

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 707**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2005** **E 10189769 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013** **EP 2371847**

54 Título: **Péptidos y derivados tipo APL de Hsp60 y composiciones farmacéuticas**

30 Prioridad:

24.09.2004 CU 20040207

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

04.03.2014

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y
BIOTECNOLOGIA (100.0%)
Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacan Playa
Ciudad de La Habana 10600, CU**

72 Inventor/es:

**DOMÍNGUEZ HORTA, MARÍA DEL CARMEN;
PADRÓN PALOMARES, GABRIEL RAMÓN;
LÓPEZ MARÍN, NELIA;
LORENZO PEREZ, NORAILYS;
BARBERÁ BETANCOURT, ARIANA;
HERNÁNDEZ GARCÍA, ARIADNA;
MORERA CORDOVA, VIVIAN;
COSME DÍAZ, CARELIA;
MERINO GARCÍA, NELSON J.;
VÁSQUEZ BONACHEA, ARIEL y
SUÁREZ ALBA, JOSÉ**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 445 707 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

Péptidos y derivados tipo APL de Hsp60 y composiciones farmacéuticas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos de la proteína humana de choque térmico de 60 kDa (abreviada *hHsp60*) y Ligandos Peptídicos Alterados (abreviados APL) derivados de los mismos. Además, la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos péptidos para el tratamiento de la Artritis Reumatoide (RA).

Técnica antecedente

La RA es una enfermedad autoinmune, de etiología desconocida que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. Se trata de un síndrome que se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones, aunque también pueden observarse manifestaciones sistémicas. Esta enfermedad se inicia con la inflamación de la membrana sinovial y con frecuencia causa la destrucción erosiva del cartílago y el hueso adyacentes, que resulta en la incapacidad física moderada del 80% de los pacientes y una mortalidad temprana (Moctezuma, J.F. (2002) Manifestaciones articulares de la Artritis Reumatoide. Revista Mexicana de Reumatología 17: 211-219). La RA puede presentarse a cualquier edad, sin distinción de razas o grupos étnicos, pero la incidencia máxima de su inicio ocurre entre los 25 y 55 años de edad. Entre las personas con RA, las mujeres superan a los hombres en una proporción de tres a uno (Emery, P. (2002) Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid arthritis: evidence based development of to clinical guide. Ann Rheum Dis. 61:290-297).

La causa de la RA es desconocida. Esta es una enfermedad que implica la presencia de factores genéticos, ambientales, inmunológicos y hormonales. Ciertos genes tienen un papel en el sistema inmune, asociados con una tendencia a desarrollar RA. Al mismo tiempo, algunas personas con RA no tienen estos genes y otras personas que los tienen nunca desarrollan la enfermedad. Por lo tanto, se ha sugerido que el antecedente genético es importante, pero no es decisivo.

En modelos de enfermedad autoinmune, antígenos microbianos con estructura similar a los antígenos propios pueden liberar una respuesta cruzada con autoantígenos, produciendo una alteración en los mecanismos de tolerancia y perpetuando una respuesta autoinmune. En general, el daño y la necrosis local en un tejido producidos por un agente infeccioso podrían descubrir el epitopo críptico del autoantígeno, siendo capaz de activar células T autorreactivas (Albert, L.J. (1999) Mechanisms of Disease: Molecular Mimicry and autoimmunity. N Engl J Med 341:2068-2074).

La fase de transición de los linfocitos T entre la tolerancia y la inmunidad/autoinmunidad es regulada a diferentes niveles. Dos parámetros importantes en esta transición son el estado de maduración de las Células Presentadoras de Antígeno (abreviadas APC) y los niveles de autoantígenos que son detectados por el sistema inmune (Ohashi, P.S. (2002) Making and breaking tolerance. Current Opinion in Immunology 14:744-759).

Una de las hipótesis actuales que trata de explicar el desarrollo de enfermedades autoinmunes, plantea que las APC en ausencia de síntomas del sistema inmune innato o de signos de peligro, se mantienen relativamente inmaduras e inducen tolerancia en las células T autorreactivas, cuando se les presentan péptidos propios (Steiman, R.M. (2000) The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. J Exp Med. 191:411-416). La inducción de tolerancia periférica también se correlaciona con la concentración de antígeno propio (Kurts, C. (1999) CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. PNAS 96:12703-12707). Un incremento en la presentación de antígenos propios debido al incremento de sus niveles de expresión, permite su detección por las células T autorreactivas ignorantes. Si los niveles de antígenos propios se incrementan en ausencia de eventos que promueven la maduración de las APC, la tolerancia a estos antígenos se mantiene, de lo contrario, ocurre que en presencia de señales proinflamatorias u otros eventos que promueven la maduración de las APC la tolerancia es rota por la activación de las células T ignorantes y se desarrollan enfermedades autoinmunes (Janeway, C.A. (2002) Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 20:197-216). Los agentes infecciosos que han sido objeto de estudio como la causa de la RA son: el virus de Epstein-Bar, los retrovirus, el virus de la hepatitis C, el *Mycobacterium tuberculosis* (abreviado *Mt*) y el *Helicobacter pylori*, entre otros.

La patogénesis de la RA se caracteriza por la acción concertada de los diferentes tipos de células que causan la destrucción progresiva del cartílago y el hueso.

En situaciones normales existe un equilibrio entre las citocinas inflamatorias como: TNF α , IL-1, IL-6, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 y el IFN γ , y las anti-inflamatorias como IL-4, IL-11, IL-13 y antagonista de IL-1 o TN α . En la RA este equilibrio se desplaza, sin embargo, en favor de las citocinas inflamatorias (Arend, W.P. (2001) Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of interleukin-1 receiving antagonist. Semin Arthritis Rheum 30(2):1-6).

El reconocimiento de un antígeno exógeno o autoantígeno es probablemente la razón de una serie de eventos que causan la destrucción de las articulaciones en pacientes con RA. Este fenómeno causa la activación de linfocitos T CD4+ que, en cooperación con la estimulación de diferentes citocinas, induce su diferenciación a células Th1, con la

- consecuente liberación de citocinas proinflamatorias (IL-2 e INF γ) (Simón, A.J. (2001) Biological therapy in Rheumatoid Arthritis. Magazine of Clinical Investigation 53(5):452-459). Muchos investigadores coinciden en que la inflamación crónica de las articulaciones es inducida por estas células T activadas que infiltran la membrana sinovial. La acción de estas citocinas sobre los macrófagos causa la producción de una alta cantidad de TNF α e IL-1. Estos
- 5 causan una serie de acciones locales y sistémicas como la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales (LFA1, ICAM-1), que reclutan otras células para los sitios de inflamación. También estimulan macrófagos, fibroblastos, condrocitos y osteoclastos para la liberación de otros mediadores de la inflamación, como IL-15 e IL-8. TNF α e IL-1 estimulan la proliferación de la membrana sinovial que causa la
- 10 formación de pannus, también pueden inducir la diferenciación de los linfocitos B en células productoras de anticuerpos que potencialmente participan en la destrucción de la articulación. También inhiben la producción de citocinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-14) producidas por las células Th2 y estimulan a los hepatocitos para liberar IL-6. La IL-6 favorece la producción de las proteínas de la fase aguda, que participan en el fortalecimiento de la respuesta inmune (Forre, O. (2000) New possibilities of treatment in AR. Scand J Rheumatol 29(2):73-84).
- 15 Entre los autoantígenos involucrados en la patogénesis de la RA se encuentra *Hsp60*, una proteína que pertenece a la familia de las *Hsp*, que son proteínas inmunogénicas con conservación excepcional de la evolución. La respuesta inmune contra las *Hsp* extrañas es un importante mecanismo de defensa contra las infecciones bacterianas. Los anticuerpos contra estas proteínas pueden ser abundantes en personas sanas y en pacientes con enfermedades autoinmunes y pueden presentar reacción cruzada con los antígenos propios (Chen, W. (1999) Human 60-kDa Heat-Shock Protein: To Danger Signal to the Innate Immune System. J Immunol. 162:3212-3219).
- 20 La *Hsp65* de *Mt* es homóloga a la *Hsp60* de los mamíferos. Esto sugiere que la *Hsp60* puede ser reconocida como autoantígeno en pacientes con RA. Al comparar los pacientes con osteoartritis y los pacientes con RA, estos últimos tienen un aumento de la respuesta proliferativa de los linfocitos B en el líquido sinovial a la *Hsp65* de *Mycobacterium*. La intensidad de la respuesta se correlaciona con la inflamación sinovial. Esta respuesta no es
- 25 específica para la RA en comparación con otras enfermedades inflamatorias (Life, P. (1993) Responses to Gram negative enteric bacterial antigens by synovial T cells from patients with juvenile chronic arthritis: recognition of heat shock protein hsp60. J Rheumatol. 20:1388-1396).
- La concentración de *Hsp* es una posible señal de peligro para el sistema inmunológico, estas son liberadas de las células muertas, y pueden inducir una respuesta inflamatoria e iniciar la maduración de las APC. Las *Hsp* son proteínas intracelulares que no se expresan en la membrana celular, ni se secretan, de modo que las *Hsp* son
- 30 candidatos atractivos para moléculas que constituyen los signos de peligro (Van den Berg, WB. (1998): Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled. Springer Semin Immunopathol. 20:149-164).
- Se han propuesto varias preparaciones usando la *Hsp60* o sus péptidos derivados para el tratamiento de algunas patologías autoinmunes. Por ejemplo en la patente EPO262710, se propone el uso de varios péptidos de la *Hsp60* de *Mt* para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades autoinmunes, especialmente de afecciones artríticas. Esta
- 35 invención se basa en el hecho de que las infecciones anteriores con diversas bacterias pueden desencadenar el desarrollo de enfermedades autoinmunes, en personas genéticamente susceptibles, por ejemplo: los pacientes con RA puede mostrar una alta reactividad a antígenos microbianos. Estos mismos inventores en la patente EPO322990 proponen el uso de otros péptidos de la *Hsp60* de *Mt* con el mismo propósito de la patente anterior.
- En la solicitud de patente W09610039 se proponen el uso de un péptido de la *Hsp60* de *Mt* para el diagnóstico y
- 40 tratamiento de la artritis autoinmune.
- En la solicitud de patente WO9711966, los autores proponen el uso de péptidos de las regiones no conservadas de la *hHsp60*, que no coinciden con la *Hsp60* de bacterias que pueden inducir tolerancia en las células T de pacientes con RA.
- La solicitud de patente WO0143691 propone el uso de preparaciones farmacéuticas compuestas específicamente
- 45 por péptidos de la *hHsp60* y sus variantes para la prevención de enfermedades inflamatorias tales como RA.
- En la patente US6180103 los autores proponen el uso de un péptido de la *Hsp60* llamado p277 y su análogo para el diagnóstico y prevención de la diabetes de tipo I.
- La patente US5993803 protege el uso de la *Hsp60*, el péptido p277 y un grupo de péptidos derivados de esta proteína para reducir la gravedad de la respuesta inmune durante el trasplante de órganos.
- 50 Quintana et al (J Immunol 2003, 171: 3533-3541) identificaron un péptido derivado de HSP60 constituido por residuos 31 - 50. La vacunación con este péptido inhibió el desarrollo de Artritis Adyuvante en ratas. El péptido no fue probado en cuanto a sus propiedades reguladoras en pacientes con RA.
- Recientemente se ha considerado que la aterosclerosis se presenta una serie de características similares a los procesos autoinmunes. En la solicitud de patente WO0072023 los autores proponen un procedimiento para el
- 55 tratamiento y diagnóstico de la aterosclerosis y enfermedades coronarias utilizando una preparación que contiene la proteína *Hsp60*.

En la solicitud de patente WO02057795, se protege un nuevo procedimiento para el diagnóstico y tratamiento de la osteoporosis utilizando proteínas de la familia de *Hsp* y proteínas de patógenos tales como: virus y bacterias.

En la actualidad, no existe cura para la RA. Los procedimientos actuales de tratamiento se centran en aliviar el dolor, reducir la inflamación, retardar los daños de las articulaciones y mejorar las funciones y el bienestar de los pacientes. Recientemente se han elaborado medicamentos inmunomoduladores, que bloquean las citocinas que participan en el inicio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria en la RA, con el propósito de detener o retardar la progresión de la enfermedad. Para este tipo de terapia existen dos tipos de medicamentos: el bloqueo de la acción del Factor de Necrosis Tumoral (abreviado TNF α) y aquellos que inhiben la acción de la interleucina 1 (IL-1).

Aunque los resultados son promisorios con las terapias anti-TNF α y anti-IL-1, el porcentaje de infecciones es alto. Muchos de los pacientes tratados con estos fármacos desarrollan infecciones serias que son fatales en algunos casos, incluyendo otras enfermedades autoinmunes, neoplasias, etc. Además, son medicamentos muy caros (Breshinan, B. (1998) Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human anti-interleukin-1 antagonist. Arthritis Reum. 41:2196-2204)

La tolerancia oral ha sido propuesta como un procedimiento para crear tolerancia periférica frente a ciertos antígenos. Esta puede ser inducida por mecanismos de supresión activa, anergia o delección clonal, dependiendo de la dosis y la frecuencia de la administración del antígeno. El procedimiento puede inducir a las células T reguladoras que son activadas en una manera específica por el antígeno, pero ejercen su acción independientemente (supresión activa). Para que tenga lugar la acción reguladora, no es necesario administrar el antígeno supuestamente patógeno, sino cualquier otro capaz de inducir la supresión activa en el foco inflamatorio, inhibiendo la actividad de las células efectoras patógenas. El colágeno tipo II (abreviado CII) es el autoantígeno que se ha utilizado con mayor frecuencia en este sentido. Los resultados de los estudios realizados en pacientes con RA, usando CII de pollo y bovino han dado resultados contradictorios (Trentham, D.E. (1993) Effects of oral administration of type II collagen in rheumatoid arthritis. Science 261:1727-1730; Sieper, J. (1996) Oral type II collagen treatment in early rheumatoid arthritis: to double-blind, placebo-controlled, randomize trial. Arthritis Rheum. 39:41-51).

La patente US6153200 propone el uso de un péptido de la *Hsp70*, proteína perteneciente a la familia de *Hsp*, para inducir tolerancia por vía oral en pacientes con RA.

Otra variante que se ha sugerido para inducir tolerancia es a través de péptidos APL, basado en el hecho de que las células T se activan si los linfocitos T CD4+ específicos para un péptido antigénico determinado reconocen el antígeno presentado por APC competentes. No obstante, si la misma célula T se activa por primera vez con una forma diferente de la del antígeno, en la que uno de los sitios de contacto con el TcR está ligeramente alterada, esto puede resultar en una activación parcial o incluso la inactivación de las células T. Estos antígenos se denominan APLs. Los APLs son similares a los péptidos inmunogénicos con una o varias sustituciones en las posiciones esenciales de contacto con el TcR o con MHC que interfieren en la cascada de eventos necesarios para la activación completa de las células T.

Conceptualmente, los APLs pueden diseñarse con propiedades similares a las del péptido inmunogénico (agonista) entre otros efectos para aumentar la respuesta de las células T hacia antígenos específicos. Este efecto es ventajoso bajo condiciones patológicas como enfermedades infecciosas. Los péptidos también pueden ser diseñados con propiedades antagonistas al péptido inmunogénico que podrían ser beneficiosas en el control de enfermedades autoinmunes, ya que pueden bloquear la respuesta de células T que actúan como antagonistas del TcR (M. De Magistris (1992) Antigen analog-major complex histocompatibility complexes act as antagonist of the T cell receptor. Cell 68:625 - 634), agonista parcial o inducir a una población de células T reguladoras que median la supresión activa (Evavold, B.D. (1991) Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell ligand. Science 252:1308-1310). La capacidad de manipular experimentalmente las propiedades intrínsecas de ligandos peptídicos permite la alteración apropiada de la naturaleza, el curso y la potencia de la respuesta inmune celular.

Hasta el momento, se han realizado dos ensayos clínicos en seres humanos utilizando péptidos tipo APL para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. En ambos ensayos, los péptidos derivan de un epitopo en la posición 83 a 93 de la proteína básica mielina. Uno de estos ensayos incluyó 142 pacientes con esclerosis múltiple, y se suspendió debido a que el 9% de los pacientes desarrollaron hipersensibilidad (Ludwig Kapposi (2000) Induction of non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in to placebo controlled, randomized phase II trial. Nature Medicine 10:1176-1182).

El otro ensayo incluyó a 25 pacientes y se interrumpió también, porque en tres pacientes se observó una exacerbación de la enfermedad (Bibiana Bielekova (2000) Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: Results of to phase II clinical trial with an altered peptide ligand. Nature Medicine 6:1167-1175). El autor principal de este trabajo analiza los posibles factores que determinaron estos resultados negativos, y plantea que los cambios llevados a cabo en los sitios del APL pueden originar nuevos motivos de unión al HLA (como ocurrió en el caso de la unión del APL a DRB1*0404 presente en el paciente I), el complejo APL-HLA puede también estimular las células T no eliminadas en la selección negativa que puede ser activada en forma cruzada por el autoantígeno nativo. En este ensayo se usaron altas concentraciones del APL en

las preparaciones farmacéuticas, que pueden estimular las células T con alta similitud al autoantígeno e inducir una respuesta de células T heteróclita. (Bibiana Bielekova and Roland Martin (2001) Antigen-specific immunomodulation via altered peptide tying. J Mol Med. 79:552-556).

5 Para llevar a cabo estos dos ensayos clínicos, los autores no analizaron previamente la respuesta *in vitro* de las células T de los pacientes en el APL. Tampoco tuvieron en cuenta los tipos de moléculas de HLA expresadas por los pacientes tratados.

10 El desafío principal en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes es el desarrollo de estrategias terapéuticas que pueden eliminar las células T patogénicas con especificidad, sin afectar a otras células T no relacionadas. Por lo tanto, la búsqueda terapéutica debe encontrar una manera segura, específica y efectiva de desactivar un proceso autoinmune avanzado. La presente invención, en contraste con el estado de la técnica anterior, propone el uso de péptidos de la *hHsp60* y su tipo derivado APL, que inducen mecanismos moleculares inhibidores, de una manera específica, del curso de la RA.

Sumario de la invención

15 La presente invención resuelve el problema anteriormente mencionado, proporcionando péptidos de la proteína humana de choque térmico de 60 kDa que constituyen epitopos para las células T, para inducir mecanismos de tolerancia, en particular mecanismos de inducción de anergia o mediados por clones de células T reguladoras en pacientes con RA.

Los péptidos ensayados respecto a la misma representan las secuencias:

20 E18-12 MGPKGRTVIEQSWGSPKVTk (SEQ. ID. NO: 1)
E18-3 SIDLKDKYKNIGAKLVQOVANNTNEEAG (SEQ. ID. NO: 2)
F19-6 IIDPTKVVRTALLDAA (SEQ. ID. NO: 3)

25 La solicitud de patente WO9711966, propone el uso de péptidos de la *hHsp60* y de *Mt* basados en el hecho de que podían inducir tolerancia en células T y prevenir la RA. Estos autores corroboran cierta mejoría de la enfermedad mediante la administración de estos péptidos a ratones (se indujo previamente Artritis con pristina). Contrariamente a esta solicitud, hemos demostrado que nuestros péptidos inducen mecanismos de supresión activa que inducen tolerancia periférica de una manera muy eficiente, corroborando un aumento significativo de IL-10 en dos modelos animales de artritis, así como en ensayos "ex vivo" utilizando células mononucleares de pacientes.

30 Es bien sabido que la respuesta fundamental de células T en el modelo de artritis inducida por adyuvante (AIA) se dirige contra la *Hsp60*. Verificamos en este modelo que nuestros péptidos derivados de la *hHsp60* ejercen una protección terapéutica muy marcada, produciendo un aumento de la IL-10 y una disminución de los niveles de TNF α . El mismo efecto terapéutico ejercido por estos péptidos, también hemos verificado en el modelo animal de artritis inducida por colágeno (CIA), en el que la respuesta principal es contra el colágeno tipo II.

35 Estos hechos indican que las capacidades terapéuticas de nuestros péptidos son independientes del agente de inducción y pueden mediar mecanismos de supresión activa en el sitio de inflamación que podrían ampliarse a otros autoantígenos presentes en las articulaciones, que progresivamente contribuyen al proceso inmunopatogénico que tiene lugar durante el curso de la RA. Estos resultados refuerzan las posibilidades terapéuticas del uso de nuestras preparaciones para el tratamiento de la RA.

40 Los péptidos que son especialmente útiles, según la presente invención, para el diseño de variantes tipo APL derivadas del péptido E18-12 (SEQ. ID NO: 1), modificadas en los sitios de contacto con la molécula de MHC humana. Las respectivas secuencias de aminoácidos son

MGPKGRTVIEQSWGSPKVTk (SEQ. ID. NR: 1).

1 2 34 56 7

45 con una sustitución en la posición 1 por: A,F,I,L,M,V,W, o Y
posición 2 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, o Y
posición 3 por: A,K,V,R,T,I,P,L,N,S,G,Y, o M,
posición 4 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, o Y
posición 5 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V, o Y
posición 6 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W, o Y
posición 7 por A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V, o Y

50 En una realización particular, péptidos derivados tipo APL tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ. ID. NO: 5, SEQ. ID. NO: 6, SEQ. ID. NO: 7, SEQ. ID. NO: 8, SEQ. ID. NO: 9, SEQ. ID. NO: 10, SEQ. ID. NO: 11, SEQ. ID. NO: 12 and SEQ. ID. NO: 13.

Los péptidos de la presente invención pueden ser producidos por procedimientos rutinarios de síntesis de péptidos. La composición específica de cada péptido puede ensayarse por el nivel y la calidad de la respuesta inmune que inducen en experimentos como los que se describen en los ejemplos que se presentan más adelante. Todas las secuencias descritas anteriormente y en los ejemplos son útiles y también pueden utilizarse como una base para el diseño y la síntesis de péptidos derivados con propiedades mejoradas.

La invención también incluye composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más de los péptidos anteriormente enumerados y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La administración de las preparaciones farmacéuticas a los pacientes estará en correspondencia con las moléculas de HLA de clase II que son expresadas por el paciente específico.

La forma de administración de las composiciones farmacéuticas dependerá del patrón de citocinas que estas preparaciones inducen en las pruebas "ex vivo". Las preparaciones farmacéuticas que contienen péptidos APL que inducen una respuesta reguladora serán administradas por vía intradérmica o subcutánea. Las preparaciones farmacéuticas que contienen los péptidos originales que inducen una respuesta TH1 podrán ser administradas por vía oral.

Las cantidades de péptidos en las composiciones farmacéuticas de esta invención son aquellas que producen una respuesta inmune efectiva en el huésped. La cantidad efectiva es la cantidad que cuando se administra induce mecanismos moleculares que disminuyen significativamente los signos inflamatorios característicos de la RA y detiene los daños en las articulaciones característicos del curso de esta enfermedad. La cantidad de la composición farmacéutica administrada al huésped también puede variar dependiendo de diversos factores que incluyen: los péptidos usados, la puntuación de ACR (Colegio Americano de Reumatología, abreviado ACR), HLA tipo II, tiempo de haberse diagnosticado la enfermedad, edad, sexo, salud general, así como el nivel de respuesta inmunológica en general. La presente invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento de la RA, que incluye la administración a un paciente de cantidades efectivas de los péptidos o las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

En parte, los resultados se muestran gráficamente en las siguientes figuras:

Figura 1: Evaluación de los signos clínicos de la Artritis en ratas tratadas con péptidos F19-6 y F19-7 por vía intradérmica, en un modelo de AIA.

Figura 2: Modulación de los niveles de TNF α inducido por péptidos F19-6 y F19-7 en células mononucleares de ratas en el modelo de AIA en el día 15 después de la inducción de la enfermedad.

Figura 3: Modulación de los niveles de IL-10 inducida por péptidos F19-6 y F19-7 en células mononucleares de ratas en el modelo de AIA en el día 15 después de la inducción de la enfermedad.

Figura 4: microscopía óptica de una sección de la articulación que pertenece a un animal enfermo no tratado. IS: espacio intra-articular, EC: erosión del cartílago, P: pannus. Tinción con hematoxilina-eosina.

Figura 5: Microscopía óptica de una sección de una articulación que pertenece a un animal tratado con péptido F19-7 por vía intradérmica. IS: espacio intra-articular. Tinción con hematoxilina-eosina.

Figura 6: Modulación de niveles de TNF α inducido por péptidos F19-6 y F19-7 en células mononucleares de ratas en el modelo de CIA en el día 21 después de la inducción de la enfermedad.

Figura 7: Modulación de niveles de IL-10 inducida por péptidos F19-6 y F19-7 en células mononucleares de ratas en el modelo de CIA en el día 21 después de la inducción de la enfermedad.

Figura 8: Modulación de los niveles de TNF α por péptidos F19-6 y F19-7 en células mononucleares de pacientes con RA.

Figura 9: Modulación de los niveles de TNF α por péptidos E18-3 y E18-12 en células mononucleares de pacientes con RA.

Figura 10: Modulación de los niveles de IL-10 por péptidos E18-3 y E18-12 en células mononucleares de pacientes con RA.

Figura 11: Modulación de los niveles de IL-10 inducida por péptidos E18-3 y E18-12 y sus APLs en células mononucleares de pacientes con RA.

Figura 12: Modulación de los niveles de TNF α inducido por péptidos E18-3 y E18-12 y sus APLs en células mononucleares de pacientes con RA.

Figura 13: Relación de niveles de IL-10 y TNF α , inducidos por péptidos E18-3 y E18-12 y sus APLs.

Figura 14: Evaluación de signos clínicos de Artritis en ratas tratadas con péptidos E18-12 y E18-12APL1 por vía intradérmica, en un modelo de AIA.

Descripción detallada de realizaciones particulares y ejemplos de otros péptidos Hsp60

Ejemplo 1: Péptidos de la hHsp60 presentados por HLA humano.

Los péptidos seleccionados de la hHsp60 eran los informados como epitopos de células T humanas por los programas utilizados: SYFPEITHI (Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar

Alexander Bachor and Stefan Stevanovic. 1999. Immunogenetics 50:213-219. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. (access via: <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) y ProPred (Singh, H. and Raghava, G.P.S. 2001. ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. Bioinformatics, 17(12):1236-37).

Las secuencias correspondientes a estos péptidos se muestran en la Tabla 1.

5 **Tabla 1. Secuencia de péptidos de *hHsp60* presentados por HLA humano.**

Péptidos	Posición en la secuencia	Secuencia de aminoácidos
E18-12	55-75	MGPKGRTVIIIEQSWGSPKVTK (SEQ. ID. NO: 1)
E18-3	83-110	SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG (SEQ. ID. NO: 2)

Ejemplo 2: Péptido de la *hHsp60* para epítipo de ratas Lewis.

10 A partir de la secuencia de *hHsp60* seleccionamos un péptido que se une a la molécula de MHC-II de rata RT1.B1 de acuerdo con el motivo de secuencia descrito en la base de datos SYFPEITHI (Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar Alexander Bachor, Stefan Stevanovic. 1999. Immunogenetics 50:213-219. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. (access via: <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>).

Se diseñó un programa que analiza todos los péptidos de 9 aminoácidos para buscar aquellos que cumplen con el motivo. También se incluyeron variantes, que en una de las posiciones no fueron incluidos los residuos descritos como anclaje o preferentes.

15 La secuencia correspondiente a uno de estos péptidos (F19-6) se muestra en la Tabla 2

Tabla 2. Secuencia de péptidos de *hHsp60* seleccionados para ratas.

Péptidos	Posición en la secuencia	Secuencia de aminoácidos
F 19-6	518-533	IIDPTKVVRTALLDAA (SEQ. ID. NO: 3)

Ejemplo 3: Diseño de APL con modificaciones en los aminoácidos implicados en la unión al MHC

20 A partir de los péptidos seleccionados en los ejemplos 1 y 2, hemos modificado las posiciones implicadas en la unión al MHC específico (posiciones 1,3,4,6,8 o 9) tratando de aumentar la afinidad del péptido por la molécula de HLA. Se han buscado los residuos óptimos en cada una de estas posiciones que podrían ser residuos de anclaje si el péptido era seleccionado para procedimientos que usan motivos de unión (SYFPEITHI) o residuos capaces de incrementar la puntuación del péptido como ligando de MHC si la selección del péptido se realizaba utilizando otro tipo de algoritmo (ProPred)

25 Como resultado de estos análisis, el péptido E18-12 ha sido sustituido en las posiciones 1 a 7 por cada uno de los aminoácidos que se especifican a continuación:

MGPKGRTVIIIEQSWGSPKVTK (SEQ. ID. NO: 1)

1 2 3 4 5 6 7

30 está sustituido en la posición 1 por: A,F,I,L,M,V,W, o Y
la posición 2 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, o Y
la posición 3 por: A,K,V,R,T,I,P,L,N,S,G,Y, o M
la posición 4 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, o Y
la posición 5 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V, o Y
la posición 6 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W, o Y
la posición 7 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V, o Y

35

SIDLKDKKYKNIGAKLVQDVANNTNEEA (SEQ. ID. NO: 2)**1 2 3 4 5 6 7 8**

está sustituido en la posición 1 por L,I,V,M,Y,W,F, o A
 la posición 2 por A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, o Y
 la posición 3 por A,F,I,K,L,M,P,R,S,T,V,W, o Y
 la posición 4 por L,I,V,M,Y,W,F, o A
 la posición 5 por A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, o Y
 la posición 6 por A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, o Y
 la posición 7 por A,F,I,K,L,M,P,R,S,T,V,W, o Y
 la posición 8 por A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, o Y

10

El péptido F19-6 ha sido sustituido en las posiciones 1 y 2 por los aminoácidos que se especifican a continuación:

IIDPTKVVRTALLDAA (F19-6)**1 2**

la posición 1 está sustituida por H.
 la posición 2 está sustituida por E.

15 Ejemplo 4: inducción de Artritis por adyuvante y por colágeno en ratas Lewis.

Se usaron ratas Lewis hembras puras (RT1.BI MHC) en el experimento suministradas por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba). Las ratas fueron seleccionadas al azar, con un peso aproximado de 101-120 g, y 5-8 semanas de edad.

20 Uno de los agentes inductores de la enfermedad usados fue *Mt* (H37Ra, Difco, Inglaterra) en adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Sigma, EE.UU.). El otro agente inductor de la Artritis fue colágeno tipo II bovino en IFA.

En este ejemplo, se usaron dos agentes de inducción diferentes para el desarrollo de artritis en ratas por una respuesta inmune contra dos diferentes autoantígenos. Es bien sabido que en el modelo animal para Artritis usando *Mt* como inductor de la enfermedad, la respuesta fundamental de las células T es contra la *Hsp60* (Anderton, SM (1995) Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis. J. Exp. Med. 181: 943-952). En el modelo usando colágeno como inductor, se desarrollaron una respuesta de anticuerpos notable así como clones de células T contra este antígeno (M Griffiths (1988) Immunogenetics of collagen-induced arthritis in rats. Inten. Rev. Immunology 4: 1-15).

30 Nuestro objetivo fundamental para el desarrollo de estos dos Modelos Animales fue evaluar nuestros péptidos en ambos modelos, con el fin de demostrar si el efecto protector de estos péptidos era independiente o no del autoantígeno usado como agente de inducción de la Artritis en ratas.

Ejemplo 5: Evaluación de los signos clínicos.

El grado de inflamación asociada con el desarrollo de la artritis que presentó cada rata se evaluó de acuerdo con el siguiente promedio preparado para este propósito:

35 0 punto: pata normal.
 1 punto: Enrojecimiento leve, pero definitivo del tobillo o la muñeca, enrojecimiento e inflamación aparentes limitados a un único dedo, independientemente del número de dedos afectados.
 2 puntos: Enrojecimiento e inflamación moderados del tobillo y la muñeca.
 3 puntos: Enrojecimiento e inflamación severos de toda la pata incluyendo los dedos.
 4 puntos: Inflamación máxima y deformidad de la pata que involucra múltiples articulaciones.

40 Los cuatro patas se evaluaron por separado de acuerdo a la puntuación establecida, cada pata podía recibir hasta 4 puntos. Por lo tanto, cada rata podía recibir un máximo de 16 puntos.

La evaluación visual se llevó a cabo después de la inducción de la enfermedad cada cinco días.

45 La evaluación clínica de los signos de la Artritis demostró que no había diferencias estadísticas significativas entre los animales correspondientes al grupo de control (grupo IV), en el que la enfermedad no fue inducida, y los animales correspondientes al grupo de control de enfermos (grupo III), en el que se indujo la enfermedad pero que no fueron tratados con péptidos, como se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 6: Síntesis de péptidos

Los péptidos fueron sintetizados mediante la estrategia de Fmoc/tBu en jeringas. La resina utilizada fue Fmoc-AM-MBHA (0,54 mmol/g) y el protocolo de síntesis se continuó con agitación mecánica. Después del tratamiento con TFA, el péptido fue liofilizado y se caracterizó por HPLC y espectrometría de masas.

5 Ejemplo 7: Administración intradérmica de péptidos.

Los animales fueron separados en cuatro grupos de 12 ratas cada uno. Se indujo la enfermedad en tres grupos de animales (Grupo I - Grupo III), y dos grupos fueron tratados con péptidos y uno fue el control de la inducción de la enfermedad. Los dos grupos de animales que fueron tratados con péptidos recibieron 200 µg de péptido por cada rata en un volumen de 100 µl de PBS, los 12 días, 17 y 22 después de la inducción de la enfermedad con Mt.

10 Los animales separados en cuatro grupos fueron tratados de la siguiente manera:

- grupo I: animales tratados con péptido F19-6
- grupo II: animales tratados con péptido F19-7
- grupo III: animales no tratados con péptidos (control de la inducción de la enfermedad)
- grupo IV: animales que no fueron inducidos con la enfermedad y no fueron tratados con péptidos (control negativo)

15 Los días 15, 21, 28 y 35 después de la inducción, se sacrificaron tres animales por grupo, se extrajeron los bazo y se tomó una muestra de articulaciones para el análisis histopatológico

20 Como se muestra en la Figura 1, los signos asociados con el desarrollo de la Artritis comenzaron gradualmente. En los animales del grupo III, correspondiente al grupo de control del desarrollo de la enfermedad, a partir del día 10 después de la inducción de la Artritis, se hizo evidente el desarrollo de un proceso inflamatorio que comenzó con un ligero enrojecimiento de las articulaciones inferiores y que fue expandiéndose al resto de las articulaciones hasta que se volvió grave en algunas ratas.

25 En esta figura, es evidente que la administración del péptido F19-6, correspondiente al epitopo original de la *hHsp60*, y su variante APL F19-7, indujo una reducción significativa de los signos clínicos de la Artritis en los animales tratados con ambos péptidos. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con los péptidos F19-6 y F19-7 y el grupo tomado como control positivo de la enfermedad ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos en este ensayo corroboran que los péptidos F19-6 y F19-7 ejercen un efecto protector en los animales tratados, ya que fue posible observar una remisión casi completa de la enfermedad en las ratas.

Ejemplo 8: Aislamiento del mRNA.

30 Las células mononucleares aisladas del bazo de ratas, se incubaron durante 20 horas aproximadamente. Posteriormente, los sobrenadantes se descartaron y se añadió 1 ml del reactivo: TRI REAGENT TM (Sigma, EE.UU.) a cada pocillo y se dejó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Más tarde, se llevó a cabo el aislamiento del ARNm siguiendo el protocolo recomendado por los proveedores.

Ejemplo 9: Transcripción inversa del ARN.

35 Para la obtención del ADN complementario se usó el sistema Gene Amp RNA PCR Kit (Perkin - Elmer, EE.UU.). Se usó 1 mg de ARNm correspondiente a cada muestra y el protocolo y se continuó con el protocolo como recomiendan los proveedores. La reacción se incubó en un termociclador (Minicycler, MJ Research, EE.UU.), de acuerdo con el siguiente esquema: un primer ciclo de 1 hora a 42 °C, posteriormente 5 minutos a 95 °C y 5 minutos a 4 °C.

40 Ejemplo 10: Reacción de la Polimerasa en Cadena.

Se llevó a cabo la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) para las citocinas: TNFα e IL-10 y el gen constituyente que codifica para la enzima GAP-DH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, abreviada GAP-DH).

45 Para cada reacción se utilizó 10 pmol de cada cebador, 5 µl de molde de ADN, 0,25 µl de ADN Polimerasa Termoestable (Taq Pol-) (Perkin - Elmer, EE.UU.) en el tampón recomendado por los proveedores (KCl 50mM, Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, Triton X-100 al 0,1% y MgCl₂ 1,5 mM) en un volumen final de 25 µl.

50 La reacción de GAP-DH se incubó en un termociclador (Minicycler, MJ Research, EE.UU.) de acuerdo con el siguiente programa: un primer ciclo de 3 minutos a 94 °C (temperatura de desnaturalización), 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C (temperatura de hibridación) y 1 minuto a 72 °C (temperatura de elongación), posteriormente 35 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C y 1 minuto a 72 °C en cada uno. Por último, un paso de extensión de 3 minutos a 72 °C.

Para las citocinas, se continuó el esquema anterior, variando sólo la temperatura de hibridación. Para la IL-10, 54 °C y para el TNF α 64 °C.

Ejemplo 11: Análisis de los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa.

5 El resultado de la PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa. Las imágenes de la ejecución electroforética fueron capturadas y analizadas con Molecular Program Analyst (BioRad). Los resultados se expresaron como niveles relativos de ARNm para cada citocina.

Ejemplo 12: Análisis estadístico de los niveles relativos de ARNm para cada una de las citocinas.

10 Para determinar las diferencias en el patrón de citocinas (de acuerdo con los niveles relativos de ARNm para cada una) entre grupos de animales tratados, se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y de Student-Newman-Keuls. (Paquete estadístico Sigma Stat v 2 1997, GraphPad Software, Inc).

Los análisis estadísticos demostraron que en el día 15 después de la inducción de la enfermedad, los péptidos disminuyen significativamente los niveles de TNF α en comparación con el grupo de control de la enfermedad.

15 Estos resultados se muestran en la Figura 2, en la que GI corresponde a los animales tratados con péptido F19-6, GII representa el grupo de ratas tratadas con el péptido F19-7, GIII representa el grupo enfermo no tratado y GIV incluye los animales sanos. Se comprobó claramente que el tratamiento con péptidos causó una disminución en los niveles relativos de esta citocina responsable en gran medida de inducir el proceso inflamatorio en los animales. Hubo diferencias estadísticamente significativas para el caso de la citocina TNF α entre los grupos tratados con los péptidos y en el grupo utilizado como control positivo de la enfermedad. No se evidenció diferencia significativa entre 20 los diferentes grupos tratados con los péptidos ni entre ellos y el grupo tomado como control negativo de la enfermedad. Este resultado indica que la administración de estos dos péptidos causó una disminución en los niveles de TNF α , prácticamente hasta niveles normales de esta citocina como en animales sanos.

Con el fin de determinar si los péptidos utilizados en este estudio podrían estimular la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10, se evaluaron los niveles relativos de ARNm correspondiente a esta citocina.

25 La IL-10 está implicada en la inducción de tolerancia periférica a través de una respuesta mediada por células T. La IL-10 regula directamente las células T para inhibir la producción de IL-2, IL-5 y TNF α .

La Figura 3 muestra la medición cuantitativa de los niveles de expresión de la IL-10 en los distintos grupos de tratamiento, en el día 15 después de la inducción de la enfermedad.

En esta figura, GI corresponde a animales tratados con el péptido F19-6, GII representa el grupo de ratas tratadas con F19-7 péptido, GIII representa el grupo de animales enfermos no tratados y GIV incluye los animales sanos.

30 El tratamiento de los animales con estos péptidos induce un incremento en los niveles de expresión relativos de la IL-10. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con ambos péptidos, pero existen diferencias entre estos grupos y los animales que constituyen controles positivos y negativos. A partir de estos resultados podemos inferir que los péptidos actúan induciendo un cambio en el fenotipo funcional de las células T que intervienen en la patogénesis de la enfermedad, aumentando los niveles de producción de citocinas anti-inflamatorias como el caso de IL-10 y disminuyendo los niveles de producción de las citocinas pro-inflamatorias como TNF α . 35

Ejemplo 13: Análisis histopatológico.

40 Con el objetivo de corroborar los signos clínicos observados en los animales de este modelo animal y analizar la capacidad de ambos péptidos para revertir o disminuir el proceso de destrucción generado por el *Mt*, se llevó a cabo el análisis patológico de las articulaciones de los animales de cada grupo.

Las láminas correspondientes a las articulaciones fueron analizadas por el grupo de Patología del CIGB.

45 Las articulaciones fueron fijadas en un tampón neutro de formalina al 10% y descalcificadas. Los tejidos se deshidrataron en un gradiente de alcohol, se absorbieron en parafina y se cortaron en secciones de 5 μ m. Posteriormente, las muestras se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con una mezcla de hematoxilina-eosina y se observaron en un microscopio óptico.

Los resultados del análisis histológico se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen del análisis histológico de las articulaciones de los animales del grupo I al grupo IV.

Grupos	# animal	Día de sacrificio	P	EC	IM	HO	G	PMN
I (F19-6)	1	15			X	X		X
	2						x/-	X
	3							
I(F19-6)	1	21					x/-	
	2						x/-	X
	3				X	X	x/-	X
I (F19-6)	1	28			X	X		
	2		X	x/-	X	X	x/-	X
	3							
I (F19-6)	1	35	X	x/-	X	X	X	X
	2		X		X		x/-	
	3		X	X	X	X	X	X
II (F19-7)	16	15						
	17							
	18							
II (F19-7)	16	21			X	X	x/-	X
	17				X	X	x/-	X
	18				X	X	x/-	X
II (F19-7)	16	28	X	X	X	X	x/-	X
	17		X	X	X	X	x/-	X
	18							
II (F19-7)	16	35						
	17		X	X	X	X	x/-	X
	18							
III	46	15	X	X	X	X	X	
	47		X	X			X	
	48		X	X	X	X	X	
III	46	21	X	X	X	X	X	
	47		X	X	X	X	X	
	48		X	X	X	X	X	X
III	46	28	X	X	X	X	X	X
	47				X	X	X	X
	48		X	X	X	X	X	X

Grupos	# animal	Día de sacrificio	P	EC	IM	HO	G	PMN
III	46	35	X	X	X	X	X	
	47			X	X	X	X	
	48		X	X	X	X	X	

En la Tabla 3 **P**: representa el pannus; **EC**: erosión del cartílago; **IM**: invasión de la médula ósea; **HO**: hiperplasia de los osteoclastos, **G**: reacción granulomatosa; **PMN**: polimorfonucleares.

- 5 En los animales del grupo III incluyendo los sacrificados en el día 15, fue evidente la presencia del pannus que causa la erosión del cartílago y la invasión de la médula ósea. Además, se observa la reacción granulomatosa típica de la inducción con *Mt* y con frecuencia la hiperplasia de los osteoclastos que son células gigantes que tienen un gran poder destructivo de la sustancia ósea. Estos resultados histológicos reproducen los signos característicos de las modificaciones en la articulación que se producen en los pacientes con RA y demuestran que hemos desarrollado un modelo animal adecuado para evaluar a los candidatos farmacológicos.
- 10 La Figura 4A corresponde a la articulación de un animal del grupo III. Podemos observar la presencia de los pannus que invaden la totalidad del espacio intra-articular, extendiéndose hacia el cartílago en el que se evidencia su erosión, así como la invasión hacia la médula ósea. La Figura 4B muestra una ampliación de la región correspondiente a la médula ósea en la que se observa claramente el pannus como un tejido de granulación rico en células fagocíticas.
- 15 En el tratamiento con el péptido F19-7 por vía intradérmica (grupo II) como se muestra en la Figura 5, los animales sacrificados en el día 15 no presentaron alteraciones histológicas, sólo la presencia de polimorfonucleares y abundantes tejidos de cicatrización; en contraste con el resto de los animales del grupo III, que se caracterizaron por presentar signos histológicos graves.
- 20 Como se muestra en la Tabla 3, los grupos de animales tratados con los péptidos F19-6 y 7-F19-7 no mostraron prácticamente afectaciones histológicas durante el curso del primer ensayo. Se evidenció una mayor protección contra el desarrollo de la Artritis en los animales tratados con péptido F19-7. La mitad de las ratas que participan en este grupo de tratamiento (6 ratas) no presentó ningún signo histológicos, en correspondencia con el grupo de animales tratados con F19-6, en el que sólo dos ratas no presentaron daño histopatológico. En los grupos tratados con los péptidos F19-6 y F19-7 no se observó la presencia de pannus en los días 15 y 21 después de la inducción de la Artritis, lo que indica que la administración de estos péptidos causado un retraso en la aparición de los eventos celulares característicos de la reacción inflamatoria durante el desarrollo de la Artritis. Es significativo que en los animales tratados con péptido F19-7 que fueron sacrificados a los 35 días después de la inducción de la Artritis, sólo una rata evidenció las afectaciones histológicas características del desarrollo de la enfermedad. Estos resultados indican que el tratamiento de los animales con este péptido indujo, además de un retardo en la manifestación clínica de la enfermedad, prácticamente una remisión total de los signos histopatológicos de la Artritis, mostrando una superioridad terapéutica del F19-7 APL con respecto al péptido que contiene el epitopo original F19-6.
- 30

Ejemplo 14. Evaluación *in vitro* del patrón de citocinas inducido por los péptidos F19-6 y F19-7, utilizando células mononucleares de ratas en las que se indujo Artritis con colágeno tipo II.

- 35 En este ensayo se usaron ratas enfermas en las que la Artritis fue inducida utilizando colágeno tipo II bovino en IFA. El bazo de cada rata analizada fue extraído y se aislaron las células mononucleares.

Las células mononucleares aisladas del bazo se cultivaron en 1,5 ml de RPMI 1640 en placas de 24 pocillos (Costar, EE.UU.). El ensayo se llevó a cabo por triplicado, y se cultivaron un total de 3×10^6 células/pocillo durante 24 horas con péptidos F19-6 y F19-7 a una concentración de 5mg/ml y se incubaron a 37°C, en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. Las células cultivadas sin los péptidos se usaron como control negativo.

- 40 Más tarde, se aisló el ARNm y se llevaron a cabo las reacciones de transcripción inversa del ácido nucleico y PCR de la misma manera como se describe en los ejemplos anteriores. Se realizaron los análisis de los productos de reacción por electroforesis en geles de agarosa como se describe en el ejemplo 12. Para determinar las diferencias en el patrón de citocinas de acuerdo con los niveles relativos de ARNm para cada muestra, se utilizaron pruebas estadísticas como se describe en el ejemplo 13.
- 45 En la Figura 6 se muestran los niveles de TNF α de las células cultivadas sin péptido y estimuladas *in vitro* con péptidos F19-6 y F19-7 correspondientes al día 21 después de la inducción de la enfermedad. La letra A representa los niveles de TNF α en las células cultivadas sin péptido, la letra B representa los valores de esta citocina cuando las células son estimuladas con el péptido F19-6 y la letra C corresponde a los niveles de TNF α cuando las células son estimuladas con el péptido F19-7. En esta figura CII representa el grupo de animales en los que se indujo la Artritis con colágeno tipo II y Control representa el grupo de animales sanos.
- 50

La Figura 7 muestra los niveles de IL-10 de células cultivadas sin péptido y estimuladas *in vitro* con péptidos F19-6 y F19-7, correspondientes al día 21 después de la inducción de la enfermedad, la letra A representa los niveles de IL-10 en las células cultivadas sin péptido, la letra B representa los valores de esta citocina cuando las células son estimuladas con el péptido F19-6 y la letra C corresponde a los niveles de IL-10 cuando las células son estimuladas con péptido F19-7. En esta figura, CII representa el grupo de animales en los que la RA se indujo con colágeno tipo II y Control representa el grupo de animales sanos.

Como se observa en estas dos figuras, los péptidos F19-6 y F19-7 disminuyen los niveles de TNF α *in vitro*, pero en el caso de los niveles de IL-10, sólo el péptido F19-7 se incrementa significativamente.

Estos resultados indican que el péptido F19-7 es capaz de modular el patrón de citocinas para un fenotipo de regulación en el modelo animal en el que la Artritis se induce con colágeno. Por lo tanto podemos afirmar que la acción inmunomoduladora de este péptido derivado de la *hHsp60 in vitro* puede extender a modelos animales de Artritis en los que el agente de inducción que participa en el desarrollo de la enfermedad no es *Mt* o autoantígenos relacionados.

Estos resultados sugieren que el péptido F19-7 puede inducir tolerancia para antígenos relacionados estructuralmente, siendo capaz de mediar en la supresión activa *in vivo* activo en el sitio de la inflamación.

Con estos resultados podemos sugerir que el péptido F19-7 induce una protección contra la Artritis inducida por *Mt* o colágeno tipo II en los animales, que es mediada por células T reguladoras que producen IL-10. Este efecto podría extenderse a otros autoantígenos presentes en las articulaciones que progresivamente contribuyen al proceso inmunopatogénico que tiene lugar en el curso de la RA.

Ejemplo 15: Medición de citocinas en pacientes con RA inducida por péptidos F19-6 y F19-7.

Utilizando sangre de pacientes con RA se llevaron a cabo ensayos de medición de citocinas: TNF α , IFN γ e IL-10. La potencialidad de los péptidos de la *hHsp60* para aumentar o disminuir las diferentes citocinas que intervienen en la patogénesis de la enfermedad fue evaluada en este ensayo.

A partir de 10 ml de sangre de cada paciente que se diluyó a la mitad en PBS 1X, se añadió 5 ml de esta dilución a 3 ml de Ficoll-Paque (Amershan) en tubos de centrifugación de 15 ml, que se centrifugaron durante 30 min a 1200 rpm. Se extrajo el anillo correspondiente a las células mononucleares. Más tarde, las células se lavaron dos veces con 15 ml de PBS 1X y después de cada lavado, se centrifugaron a 900 rpm. Por último, el pellet de células se resuspendió en RPMI 1640 que contenía 10% de suero fetal bovino suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml), HEPES 25 mM/l y L-glutamina 2 mM (todos adquiridos desde Gibco BRL). Las células mononucleares obtenidas se sembraron en número de 10^6 células/pocillo en placas de 24 pocillos (Costar) en un volumen de 800 μ l. Posteriormente, los péptidos de la *hHsp60* se añadieron a un intervalo de concentración de 0,5 μ g/ml hasta 100 μ g/ml, con el fin de conocer la concentración óptima de cada péptido para modular los niveles de citocinas. Se usó fitohemaglutinina (PHA) 1% como control positivo de la estimulación celular, mientras que se usó RPMI 1640 solo como control del crecimiento de células basales.

Las células fueron cultivadas durante 24 horas y más tarde se tomó el sobrenadante de cada pocillo, se diluyó a la mitad y se determinó la concentración de citocinas mediante los equipos específicos (Quantikine®, R&D Systems) de acuerdo con las recomendaciones de los proveedores.

Los niveles de TNF α modulado por péptidos F19-6 y F19-7 en células mononucleares de pacientes con RA están representados en la Figura 8. En esta figura, la letra A representa células cultivadas *in vitro* sin péptidos, mientras que B corresponde a células estimuladas *in vitro* con péptido F19-6 y C representa células estimuladas *in vitro* con péptido F19-7. En la figura, cuando existe una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de citocinas secretadas por células estimuladas con péptidos con respecto a las células no estimuladas, se asigna una letra diferente en barras para los niveles de la citocina correspondiente.

En los pacientes representados como P19 y P21, los niveles de TNF α disminuyeron significativamente por los péptidos F19-6 y F19-7 en comparación con las células no estimuladas como se observa en la Figura 8, aunque en el paciente P19 la disminución en los niveles de esta citocina es más significativa que con el péptido F19-7.

En el paciente representado como P13, los niveles de TNF α fueron aumentados por el péptido F19-6, sin embargo, los niveles de esta citocina disminuyeron significativamente, cuando las células mononucleares de este paciente son estimuladas con el péptido F19-7. Estos resultados evidencian que el péptido F19-7, a pesar de que fue diseñado para ser presentado por el MHC de rata, puede disminuir los niveles de esta citocina, que es en gran parte responsable del proceso inflamatorio característico de la RA, por lo que este péptido es un candidato terapéutico potencial para el tratamiento de esta enfermedad.

Ejemplo 16: Medición de citocinas en pacientes con RA inducida por péptidos E18-12 y E18-3.

Se llevaron a cabo ensayos para la medición de citocinas usando sangre de pacientes con RA: TNF α , IFN γ e IL-10. La potencialidad de los péptidos de la *hHsp60* para aumentar o disminuir las diferentes citocinas que intervienen en la patogénesis de la enfermedad fue evaluada en estos ensayos.

- 5 Se extrajeron 10 ml de sangre de cada paciente, que se diluyeron a la mitad en PBS 1X. Se añadieron 5 ml de esta dilución a 3 ml de Ficoll-Paque (Amershan) en tubos de centrifugación de 15 ml, y se centrifugó durante 30 min a 1200 rpm. Se extrajo el anillo correspondiente a las células mononucleares. Más tarde, las células se lavaron dos veces con 15 ml de PBS 1X y después de cada lavado se centrifugaron a 900 rpm. Finalmente, el precipitado se resuspendió en medio RPMI 1640 que contenía 10% de suero fetal bovino suplementado con penicilina (100 U/ml),
- 10 estreptomycin (100 ig/ml), HEPES 25 mM/L y L-glutamina 2 mM (todos adquiridos de Gibco BRL) . Las células mononucleares obtenidas se sembraron en un número de 10⁶ células/pocillo en placas de 24 pocillos (Costar) en un volumen de 800 μ l. Posteriormente, los péptidos de la *hHsp60* se añadieron en un intervalo de concentración de 0,5 μ g/ml hasta 100 μ g/ml, a fin de conocer la concentración óptima de cada péptido para modular los niveles de citocinas. Se usó fitohemaglutinina (PHA) al 1% como control positivo de la estimulación celular, mientras que se usó medio RPMI 1640 solo como control del crecimiento de células basales.
- 15

Las células fueron cultivadas durante 24 horas y posteriormente se tomó el sobrenadante de cada pocillo, se diluyó a la mitad, y se determinó la concentración de citocinas mediante los equipos específicos (Quantikine®, R&D Systems) de acuerdo con las recomendaciones de los proveedores.

- 20 Los niveles de TNF α modulado por los péptidos E18-3 y E18-12 en células mononucleares de pacientes con RA están representados en la Figura 9. Los pacientes representados por P4, P5 y P16 expresan la molécula DR 0306, los pacientes identificados como P7, P8 y P12 expresan la molécula DR 0303, mientras que el paciente P9 presenta un genotipo DR0506 y el paciente P10 tiene un genotipo DR 0204.

- 25 En la figura cuando existe diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de las citocinas secretadas por las células estimuladas con los péptidos con respecto a las células no estimuladas, se asigna una letra diferente en las barras para los niveles de la citocina correspondiente.

Como se observa en la Figura 9, la inducción de la síntesis de TNF α en células mononucleares de pacientes, estimuladas con péptidos E18-12 y E18-3 depende de las moléculas de HLA tipo II que estos pacientes expresan. En los pacientes P4, P5 y P6 que presentan un genotipo DR 0306, se observó un incremento estadísticamente significativo de la concentración de TNF α , en comparación con las células no estimuladas con péptidos.

- 30 Este mismo efecto se produce en el paciente P9 de genotipo DR 0506 y el paciente P10 DR 0204.

En los pacientes P7, P8 y P12 que presentan un genotipo DR 0303, no se observó ninguna diferencia en los niveles de TNF α cuando las células mononucleares se estimularon con nuestros péptidos.

La modulación de los niveles de IL-10 por péptidos E18-3 y E18-12 es representada en la Figura 10.

- 35 En el caso de IL-10, como se observa en la Figura 10, hay una disminución significativa de esta citocina en los pacientes P9 y P10, pero en el resto de los pacientes no hubo cambios significativos.

A partir de estas observaciones podemos inferir que los péptidos E18-12 y E18-3 inducen un fenotipo TH1 en células mononucleares periféricas.

Una variante terapéutica de los péptidos originales: E18-12 o E18-3-podría ser su administración por vía oral, por lo que inducirán mecanismos de tolerancia que contribuyen significativamente a disminuir la inflamación.

- 40 **Ejemplo 17: Medición de citocinas en pacientes con RA inducida por péptidos derivados tipo APL.**

A partir de los resultados anteriores, decidimos modificar estos péptidos originales correspondientes a epitopos de células T, en los sitios de contacto con la molécula HLA, usando herramientas Bioinformáticas, de modo que los péptidos modificados tipo APL serían capaces de cambiar el patrón de citocinas a un fenotipo de regulación. Además, las modificaciones realizadas en cada uno de estos péptidos cumplen con motivos de unión a péptidos

45 informados para la mayoría de las moléculas de HLA expresadas por los pacientes que teóricamente favorecerán la interacción de cada uno de ellos con diferentes moléculas de HLA.

- 50 Los ensayos para la medición de las citocinas: TNF α -alfa y IL-10, se llevaron a cabo utilizando sangre de pacientes con RA. La potencialidad de los péptidos derivados tipo APL de la *hHsp60* para aumentar o disminuir las diferentes citocinas que intervienen en la patogénesis de la enfermedad se evaluaron en estas pruebas. Además, los péptidos originales se incluyeron en esta evaluación (E18-3, E18-12) como controles experimentales. Los péptidos APL evaluados en estos ensayos fueron los siguientes:

MGPKGRTVILQSWGSPKVTk (SEQ. ID. NO: 5)
MGPKGRTVIMQSWGSPKVTk (SEQ. ID. NO: 6)

MGPKGRTVIIA QSWGSPKVT K (SEQ. ID. NO: 7)
 MGPKGRTVII EQSLGSPKVT K (SEQ. ID. NO: 8)
 MGPKGRTVII EQSMGSPKVT K (SEQ. ID. NO: 9)
 MGPKGRTVII LQSLGSPKVT K (SEQ. ID. NO: 10)
 MGPKGRTVII LQSMGSPKVT K (SEQ. ID. NO: 11)
 MGPKLRTVII EQSWGSPKVT K (SEQ. ID. NO: 12)
 MGPKLRTVII LQSMGSPKVT K (SEQ. ID. NO: 13)
 SIDLKDKLKNIGAKLVQDVANNTNEEA (SEQ. ID. NO: 14)
 SIDLKDKYKNIGAKLSQDVANNTNEEA (SEQ. ID. NO: 15)
 SIDLKDKLKNIGAKLSQDVANNTNEEA (SEQ. ID. NO: 16)
 SIDLKDKYKNAGAKLVQDVANNTNEEA (SEQ. ID. NO: 17)
 SIDLKDKYKNIGAKLVQLVANNTNEEA (SEQ. ID. NO: 18)
 SIDLKDKYKNIGAKLVQAVANNTNEEA (SEQ. ID. NO: 19)
 SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNANEEA (SEQ. ID. NO: 20)
 SIDLKDKYKNIGAKLVQLVANNANEEA (SEQ. ID. NO: 21)

Se extrajeron 10 ml de sangre de cada paciente y se diluyeron a la mitad en PBS 1X. Se añadieron 5 ml de esta dilución a 3 ml de Ficoll-Paque (Amersham) en tubos de centrifugación de 15 ml, y se centrifugó durante 30 min a 1200 rpm. Se extrajo el anillo correspondiente a las células mononucleares. Más tarde, las células se lavaron dos veces con 15 ml de PBS 1X y después de cada lavado se centrifugaron a 900 rpm. Finalmente, el precipitado se resuspendió en medio RPMI 1640 que contenía 10% de suero fetal bovino suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml), HEPES 25 mM/l y L-glutamina 2 mM (todos adquiridos de Gibco BRL).

Las células mononucleares obtenidas fueron cultivadas en número de 106 células/pocillo en placas de 24 pocillos (Costar) en un volumen de 800 µl. Las células fueron estimuladas con péptidos [E18-3, E18-12, E18-3APL1 (SEQ ID NO: 18), E18-3APL2 (SEQ ID NO 16: 21), E18-12APL1 (SEQ ID NO: 5), E18-12APL3 (SEQ. ID NO: 12)] a una concentración de 40 µg/ml y por triplicado. Se utilizó RPMI 1640 como control del crecimiento celular basal.

Las células fueron cultivadas durante 24 horas y más tarde se tomaron los sobrenadantes de cada pocillo, se diluyeron a la mitad, se determinó la concentración de citocinas mediante equipos específicos (Quantikine®, R&D Systems) de acuerdo con las recomendaciones de los proveedores.

En la Figura 11 se muestran los niveles de IL-10 inducida por péptidos originales (E18-12 y E18-3) y un panel de péptido de APLs: E18-3APL1 (SEQ.ID. NO: 18); E18-3APL2 (SEQ ID NO: 21); E18-12APL1 (SEQ ID NO: 5); E18-12APL3 (SEQ ID NO: 12.). En esta figura, las letras indican diferencias estadísticamente significativas (nos referimos sólo a significación estadística entre los diferentes péptidos y las células de control de cada paciente de forma individual). Además, las células de los pacientes P4 y P6 no fueron estimuladas con los péptidos E18-3APL2 ni E18-12APL3. Es evidente que, en todos los pacientes, el péptido E18-3APL1 aumenta los niveles de IL-10 muy significativamente con respecto a las células no estimuladas. El aumento inducido por este péptido en algunos de los pacientes, como P2 y P4, fue aproximadamente 9 veces mayor que la cantidad producida por las células sin estimulación, y en pacientes como P1, P3 y P5 aproximadamente 5 veces superior. Además, se obtuvieron resultados similares con E18-12APL1 debido a un aumento significativo en los niveles de IL-10 en los pacientes P1, P4 y P6. Por otro lado, ni los péptidos originales ni los péptidos E18-3APL2 y E18-12APL3 indujeron un aumento en los niveles de IL-10 en comparación con las células que representan el control negativo.

En la figura 12 se muestran los niveles de TNFα inducido por péptidos diferentes en el mismo grupo de pacientes. En esta figura, las letras indican diferencias estadísticamente significativas (nos referimos sólo a significación estadística entre diferentes péptidos y las células de control de cada paciente de forma individual). Además, las células de los pacientes P4 y P6 no fueron estimuladas por los péptidos E18-3APL2 ni E18-12APL3). Como puede apreciarse, todos los pacientes no responden con la misma intensidad a los estímulos con péptidos diferentes, aunque es notorio que la respuesta fue bastante homogénea. Por otro lado, el péptido que incrementó más la producción de TNFα fue el E18-12APL1, principalmente en los pacientes P4 y P5, mientras que los pacientes: P1, P2 y P3 mostraron un ligero aumento con respecto al control negativo. Además, el péptido E18-3APL1 tuvo un comportamiento similar en la mayoría de los pacientes. En el caso del péptido E18-3APL1 las células de los pacientes P2, P4 y P5, mostraron el mayor aumento de los niveles de TNFα, aunque fue menos marcado. En esta prueba, se obtuvieron resultados similares a las evaluaciones anteriores con los péptidos originales. Los resultados anteriores indican que ni el péptido ni su APL inducen una disminución de la expresión de TNFα en células mononucleares de los pacientes.

Estos resultados podrían ser contradictorios, ya que estos APLs que aumentan la producción de IL-10 promueven un aumento en los niveles de TNFα. En la figura 13 se muestra la relación de los niveles de IL-10 y TNFα inducidos por péptidos originales y sus APLs. En esta figura, las letras indican diferencias estadísticamente significativas (nos referimos sólo a significación estadística entre los diferentes péptidos y las células de control de cada paciente de forma individual). Además, las células de los pacientes P4 y P6 no fueron estimuladas por los péptidos E18-3APL2 ni E18-12APL3). Es evidente el hecho de que el aumento de la IL-10 con respecto a los niveles de TNFα fue considerablemente mayor, porque las células estimuladas con el E18-3APL1 mostraron un índice superior a 1 en cuatro de seis pacientes, lo que indica que los niveles de IL-10 superaron a los de TNFα. Además, en todos los

pacientes, los niveles de IL-10 fueron considerablemente más altos en células estimuladas con péptido E18-3APL1 con respecto a las células que constituyen el control negativo, mostrando diferencias estadísticamente significativas. En el caso de la E18-12APL1 las diferencias en comparación con el control negativo no fueron tan notables. Por lo tanto, aunque E18-3APL1 aumenta los niveles de TNF α , el efecto neto predominante es el incremento en los niveles de IL-10, que se traduce en una polarización de la respuesta a favor de las citocinas inmunosupresoras.

Los resultados del estudio son extremadamente promisorios, ya que sugieren que estos dos APLs podrían ser administrados a los pacientes y podrían inducir una subpoblación de células T reguladoras secretoras de IL-10 que median una supresión activa a nivel sistémico. Otra conclusión parcial a la que podemos llegar por medio del análisis de estos resultados, es que estos APLs muestran prácticamente un comportamiento homogéneo en todos los pacientes estudiados, independientemente del genotipo que tengan. Estos resultados son extremadamente alentadores, ya que permitirían que la administración de estos APL tenga el mismo efecto en todos los pacientes, a pesar de las diferencias existentes con respecto al tipo de moléculas HLA-II que presenten.

A partir de nuestros resultados experimentales, la ventaja fundamental de la presente invención es el uso de preparaciones farmacéuticas que contienen péptidos inmunomoduladores de la proteína de estrés *Hsp60* humana, que corresponden a epitopos de células T o variantes tipo APL de estos péptidos, que pueden ser utilizados efectivamente en el tratamiento de pacientes con RA, lo que induce una respuesta inmune específica dirigida a silenciar los clones de células T autorreactivas involucradas en los mecanismos inmunopatológicos de esta enfermedad.

El tratamiento que proponemos en esta invención es razonable y puede extenderse a un gran número de pacientes y también puede utilizarse en combinación con terapias actuales para esta enfermedad.

Ejemplo 18: Evaluación del efecto terapéutico de péptidos derivados tipo APL, en un modelo animal en el que la Artritis es inducida con Mt.

Los animales fueron separados en doce grupos de ocho ratas cada uno. Se indujo la enfermedad en once grupos de animales (Grupo I-Grupo XI), diez de ellos fueron tratados con péptidos y uno permaneció como control de la inducción de la enfermedad. Los grupos de animales que fueron tratados con péptidos recibieron 50 μ g de péptido por rata en un volumen de 100 μ l de PBS, en los días 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 después de la inducción de la enfermedad con Mt.

Los animales separados en doce grupos fueron tratados de la siguiente forma:

- Grupo I: recibió péptido E18-12 (SEQ ID NO: 1.)
- Grupo II: recibió péptido correspondiente a: SEQ. ID. NO: 5
- Grupo III: recibió péptido correspondiente a: SEQ. ID. NO: 8
- Grupo IV: recibió péptido correspondiente a: SEQ. ID. NO: 12
- Grupo V: recibió péptido correspondiente a: SEQ. ID. NO: 13
- Grupo VI: recibió péptido E18-3 (SEQ ID NO: 2)
- Grupo VII: recibió péptido correspondiente a: SEQ. ID. NO: 14
- Grupo VIII: recibió péptido correspondiente a: SEQ. ID. NO: 15
- Grupo IX: recibió péptido correspondiente a: SEQ. ID. NO: 16
- Grupo X: recibió péptido correspondiente a: SEQ. ID. NO: 17
- Grupo XI: no recibió péptido (control de inducción de la enfermedad)
- Grupo XII: no se indujo la enfermedad ni se administró ningún péptido (control negativo).

Los días 21 y 35 después de la inducción, se sacrificaron varios animales de cada grupo, se extrajeron los bazo y se tomó muestra de articulaciones para el análisis histopatológico.

En los grupos de animales tratados con péptidos tipo APL, la mejoría clínica fue significativa en comparación con el grupo de animales no tratados y con los grupos tratados con E18-12 y E18-3. Estos resultados fueron corroborados por el análisis histopatológico y mediante la medición de citocinas, demostrando en todos los casos una superioridad de los péptidos derivados tipo APL sobre los péptidos originales.

En la figura 14 mostramos el gráfico de la evolución de la enfermedad en cuatro grupos de animales pertenecientes a este modelo animal. En este caso, los grupos son: grupo I (animales tratados con E18-12), grupo II (animales tratados con E18-12APL1 SEQ ID NO: 5), grupo XI (control de inducción de la enfermedad) y grupo XII (animales sanos). En este gráfico, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$) (se refiere a la significación estadística entre todos los grupos en días específicos de medición).

Es posible apreciar en este gráfico, que desde el día 12 después de la inducción de la enfermedad, los animales de los grupos I, II y XI comenzaron a mostrar los signos clínicos característicos de la RA. Muchos animales también presentaron manifestaciones extraarticulares, como nódulos en las orejas, en la cola y en las extremidades. Las manifestaciones más graves de la RA se observaron alrededor del día 20 para los tres grupos de animales enfermos. En el caso de los animales tratados con E18-12, en el día 21 no pudimos apreciar diferencias significativas con respecto al grupo de control de inducción de la enfermedad. Sin embargo, alrededor del día 35

después de la inducción de la enfermedad, los signos clínicos en animales de este grupo fueron significativamente inferiores a los del grupo XI ($p < 0,001$). Estos resultados indican que el efecto protector del péptido E18-12 se muestra alrededor del día 35. En este sentido, sería recomendable administrar este péptido en fases tempranas de la enfermedad con el fin de obtener mejores resultados en el día 21. Sin embargo, en el caso de animales del grupo II los signos clínicos de inflamación fueron evidentemente más pequeño en comparación con los grupos I y XI ($p < 0,001$), lo que indica que este péptido ejerce un potente efecto protector en los animales en los que se indujo la enfermedad.

Listado de Secuencias

- 10 <110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
 <120> PÉPTIDOS Y SUS DERIVADOS TIPO APL DE HSP60 Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS.
 <130> pepMC
 <140>
 <141>
 <160> 21
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido
 <900> 1

```

Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Glu Gln Ser Trp Gly Ser
  1             5             10             15
Pro Lys Val Thr Lys
              20
  
```

- 25 <210> 2
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido
 30 <400> 2

```

Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Val
  1             5             10             15
Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala Gly
              20             25
  
```

- 35 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido
 <400> 3

```

Ile Ile Asp Pro Thr Lys Val Val Arg Thr Ala Leu Leu Asp Ala Ala
  1             5             10             15
  
```

- 40 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido
<400> 4

Ile Ile Asp Pro Thr His Val Val Arg Thr Glu Leu Leu Asp Ala Ala
1 5 10 15

<210> 5

5 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

10 <400> 5

Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Leu Gln Ser Trp Gly Ser
1 5 10 15

Pro Lys Val Thr Lys

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 6

Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Met Gln Ser Trp Gly Ser
1 5 10 15

Pro Lys Val Thr Lys

20

20 <210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 7

Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Ala Gln Ser Trp Gly Ser
1 5 10 15

Pro Lys Val Thr Lys

20

<210> 8

<211> 21

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 8

Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Glu Gln Ser Leu Gly Ser
1 5 10 15

Pro Lys Val Thr Lys
20

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 9

Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Glu Gln Ser Met Gly Ser
1 5 10 15

Pro Lys Val Thr Lys
20

10 <210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 10

Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Leu Gln Ser Leu Gly Ser
1 5 10 15

Pro Lys Val Thr Lys
20

<210> 11

<211> 21

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 11

Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile Leu Gln Ser Met Gly Ser
1 5 10 15

Pro Lys Val Thr Lys
20

25

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 12

Met Gly Pro Lys Leu Arg Thr Val Ile Ile Glu Gln Ser Trp Gly Ser
 1 5 10 15
 Pro Lys Val Thr Lys
 20

<210> 13
 <211> 21
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido
 <400> 13

Met Gly Pro Lys Leu Arg Thr Val Ile Ile Leu Gln Ser Met Gly Ser
 1 5 10 15
 Pro Lys Val Thr Lys
 20

10 <210> 14
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido
 <400> 14

Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Leu Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Val
 1 5 10 15
 Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala
 20 25

20 <210> 15
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido
 <400> 15

Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Ser
 1 5 10 15
 Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala
 20 25

25 <210> 16
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido
 <400> 16

Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Leu Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Ser
 1 5 10 15
 Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala
 20 25

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 17

Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Gly Ala Lys Leu Val
 1 5 10 15
 Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala
 20 25

10 <210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 18

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

<210> 19

<211> 27

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 19

Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys Leu Val
 1 5 10 15
 Gln Ala Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala
 20 25

25

<210> 20

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 20

Ser	Ile	Asp	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ile	Gly	Ala	Lys	Leu	Val
1				5					10					15	
Gln	Asp	Val	Ala	Asn	Asn	Ala	Asn	Glu	Glu	Ala					
				20				25							

<210> 21

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido

<400> 21

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	Ala	Asn	Glu	Glu	Ala					
				20				25							

10

REIVINDICACIONES

1. Péptido de la proteína de choque térmico humana de 60 kDa que constituye epitopos para células T, para su uso en la inducción de mecanismos de tolerancia periférica, en particular inducción de anergia o mediada por clones de células T reguladoras en pacientes con Artritis Reumatoide en el que dicho péptido **se caracteriza por** la secuencia:

5 E18-12 MGPKGRTVIIEQSWGSPKVTk (SEQ. ID. NO: 1).

2. Un péptido, de Ligando de Péptido Alterado (APL) para su uso en mecanismos de inducción de tolerancia periférica, en particular inducción de anergia o mediada por clones de células T reguladoras en pacientes con Artritis Reumatoide en el que dicho péptido APL es derivado del péptido E18-12 (SEQ.ID. NO: 1) modificado en los sitios de contacto con las moléculas del MHC humano, en el que la secuencia de aminoácidos:

MGPKGRTVIIEQSWGSPKVTk (SEQ. ID. NO: 1)

10 **1 2 3 4 5 6 7**

está sustituido

en la posición 1 por: A,F,I,L,M, M, V,W, o Y

la posición 2 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, o Y

la posición 3 por: A,K,V,R,T,I,P,L,N,S,G,Y, o M

15 la posición 4 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, o Y

la posición 5 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V, o Y

la posición 6 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W, o Y

la posición 7 por: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V, o Y.

20 3. Péptidos de acuerdo con la reivindicación 2, que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ. ID NO. 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

4. Una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 5.. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de la Artritis Reumatoide.

6. Uso de una cantidad efectiva de péptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto humano que sufre de Artritis Reumatoide.

Figura 1

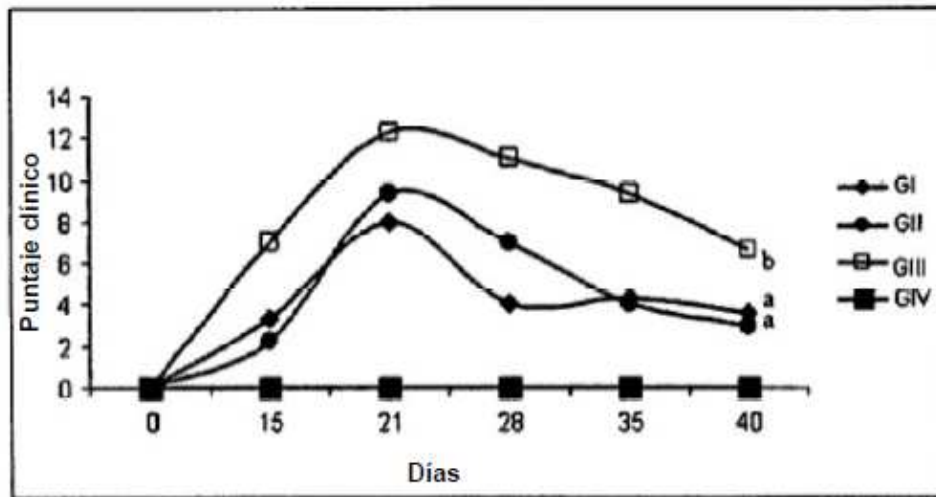


Figura 2

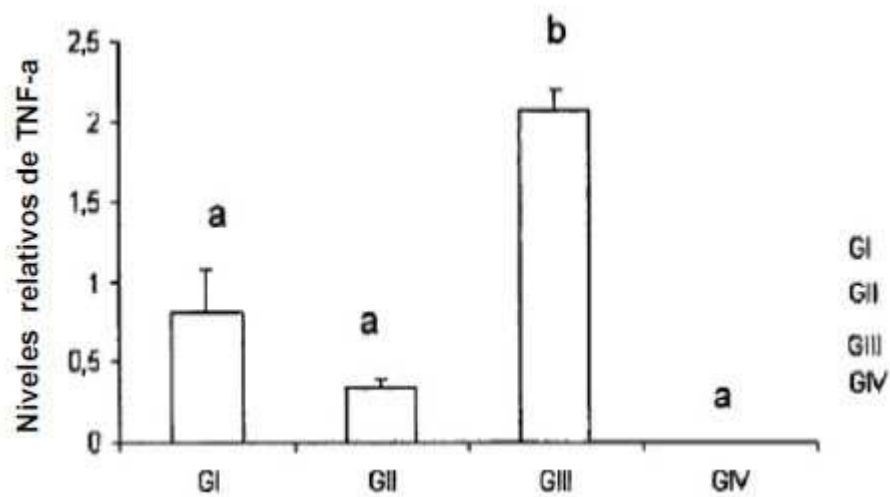


Figura 3

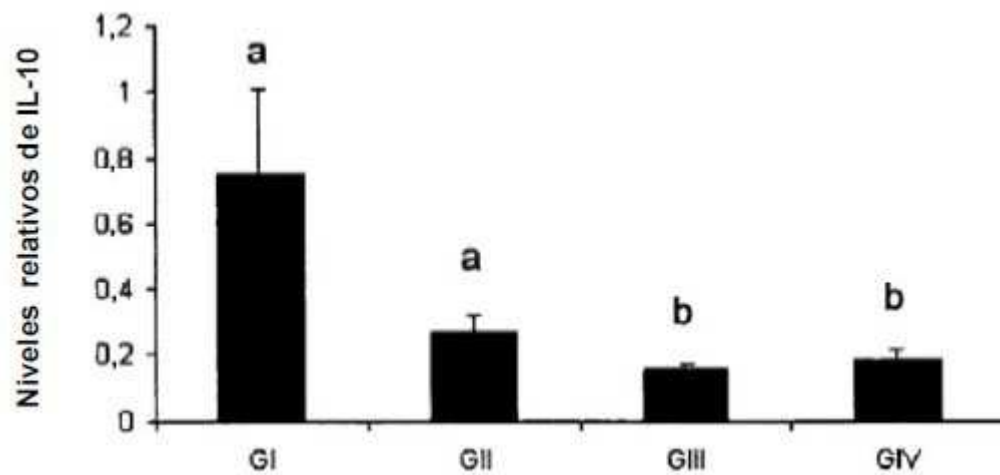


Figura 4

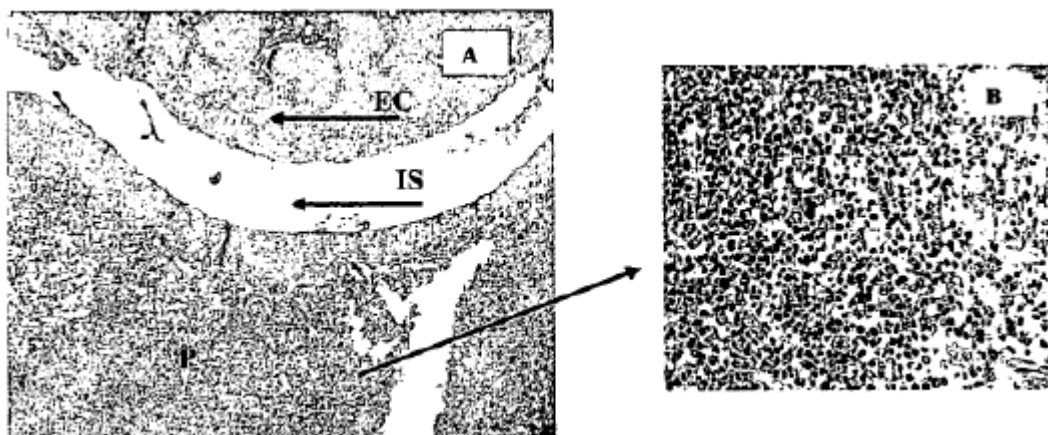


Figura 5

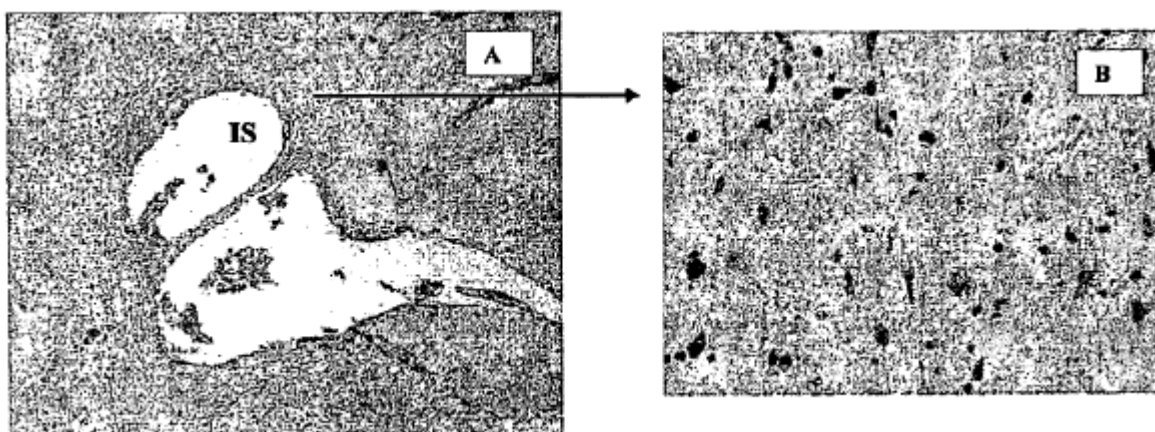


Figura 6

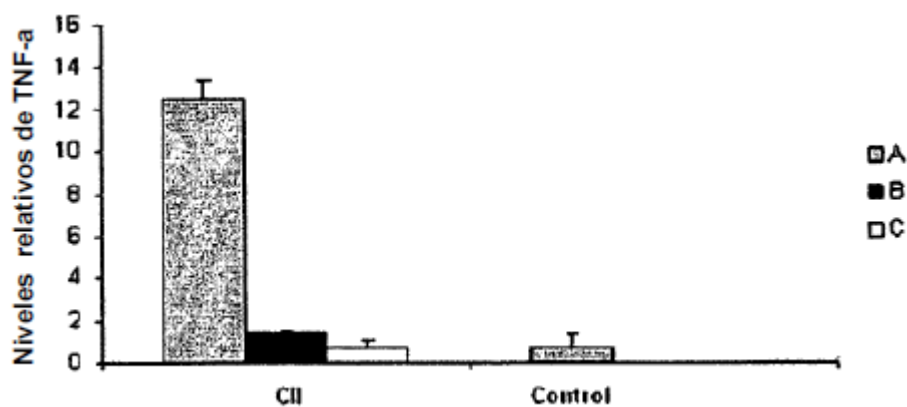


Figura 7

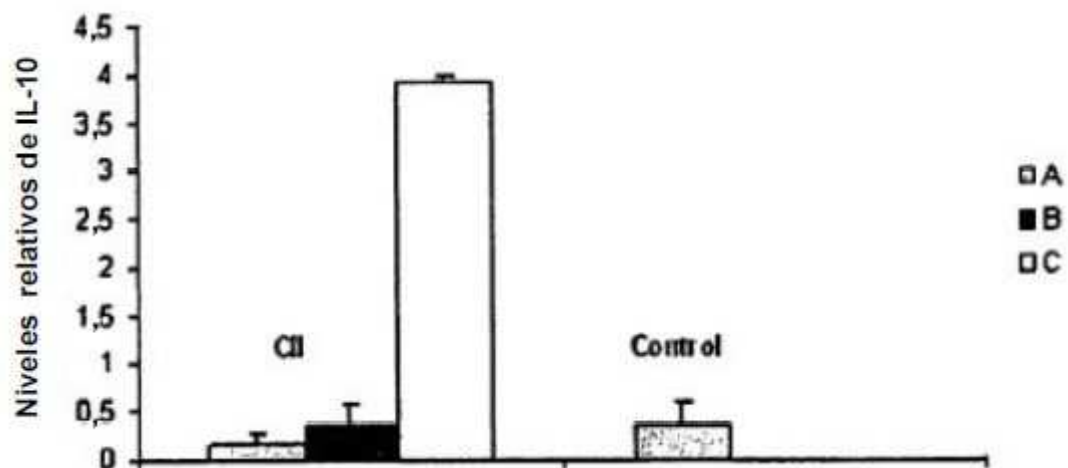


Figura 8

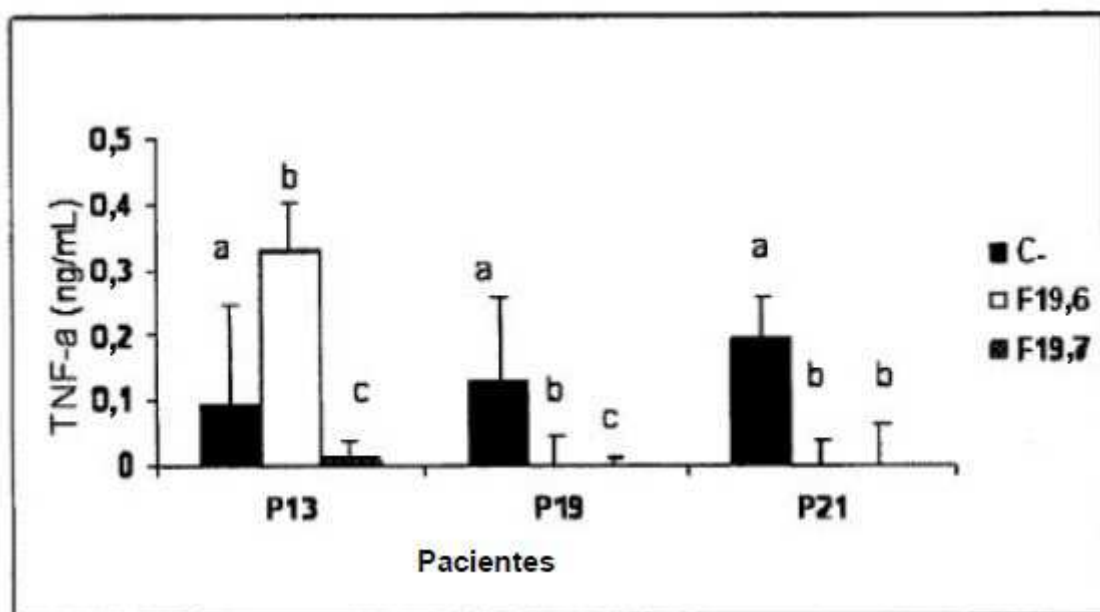


Figura 9

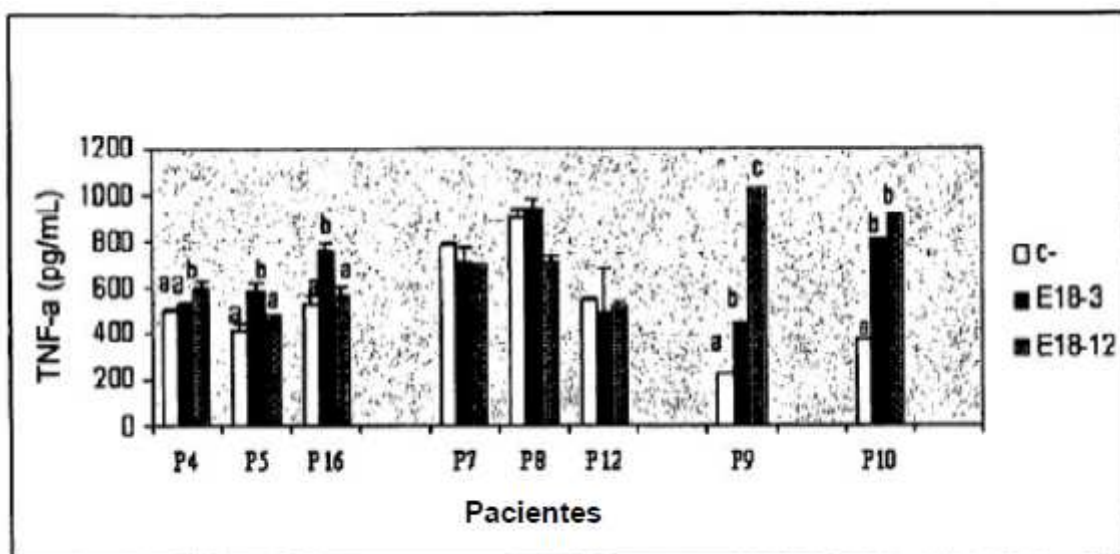


Figura 10

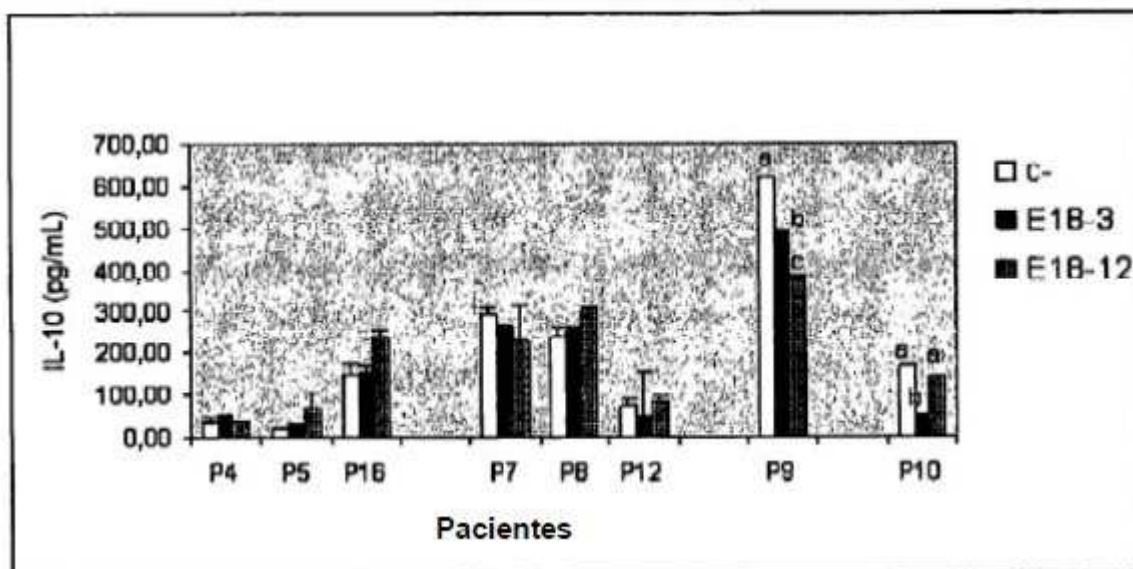


Figura 11

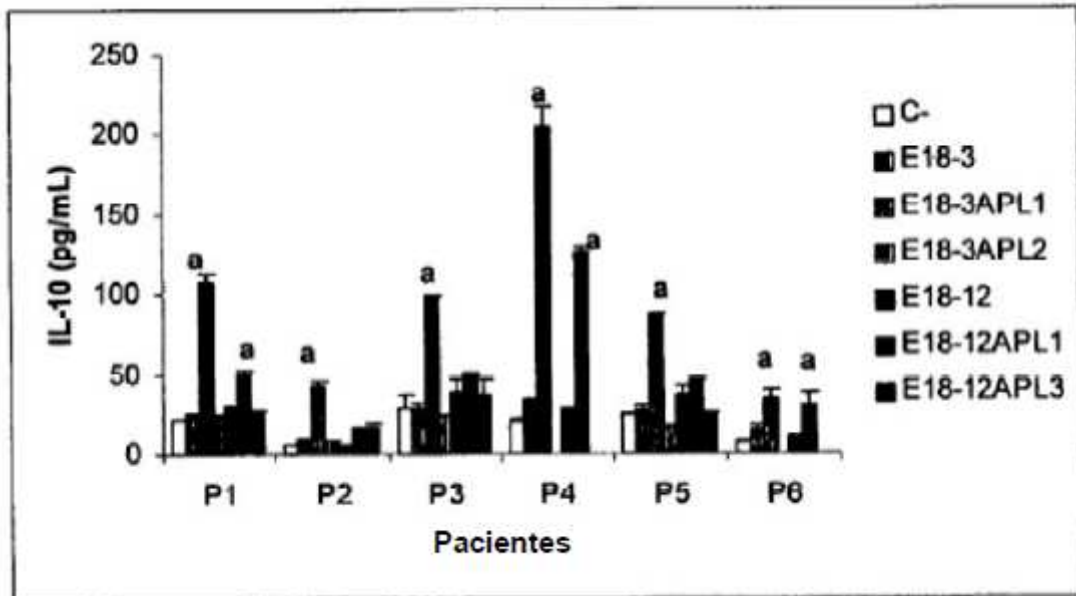


Figura 12

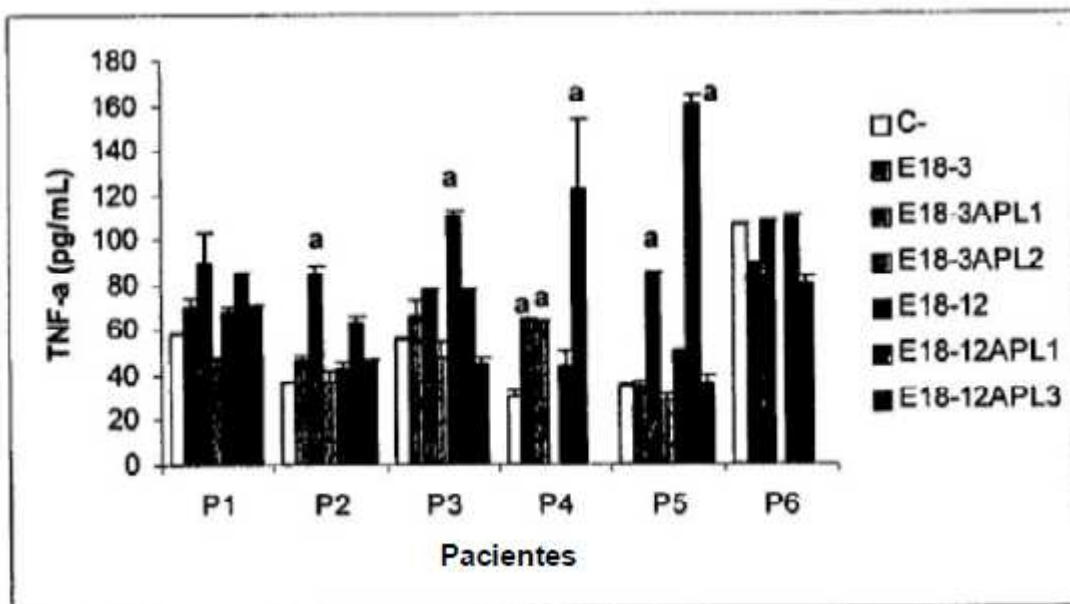


Figura 13

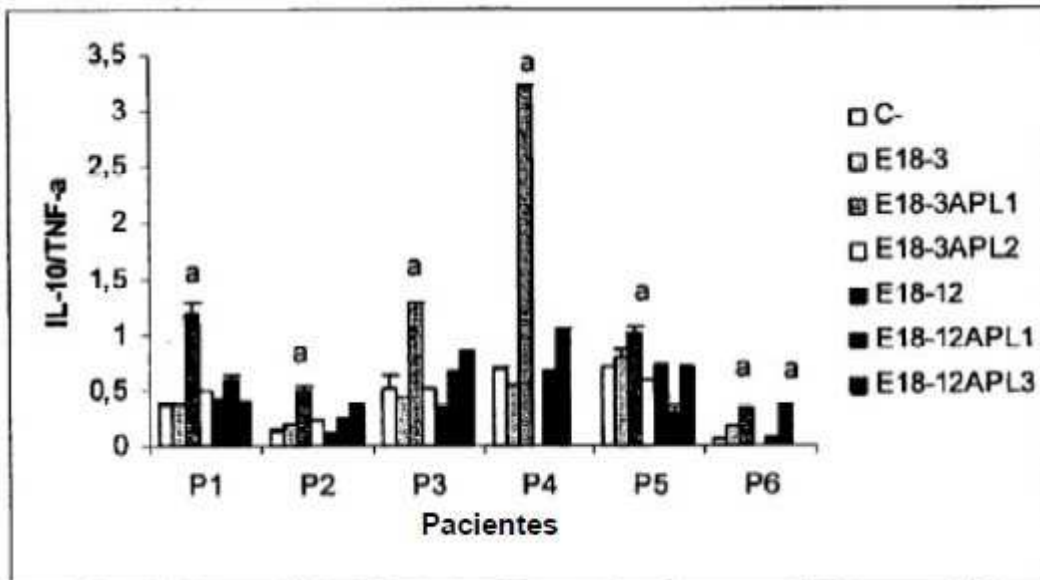


Figura 14

