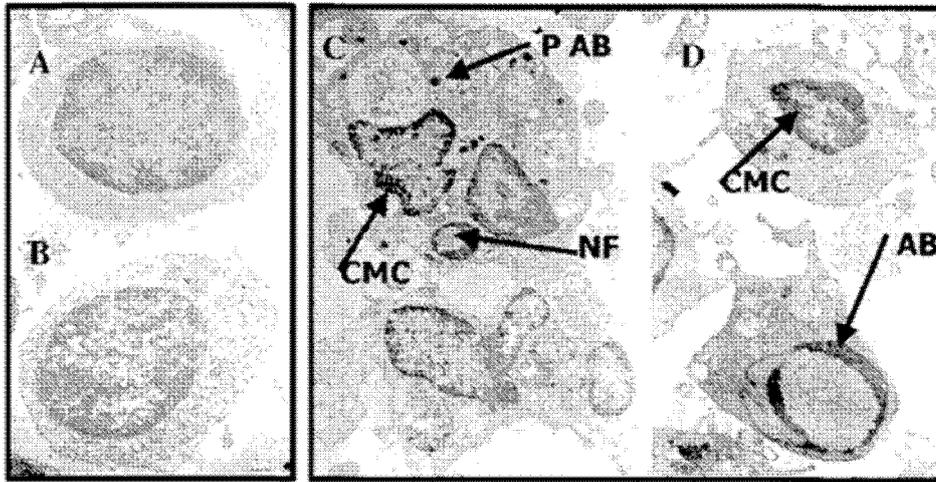


Figura 6

A

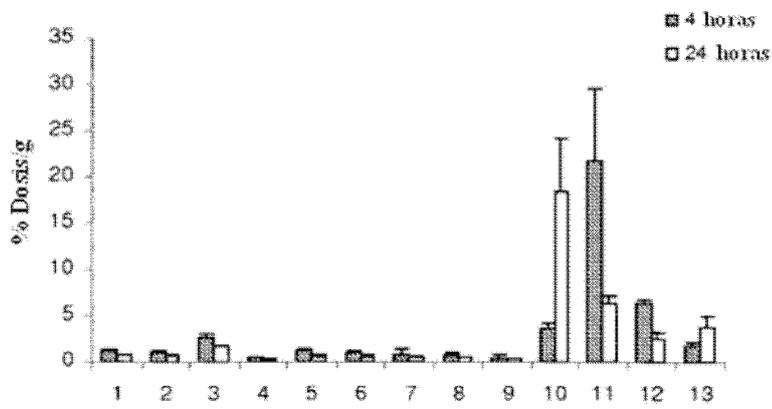
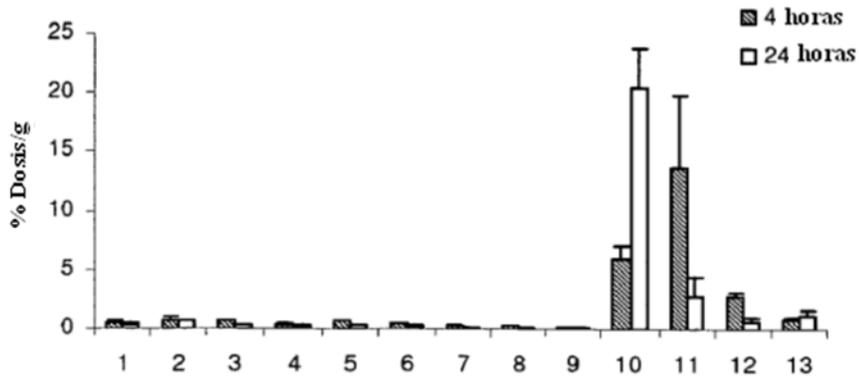
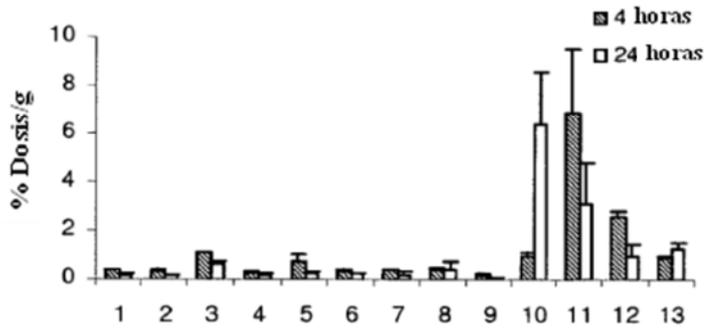


Figura 6

**B**



**C**



**D**

