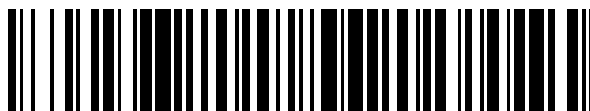


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 822**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2003 E 09005836 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2157101**

54 Título: **Péptidos hsp y análogos para la modulación de respuestas inmunes mediante células presentadoras de antígeno**

30 Prioridad:

31.01.2002 US 352594 P

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

15.01.2015

73 Titular/es:

**ANDROMEDA BIO TECH LTD. (100.0%)
BUILDING NO. 16 KIRYAT WEIZMANN
76326 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**KARMON, YORAM;
AVRON, ANN y
ELIAS, DANA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 526 822 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).

Péptidos hsp y análogos para la modulación de respuestas inmunes mediante células presentadoras de antígeno

5 Descripción

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a péptidos y análogos peptídicos de proteínas de choque térmico (hsp) capaces de interactuar directamente con células dendríticas. La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden células dendríticas expuestas a dichos péptidos y análogos, útiles para la prevención o tratamiento de trastornos inflamatorios y enfermedades o malignidades autoinmunes, infecciones virales y alergia.

15 Antecedentes de la invención

Proteínas de choque térmico

20 Las proteínas de choque térmico (hsp) son polipéptidos ubicuos producidos por todas las células de todas las especies. Se encuentran entre las proteínas mejor conservadas filogenéticamente, con respecto tanto a la secuencia como a la función. Las proteínas de choque térmico humanas y bacterianas son más del 50% homólogas (Jindal et al. Mol Cell Biol. 9: 2279, 1989). Las proteínas de choque térmico se expresan tanto como proteínas constitutivas que actúan como chaperonas moleculares (Becker J. y Craig A.E., Eur. J. Biochem. 219; 11, 1994), como en forma de proteínas de estrés inducibles.

25 Hsp60 es una chaperona mitocondrial con un papel importante en el plegamiento y desplegamiento de proteínas, así como la translocación de proteínas a la mitocondria. Hsp60 se encuentra en el citosol celular en condiciones de estrés e inflamatorias; infección o niveles elevados de citoquinas inducirán la respuesta al estrés celular. Por lo tanto, no es sorprendente que hsp60 sea una proteína altamente inmunogénica: es el "antígeno común" de bacterias gram-negativas. La reactividad inmunológica a hsp60 tanto bacteriana como autóloga es altamente prevalente en la población general, ya que la respuesta inmune dirigida a patógeno puede convertirse fácilmente en una respuesta autoinmune debido a la alta homología.

30 Están presente respuestas de células T contra múltiples epítomos de hsp60 en diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Van Eden et al. Immunology Today 19; 303, 1998), incluyendo la diabetes tipo 1 (Elias et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 3088, 1991), la artritis reumatoide y juvenil, la esclerosis múltiple, la espondilitis anquilosante, la infertilidad asociada con la inflamación pélvica, la enfermedad inflamatoria del intestino, la aterosclerosis, el rechazo de injertos y más. El sistema inmune reacciona contra epítomos de hsp60 tienen reacción cruzada entre los análogos humanos y bacterianos, o son idiosincrásicos.

40 Las enfermedades inflamatorias asociadas con la expresión de hsp60 en tejidos diana incluyen: (i) Enfermedades autoinmunes: diabetes (Birk et al. Proc Natl Acad Sci 93: 1032, 1996), esclerosis múltiple, artritis reumatoide (Van Eden et al., Nature, 331: 171, 1988), artritis crónica juvenil; (ii) Inflamación crónica: enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reactiva; (iii) Rechazo de injertos: Hsp60 puede contribuir significativamente al proceso inflamatorio que termina en el rechazo del injerto. Introduciendo antagonistas derivados de hsp60 derivado en una fase temprana después del trasplante, se podría amortiguar la inflamación y prolongar la supervivencia del injerto (Birk et al. Proc Natl Acad Sci, 96: 5159, 1999); (iv) Aterosclerosis: Hsp60 se ha implicado en la aterosclerosis, ya que se demostró que autoanticuerpos contra hsp60 humana se correlacionan con el estado clínico de los pacientes y modelos animales experimentales. Además, hsp60 puede estimular las funciones de macrófagos relevantes a la aterosclerosis, tales como la producción de TNF α , IL-6 y metaloproteinasas que degradan la matriz (Chen et al., J. Immunol. 162, 3212, 1999).

Uso de proteínas de choque térmico en terapia

55 Muchas divulgaciones reivindican usos de las proteínas de choque térmico o fragmentos de las mismas como moduladores inmunes en el diagnóstico, tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunes. La mayoría de estas divulgaciones se refieren a la proteína de choque térmico 60 también conocida anteriormente como hsp65, o fragmentos de esta proteína.

60 Por ejemplo, la proteína particular producida por el cuerpo humano durante el desarrollo de IDDM, que sirve como marcador de diagnóstico para el brote incipiente de IDDM, es la proteína de choque térmico humana que tiene un tamaño de aproximadamente 65 KD (hsp65 humana) o una antígeno con reacción cruzada con la misma como se describe en el documento EP 0417271, y en las patentes de Estados Unidos 5.114.844; 5.671.848; 5.578.303 y 5.780.034. Se ha descrito que fragmentos de esta proteína hsp60 pueden servir como entidades terapéuticamente
65 útiles en la prevención o el alivio de IDDM y la enfermedad de hospedador contra injerto (patentes de Estados Unidos 6.180.103 y 5.993.803 y documento WO 96/19236, documento WO 97/01959 y documento WO 98/08536).

Además, pueden usarse fragmentos de hsp60 como vehículos para el desarrollo de vacunas sintéticas aumentando la inmunogenicidad de antígenos poco inmunogénicos como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.736.146 y 5.869.058.

5 La patente europea N° 0262710 describe polipéptidos útiles para el alivio, tratamiento y diagnóstico de artritis autoinmune y enfermedades autoinmunes similares. Los polipéptidos reivindicados se obtienen de la proteína bacteriana llamada "antígeno A" que se identificó más tarde como hsp60 micobacteriana.

10 El documento WO 92/04049 describe péptidos de al menos siete aminoácidos homólogos a un fragmento de hsp60 de *Mycobacterium tuberculosis*, que inhiben la activación y proliferación de linfocitos T y puede proteger contra reacciones inmunes y enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

15 Los documentos WO 89/12455 y WO 94/29459, describen el uso de proteínas de estrés y análogos para producir o potenciar una respuesta inmune o para inducir tolerancia inmune, para profilaxis o terapia de enfermedades autoinmunes y para tratar o prevenir infecciones o cáncer. Se reivindica una proteína de fusión que comprende una proteína de estrés fusionada con una proteína contra la cual se desea una respuesta inmune.

20 El documento WO 95/25744 describe fragmentos de la proteína de estrés microbiana que contienen epítos homólogos a epítos de mamífero relacionados - usados para tratar y prevenir enfermedades autoinmunes inflamatorias y para prevenir el rechazo del trasplantes. Los epítos protectores se localizan en péptidos cortos que comprenden regiones de secuencias de 5-15 aminoácidos de proteínas de estrés, que están altamente conservadas entre microorganismos y animales.

25 Los documentos WO 97/11966 y WO 96/10039 describen polipéptidos de hasta 21 aminoácidos, derivados de la proteína de choque térmico microbiana que son útiles para la profilaxis o tratamiento de enfermedades autoinmunes, especialmente la artritis.

30 El documento WO 96/16083 describe un péptido de 25 aminoácidos de longitud, derivado de la proteína de choque térmico de 10 kD (hsp10) de *Mycobacterium tuberculosis* que es útil en productos farmacéuticos para el tratamiento de patologías inflamatorias, especialmente artritis reumatoide.

35 El documento WO 91/02542 describe el uso de material antigénico y/o inmuno-regulador derivado de *Mycobacterium vaccae* y, específicamente, hsp60, para el tratamiento de trastornos inflamatorios crónicos causados o acompañados por una liberación anormalmente alta de IL-6 y/o TNF α .

El documento WO 96/18646 describe péptidos de 9-20 aminoácidos derivados de hsp60 micobacteriana usados para el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunes del SNC, por ejemplo, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria crónica del SNC y tumores cerebrales primarios.

40 El documento WO 94/02509 describe péptidos de 7-30 aminoácidos derivados del epítipo DR3-restringido de hsp60 micobacteriana usados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes relacionadas con HLA-DR3.

45 El documento WO 00/27870 describe péptidos derivados de hsp60 micobacteriana y de rata y vacunas que comprenden dichos péptidos para inmunización contra enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

El documento US 5.958.416 describe péptidos de proteína de choque térmico y métodos para modular enfermedades autoinmunes del sistema nervioso central.

50 El documento WO 01/43691 describe fragmentos y antagonistas de Hsp60, capaces de reducir o prevenir la inducción de una respuesta inmune pro-inflamatoria de células del sistema inmune innato por hsp60, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Los compuestos descritos inhiben la unión de hsp60 al receptor tipo Toll, y por lo tanto reducen o previenen la inducción de una respuesta proinflamatoria consecuente.

55 Se han descrito proteínas de choque térmico adicionales, distintas de hsp60, como útiles para tratamiento. Por ejemplo, el documento 5.348.945 describe un método para reducir la mortalidad en tejido sometido a estrés con proteína de choque térmico para el tratamiento de aterosclerosis, restenosis arterial y daño anóxico a los nervios utilizando hsp70 exógena. Otras invenciones (por ejemplo, documento JP 10212230, documento JP 09241159) describen compuestos y extractos sintéticos y naturales que inhiben la expresión de proteínas que pertenecen a las familias de hsp60 o hsp27 y son, por lo tanto, útiles para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y cánceres.

60 Srivastava y sus colegas han descrito el uso de complejos no covalentes de hsp70, hsp90 o hsp96 junto con un antígeno para prevenir y tratar el cáncer y enfermedades infecciosas y para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la diabetes y la esclerosis múltiple. El documento US 6.322.790 describe composiciones y métodos para provocar una respuesta inmune usando complejos de proteína de choque térmico-péptido en combinación con inmunoterapia adoptiva, para la prevención y tratamiento de enfermedades neoplásicas y enfermedades infecciosas. En estos métodos el complejo consta de una proteína de choque térmico unida no

covalentemente a una molécula antigénica en combinación con la administración de células presentadoras de antígeno sensibilizadas con complejos de hsp unida no covalentemente a una molécula antigénica.

Proteínas Toll y hsp60

5 Recientemente se ha descubierto que hsp60 es un activador endógeno putativo de receptores de tipo Toll en mamíferos (Ohashi et al. J. Immunol. 164, 558-61, 2000), mientras que los ligandos descritos previamente para los receptores de tipo Toll en células de mamífero son de origen microbiano, que está en acuerdo con una función de estos receptores en la respuesta inmune innata. Este hallazgo sugiere que los receptores de tipo Toll no sólo
10 pueden tener una función en la defensa inmune innata contra patógenos microbianos, sino que también cumplen funciones fisiológicas mediante interacción con ligandos endógenos.

Es de destacar que tanto los receptores de tipo Toll como hsp60 se encuentran temprano en la filogenia y ambos son de estructura muy conservada. Esto sugirió que su interacción es relevante y también puede ocurrir en
15 organismos más primitivos. Hsp60 de mamíferos habitualmente está secuestrada en el interior de la célula, de acuerdo con su capacidad de funcionar como chaperona. Sin embargo, hsp60 se vuelve accesible cuando queda libre durante la necrosis de los tejidos durante la inflamación o cuando hsp60 se transloca parcialmente a la membrana plasmática en respuesta a diversos tipos de estrés. Por lo tanto se propuso que hsp60 autóloga puede servir como antígeno de señal de peligro para el sistema inmune innato (Chen et al. *ibid*).

Células del sistema inmune adaptativo

La respuesta inmune adaptativa desempeña un papel crítico en la erradicación de patógenos. Sin embargo, respuestas inadecuadas a una infección pueden causar patología grave. Las células del sistema inmune adaptativo
25 están normalmente presentes como células que circulan en la sangre y el fluido linfático, en una colección anatómicamente definida de órganos linfoides, y como células dispersas en prácticamente todos los tejidos. La capacidad del sistema inmune adaptativo para realizar óptimamente su función protectora depende de varias propiedades de sus células y tejidos constituyentes. La estructura y la función del sistema inmunológico se revisa por Abbas et al. Cellular and Molecular Immunology, cuarta edición 2000, WB Saunders Company, Philadelphia.

Células dendríticas y su papel en la inmunidad

Las células dendríticas (DC) son una familia de células presentadoras de antígeno (APC) derivadas de médula ósea con una capacidad exquisita para interactuar con células T y modular sus respuestas. Las DC patrullan la mayoría
35 de los órganos no linfoides incluyendo los epitelios (por ejemplo, la piel y la mucosa de los intestinos donde las DC se denominan células de Langerhans (LC)), la dermis y los intersticios de órganos vascularizados, tales como el corazón y los riñones. Las DC también se encuentran en la sangre y el fluido linfático y están presentes en todos los órganos linfoides. En las áreas de células T de los órganos linfoides se les llama DC de interdigitación. Las DC de tejidos no linfoides pueden migrar a órganos linfoides secundarios, a través de la sangre o del fluido linfático, llevando los antígenos a las células T vírgenes desde sitios periféricos en los cuales están excluidas las últimas células. Como norma muy general, si la DC que presenta el antígeno a la célula T virgen no está activada, la célula T será tolerogénica. Si la DC que presenta el antígeno a la célula T virgen está activada, entonces la célula T se estimulará para producir una respuesta. En otras palabras, la primera decisión crítica que regula la respuesta del sistema inmune depende de si se ha activado la célula dendrítica por qué.

45 La implicación de las proteínas de choque térmico en la modulación de las respuestas inmunes está ahora bien establecida, sin embargo, en ninguna parte de la técnica antecedente se muestra o sugiere que la exposición de las células dendríticas a proteínas hsp en solitario (en ausencia de antígeno) o a péptidos derivados de hsp aislada pueda regular directamente la respuesta inmune, y que los péptidos y análogos de proteínas de choque térmico
50 puedan actuar directamente a nivel de células dendríticas conduciendo de este modo a la discriminación entre subconjuntos Th1 y Th2 de células T.

Sumario de la invención

55 Ahora se describe que la exposición de células presentadoras de antígeno, en particular células dendríticas, a proteínas de choque térmico en sí mismas, incluso en ausencia de antígeno, o a péptidos o análogos peptídicos derivados de hsp posibilitará que estas células presentadoras de antígeno activen células T para producir citoquinas inmunomoduladoras.

60 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que ciertos epítomos peptídicos derivados de hsp60 no ejercen su efecto como hasta ahora se creía actuando a nivel de las células T auxiliares. Propiamente ahora se describe que estos epítomos evocan de forma eficaz su acción inmunomoduladora a través de las células presentadoras de antígeno.

65 Se describen ciertos compuestos y composiciones nuevas capaces de actuar directamente sobre células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno y de ese modo activar otros tipos de células del sistema inmune. Se

describen compuestos y composiciones conocidas adicionales que pueden usarse ventajosamente en combinación con células presentadoras de antígeno.

5 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un análogo peptídico de una proteína de choque térmico (Hsp), donde dicho análogo peptídico es la SEC ID N° 8.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el análogo peptídico de la SEC ID N° 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende adicionalmente células presentadoras de antígeno.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende: células presentadoras de antígeno expuestas al análogo peptídico de la SEC ID N° 8 en ausencia de un antígeno diferentes de dicho análogo peptídico, donde las células son capaces de estimular adicionalmente células T auxiliares, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente las células presentadoras de antígeno son células dendríticas. Más preferiblemente, las células dendríticas son células dendríticas autólogas.

15 La presente invención se ejemplifica a continuación en este documento para el péptido conocido p277 (Val⁶-Val¹¹), también conocido como DiaPep277, descrito en el documento US 6.180.103, aunque esto es sólo con fines ilustrativos. Ahora se describen fragmentos y análogos nuevos de dicho péptido como identificados por métodos descritos. Otras descripciones proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden dichos fragmentos y análogos nuevos de DiaPep277 junto con células presentadoras de antígeno, particularmente células dendríticas, preferiblemente células dendríticas autólogas. Descripciones adicionales proporcionan métodos para la prevención o el tratamiento de enfermedades que implican niveles anormales Th1 o Th2, tales como enfermedades autoinmunes, inflamatorias, alérgicas, infecciones virales y malignidades, usando composiciones farmacéuticas que comprenden fragmentos y análogos de p277 (Val⁶-Val¹¹).

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor en relación a los siguientes dibujos y descripción detallada:

- 30 **FIGURA 1** demuestra el efecto de p277 (Val⁶-Val¹¹) sobre el perfil de citoquinas de células T después de incubación del compuesto con células dendríticas.
- FIGURA 2** representa la ausencia de efecto de p277 (Val⁶-Val¹¹) sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos de ratón.
- 35 **FIGURA 3** muestra el efecto de LPS, zymosan o p277 (Val⁶-Val¹¹) sobre la maduración de células dendríticas derivadas de mononucleares de sangre periférica, demostrado por la expresión de CD83 y CD86.
- FIGURA 4** presenta la influencia de la estimulación directa o preincubación de las células mononucleares de sangre periférica con p277 (Val⁶-Val¹¹) sobre la secreción de IP-10, después de estimulación con LPS.
- 40 **FIGURA 5** demuestra los efectos de p277 (Val⁶-Val¹¹) y varios fragmentos y análogos del mismo, sobre la secreción de radicales libres de oxígeno a partir de una línea celular de monocitos de ratón.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que ciertos epítopos peptídicos derivados de hsp60 (SEC ID N° 1) no ejercen su efecto como hasta ahora se creía actuando únicamente a nivel de las células T auxiliares. Más bien ahora se describe que estos epítopos provocan de forma eficaz su acción inmunomoduladora a través de células presentadoras de antígeno.

50 Se describen ciertos compuestos y composiciones nuevas capaces de actuar directamente sobre células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno y de este modo activando otros tipos de células del sistema inmune. También se describen compuestos y composiciones conocidas que se pueden usar ventajosamente en combinación con células presentadoras de antígeno.

55 Se ejemplifican nuevos péptidos específicos por fragmentos de p277 (Val⁶-Val¹¹), también conocida como DiaPep277, descrita en el documento US 6.180.103. Dichos fragmentos se identificaron por los métodos de la presente invención. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden células presentadoras de antígeno expuestas a estos péptidos. También se describe el uso de la composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de enfermedades que implican niveles anormales de Th1 o Th2.

60 Se describen adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido derivado de Hsp de acuerdo con la invención. La formulación de dicho compuesto en una composición farmacéutica comprende adicionalmente la adición de un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender al menos un péptido derivado de la proteína de choque térmico o un análogo de la misma. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier vía adecuada de administración, incluyendo por vía oral, tópica, transdérmica o sistémica. Los modos preferidos de administración incluyen, aunque sin limitación, vías parenterales tales como inyecciones intravenosas e intramusculares. Vías adicionales de

administración preferidas incluyen, aunque sin limitación, administración por inhalación nasal o ingestión oral.

Los nuevos péptidos son útiles como ingredientes activos en composiciones farmacéuticas para la prevención o tratamiento de enfermedades que implican niveles anormales de respuesta Th1 o Th2 en su etiología o patología.

5 En este sentido, un objeto es proporcionar métodos para usar estos péptidos para la supresión o prevención de ciertas enfermedades y afecciones en que la estimulación de la respuesta Th2 es beneficiosa, tales como enfermedades inflamatorias crónicas, rechazo de injertos y enfermedades autoinmunes. Alternativamente, otros péptidos, que se identifican como estimuladores Th1 pueden ser útiles como ingredientes activos en composiciones farmacéuticas para la prevención o el tratamiento de cáncer, alergia y enfermedades parasitarias. También se describen métodos para el diagnóstico o control de la progresión de estas enfermedades usando péptidos.

Los análogos peptídicos y composiciones farmacéuticas que los comprenden, son útiles en métodos para el tratamiento de trastornos tales como: enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, rechazo de injertos, y enfermedades infecciosas incluyendo, aunque sin limitación, diabetes tipo I, artritis reumatoide, artritis reactiva, artritis crónica juvenil, esclerosis múltiple, miastenia grave, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, aterosclerosis, gingivitis, restenosis arterial, daño anóxico de los nervios, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, colitis ulcerosa, psoriasis, síndrome de Guillain-Barre, y enfermedades neuro-inflamatorias, así como trastornos que incluyen cáncer, alergia y enfermedades parasitarias.

20 El documento WO 01/43691 describe métodos para identificar, seleccionar y caracterizar compuestos que pueden actuar como antagonistas de hsp60 en base al hallazgo de que hsp60 se une al complejo receptor 4 de tipo Toll y como resultado provoca una potente respuesta pro-inflamatoria en células del sistema inmune innato. El sistema de selección descrito en ese documento se basa por tanto en la inhibición de la unión de hsp60 a células linfáticas, preferiblemente macrófagos, que expresan el receptor de tipo Toll. Se describe la acción de los péptidos hsp60 al nivel de células dendríticas. El efecto esperado es un efecto directo sobre las células dendríticas y no un efecto de inhibición. Las células dendríticas "educadas", posteriormente, aportan la señal a las células T.

Proteínas de choque térmico e inmunomodulación

30 Las proteínas de choque térmico tienen un papel fundamental y central en el inicio o la modulación de respuestas inmune. De acuerdo con el modelo propio/no propio de Janeway (Janeway et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 98, 7461 hasta 7468, 2001), las proteínas de choque térmico (en particular hsp60) tienen una fuerte homología con proteínas bacterianas. En la teoría de peligro (Colin C.A. y Matzinger P. Seminars in Immunology 12, 231-238, 2001) es obvio que las células "en peligro" tienen niveles aumentados de proteínas de choque térmico y que son uno de los signos obvios de sufrimiento celular.

Habiendo activado la célula dendrítica, el sistema inmune está preparado para responder a los antígenos portados de nuevo a las células T por la célula dendrítica que regresa de la periferia. La siguiente decisión es el tipo de respuesta a montar. Las células T que son CD8⁺, montan una respuesta celular citotóxica. Las células T que son CD4⁺ son responsables de la respuesta auxiliar T. Las células auxiliares T CD4⁺ pueden dividirse en subconjuntos distintos dependiendo del tipo de linfoquinas que producen. Las Th1 secretan IL-2, IFN γ y TNF α , mientras que las Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Las Th1 controlan predominantemente las respuestas inmunes mediadas por células y parecen estar implicadas en enfermedades inflamatorias crónicas, mientras que las Th2 inhiben la respuesta Th1 regulando positivamente al mismo tiempo la producción de IgE y son prominentes en la patogénesis de enfermedades alérgicas y parasitarias. Ambos tipos de células T derivan de células T vírgenes e *in vitro* el tipo de respuesta pueden estar influenciada por la adición de citoquinas a las células respondedoras. En general, las citoquinas Th1, tales como IL-2 promueven una respuesta Th1 y las citoquinas Th2, tales como IL-4 promueven una respuesta Th2. El desencadenante para el compromiso inicial al tipo de respuesta no se ha demostrado de manera definitiva. Para mover el problema un paso atrás, se ha informado de que las células dendríticas se pueden dividir en DC1 y DC2 responsables de influenciar respuestas de tipo Th1 y Th2, respectivamente. Sin embargo también se desconoce el desencadenante para el compromiso inicial de las células dendríticas.

55 El péptido denominado p277 (Val⁶-Val¹¹) es un análogo de 24 restos de longitud lineal correspondiente a los restos 436-460 de la hsp60 humana. El péptido, descrito en la patente de Estados Unidos N° 6.180.103, se identificó como una entidad terapéuticamente útil en la prevención o alivio de IDDM y rechazo de injertos. Se cree que el péptido actúa influyendo en el tipo de respuesta Th en favor del tipo Th2. Ahora se ha descubierto inesperadamente que el péptido actúa directamente a nivel de las células dendríticas. La exposición a p277 (Val⁶-Val¹¹) aumentó enormemente la respuesta IL-4 de células T estimuladas por las células dendríticas "educadas".

60 Péptidos HSP y el sistema inmune innato

Se aplicaron varios enfoques para investigar el efecto de las composiciones de la presente invención sobre el sistema innato humano.

65 a. Se ensayaron células T estimuladas con células dendríticas "educadas" expuestas a compuestos ensayados para su influencia en la respuesta IL-4.

b. Se ensayó la línea celular de macrófagos de ratón para su influencia sobre la producción de óxido nítrico después de estimulación con los compuestos de la presente invención.

c. Se ensayaron células dendríticas derivadas de sangre periférica, que se activan diferencialmente a través del receptor 2 de tipo Toll (Tlr2) o Tlr4 secreción de IP-10 y I1-8 después de estimulación con los compuestos de la presente invención. Estas células también se usaron para ensayar los efectos de las composiciones sobre la maduración de células dendríticas manifestados por expresión de CD86.

d. Se ensayaron monocitos de sangre periférica con o sin preincubación con los compuestos ensayados para su influencia sobre la cantidad de IP-10 producido en respuesta a estímulo con LPS.

e. Se ensayaron líneas celulares monocíticas humanas diferenciadas estimuladas directamente con el compuesto ensayado o preincubadas y después estimuladas con LPS, para su influencia sobre la cantidad de TNF α secretado, o IP-10.

f. Se ensayaron líneas celulares de macrófagos de ratón para su influencia sobre la producción de óxido nítrico después de estimulación con los compuestos de la presente invención.

El efecto de las composiciones de la presente invención sobre células dendríticas derivadas de sangre periférica, se ensayó de acuerdo con un protocolo descrito por Re, F. y Strominger, J.L. 2001. El receptor 2 de tipo Toll (Tlr2) y Tlr4 activan diferencialmente células dendríticas humanas. (J Biol Chem 276: 37692-9). De acuerdo con este método, se usan células dendríticas inmaduras derivadas de sangre periférica humana. El resultado después de incubar las células con moléculas ensayadas es diferente si la estimulación es a través del receptor Toll 4 o el receptor Toll 2. De acuerdo con los autores, la señalización de Toll 2 por estimulación con zymosan se asocia con un tipo de respuesta Th2 (ejemplificado por IL-8) y la señalización de Toll 4, tal como la obtenida por estimulación con LPS (ejemplificado por IP-10), con un tipo de respuesta Th1. Las composiciones descritas se ensayaron usando un sistema de ensayo similar para comprobar qué tipo de estimulación inducen. Ahora se ha descubierto que la maduración celular se aumenta después de estimulación con LPS, zymosan o p277 (Val⁶-Val¹¹). La indicación de que de las citoquinas secretadas, la estimulación con p277 (Val⁶-Val¹¹) produjera secreción de IL-8, pero no secreción de IP-10, puede sugerir que p277 (Val⁶-Val¹¹) similar a zymosan, estimula a través del receptor Toll 2. El aumento en la expresión de CD86 después de exposición de APC a Hsp o péptidos derivados de Hsp es importante ya que CD86 (B7.2) es un componente esencial de la sinapsis inmunológica formada entre células T y APC. Esta sinapsis consta de CD80 y CD86 en el lado de la APC y CD28 y CD40 en el lado de la célula T. El reconocimiento por células T del péptido sobre APC sin la expresión simultánea de CD86 da lugar a anergia en lugar de una respuesta de células T. Por lo tanto, para producir una respuesta, deben estar presentes todos los componentes.

Se ensayaron los efectos del compuesto sobre monocitos de sangre periférica. Los resultados muestran que aunque la estimulación directa con los compuestos de ensayo no dio lugar a IP-10, la preincubación con el compuesto ensayado hizo aumentar la respuesta IP-10 a la estimulación con LPS. La estimulación con Hsp60 con o sin preincubación no generó IP-10. Esto indica un efecto directo de los compuestos de ensayo sobre monocitos, que afecta a su respuesta a otro estímulo (tal como LPS).

Los efectos directos de péptidos y análogos de Hsp sobre APC se evidenciaron más en líneas celulares humanas. Células monocíticas humanas diferenciadas incubadas con análogo peptídico de hsp60 no secretaron TNF, o IP-10 directamente. Sin embargo, la preincubación con los análogos peptídicos y el posterior estímulo con LPS dieron lugar a una cantidad aumentada de IP-10 secretada en comparación con LPS solo. Estos resultados indican adicionalmente efectos directos de péptidos y análogos de Hsp sobre APC.

Terminología y definiciones:

La expresión "proteína de choque térmico" se refiere a cualquier miembro de la familia de proteínas de choque térmico también conocidas como chaperonas. La expresión "proteína de choque térmico" también se menciona como "proteína de estrés", un término que se usó en el pasado para dichas moléculas.

El término "fragmento" en el contexto de la presente invención significa preferiblemente una parte de molécula hsp que comprende al menos 5, más preferiblemente al menos 7 aminoácidos consecutivos en una secuencia como ocurre en una hsp nativa o a una parte de una molécula hsp que puede obtenerse escindiendo una proteína hsp60, por ejemplo, enzimáticamente o por otros medios. En este caso, el fragmento no tiene necesariamente que contener sólo una secuencia de aminoácidos consecutivos, sino que puede contener dos o más de estas secuencias que pueden unirse entre sí, por ejemplo, por enlaces disulfuro, por enlaces peptídicos o por cualquier otro enlace covalente.

Como se usa en este documento "péptido" indica una secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Los péptidos de acuerdo con la presente invención comprenden una secuencia de 5 a 30 restos de aminoácido, preferiblemente de 6 a 24 restos, más preferiblemente de 7 a 18 aminoácidos. Un análogo peptídico de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente al menos un enlace que es un enlace de remplazo amida tal como enlace de urea, enlace de carbamato, enlace de sulfonamida, enlace de hidrazina, o cualquier otro enlace covalente.

Siempre que se menciona "péptido de la invención" o "análogos de la invención" en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, también se contemplan sales, variantes modificadas de forma conservativa, péptidos funcionales y derivados funcionales de los mismos, siempre que se mantenga la actividad biológica del péptido.

5 "Derivados funcionales" de los péptidos de la invención, como se usa en este documento, cubre derivados que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales en los restos o los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención, siempre que se permanezcan farmacéuticamente aceptables, es decir, que no destruyan la actividad del péptido, no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen y no afecten de forma adversa a las propiedades antigénicas de los mismos.

10 Estos derivados pueden, por ejemplo, incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo producidas por reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acilo de grupos amino libres de los restos de aminoácido formados por reacción con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanilo o aroilo carbocíclico) o derivados O-acilo de grupo hidroxilo libre (por ejemplo el de restos serilo o treonilo) formados por reacción con restos acilo.

15 Como se usa en este documento, "funcional" incluye referencias a una actividad suficiente para producir un efecto deseado. Un "péptido funcional" tendrá la actividad de conseguir un resultado deseado, tal como inhibición o inducción de citoquinas. Alternativamente, un péptido funcional proporcionará a la célula un efecto beneficioso o terapéutico, tal como inducción de liberación de un mediador específico. Por tanto referencias a un péptido particular o "péptido funcional" incluye la secuencia peptídica de origen natural o un péptido que tiene sustancialmente la misma actividad que la secuencia de origen natural. Los "péptidos funcionales" de la invención también incluyen péptidos modificados (con sustituciones de aminoácidos, tanto conservativas como no conservativas) que tienen la misma actividad que un péptido de tipo silvestre o no modificado. Las "sales" de los péptidos de la invención contempladas por la invención son sales orgánicas e inorgánicas fisiológicamente aceptables.

20 El término "análogo" indica adicionalmente una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la invención, excepto por uno o más cambios de aminoácido. Los análogos de acuerdo con la presente invención pueden comprender también peptidomiméticos. "Peptidomimético" significa que un péptido de acuerdo con la invención está modificado de tal manera que incluye al menos un resto no codificado o enlace no peptídico. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, alquilación y metilación más específica de uno o más restos, inserción de o remplazo de aminoácidos naturales por aminoácidos no naturales, remplazo de un enlace amida con otro enlace covalente. Un peptidomimético de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente al menos un enlace que es un enlace de reemplazo amida tales como enlace de urea, enlace de carbamato, enlace de sulfonamida, enlace de hidrazina, o cualquier otro enlace covalente. El diseño de "análogos" apropiados puede estar asistido por ordenador.

30 Tal como se usa en este documento y en las reivindicaciones, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de péptido o análogo peptídico o composición que comprende el mismo a administrar a un hospedador para conseguir los resultados deseados para las indicaciones descritas en este documento.

35 Se usan ciertas abreviaturas en este documento para describir esta invención y la manera de hacerla y usarla. Por ejemplo, 2Abu se refiere a ácido 2-aminobutírico, Alloc se refieren a aliloxicarbonilo, APC se refiere a células presentadoras de antígeno, Boc se refiere al radical t-butiloxicarbonilo, BOP se refiere a hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-(dimetilamino)fosfonio, DC se refiere a células dendríticas, DIEA se refiere a diisopropil-etil amina, EDT se refiere a etanoditiol, ELISA se refiere a ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, FCS se refiere a suero de ternera fetal, Fmoc se refiere al radical fluorenilmetoxicarbonilo, HBTU se refiere a hexafluorofosfato de 1-hidroxibenzotriazoliltetrametil-uronio, HOBT se refiere a 1-hidroxibenzotriazol, HPLC se refiere a cromatografía líquida de alta presión, Hsp se refiere a proteína de choque térmico, IDDM se refiere a Diabetes Mellitus insulino-dependiente, IFN se refiere a interferón-gamma, IL- se refiere a interleuquina, IP-10 se refiere a proteína 10 inducible por interferón, kD se refiere a Kilo Dalton, LC se refiere a células de Langerhans, LPS se refiere a lipopolisacárido, MPS se refiere a síntesis paralela múltiple, MS se refiere a espectrometría de masas, NMM se refiere a N-metilmorfolina, NMP se refiere a 1-metil-2-pirrolidionona, PMA se refiere a miristil acetato de forbol, PyBOP se refiere a hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio, PyBrOP se refiere a hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio, y TFA se refiere a ácido trifluoroacético, Tlr refiere a receptor de tipo Toll, Tlr2 refiere a receptor 2 de tipo Toll, Tlr4 refiere a receptor 4 de tipo Toll, TNF se refiere a factor de necrosis tumoral alfa.

40 Los aminoácidos utilizados son aquellos que están disponibles en el mercado o están disponibles por métodos sintéticos rutinarios. Ciertos restos pueden requieren métodos especiales para su incorporación en el péptido, y enfoques sintéticos secuenciales, divergentes y convergentes a la secuencia del péptido son útiles en esta invención. Los aminoácidos codificados naturales y sus derivados se representan mediante códigos de tres letras de acuerdo con las convenciones de la IUPAC. Cuando no hay ninguna indicación, se usó el isómero L. Los isómeros D se indican con "D" antes de la abreviatura del resto.

Puede tener lugar sustitución conservativa de aminoácidos como conocen los especialistas en la técnica. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen el remplazo de un aminoácido con otro que tiene el mismo tipo de grupo funcional o cadena lateral por ejemplo, alifático, aromático, cargado positivamente, cargado negativamente. Estas sustituciones pueden potenciar la biodisponibilidad oral, la penetración en el sistema nervioso central, el direccionamiento a poblaciones celulares específicas y similares. Un especialista reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales a la secuencia del péptido, polipéptido o proteína que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservativa", donde la alteración provoca la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los seis siguientes grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 1) Alanina (A), serina (S), treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), Triptófano (W). (Véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

20 Sistema de selección usando células presentadoras de antígeno

El sistema de selección para ensayar péptidos a nivel de células dendríticas implica la producción y la educación de células dendríticas y la posterior utilización de estas células dendríticas educadas para la estimulación de células T. Aunque es factible usar otras fuentes incluyendo APC humanas, es más conveniente realizar la selección de péptidos candidatos u otros compuestos de ensayo usando células de ratón.

Una fuente particularmente conveniente de APC es células de médula ósea de ratones transgénicos para el TcR. Todas las células de dichos ratones (DO.11.10 Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) responden a un único péptido, péptido OVA (OVA323-329). Las células no adherentes de cultivos de estas células de médula ósea en presencia del factor de crecimiento hematopoyético GM-CSF sirven como células dendríticas inmaduras que se "educan" por la exposición a un compuesto o péptido de ensayo.

Estas células educadas después se cocultivan con células T. Se preparan células T vírgenes a partir de las células esplénicas de los ratones DO.11.10 y se cultivan con las células dendríticas educadas en presencia de diversas concentraciones del péptido OVA.

Se recogen los sobrenadantes celulares y se ensayan para el contenido de citoquinas (por ejemplo, interferón γ , IL-4, IL-10 e IL-12). Los patrones de respuesta obtenidos se usan para distinguir los péptidos activos o compuestos de ensayo. Los péptidos que inducen células Th1 se distinguen de aquellos que inducen células Th2, en base a las citoquinas producidas como se sabe en la técnica.

Alternativamente, se ensayan APC expuestas a péptidos y análogos de Hsp para su influencia directa sobre la producción de citoquinas. Por ejemplo, se usan células derivadas tipo pre-monocito (por ejemplo, la línea celular monocítica humana THP-1), que puede diferenciarse en monocitos por tratamiento con éster de forbol 100 nM (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, PMA) durante 72 horas. Durante el tratamiento con PMA, la sensibilidad celular al estímulo con LPS y hsp60 aumenta en más de 100 veces con respecto a la secreción de TNF. Las células diferenciadas se preincuban con los compuestos ensayados o se incuban después de tratamiento con PMA seguido por estímulo posterior con LPS. Se miden las cantidades secretada de citoquinas (tales como TNF, e IP-10). Otro ejemplo para la medición directa de citoquinas secretadas por APC expuestas a péptidos y análogos de Hsp implica la medición de secreción de citoquinas (por ejemplo, IP-10 e IL-8) en células mononucleares de sangre periférica humanas cultivadas primero con GM-CSF e IL-4 y luego con LPS, zymosan o péptido ensayado. Estas células también se usan para la investigación de antígenos de superficie celular (por ejemplo, CD83 y CD86) que indican su maduración.

55 Sistemas adicionales de selección

Después de la selección a nivel de células dendríticas, que identifica los compuestos con actividad potencial hacia estimulación Th2 o Th1, y después de la confirmación de la actividad del compuesto en un ensayo específico in vitro, los compuestos seleccionados se ensayan adicionalmente para la actividad antiinflamatoria y en varios modelos animales para enfermedades autoinmunes. Ejemplos para tales ensayos y modelos son: influencia en la insulinitis y la diabetes en modelos de ratón, como se describe en el documento WO 96/19236 y el documento WO 97/01959; el documento WO 96/10039 que describe la protección contra la artritis inducida por pristano, que es un modelo in vivo en ratones para artritis; el documento WO 96/16083 que describe un método in vivo para el modelo de artritis reumatoide en rata; el documento WO 96/32957 que describe la protección contra la Encefalomiélitis Alérgica Experimental (EAE), que es un modelo in-vivo (en roedores) para la esclerosis múltiple; y el documento US 5.348.945 que describe un modelo in vivo para ensayar el efecto de los compuestos sobre la aterosclerosis. Un

ejemplo detallado para ensayar los compuestos y composiciones de la presente invención en modelo animal de enfermedad de Crohn se describe en el ejemplo 10 más adelante en este documento.

Combinación con inmunoterapia adoptiva

5 Inmunoterapia adoptiva se refiere a un enfoque terapéutico para tratar el cáncer o enfermedades infecciosas en que se administran células inmunes a un hospedador con el objetivo de que las células medien directa o indirectamente inmunidad específica contra células tumorales y/o componentes antigénicos o regresión del tumor o tratamiento de enfermedades infecciosas, como pueda ser el caso. (Véase la patente de Estados Unidos N° 5.985.270). De acuerdo con los métodos descritos en este documento, se sensibilizan APC con péptidos hsp y se usan en inmunoterapia adoptiva. La APC sensibilizada con péptido hsp puede administrarse simultáneamente con péptido hsp, o antes o después de la administración de péptido hsp. Además, el modo de administración se puede variar, incluyendo, aunque sin limitación, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica o por vía mucosa.

Enfermedades autoinmunes diana

15 Las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse por los métodos descritos incluyen, aunque sin limitación, diabetes mellitus insulino-dependiente (es decir, la IDDM, o diabetes autoinmune), esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Sjogren, esclerodermia, polimiositis, hepatitis activa crónica, enfermedad mixta del tejido conectivo, psoriasis, la cirrosis biliar primaria, anemia perniciosa, tiroiditis autoinmune, enfermedad idiopática de Addison, vitiligo, enteropatía sensible al gluten, enfermedad de Graves, miastenia grave, neutropenia autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide, cirrosis, pénfigo vulgar, infertilidad autoinmune, enfermedad de Goodpasture, penfigoide bulboso, lupus discoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y enfermedad por depósitos densos. Las enfermedades expuestas anteriormente, mencionadas en este documento, incluyen las mostradas por modelos animales para estas enfermedades, tales como, por ejemplo ratones diabéticos no obesos (NOD) para IDDM y ratones con encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) para esclerosis múltiple.

20 Los métodos pueden usarse para tratar dichas enfermedades autoinmunes reduciendo o eliminando la respuesta inmune contra el propio (auto) tejido del paciente o, alternativamente, reduciendo o eliminando una respuesta autoinmune pre-existente dirigida a tejidos u órganos trasplantados para remplazar tejidos u órganos propios dañados por la respuesta autoinmune.

Enfermedades infecciosas diana

35 Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse por los métodos descritos están causadas por agentes infecciosos incluyendo, aunque sin limitación virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos.

40 Las enfermedades víricas que pueden tratarse o prevenirse por los métodos descritos incluyen, aunque sin limitación, aquellas causadas por hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-I) , herpes simple tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, virus papova, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus coxsachie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, polio virus, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), y virus de la inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II).

45 Las enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse por los métodos descritos están causadas por bacterias incluyendo, aunque sin limitación, micobacterias rickettsia, micoplasma, neisseria y legionella.

50 Las enfermedades por protozoos que pueden tratarse o prevenirse por los métodos descritos están causadas por protozoos incluyendo, aunque sin limitación, leishmania y trypanosoma.

Las enfermedades parasitarias que pueden tratarse o prevenirse por los métodos descritos están causadas por parásitos incluyendo, aunque sin limitación, clamidia y rickettsia.

Cánceres diana

55 Los cánceres que pueden tratarse o prevenirse por los métodos descritos incluyen, aunque sin limitación, sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma,

hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica); y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de la cadena pesada.

El cáncer puede ser metastásico. El paciente que tiene un cáncer puede estar inmunosuprimido por la razón de haber experimentado terapia antineoplásica (por ejemplo, radiación de quimioterapia) antes de la administración de la molécula hsp de la invención. El cáncer puede ser un tumor.

Prevención y tratamiento de enfermedades neoplásicas primarias y metastásicas

Hay muchas razones por las que se desea la inmunoterapia proporcionada por la presente descripción para su uso en pacientes con cáncer. En primer lugar, si los pacientes con cáncer están inmunosuprimidos y la cirugía, con anestesia, y la posterior quimioterapia, puede empeorar la inmunosupresión, entonces con inmunoterapia apropiada en el período preoperatorio, esta inmunosupresión puede prevenirse o revertirse. Esto podría conducir a menos complicaciones infecciosas y a una curación acelerada de heridas. En segundo lugar, la masa del tumor es mínima después de la cirugía y la inmunoterapia es más probable que sea eficaz en esta situación. Una tercera razón es la posibilidad de que las células tumorales se desprenden en la circulación durante la cirugía y la inmunoterapia eficaz aplicada en este momento puede eliminar estas células.

Los métodos preventivos y terapéuticos descritos están dirigidos a potenciar la inmunocompetencia del paciente con cáncer, ya sea antes de la cirugía, en o después de la cirugía, y para inducir la inmunidad específica de tumor contra células cancerosas, siendo el objetivo inhibición del cáncer, y siendo el objetivo clínico final la regresión total y la erradicación del cáncer.

Farmacología

Aparte de otras consideraciones, el hecho de que los nuevos ingredientes activos sean péptidos, análogos peptídicos o células, dictamina que la formulación sea adecuada para el suministro de este tipo de compuestos. Claramente, los péptidos son menos adecuados para administración oral debido a la susceptibilidad a la digestión por ácidos gástricos o enzimas intestinales. Las vías preferidas de administración de péptidos son intra-articular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, o intratecal. Una vía más preferida es por inyección directa en o cerca del sitio del trastorno o enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, molienda, pulverización, formación de grageas, levigación, emulsionado, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas por tanto pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para inyección, los compuestos pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración a través de la mucosa, se usan penetrantes apropiados para la barrera a penetrar en la formulación. Dichos penetrantes por ejemplo, polietilenglicol, son generalmente conocidos en la técnica.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, pueden usarse soluciones concentradas de azúcar que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas, que pueden usarse por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida. Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación, las variantes se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del péptido y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los ingredientes activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los vehículos naturales o sintéticos adecuados son bien conocidos en la técnica (Pillai et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 447, 2001). Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos, para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Los compuestos de la presente invención también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención usando, por ejemplo, bases convencionales de supositorio tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir composiciones donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de un compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz pertenece a las capacidades de los especialistas en la técnica.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los péptidos descritos en este documento pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la IC₅₀ (la concentración que proporciona una inhibición del 50%) y la LD₅₀ (la dosis letal que causa muerte en el 50% de los animales ensayados) para un compuesto sujeto. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación puede elegirlas el médico individual en vista de la afección del paciente (por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 pág.1).

Dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación también puede ser una única administración de una composición de liberación lenta, durando el curso de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se efectúa la cura o se consiga una disminución del estado patológico. La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección, la manera de administración, el juicio del médico que prescribe, y todos los otros factores relevantes.

Los análogos de proteínas de choque térmico construidos se basaron en parte en las secuencias de varias proteínas de choque térmico conocidas, presentadas en los ejemplos a continuación. Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar el modo de preparar y usar los compuestos y métodos descritos en esta invención y no deben entenderse de ninguna manera como una limitación.

Ejemplos

Métodos generales

Producción y educación de las células dendríticas de ratón y estimulación de células T

Whelan et al (J. Immunol 164, 6453 a 6460, 2000) abordaron el problema en ratones mediante un experimento en que se cultivaron células de médula ósea de ratón durante 6 días en cultivo con GM-CSF para dar células dendríticas inmaduras. Estas células dendríticas después se incubaron durante una noche con LPS (que se sabe que dirige a las células a DC1) o con un antígeno de nematodos. La razón de la elección de antígeno de nematodos fue que la inyección de este antígeno *in vivo* da lugar a una respuesta Th2 en animales. Después de esta llamada "educación" de las células dendríticas, se lavaron y posteriormente se incubaron con células T vírgenes en presencia de estímulo antigénico. El experimento fue posible debido al uso de ratones transgénicos en que todas las células T responden al mismo péptido (OVA323-339), lo que exime al sistema de cualquier cuestión de sesgo de la respuesta de células T a nivel de las células T. Cualquier sesgo debe ser una consecuencia de la "educación" de las células dendríticas. Después de tres días de incubación, se midieron por ELISA las respuestas de citoquinas producidas por las células T. Se encontró que la incubación con LPS daba lugar a más IFN γ (Th1) que los controles o antígeno de nematodos. En contraste, la incubación con antígeno de nematodos daba lugar a más IL-4 (Th2) que los controles,

mientras que la incubación con LPS inhibía la respuesta de IL-4. Por lo tanto, se dijo que el antígeno de nematodos dirigía a las células a DC2. Se usó un método similar para ensayar los compuestos de la presente invención:

1. Se extrajeron células de médula ósea de los huesos de la pierna de ratones DO.11.10 transgénicos para el TcR. Todas las células de estos ratones responden al péptido OVA (OVA323-329).
2. Las células de médula ósea se sembraron a 10^6 células/ml en placas Petri de cultivo tisular de 100 mm de diámetro en medio de Iscove suplementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, penicilina/estreptomicina (de acuerdo con las recomendaciones del fabricante), aminoácidos no esenciales, β -mercaptoetanol 50 μ M y 10 ng/ml de mGM-CSF.
3. Después de 4 días, el medio se retiró cuidadosamente y se reemplazó con medio fresco
4. Después de 6 días, se recogieron las células no adherentes y se usaron como células dendríticas inmaduras
5. Las células dendríticas inmaduras se siembran en placas a 1×10^5 células/ml, 1 ml/pocillo en placas de 24 pocillos en el medio anterior con diversos reactivos añadidos a diversas concentraciones y se incuban durante una noche. Esta es la fase en que las células dendríticas se "educan"
6. El día siguiente, se recogieron las células y se lavaron 3 veces, luego se resuspendieron a 5×10^4 células/ml en 1 ml del medio anterior pero sin la adición de GM-CSF a cocultivar con células T
7. Las células T vírgenes se prepararon a partir de células esplénicas de ratones DO.11.10 que se recogieron y se pasaron sobre columnas de lana de nylon (de acuerdo con las recomendaciones del fabricante) para seleccionar las células T no adherentes y luego agotaron para los macrófagos cogiendo las células que no se adherían al plástico después de 2 horas.
8. Se cultivaron 5×10^5 células T con las células dendríticas de la etapa 6 en presencia de diversas concentraciones del péptido OVA (0, 0,3 nM, 3 nM y 30 nM).
9. Después de 3 días se añadieron PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) para estimular adicionalmente las células.
10. Al día siguiente, se recogieron los sobrenadantes celulares y se ensayaron para el contenido de citoquinas (interferón γ , IL-4, IL-10 e IL-12).

Ejemplo 1: Influencia de p277 (Val⁶-Val¹¹) sobre el perfil de citoquinas

- 30 Se ensayó el compuesto para la estimulación de células de médula ósea DO.11.10 de acuerdo con el ensayo descrito anteriormente (Producción y educación de células dendríticas de ratón y estimulación de células T).

Se cultivaron células de médula ósea BALB/c DO.11.10 para las células dendríticas y después se estimularon estimulados con LPS 1 μ g/ml, LPS 10 μ g/ml, hsp60 3 μ g/ml, hsp60 10 μ g/ml, p277 5 μ g/ml y P277 50 μ g/ml. Las células después se transfirieron a pocillos con células T de ratones BALB/c DO.11.10 frescas y se estimularon con péptido OVA a diferentes concentraciones (0, 0,3 nM, 3 nM, 30 nM). El sobrenadante se recogió después de 48 horas para el ensayo. Se cogieron 30 μ l para los ensayos de IFN γ , 40 μ l para IL-4 e IL-10 y 50 μ l para IL-12. Los resultados se presentan en las siguientes tablas, como la cantidad de citoquinas (pg/ml), y en la figura 1.

- 40 Después de la exposición a p277 (Val⁶-Val¹¹), las células dendríticas influyen en las células T para producir más IL-4 que las células dendríticas no expuestas. Esto es característico de una respuesta Th2. Esto está en contraste con el tratamiento con LPS que provoca una respuesta Th1 característica con IL-4 disminuido e IFN gamma aumentado. Por lo tanto, en cualquier enfermedad asociada con respuestas inflamatorias (tipo Th1), el tratamiento con análogos peptídicos de hsp60 puede modular el perfil de citoquinas a una respuesta no patogénica.

Tabla 1. Secreción de citoquinas de células T estimuladas con péptido Ova 0,3 nM y células dendríticas educadas.

	LPS 1 μ g/ml	LPS 10 μ g/ml	hsp60 3 μ g/ml	hsp60 10 μ g/ml	p277 (Val ⁶ -Val ¹¹) 5 μ g/ml	p277 (Val ⁶ -Val ¹¹) 50 μ g/ml	GMCSF solo	
50	IFN	328,33	478,89	447,78	480,56	722,22	373,89	367,78
	IL-4	11,07	1,07	35,96	24,29	36,96	82,29	12,40
	IL-10	15,26	75,48	34,50	80,18	32,53	27,15	56,85
55	IL-12	90,00	131,25	95,00	126,25	177,50	82,50	125,00

Ejemplo 2:

Ausencia de efecto de p277 (Val⁶-Val¹¹) en la producción de óxido nítrico en macrófagos de ratón.

- 60 El óxido nítrico es un mediador proinflamatorio producido por macrófagos. El estímulo clásico para la producción de óxido nítrico es lipopolisacárido (LPS). Otras moléculas derivadas de patógenos tales como hsp60 también inducen a los macrófagos a producir óxido nítrico. El óxido nítrico se produce normalmente por células junto con TNF α , IL-1 e IL-6.

65

Se ensayó el efecto de p277 (Val⁶-Val¹¹) sobre la producción de óxido nítrico a partir de una línea celular de macrófagos, tanto el efecto directo como el efecto de p277 (Val⁶-Val¹¹) sobre el óxido nítrico producido en respuesta a hsp60. Bajo ninguna circunstancia el péptido estimuló la producción de óxido nítrico por las células. Tampoco inhibió el óxido nítrico inducido por hsp60 producido. El efecto de p277 (Val⁶-Val¹¹) se describen en la figura 2.

El método de ensayo se describe en su totalidad en el documento WO 01/43691. En resumen, se incubaron células J774 (2x10⁵ células/ensayo) durante 48 horas con LPS, hsp60 o p277 (Val⁶-Val¹¹) o en ensayo de inhibición, las células se incubaron con hsp60 a diversas concentraciones en presencia o ausencia de 20 µg/ml de p277 (Val⁶-Val¹¹). Después de 48 horas se recogió el sobrenadante y se ensayó para el óxido nítrico. En ensayo para el óxido nítrico se realiza mezclando un volumen igual del sobrenadante de células con reactivo de Griess y midiendo el color resultante a 550 nm.

Ejemplo 3

15 Efectos de péptidos y análogos de hsp60 en células dendríticas derivadas de sangre periférica

El ensayo se basó en el protocolo descrito por Re, F. y Strominger, J.L. 2001. Toll-like receptor 2 (Tlr2) and Tlr4 differentially activate human dendritic cells. (J Biol Chem 276: 37692-9).

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica a partir de leucocitos de lotes de sangre obtenidos del banco de sangre. Las células se sembraron en a 10⁸ células/10 ml/placa Petri en medio RPMI que incluía FCS al 10% y se dejaron adherir a 37°C durante 2 horas. Al final de este tiempo, las células no adherentes se eliminaron por lavado de las placas con PBS y las células adherentes se resuspendieron en medio fresco como anteriormente. Las células entonces se cultivaron durante al menos 8 días con la adición de GM-CSF e IL-4 con el medio cambiado cada 4 días. Después de este tiempo, las células se recogieron y se cultivaron durante una noche con LPS, zymosan o p277 (Val⁶-Val¹¹). El día siguiente, se recogió el sobrenadante para el ensayo de las citoquinas secretadas (IP-10 e IL-8) y se recogieron las células para la investigación de los antígenos de superficie celular (CD83, CD86). CD83 es un antígeno característico de células dendríticas. Sólo el 30% de las células en los cultivos no fraccionados dieron tinción positiva para este marcador que indica que el cultivo no estaba completamente diferenciado. El segundo marcador, CD86 (B7.2) es característico de células dendríticas maduras. El marcador CD86 es un componente esencial de la sinapsis inmunológica formada entre las células T y APC. Esta sinapsis consta de CD80 y CD86 en el lado de la APC y CD28 y CD40 en el lado de la célula T. Esto es, por supuesto, además del reconocimiento específico entre el receptor de células T y el péptido mantenido en el MHC de la APC. El reconocimiento por las células T del péptido sobre la APC sin la expresión simultánea de CD86 da lugar a anergia en lugar de una respuesta de células T.

Los resultados mostrados en la figura 3 indican que hay un aumento de la maduración después de estimulación con LPS, zymosan o p277 (Val⁶-Val¹¹) indicada por el aumento en el porcentaje de células teñidas con anti-CD86. De las citoquinas secretadas, la estimulación con p277 (Val⁶-Val¹¹) provocó la secreción de IL-8, pero no la secreción de IP-10 (tabla 2). Esto podría sugerir que p277 (Val⁶-Val) se comporta como zymosan mediante estimulación a través del receptor Toll 2. Esto se ensayó adicionalmente con anticuerpos específicos para los receptores Toll.

Tabla 2. Influencia de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con p277 (Val⁶-Val¹¹) sobre la secreción de IP-10 e IL-8.

Estímulo	IP 10 pg/ml	ETM	IL-8 pg/ml	ETM
ninguno	-18	3,18	479	23
LPS 10 ng/ml	2520	19,09	3131	242
zymosan 50 µg/ml	141	20,45	2838	125
hsp60 1 µg/ml	31	0,91		
hsp60 0,1 µg/ml	1	10,91		
hsp60 10 ng/ml	6	12,27		
p277 (Val ⁶ -Val ¹¹) 0,5 µg/ml	21	7,27		
p277 (Val ⁶ -Val ¹¹) 50 ng/ml	39	17,27	2574	55
p277 (Val ⁶ -Val ¹¹) 5 ng/ml	2	5,45		
p277 (Val ⁶ -Val ¹¹) 0,5 ng/ml	-1	4,55	2368	45

Ejemplo 4

Efecto sobre monocitos de sangre periférica

Se preparan células mononucleares de sangre periférica a partir de leucocitos de lotes de sangre obtenidos del

banco de sangre. Las células se sembraron a una concentración de 4×10^6 células/ml/pocillo en placas de cultivo tisular de 24 pocillos en medio que contenía suero de ternera fetal al 10%. Las células se dejaron adherir durante 2 horas a 37°C. Después de este tiempo, las células no adherentes se retiraron por lavado y las células adherentes se incuban en medio fresco que contenía suero AB humano al 10% durante 6-8 días, cambiando el medio después de 4 días. Se informó de que estas condiciones de cultivo para daba lugar a monocitos.

Para la estimulación, se reemplazó el medio con medio sin suero. Para la preincubación, las células se expusieron durante una noche a los compuestos ensayados a diversas concentraciones y después se añadió LPS. Se recogió el sobrenadante después de una incubación durante una noche adicional y se ensayó para diversas citoquinas por ensayos ELISA.

Los resultados mostrados en la figura 4 indican que la estimulación directa con p277 (Val⁶-Val¹¹) no dio lugar directamente a IP-10, pero la preincubación con este compuesto aumentó la cantidad de IP-10 producido en respuesta al estímulo con LPS. Las células también se estimularon con hsp60 pero esto no dio lugar a IP-10, ya sea sola o después de preincubación con p277 (Val⁶-Val¹¹).

Ejemplo 5

Efecto sobre líneas celulares humanas

Se usó la línea celular humana THP-1 para este ensayo. Estas células son de tipo pre-monocito derivadas de leucemia monocítica aguda y se pueden diferenciar en monocitos por tratamiento con de éster de forbol (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato, PMA) 100 nM durante 72 horas. Durante este tiempo, las células cambian de morfología de células redondas que crecen en suspensión a células más grandes, planas, adherentes. La sensibilidad al estímulo con LPS y hsp60 aumenta en más de 100 veces con respecto a la secreción de TNF.

Las células THP-1 diferenciadas incubadas con p277 (Val⁶-Val¹¹) no secretaron TNF, o IP-10 directamente. Sin embargo, la preincubación con p277 (Val⁶-Val¹¹) y el estímulo posterior con 10 ng/ml de LPS dieron lugar a una cantidad aumentada de IP-10 secretada como se muestra en la tabla 3. La cantidad de TNF no se vio afectada significativamente.

Tabla 3. Efecto de la preincubación de células THP-1 con p277 (Val⁶-Val¹¹) y después estimulación con LPS, sobre la secreción de IP-10.

p277 (Val ⁶ -Val ¹¹) ng/ml	% de estimulación de la secreción de IP-10	ETM
Fondo	-92	12
1000	45	15
200	45	9
40	141	3
8	77	1
1,6	46	20
0,32	61	4
0,064	52	6
0,0128	-48	0

Ejemplo 6

Fragmentos adicionales y análogos de p277

Se ensayaron varios péptidos que son fragmentos y análogos de p277 (Val⁶-Val¹¹), incluyendo péptidos descritos anteriormente como epítomos críticos de este compuesto, para la producción de óxido nítrico en macrófagos de ratón.

Tabla 4. Los fragmentos y análogos de p277

Péptido	Secuencia	SEC ID N°
p277	VLGGGCALLRCIPALDSLTPANED	2
p277 (Val ⁶ -Val ¹¹) DiaPep277™	VLGGGVALLRVIPALDSLTPANED	3
epítipo de células T	ALLRVIPALDSL	4
anclajes MHC	ALLRVIPALDSL	5
p277 (437-450, Ser ⁶ Ser ¹¹)	VLGGGSALLRSIPA	6
p277 (442-450, Ser ⁶ Ser ¹¹)	SALLRSIPA	7
p277 (442-450, Val ⁶ Val ¹¹)	VALLRVIPA	8

15 Aunque el péptido p277 (Val⁶-Val¹¹) ha demostrado ser ineficaz tanto para la estimulación directa de TNF α de líneas celulares de ensayo como para la inhibición de TNF α secretado como resultado de estimulación por LPS o hsp60, el péptido inhibió la secreción de radicales libres de oxígeno desde una línea de monocitos de ratón J774. De los compuestos ensayados, sólo los p277 (Val⁶-Val¹¹) y p277 (442-450, Val⁶Val¹¹) fueron eficaces en la inhibición de la explosión oxidativa como se muestra en la figura 5.

20

Ejemplo 7

Fragmentos adicionales de hsp60

25 Se ensayan los siguientes fragmentos y análogos peptídicos de de hsp60 para la influencia en la respuesta Th1-Th2 de células T expuestas a células dendríticas educadas.

Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala (SEC ID N° 6) se describe en el documento WO 96/11948.

30 Gly-Gly-Val-Thr-Leu-Leu-Gln-Ala-Ala-Pro-Ala-Leu-Asp (SEC ID N° 9) se describe en el documento US 5.958.416.

Cualquiera de los péptidos, derivados y análogos de hsp60 descritos en los documentos US 6.180.103 y US 6.110.746.

35 Ejemplo 8

Péptidos solapantes de p277 (Val⁶-Val¹¹)

40 Para ensayar cuales de los epítipos o fragmentos del p277 (Val⁶-Val¹¹) son importantes para la actividad, se prepararon péptidos adicionales usando el método de síntesis paralela múltiple descrito en detalle en el ejemplo 9. Los péptidos se diseñaron para incluir un análisis de péptidos de p277 (Val⁶-Val¹¹) empezando 2 aminoácidos antes del p277 (Val⁶-Val¹¹) (posición 435 de hsp60) y procediendo a lo largo de la secuencia de síntesis de péptidos de 7 a 14 aminoácidos. Estos péptidos se ensayan adicionalmente en los sistemas de ensayo mencionados anteriormente para definir fragmentos activos.

45

Ejemplo 9

Método para la síntesis de fragmentos y análogos peptídicos

50 Método general para la síntesis, purificación y caracterización de bibliotecas en formato de síntesis paralela múltiple (MPS):

Se usa el procedimiento MPS como procedimiento de desarrollo de péptidos rutinario. Se sintetizan péptidos individuales, o grupos de unos pocos péptidos, en placas de microtitulación de 96 pocillos equipadas con filtros que permiten el paso de disolvente, pero no de matriz en fase sólida. Se usa un aparato de válvula simple y eficaz que posibilita el cierre y abertura simultánea de todas las válvulas (producido por Millipore). El sistema utiliza un enfoque en que cada pocillo está equipado con una membrana permeable a disolvente en la parte inferior que no pasa partículas por encima de un cierto tamaño. El proceso permite colocar resina en los pocillos, realizar la reacción en disolvente, y eliminar el disolvente de todos los pocillos simultáneamente aplicando vacío. Estas placas especiales, que están disponibles en el formato de 96 pocillos convencional, permiten la síntesis paralela de 96 péptidos simultáneamente. La escala de síntesis del procedimiento está en el intervalo de 1-5 μ moles por pocillo. Después de la purificación por columnas C18 de fase inversa (purificación SepPak), que se realiza también en el formato de 96 pocillos convencional, los péptidos se disuelven rutinariamente en 1 ml de agua para producir una concentración teórica en bruto de 1-5 mM (dependiendo de la escala de síntesis). El control de la calidad química de los péptidos resultantes se realiza mediante análisis de ESI-MS. Análisis de varias placas preparadas en diferentes ocasiones por diferentes operarios indicó una tasa de éxito general de aproximadamente el 80%, juzgada por la presencia de la

65

masa del péptido deseado en la preparación en bruto. Se realiza un análisis adicional de un péptido de MPS por LC-MS. El análisis reveló una calidad de péptido en bruto similar a las preparaciones en bruto de péptidos sintetizados individualmente a gran escala. Ahora se realizan diferentes etapas o el proceso completo de forma automática mediante sintetizadores automáticos de péptidos. De acuerdo con las presentes ejemplificaciones, los péptidos se sintetizan actualmente de forma automática usando el ACT 396 de Advanced ChemTech, y el dispositivo de calentamiento Lab Tech 4 de Advanced ChemTech.

Procedimiento detallado para la síntesis automatizada en formato MPS:

10 La síntesis se realizó en ACT 396 de Advanced ChemTech.

Para la capacidad de 6 μ moles se usan 10 mg de resina con una sustitución de 0,6 mmol/g. Desprotección de Fmoc: A cada pocillo se añaden dos veces 500 μ l de piperidina al 25% en NMP. La reacción se agitó durante 15 min. El NMP se retira por succión.

15 Lavado después de desprotección de Fmoc: la resina se lava colocando 600 μ l de NMP en cada pocillo seguido por evacuación de la solución por vapor de nitrógeno. El proceso de lavado se repite 4 veces.

Acoplamiento usando HBTU:

20 Capacidad de pocillo: 6 μ mol; cantidad de aminoácido por acoplamiento por pocillo: 30 μ mol; concentración de aminoácido en NMP: 0,2 M; volumen aminoácido usado: 150 μ l; cantidad de HBTU: 30 μ mol concentración de HBTU: 0,2 M; volumen de HBTU usado: 150 μ l; DIEA añadido: 150 μ l de 0,4 M en NMP; volumen de reacción total: 450 μ l.

25 Los aminoácidos se disuelven en una solución de HOBt en NMP. La resina se lava colocando 600 μ l de NMP en cada pocillo seguido por evacuación de la solución por vapor de nitrógeno. El proceso de lavado se repite 4 veces. La reacción de acoplamiento se repite dos veces durante 1 hora.

30 Escisión del péptido de la resina y purificación SepPak: Después de la desprotección final de Fmoc, la resina se transfirió a una placa de microtitulación de pocillos profundos, a cada pocillo se añaden 300 μ l de solución de TFA que contiene TIS al 2,5%, H₂O al 2,5%, EDT al 2,5%. La eliminación del TFA se realiza por liofilización. Después de la escisión, los péptidos se purifican por SepPak.

35 Síntesis manual de péptidos y análogos peptídicos

Los péptidos y análogos peptídicos se sintetizaron manualmente, en resina de cloruro de 2-clorotritilo. En primer acoplamiento se realizó usando 0,7 mmol de Fmoc-AA-OH y 2,8 mmol de DIEA. Después de 1 h, la resina se lavó con MeOH seguido de CH₂Cl₂ y DMF. El resto de los acoplamientos se realizaron según la química Fmoc regular usando DIC/HOBt como reactivo de acoplamiento, tiempo de reacción 1-2 h. Al final del ensamblaje, la resina se lavó con CH₂Cl₂ y se secó a presión reducida. La escisión del péptido de la resina se hizo mediante una solución de TFA que contenía TIS al 2,5% + H₂O al 2,5%. El péptido en bruto se purificó en columna C18 de fase inversa.

45 **Ejemplo 10**

Modelos animales de enfermedad de Crohn

La enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) abarca 2 trastornos crónicos distintos, idiopáticos, inflamatorios que afectan al tracto gastrointestinal: la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Aunque estas dos entidades se agrupan frecuentemente juntas, con respecto al mecanismo subyacente de la patología son diferentes. La enfermedad de Crohn aborda predominantemente el íleon o el colon, pero puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano. La profunda inflamación del tracto gastrointestinal puede causar calambres abdominales dolorosos, fiebre, sangrado rectal y diarrea frecuente, especialmente después de una comida. En las zonas afectadas se produce una respuesta inflamatoria con secreción de citoquinas de tipo Th1 tales como interferón gamma e IL-12.

En base a la comprensión actual de la patogénesis de la enfermedad, las terapias se han centrado en la atenuación de la inflamación entérica. Los cuatro grupos prominentes de fármacos usados para tratar la enfermedad de Crohn son aminosalicilatos, corticosteroides, inmunomoduladores y antibióticos. Los inmunomoduladores están dirigidos a disminuir la inflamación crónica del tejido observada en la enfermedad de Crohn, ya sea reduciendo la cantidad de células inmunes o interfiriendo con las citoquinas pro-inflamatorias de tipo Th1 que producen. El problema principal con la inmunosupresión es que el cuerpo está expuesto a peligros de infección. Se usan frecuentemente Imuran (azatioprina) y Purinethol (6-mercaptopurina (6-MP)) y pueden usarse junto con corticosteroides. El primer tratamiento aprobado específicamente para la enfermedad de Crohn es remicade (infliximab), que es un anticuerpo anti-TNF α . Otros tratamientos en ensayo son GM-CSF, hormona del crecimiento y anticuerpo contra ICAM-1

(alicaforsen).

5 En modelos de ratón de la enfermedad de Crohn, los anticuerpos contra TNF α , factor inhibidor de la migración de macrófagos, e IL-12 han demostrado ser eficaces, así como el tratamiento con TGF- β . Todas estas indicaciones tienden a confirmar que la enfermedad de Crohn está mediada por Th1 y puede mejorarse mediante la modulación de la respuesta Th1. Esto la hace adecuada para inmunomodulación con los compuestos de la presente invención.

Modelos de ratón para enfermedad de Crohn

10 Se usa el modelo de ratón de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (Ohkawara, et al. 2002, Gastroenterology 123: 256-70, Mahler, et al. 1999, Genomics 55: 147-56), que no requiere intervención con citoquinas para iniciarlo o el uso de cepas especializadas de ratones, para ensayar los compuestos y composiciones de acuerdo con la presente invención. Se inyectan péptidos y análogos de HSP por vía intraperitoneal 2, 4, y 6 días
15 después de la adición de sulfato de dextrano al 4% en el agua de beber de los ratones. Se hace un seguimiento de los ratones para la presencia de diarrea y pérdida de peso y en el día 7 se sacrifican los ratones. Se retira el intestino y se evalúa histológicamente para la patología. Como control positivo, se inyecta a los ratones dexametasona.

LISTA DE SECUENCIAS

- 20 <110> Peptor Ltd.
- <120> PÉPTIDOS HSP Y ANÁLOGOS PARA LA MODULACIÓN DE RESPUESTAS INMUNES MEDIANTE
25 CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO
- <130> PTR/023/PCT
- <150> US 60/352594
30 <151> 31-01-2001
- <160>9
- <170> PatentIn versión 3.1
- 35 <210> 1
<211> 573
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 40 <400> 1

45

50

55

60

65

ES 2 526 822 T3

1 Met Leu Arg Leu Pro Thr Val Phe Arg Gln Met Arg Pro Val Ser Arg
 5 Val Leu Ala Pro His Leu Thr Arg Ala Tyr Ala Lys Asp Val Lys Phe
 10 Gly Ala Asp Ala Arg Ala Leu Met Leu Gln Gly Val Asp Leu Leu Ala
 15 Asp Ala Val Ala Val Thr Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile
 20 Glu Gln Gly Trp Gly Ser Pro Lys Val Thr Lys Asp Gly Val Thr Val
 25 Ala Lys Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys
 30 Leu Val Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala Gly Asp Gly
 35 Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Arg Ser Ile Ala Lys Glu Gly Phe
 40 Glu Lys Ile Ser Lys Gly Ala Asn Pro Val Glu Ile Arg Arg Gly Val
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 526 822 T3

Met Leu Ala Val Asp Ala Val Ile Ala Glu Leu Lys Lys Gln Ser Lys
 145 150 155 160

5
 Pro Val Thr Thr Pro Glu Glu Ile Ala Gln Val Ala Thr Ile Ser Ala
 165 170 175

10
 Asn Gly Asp Lys Glu Ile Gly Asn Ile Ile Ser Asp Ala Met Lys Lys
 180 185 190

15
 Val Gly Arg Lys Gly Val Ile Thr Val Lys Asp Gly Lys Thr Leu Asn
 195 200 205

20
 Asp Glu Leu Glu Ile Ile Glu Gly Met Lys Phe Asp Arg Gly Tyr Ile
 210 215 220

25
 Ser Pro Tyr Phe Ile Asn Thr Ser Lys Gly Gln Lys Cys Glu Phe Gln
 225 230 235 240

30
 Asp Ala Tyr Val Leu Leu Ser Glu Lys Lys Ile Ser Ser Ile Gln Ser
 245 250 255

35
 Ile Ile Ala Glu Asp Val Asp Gly Glu Ala Leu Ser Thr Leu Val Leu
 275 280 285

40
 Asn Arg Leu Lys Val Gly Leu Gln Val Val Ala Val Lys Ala Pro Gly
 290 295 300

45
 Phe Gly Asp Asn Arg Lys Asn Gln Leu Lys Asp Met Ala Ile Ala Thr
 305 310 315 320

50
 Gly Gly Ala Val Phe Gly Glu Glu Gly Leu Thr Leu Asn Leu Glu Asp
 325 330 335

55
 Val Gln Pro His Asp Leu Gly Lys Val Gly Glu Val Ile Val Thr Lys
 340 345 350

60
 Asp Asp Ala Met Leu Leu Lys Gly Lys Gly Asp Lys Ala Gln Ile Glu
 355 360 365

65

ES 2 526 822 T3

5 Lys Arg Ile Gln Glu Ile Ile Glu Gln Leu Asp Val Thr Thr Ser Glu
 370 375 380
 Tyr Glu Lys Glu Lys Leu Asn Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 10 Val Ala Val Leu Lys Val Gly Gly Thr Ser Asp Val Glu Val Asn Glu
 405 410 415
 15 Lys Lys Asp Arg Val Thr Asp Ala Leu Asn Ala Thr Arg Ala Ala Val
 420 425 430
 20 Glu Glu Gly Ile Val Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Leu Arg Cys Ile
 435 440 445
 25 Pro Ala Leu Asp Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly
 450 455 460
 30 Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr Leu Lys Ile Pro Ala Met Thr Ile Ala
 465 470 475 480
 35 Lys Asn Ala Gly Val Glu Gly Ser Leu Ile Val Glu Lys Ile Met Gln
 485 490 495
 40 Ser Ser Ser Glu Val Gly Tyr Asp Ala Met Ala Gly Asp Phe Val Asn
 500 505 510
 45 Met Val Glu Lys Gly Ile Ile Asp Pro Thr Lys Val Val Arg Thr Ala
 515 520 525
 50 Leu Leu Asp Ala Ala Gly Val Ala Ser Leu Leu Thr Thr Ala Glu Val
 530 535 540
 Val Val Thr Glu Ile Pro Lys Glu Glu Lys Asp Pro Gly Met Gly Ala
 545 550 555 560
 55 Met Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Phe
 565 570

55 <210>2
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 2

65

ES 2 526 822 T3

Val Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Leu Arg Cys Ile Pro Ala Leu Asp
1 5 10 15

5 Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp
20

10 <210>3
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 3

Val Leu Gly Gly Gly Val Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp
1 5 10 15

20 Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp
20

25 <210>4
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 4

Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp Ser Leu
1 5 10

35 <210>5
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp Ser Leu
1 5 10

45 <210>6
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Leu Gly Gly Gly Ser Ala Leu Leu Arg Ser Ile Pro Ala
1 5 10

55 <210>7
<211>9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400>7

Ser Ala Leu Leu Arg Ser Ile Pro Ala
1 5

65

ES 2 526 822 T3

<210>8
<211>9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 8

Val Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala
1 5

10

<210>9
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 9

Gly Gly Val Thr Leu Leu Asn Ala Ala Pro Ala Leu Asp
1 5 10

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un análogo peptídico de una proteína de choque térmico (Hsp), en el que dicho análogo peptídico es la SEC ID N° 8.
2. Una composición farmacéutica que comprende el análogo peptídico de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, que adicionalmente comprende células presentadoras de antígeno.
4. Una composición farmacéutica que comprende:
- células presentadoras de antígeno expuestas al análogo peptídico de acuerdo con la reivindicación 1 en ausencia de un antígeno diferente a dicho análogo peptídico, en la que las células son capaces de estimular adicionalmente células T auxiliares, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. La composición de la reivindicación 4, en la que las células presentadoras de antígeno son células dendríticas.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que las células dendríticas son células dendríticas autólogas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

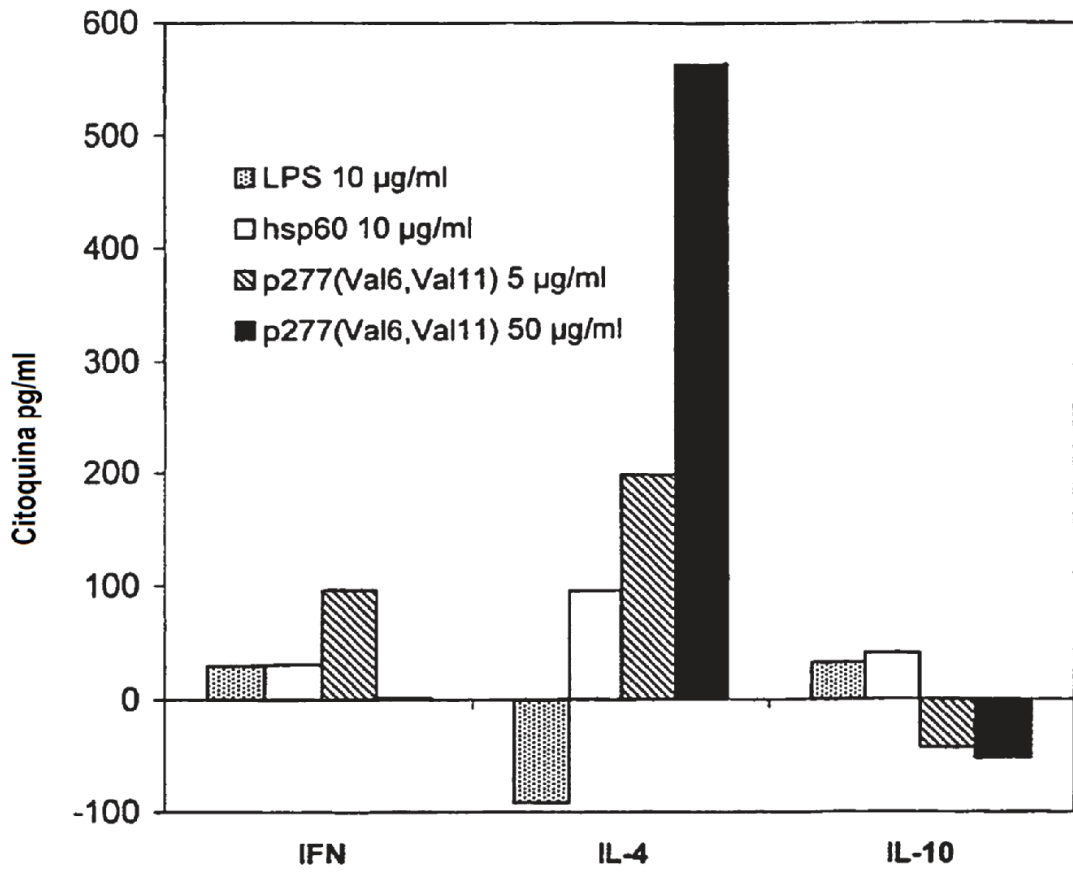


Figura 2

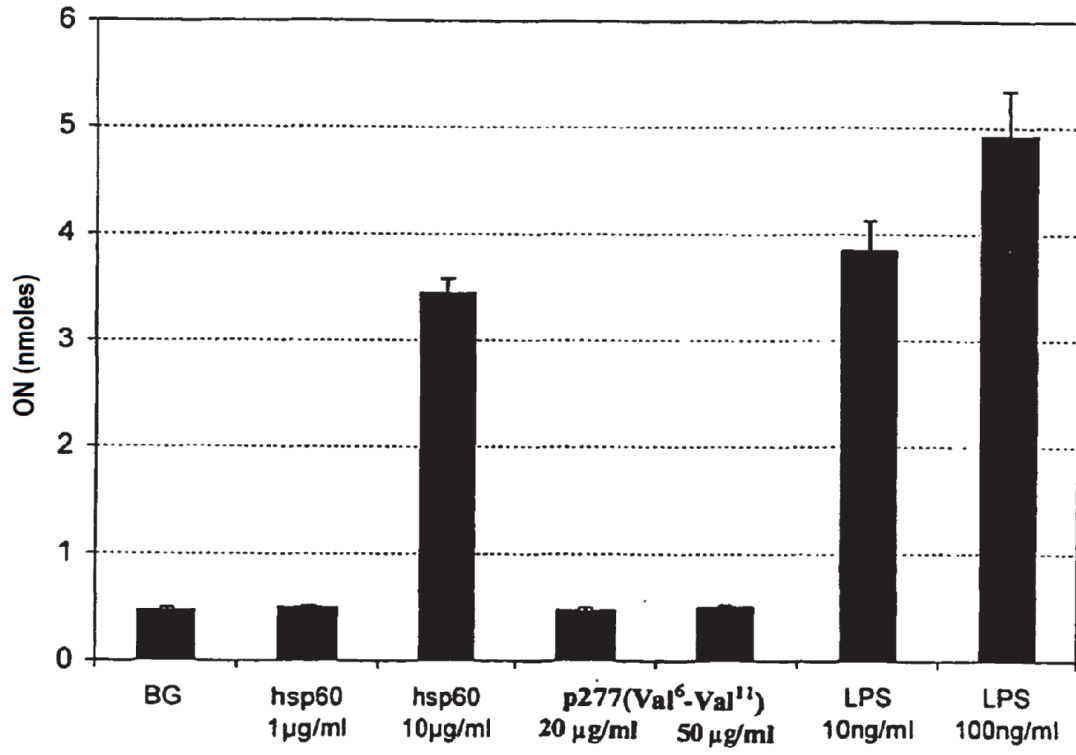


Figura 3

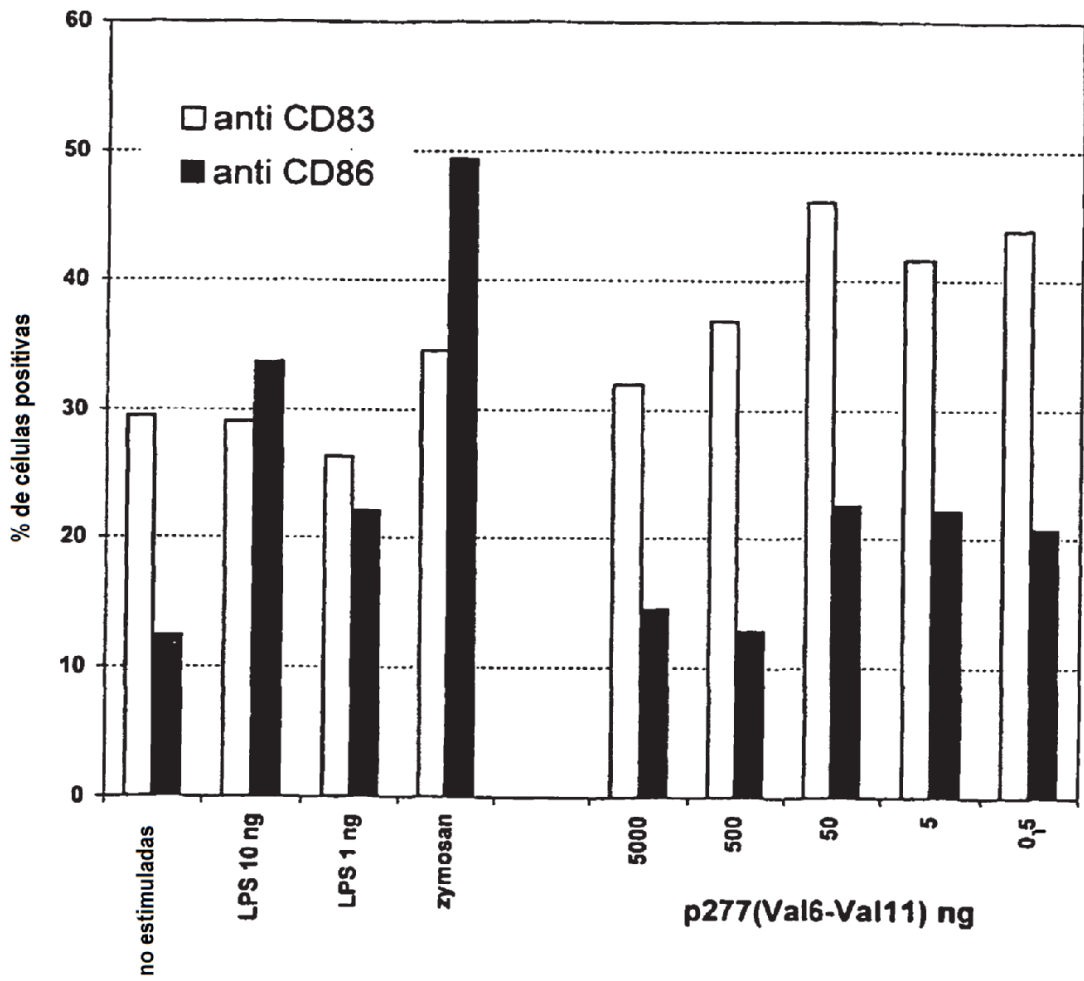


Figura 4

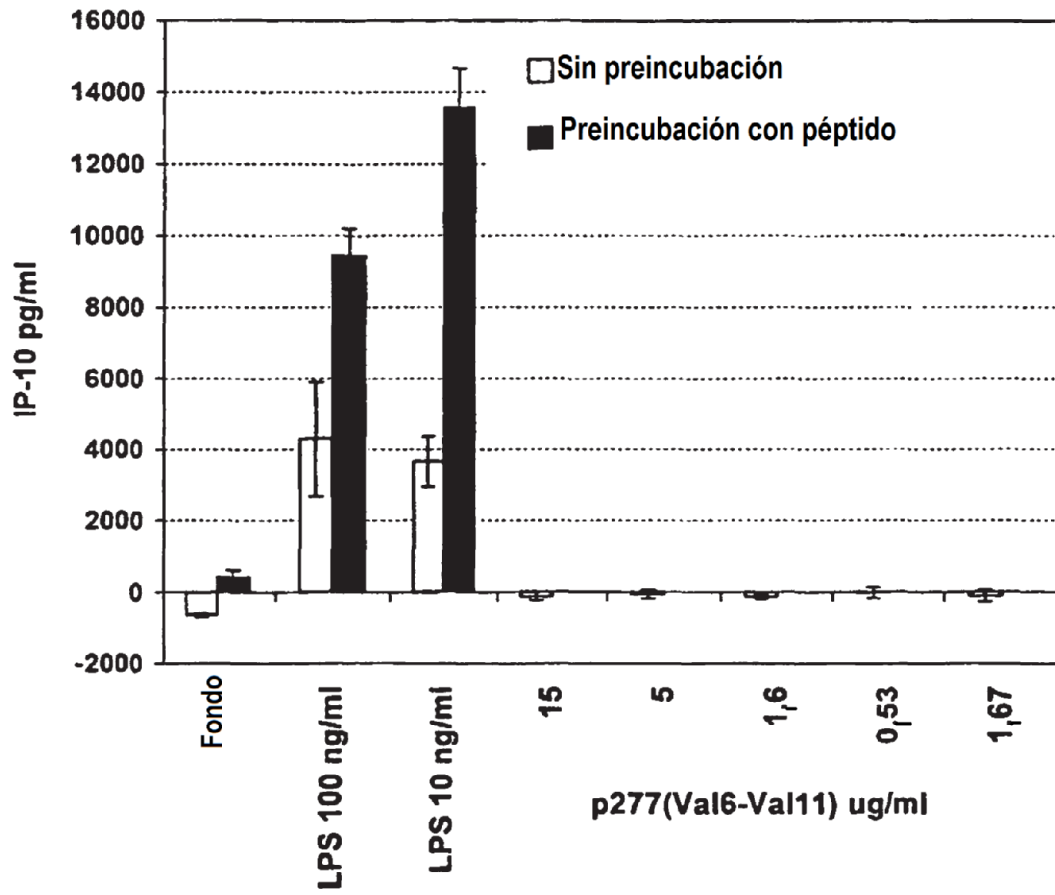


Figura 5

