

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 760**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/00** (2006.01)

**C07K 7/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.1999 E 10180952 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2327712**

54 Título: **Tratamiento de enfermedad de Crohn con copolímero 1 y polipéptidos**

30 Prioridad:

**23.07.1998 US 93859 P**

**25.09.1998 US 101825 P**

**02.10.1998 US 102960 P**

**12.11.1998 US 108184 P**

**30.10.1998 US 106350 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.01.2015**

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD. (50.0%)**  
**The Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95**  
**76100 Rehovot, IL y**  
**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AHARONI, RINA;**  
**TEITELBAUM, DVORA;**  
**ARNON, RUTH;**  
**SELA, MICHAEL;**  
**FRIDKIS-HARELI, MASHA y**  
**STROMINGER, JACK L.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 527 760 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

Tratamiento de enfermedad de Crohn con copolímero 1 y polipéptidos

## INTRODUCCIÓN

5 La presente invención proporciona composiciones y procedimientos de tratamiento de la enfermedad de Crohn usando cantidades terapéuticamente eficaces de un péptido o polipéptido relacionado con el copolímero 1. El copolímero 1 es una mezcla heterogénea de copolímeros lineales aleatorios sintéticos de tirosina, alanina, ácido glutámico y lisina y, en cantidades terapéuticas apropiadas y tamaños moleculares promedio, se usa para tratar esclerosis múltiple. Cuando tales mezclas de copolímeros lineales aleatorios sintéticos consisten esencialmente en tres de los cuatro aminoácidos encontrados en el copolímero 1, se denominan terpolímeros. La presente invención se refiere en parte a terpolímeros.

10 Preferentemente, los terpolímeros están compuestos de tirosina, alanina y lisina, o de ácido glutámico, tirosina y lisina, o de ácido glutámico, alanina y lisina. Sorprendentemente, los terpolímeros tienen eficacia para tratar una variedad de enfermedades autoinmunitarias y se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, además de a células presentadoras de antígeno.

15 La presente memoria descriptiva también incluye ciertos péptidos, que comprenden los cuatro aminoácidos del copolímero 1, que también se ha encontrado que tienen eficacia para tratar una variedad de enfermedades autoinmunitarias y unirse a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), además de a células presentadoras de antígeno. Tales péptidos se denominan más adelante “copéptidos”, para enfatizar su relación con el copolímero 1.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Las enfermedades autoinmunitarias se producen cuando el sistema inmunitario de un organismo deja de reconocer algunos de los propios tejidos del organismo como “propios” y los ataca como “extraños”. Normalmente, la auto-tolerancia se desarrolla pronto por los acontecimientos de desarrollo dentro del sistema inmunitario que previenen que los propios linfocitos T y linfocitos B del organismo reaccionen con los propios tejidos del organismo. Las proteínas de la superficie celular del MHC ayudan a regular estas respuestas inmunitarias tempranas uniéndose a y presentando péptidos procesados a linfocitos T.

25

Este proceso de auto-tolerancia se rompe cuando se desarrollan enfermedades autoinmunitarias. Ahora, los propios tejidos del organismo y proteínas son reconocidos como “autoantígenos” y son atacados por el sistema inmunitario del organismo. Por ejemplo, se cree que la esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmunitaria que se produce cuando el sistema inmunitario ataca la vaina de mielina, cuya función es aislar y proteger los nervios. Es una enfermedad progresiva

30 caracterizada por desmielinización, seguida de pérdida de la función neuronal y motora. La artritis reumatoide (“AR”) también se cree que es una enfermedad autoinmunitaria que implica inflamación crónica de las articulaciones sinoviales e infiltración por linfocitos T activados, macrófagos y células plasmáticas, conduciendo a destrucción progresiva del cartílago articular. Es la forma más grave de enfermedad articular. La naturaleza del (de los) autoantígeno(s) atacado(s) en la artritis reumatoide se entiende poco, aunque el colágeno tipo II es un candidato.

35 Una tendencia a desarrollar esclerosis múltiple y artritis reumatoide es heredada -- estas enfermedades se producen más frecuentemente en individuos que llevan uno o más alelos de clase II del MHC característicos. Por ejemplo, la susceptibilidad heredada a artritis reumatoide está fuertemente asociada a los alelos DRB1 \*0401, DRB 1 \*0404, o DRB 1\*0405 o DRB1\*0101 de clase II del MHC. Los antígenos del sitio de histocompatibilidad (HLA) se encuentran sobre la superficie de células y ayudan a determinar la individualidad de tejidos de diferentes personas. Los genes para los

40 antígenos de sitios de histocompatibilidad se localizan en la misma región del cromosoma 6 que el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La región de MHC expresa varias clases características de moléculas en diversas células del cuerpo, que son los genes, con el fin de de secuenciar a lo largo del cromosoma, los genes de la clase I, II y III del MHC. Los genes de clase I consisten en genes HLA, que se subdividen adicionalmente en subregiones A, B y C. Los genes de clase II se subdividen en las subregiones DR, DQ y DP. Las moléculas de MHC-DR son las mejor conocidas; éstas se producen sobre las superficies de células presentadoras de antígeno tales como macrófagos, células dendríticas de tejido

45 linfóide y células epidérmicas. Los productos de MHC de clase III se expresan en diversos componentes del sistema del complemento, además de en algunas células no inmunorrelacionadas.

Se han desarrollado varios agentes terapéuticos para tratar enfermedades autoinmunitarias, que incluyen fármacos esteroideos y antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, metotrexato; diversos interferones; y ciertos inhibidores de la

50 síntesis de prostaglandinas. Sin embargo, estos agentes pueden ser tóxicos cuando se usan durante más de un corto periodo de tiempo o producen efectos secundarios no deseables. Otros agentes terapéuticos se unen a y/o inhiben la actividad inflamatoria del factor de necrosis tumoral (TNF), por ejemplo, anticuerpos específicos anti-TNF o fragmentos de anticuerpos, o una forma soluble del receptor de TNF. Estos agentes eligen como diana una proteína sobre la superficie de un linfocito T y generalmente previenen la interacción con una célula presentadora de antígeno (APC). Sin embargo,

55 las composiciones terapéuticas que contienen proteínas plegadas naturales son frecuentemente difíciles de producir,

formular, almacenar y administrar. Además, la heterogeneidad innata del sistema inmunitario puede limitar la eficacia de los fármacos y complicar el tratamiento a largo plazo de enfermedades autoinmunitarias.

Así, con el fin de tratar eficazmente enfermedades autoinmunitarias y otras afecciones inmunitarias, se necesitan nuevos fármacos que no tengan los efectos secundarios de los presentes agentes terapéuticos y que traten adecuadamente la heterogeneidad innata del sistema inmunitario.

## REFERENCIAS

- Aharoni y col., 58 immunology Letters 79 (1997).
- Allison, en IMMUNOSUPPRESSION AND ANTI-INFLAMMATORY DRUGS, ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCE 696:xi (1993).
- 10 Ben-Nun A y col., 243 J NEUROL (Suppl 1) S14-S22 (1996).
- Dorling y col., 6 CUR. OPINIONS IMMUNOL. 765 (1994).
- Ferrara y col., 324 NEW ENGLAND J. OF MEDICINE 667 (1991).
- Fridkis-Hareli y col., 63 J. NEUROCHEM. 63 (Suppl. 1) S61 (1994).
- Fridkis-Hareli y col., 163 CELL. IMMUNOL. 229. (1995).
- 15 Fridkis-Hareli y col., 160 J. IMMUNOL. 4386 (1998).
- Johnson, 1 NEUROLOGY 65-70 (1995).
- Kay y col., 22 TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 96 (1990).
- Kelemen y col., 102 INT ARCH ALLERGY IMMUNOL. 309 (1993).
- Mengle-Gaw, The Major Histocompatibility Complex (MHC), en ENCYCLOPEDIA OF MOLECULAR BIOLOGY 602-06 (Oxford: Blackwell Science Ltd., 1994).
- 20 Rothbard, J. B. y col., 9 ANNU. REV. IMMUNOL. 527 (1991).
- Schlegel y col., 84 BLOOD 2802 (1994).
- Sela M y col., 88 BULL INST PASTEUR 303-14 (1990).
- Stazl, 22 TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 5 (1990).
- 25 Sykes, 10 THE FASEB JOURNAL 721 (1996).
- Teitelbaum y col., 1 EUR. J. IMMUNOL. 242-48 (1971).
- Teitelbaum y col., 3 EUR. J. IMMUNOL. 273-79 (1973).
- Teitelbaum y col., 64 J. NEUROIMMUNOL. 209-17 (1996).
- Thomson, 10 IMMUNOLOGY TODAY 6 (1988).
- 30 Van Den Bogaerde y col., 52 TRANSPLANTATION 15 (1991).
- Webb y col., 13 IMMUNOCHEM. 333 (1976).

El documento WO983022 desvela el uso de un copolímero que consiste en Y.E.A.K y que tiene MW dentro de 2.000 y 40.000 dalton para tratar una enfermedad autoinmunitaria, esclerosis múltiple.

35 El documento US5.679.640 desvela procedimientos de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que implican péptidos que se unen a MHC e inhiben linfocitos T. Los péptidos que se unen a HLA-DR1 se proponen para tratar artritis reumatoide.

Fridkis-Hareli, M. y col. (1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 91, pág. 4872-4876 y 1998, Journal of Immunology, vol. 160, pág. 4386-4397) desvelan que Cop1 se une a varios DR.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

La invención en su forma más amplia se define en las reivindicaciones independientes 1 y 8:

5 1. Uso de una mezcla de polipéptidos que tienen un peso molecular promedio de 2.000 a 40.000 dalton, en la que cada polipéptido consiste en ácido glutámico, tirosina, alanina y lisina, en una cantidad eficaz para tratar un sujeto humano afectado con enfermedad de Crohn para la preparación de una composición farmacéutica que va a administrarse a un sujeto afectado con enfermedad de Crohn para el tratamiento de enfermedad de Crohn.

8. El copolímero 1 para su uso en el tratamiento de enfermedad de Crohn.

Realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes 2-7. La divulgación del tratamiento de enfermedades distintas de enfermedad de Crohn en la presente memoria descriptiva es para referencia solo.

10 Sorprendentemente, el copolímero 1 y los terpolímeros y copéptidos de la presente invención pueden usarse para tratar una variedad de enfermedades autoinmunitarias en una población heterogénea de pacientes. Estos terpolímeros y copéptidos pueden inhibir algunas de las respuestas fisiológicas de linfocitos T que atacan autoantígenos a medida que progresan estas enfermedades. Además, el copolímero 1 y los terpolímeros y copéptidos de la presente invención se unen con alta afinidad a células presentadoras de antígeno de diferentes contextos genéticos y a varias moléculas de MHC de clase II para bloquear el reconocimiento y ataque de células inmunitarias. Además, los terpolímeros y copéptidos pueden estimular el crecimiento y funcionamiento de linfocitos T específicos del copolímero 1 para tratar y prevenir adicionalmente diversas enfermedades autoinmunitarias.

20 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona una composición que tiene un polipéptido que comprende tres aminoácidos diferentes seleccionados del grupo de aminoácidos que comprende el copolímero 1, es decir, ácido glutámico, alanina, lisina y tirosina, en las relaciones molares relativas aproximadas encontradas en el copolímero 1.

La presente divulgación también se refiere a péptidos que comprenden tres aminoácidos diferentes seleccionados del grupo de aminoácidos que comprende el copolímero 1,

25 La presente divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de un terpolímero que consiste esencialmente en los aminoácidos tirosina, alanina y lisina, en la relación molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,25 de tirosina, de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,6 de alanina y de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 de lisina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Este terpolímero está preferentemente sustancialmente libre de ácido glutámico.

30 La presente divulgación proporciona además una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un terpolímero que consiste esencialmente en ácido glutámico, tirosina y lisina, en la relación molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,300 de ácido glutámico, de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,250 de tirosina; y de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,7 de lisina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El terpolímero está preferentemente sustancialmente libre de alanina.

35 La presente divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de un terpolímero que consiste esencialmente en los aminoácidos tirosina, ácido glutámico y alanina en la relación molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,25 de tirosina, de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,3 de ácido glutámico, y de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,8 de lisina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Este terpolímero está preferentemente sustancialmente libre de lisina.

40 La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un terpolímero que consiste esencialmente en ácido glutámico, alanina y lisina, en la relación molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,3 de ácido glutámico, de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,6 de alanina; y de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,7 de lisina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Este terpolímero está preferentemente sustancialmente libre de tirosina.

45 La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica para tratar enfermedades autoinmunitarias que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del copolímero 1 o un polipéptido que consiste esencialmente en ácido glutámico, alanina, tirosina y lisina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 La presente divulgación proporciona además procedimientos de tratamiento y prevención de enfermedades autoinmunitarias en un mamífero, que incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el copolímero 1, un terpolímero o un copéptido. En otra realización, el procedimiento de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias en un mamífero implica adicionalmente inhibir la proliferación de linfocitos T que participan en el ataque inmunitario. En otra realización, el procedimiento de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias en un mamífero implica unir el terpolímero o copéptido a una célula presentadora de antígeno. En otra realización más, el procedimiento de tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria en un mamífero implica unir el

terpolímero o copéptido a una proteína de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad que está asociada a enfermedades autoinmunitarias.

Enfermedades autoinmunitarias contempladas por la presente divulgación incluyen afecciones artríticas, enfermedades desmielinizantes y enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse por las presentes composiciones incluyen esclerosis múltiple, anemia hemolítica autoinmune, ooforitis autoinmune, tiroiditis autoinmune, uveoretinitis autoinmune, enfermedad de Crohn, púrpura trombocitopénica inmune crónica, colitis, enfermedad de sensibilidad por contacto, diabetes mellitus, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, mixedema idiopático, miastenia grave, psoriasis, pénfigo vulgar, artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico. Las presentes composiciones pueden usarse para tratar una o más de estas enfermedades.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Como se usa a continuación

“GAL” es un terpolímero aleatorio de ácido glutámico, alanina y lisina;

“TGA” o “YEA” es un terpolímero aleatorio de tirosina, ácido glutámico y alanina;

“TAL” o “YAK” es un terpolímero aleatorio de tirosina, alanina y lisina;

15 “GTL” o “YEK” es un terpolímero aleatorio de ácido glutámico, tirosina y lisina; y

“YEAk” es el copolímero 1.

La Figura 1 ilustra el efecto del copolímero 1 y terpolímeros sobre la proliferación de linfocitos T que son específicos para ciertos péptidos de la proteína básica de mielina (MBP). Varios de los presentes terpolímeros inhiben la proliferación de líneas de linfocitos T que son específicas para antígeno de la proteína básica de mielina, 84-102 de MBP (SEC ID NO: 1). Se usaron los siguiente símbolos: Copolímero 1 (●); GAL (□); TGA (Δ); TAL (○); GTL (X). La Figura 1A ilustra la inhibición de la proliferación del clon de linfocitos T de ratón MBP-sp-1 específico para el péptido 84-102 de MBP (0,5 g/pocillo). Como control, la proliferación del clon de linfocitos T de ratón MBP-sp-1 estimulado por 84-102 de MBP (SEC ID NO: 1) sin inhibidor fue 21,145 cpm. La Figura 1B ilustra la inhibición de la respuesta del clon GP-25 de linfocitos T humanos al péptido 84-102 de MBP (0,125 g/pocillo). La proliferación del clon de linfocitos T humanos GP-25 estimulada por el péptido 84-102 de MBP (SEC ID NO: 1) sin inhibidor fue 11,442 cpm.

La Figura 2A compara la unión de los presentes polipéptidos con la unión del copolímero 1 a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II DR1 (arriba), DR2 (centro) y DR4 (abajo). La unión por el copolímero 1 (■) se comparó con la unión por los siguientes terpolímeros biotinilados: GAL (□); TGA (▲); GTL (Δ); y TAL (◆). La cantidad de molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II se mantuvo constante a 0,5 μg/muestra y la concentración de polipéptido se varió entre 0-8 μM como se indica sobre el eje y. La unión fue a pH 5,0 durante 40 h a 37 °C. La unión se detectó capturando los complejos de clase II del polipéptido con un anticuerpo LB3.1 y detectando la cantidad de polipéptido biotinilado unido monitorizando la absorbancia a 410 nm después de la reacción con fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina.

La Figura 2B proporciona representaciones de Lineweaver-Burke de los datos de unión proporcionados en la Figura 2A.

La Figura 3 ilustra la inhibición competitiva del copolímero 1 que se une a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II por los presentes polipéptidos. Las moléculas purificadas de HLA-DR1 (arriba), HLA-DR2 (centro) y HLA-DR4 (abajo) se incubaron con una cantidad constante (1,5 μM) de copolímero 1 biotinilado, tanto solo como en presencia de uno de los siguientes polipéptidos no marcados: copolímero 1 (■); GAL (□); TGA (▲); GTL (Δ); y TAL (◆). La inhibición por estos polipéptidos se comparó para inhibición por el antígeno de la proteína básica de mielina 306-318 de HA (○) (SEC ID NO: 2). La unión fue a pH 5,0 durante 40 h a 37 °C. La cantidad de polipéptido no marcado se varió entre 0,1 - 1000 μM, como se indica sobre el eje y. La unión específica se expresa como el porcentaje de inhibición usando la Ecuación 1:

$$\text{porcentaje de inhibición} = 100 - \frac{(\text{señal con competidor} - \text{ruido de fondo})}{(\text{señal sin competidor} - \text{ruido de fondo})} \times 100 \quad 1$$

La Figura 4A ilustra la inhibición competitiva de TAL que se une a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II por los superantígenos bacterianos SEA, SEB y TSST-1. Se incubaron moléculas purificadas de HLA-DR1 (arriba), HLA-DR2 (centro) y HLA-DR4 (abajo) con una cantidad constante de TAL biotinilado, en presencia de cantidades crecientes del superantígeno bacteriano no marcado SEA (□); SEB (■); o TSST-1 (●). La unión fue a pH 5,0 durante 40 h

a 37 °C. La cantidad de superantígeno se varió entre 0,1 - 1000 µM, como se indica sobre el eje y. La unión específica se expresa como el porcentaje de inhibición usando la Ecuación 1.

La Figura 4B ilustra la inhibición competitiva de TGA que se une a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II por los superantígenos bacterianos SEA, SEB y TSST-1. Se incubaron moléculas purificadas de HLA-DR1 (arriba), HLA-DR2 (centro) y HLA-DR4 (abajo) con una cantidad constante del péptido biotinilado TGA, en presencia de cantidades crecientes del superantígeno bacteriano no marcado SEA (□); SEB (■); o TSST-1 (●). La unión fue a pH 5,0 durante 40 h a 37 °C. La cantidad de superantígeno se varió entre 0,1 - 1000 µM, como se indica sobre el eje y. La unión específica se expresa como el porcentaje de inhibición, calculado según la Ecuación 1 anterior.

La Figura 4C ilustra la inhibición competitiva de GAL que se une a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II por los superantígenos bacterianos SEA, SEB y TSST-1. Se incubaron moléculas purificadas de HLA-DR1 (arriba), y HLA-DR2 (abajo) con una cantidad constante de GAL biotinilado, en presencia de cantidades crecientes del superantígeno bacteriano no marcado SEA (□); SEB (■); o TSST-1 (●). La unión fue a pH 5,0 durante 40 h a 37 °C. La cantidad de superantígeno se varió entre 0,1 - 1000 µM, como se indica sobre el eje y. La unión específica se expresa como el porcentaje de inhibición usando la Ecuación 1 anterior.

La Figura 5 muestra la inhibición de la unión de moléculas marcadas a proteínas purificadas de clase II del MHC por terpolímeros de la presente invención. La Fig. 5A muestra la inhibición de la unión a la proteína HLA-DR1 del MHC. La Fig. 5B muestra la inhibición de la unión a la proteína HLA-DR4 del MHC. Competidores no marcados incluyen terpolímeros de la presente invención, péptido 306-318 de hemaglutinina del virus de la gripe (HA) (SEC ID NO: 2) y péptido 261-273 de colágeno tipo II (CII) (SEC ID NO: 3). La concentración de competidor no marcado se indica sobre las abscisas. En cada panel, la inhibición por 261-273 de CII (SEC ID NO: 3) se muestra como círculos blancos (○), la inhibición por 306-318 de HA (SEC ID NO: 2) se muestra por círculos negros (●), la inhibición por uno de los presentes terpolímeros se indica como se muestra por triángulos o cuadrados blancos o negros. El grado de inhibición por GTL se muestra usando triángulos blancos (Δ), por TAL se muestra como triángulos sólidos (▲), por TGA como cuadrados blancos (□), y por el copolímero 1 como cuadrados negros (■). La unión específica observada y mostrada sobre la ordenada se calculó como el porcentaje de inhibición usando la Ecuación 1 anterior.

La Figura 6 muestra la inhibición de la producción de IL-2 por hibridomas de linfocitos T específicos de CII restringidos a DR1 en presencia de diferentes polipéptidos de la presente invención. Células L57.23 irradiadas (fibroblastos transfectados con un gen que codifica HLA-DR1) se co-incubaron por duplicado con el péptido 261-273 de colágeno CII (40 µg/ml) y concentraciones variables, mostradas sobre las abscisas, de uno de los presentes polipéptidos durante 2 h a 37 °C, a continuación se añadieron linfocitos T (clon 3.19 ó 19.3 como se indica), y las mezclas se incubaron adicionalmente durante 24 h a 37 °C. A continuación se extrajeron los sobrenadantes (30 µl) y se ensayaron para la activación por proliferación inducida por IL-2 de linfocitos T citotóxicos dependientes de IL-2 (CTL-L). El grado de inhibición por TAL se muestra como círculos negros (●), por TGA como triángulos negros (▲), por GTL como triángulos blancos (Δ) y por el copolímero 1 como cuadrados negros (■). El porcentaje de inhibición de la proliferación de CTL-L mostrada sobre la ordenada se calculó según la Ecuación 1.

La Figura 7 muestra la inhibición de la producción de IL-2 por hibridomas de linfocitos T específicos de CII restringidos a DR4 (3838 y D3) en presencia de diferentes polipéptidos de la presente invención. La Fig. 7A muestra los efectos de la co-incubación de células Priess 3838 o D3 irradiadas con el péptido 261-273 de colágeno CII (SEC ID NO: 3) a la concentración fija de 40 µg/ml, y con concentraciones variables de cada uno de los presentes polipéptidos, durante 2 h a 37 °C. La Fig. 7B muestra los efectos de incubar células L transfectadas con un gen que codifica HLA-DR4 con el péptido 261-273 de colágeno CII (SEC ID NO: 3) a la concentración fija de 40 µg/ml, y con concentraciones variables de cada uno de los presentes polipéptidos, durante 2 h a 37 °C. A continuación se añadieron linfocitos T (clones 3838 o D3 como se indica), las muestras se incubaron adicionalmente durante 24 h a 37 °C, y los sobrenadantes se ensayaron como se describe en la Figura 6. Cada polipéptido se probó por duplicado. La concentración de los presentes polipéptidos se indica sobre la abscisa. Los mismos símbolos que se usan en la Figura 6 se usan para esta figura.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención en su forma más amplia se define en las reivindicaciones independientes 1 y 8:

1. Uso de una mezcla de polipéptidos que tienen un peso molecular promedio de 2.000 a 40.000 dalton, en el que cada polipéptido consiste en ácido glutámico, tirosina, alanina y lisina, en una cantidad eficaz para tratar un sujeto humano afectado con enfermedad de Crohn para la preparación de una composición farmacéutica que va a administrarse a un sujeto afectado con enfermedad de Crohn para el tratamiento de enfermedad de Crohn.

8. Copolímero 1 para su uso en el tratamiento de enfermedad de Crohn.

Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes 2-7. La divulgación del tratamiento de enfermedades distintas de enfermedad de Crohn en la presente memoria descriptiva es para referencia solo.

Según la presente invención, polipéptidos y péptidos que tienen al menos tres aminoácidos diferentes polimerizados aleatoriamente en una configuración lineal son útiles para tratar enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias se producen cuando el sistema inmunitario ataca inapropiadamente ciertos tejidos o células. Los polipéptidos y péptidos de la presente invención pueden prevenir el ataque del sistema inmunitario, por ejemplo, suprimiendo la proliferación o función de linfocitos T o B responsables del ataque, o protegiendo el tejido del ataque uniendo a una proteína del MHC sobre la superficie de las células que constituyen el tejido.

Los aminoácidos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los 20 aminoácidos que se producen comúnmente. También están incluidos derivados que se producen naturalmente y sintéticos, por ejemplo, selenocisteína. Los aminoácidos incluyen adicionalmente análogos de aminoácidos. Un "análogo" de aminoácido es formas químicamente relacionadas del aminoácido que tienen una configuración diferente, por ejemplo, un isómero, o una configuración D en vez de una configuración L, o una molécula orgánica con el tamaño y forma aproximados del aminoácido, o un aminoácido con modificación a los átomos que participan en el enlace peptídico, de manera que sea resistente a proteasas cuando se polimeriza en un péptido o polipéptido.

Los términos "aminoácido" y "secuencia de aminoácidos", como se definen aquí y en las reivindicaciones, pueden incluir uno o más componentes que son derivados de aminoácidos y/o análogos de aminoácidos que comprenden parte o la totalidad de los residuos para uno cualquiera o más de los 20 aminoácidos que se producen naturalmente indicados por esa secuencia. Por ejemplo, en una secuencia de aminoácidos que tiene uno o más residuos de tirosina, una porción de uno o más de aquellos residuos puede estar sustituida con homotirosina. Además, dentro de esta definición se incluye una secuencia de aminoácidos que tiene uno o más enlaces no peptídicos o peptidomiméticos entre dos residuos adyacentes.

Los códigos de aminoácidos de una letra y de tres letras (y el aminoácido que representa cada uno) son los siguientes: A significa ala (alanina); C significa cys (cisteína); D significa asp (ácido aspártico); E significa glu (ácido glutámico); F significa phe (fenilalanina); G significa gly (glicina); H significa his (histidina); I significa ile (isoleucina); K significa lys (lisina); L significa leu (leucina); M significa met (metionina); N significa asn (asparagina); P significa pro (prolina); Q significa gln (glutamina); R significa arg (arginina); S significa ser (serina); T significa thr (treonina); V significa val (valina); W significa trp (triptófano); e Y significa tyr (tirosina).

El término aminoácido "hidrófobo" se define aquí y en las reivindicaciones como que incluye los aminoácidos alifáticos alanina (A, o ala), glicina (G, o gly), isoleucina (I, o ile), leucina (L, o leu), prolina (P, o pro) y valina (V, o val), siendo los términos entre paréntesis las abreviaturas del código estándar de una letra y de tres letras para cada aminoácido, y los aminoácidos aromáticos triptófano (W, o trp), fenilalanina (F o phe) y tirosina (Y, o tyr). Los aminoácidos confieren hidrofobia en función de la longitud de alifáticas y tamaño de cadenas laterales aromáticas, cuando se encuentran como residuos dentro de una proteína.

El término aminoácido "cargado" se define aquí y en las reivindicaciones como que incluye un aminoácido ácido aspártico (D, o asp), ácido glutámico (E, o glu), histidina (H, o his), arginina (R, o arg) y lisina (K, o lys), que confieren una carga positiva (his, lys y arg) o negativa (asp y gly) a valores fisiológicos de pH en disoluciones acuosas sobre proteínas que contienen estos residuos.

#### Composiciones de polipéptido contempladas por la invención

Los polipéptidos y péptidos de la presente invención comprenden el copolímero 1 y terpolímeros que consiste esencialmente en tres de los cuatro aminoácidos del copolímero 1, concretamente tirosina, ácido glutámico, alanina y lisina. Así, la presente invención contempla adicionalmente sustituciones de aminoácidos conservativas para tirosina, ácido glutámico, alanina y lisina en los presentes polipéptidos. Tales sustituciones conservativas son sustituciones de aminoácidos estructuralmente relacionadas, que incluyen aquellos aminoácidos que tienen aproximadamente la misma carga, hidrofobia y tamaño que la tirosina, ácido glutámico, alanina o lisina. Por ejemplo, la lisina está estructuralmente relacionada con la arginina y la histidina; el ácido glutámico está estructuralmente relacionado con el ácido aspártico; la tirosina está estructuralmente relacionada con la serina, treonina, fenilalanina y triptófano; y la alanina está estructuralmente relacionada con la valina, leucina e isoleucina. Estas y otras sustituciones conservativas, tales como aminoácidos sintéticos estructuralmente relacionados, se contemplan por la presente invención.

Además, los terpolímeros y copéptidos pueden estar compuestos de *l*- o *d*-aminoácidos. Como es sabido por un experto en la materia, los *l*-aminoácidos se producen en la mayoría de las proteínas naturales. Sin embargo, los *d*-aminoácidos están comercialmente disponibles y pueden estar sustituidos con algunos o todos de los aminoácidos usados para preparar los terpolímeros y copéptidos. La presente invención contempla terpolímeros y copéptidos formados a partir de mezclas de *d*- y *l*-aminoácidos, además de terpolímeros y copéptidos coherentemente esencialmente de tanto *l* como *d*-aminoácidos.

Pueden variar el peso molecular promedio y la fracción molar promedio de los aminoácidos en los terpolímeros. Sin embargo, se contempla que un peso molecular promedio oscile de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 40.000

dalton. Un intervalo de pesos moleculares promedio preferido es de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 12.000 dalton. Los copéptidos pueden tener de aproximadamente 7 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 aminoácidos de longitud. Intervalos de peso molecular promedio preferidos y procedimientos de preparación de los terpolímeros se describen en la patente de EE.UU. n° 5.800.808.

En una realización, la presente invención proporciona terpolímeros que contienen tirosina, alanina y lisina. La fracción molar promedio de los aminoácidos en estos terpolímeros puede variar, por ejemplo, la tirosina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,250; la alanina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,6; y la lisina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5. El peso molecular promedio es entre 2.000 y aproximadamente 40.000 dalton y preferentemente entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 35.000 dalton. En una realización más preferida, el peso molecular promedio es aproximadamente 5.000 a aproximadamente 25.000 dalton.

En otra realización, la presente invención proporciona terpolímeros que contienen tirosina, ácido glutámico y lisina. La fracción molar promedio de los aminoácidos en estos polipéptidos también puede variar, por ejemplo, el ácido glutámico puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,300, la tirosina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,250; la lisina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,7. El peso molecular promedio es entre 2.000 y aproximadamente 40.000 dalton y preferentemente entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 35.000 dalton. En una realización más preferida, el peso molecular promedio es aproximadamente 5.000 a aproximadamente 25.000 dalton.

En otra realización, la presente invención proporciona terpolímeros que contienen ácido glutámico, alanina y lisina. La fracción molar promedio de los aminoácidos en estos polipéptidos también puede variar, por ejemplo, el ácido glutámico puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,300, la alanina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,600; la lisina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,7. El peso molecular promedio es entre 2.000 y aproximadamente 40.000 dalton y preferentemente entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 35.000 dalton. En una realización más preferida, el peso molecular promedio es aproximadamente 5.000 a aproximadamente 25.000 dalton.

En otra realización, la presente invención proporciona terpolímeros que contienen tirosina, ácido glutámico y alanina. La fracción molar promedio de los aminoácidos en estos polipéptidos también puede variar, por ejemplo, la tirosina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,250; el ácido glutámico puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,300; y la alanina puede estar presente en una fracción molar de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,800. El peso molecular promedio es entre 2.000 y aproximadamente 40.000 dalton y preferentemente entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 35.000 dalton. En una realización más preferida, el peso molecular promedio es aproximadamente 5.000 a aproximadamente 25.000 dalton.

En una realización más preferida, la fracción molar de aminoácidos de los terpolímeros es aproximadamente la que se prefiere para el copolímero 1. La fracción molar de aminoácidos en el copolímero 1 es ácido glutámico (aproximadamente 0,14), alanina (aproximadamente 0,43), tirosina (aproximadamente 0,10) y lisina (aproximadamente 0,34). El peso molecular promedio más preferido para el copolímero 1 es entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 9.000 dalton.

Las relaciones molares de los monómeros del terpolímero más preferido de ácido glutámico, alanina y tirosina es aproximadamente 0,21 a aproximadamente 0,65 a aproximadamente 0,14.

Las relaciones molares de los monómeros del terpolímero más preferido de ácido glutámico, alanina y lisina es aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,48 a aproximadamente 0,36.

Las relaciones molares de los monómeros del terpolímero más preferido de ácido glutámico, tirosina y lisina es aproximadamente 0,26 a aproximadamente 0,16 a aproximadamente 0,58.

Las relaciones molares de los monómeros del terpolímero más preferido de tirosina, alanina y lisina es aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,54 a aproximadamente 0,35.

En una realización, los terpolímeros y copéptidos de la presente invención pueden unirse a una proteína de clase II del MHC que, preferentemente, está asociada a una enfermedad autoinmunitaria. Puede usarse cualquier procedimiento disponible para determinar si el terpolímero o copéptido se une a una o más proteínas de clase II del MHC. Por ejemplo, el polipéptido puede marcarse con una molécula indicadora (tal como un radionúclido o biotina), mezclarse con una preparación en bruto o pura de proteína de clase II del MHC y la unión se detecta si la molécula indicadora se adhiere a la proteína de clase II del MHC después de eliminar el polipéptido no unido.

En otra realización, los terpolímeros y copéptidos de la invención pueden unirse a una proteína de clase II del MHC asociada a esclerosis múltiple. Un polipéptido de esta realización puede tener afinidad similar o mayor por el surco de unión al antígeno de una proteína de clase II del MHC asociada a esclerosis múltiple que el copolímero 1. Por tanto, el polipéptido contemplado puede inhibir la unión de o desplazar la unión de autoantígenos de mielina de la proteína de clase II del MHC. Una proteína de clase II del MHC asociada a esclerosis múltiple es HLA-DR4 (DRB1\*1501).

En otra realización, el copolímero 1, los terpolímeros y los copéptidos de la invención pueden unirse a una proteína de clase II del MHC asociada a una afección artrítica, por ejemplo, artritis reumatoide u osteoartritis. El copolímero 1, un terpolímero o copéptido de esta realización, puede tener una mayor afinidad por el surco de unión al antígeno de una proteína de clase II del MHC asociada a enfermedad autoinmunitaria que un péptido 261-273 de colágeno tipo II (SEC ID NO: 3). Por tanto, el copolímero 1 contemplado, terpolímeros o copéptidos pueden inhibir la unión de o desplazar el péptido 261-273 de colágeno tipo II del surco de unión al antígeno de una proteína de clase II del MHC. La proteína de clase II del MHC consiste en subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de aproximadamente igual tamaño, ambas de las cuales son proteínas transmembrana. Se forma una hendidura de unión al péptido por partes de los extremos amino de tanto subunidades  $\alpha$  como  $\beta$ . Esta hendidura de unión al péptido es el sitio de presentación del antígeno a linfocitos T. Hay al menos tres tipos de moléculas del MHC de clase II: moléculas de HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. También hay numerosos alelos que codifican cada tipo de estas moléculas de HLA. Las moléculas del MHC de clase II se expresan predominantemente sobre las superficies de linfocitos B y células presentadoras de antígeno tales como macrófagos.

Los copéptidos de la presente invención son péptidos sintéticos de al menos siete residuos de aminoácidos de longitud y que pueden unirse a una proteína de clase II del MHC asociada a una enfermedad autoinmunitaria. El copéptido puede incluir una alanina del extremo amino, y la secuencia está seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en alanina - ácido glutámico - lisina - tirosina - alanina (AEKYA) (SEC ID NO: 4); alanina - ácido glutámico - lisina - valina - alanina (AEKVA) (SEC ID NO: 5); alanina - ácido glutámico - lisina - fenilalanina - alanina (AEKFA) (SEC ID NO: 6); lisina - ácido glutámico - tirosina - alanina (KEYA) (SEC ID NO: 7); lisina - tirosina - alanina - ácido glutámico (KYAE) (SEC ID NO: 8); lisina - ácido glutámico - valina - alanina (KEVA) (SEC ID NO: 9); lisina - valina - alanina - ácido glutámico (KVAE) (SEC ID NO: 10); lisina - ácido glutámico - fenilalanina - alanina (KEFA) (SEC ID NO: 11); lisina - fenilalanina - alanina - ácido glutámico (KFAE) (SEC ID NO: 12); lisina - tirosina - alanina - alanina (KYAA) (SEC ID NO: 13); lisina - lisina - tirosina - alanina (KKYA) (SEC ID NO: 14); lisina - valina - alanina - alanina (KVAA) (SEC ID NO: 15); lisina - lisina - valina - alanina (KKVA) (SEC ID NO: 16); lisina - fenilalanina - alanina - alanina (KFAA) (SEC ID NO: 17); y lisina - lisina - fenilalanina - alanina (KKFA) (SEC ID NO: 18). En esta realización, el péptido puede comprender además dos residuos de alanina, y la secuencia puede seleccionarse del grupo o secuencias que consisten en alanina - lisina - tirosina - alanina - ácido glutámico (AKYAE) (SEC ID NO: 19); ácido glutámico - alanina - lisina - tirosina - alanina (EAKYA) (SEC ID NO: 20); alanina - lisina - valina - alanina - ácido glutámico (AKVAE) (SEC ID NO: 21); ácido glutámico - alanina - lisina - valina - alanina (EAKVA) (SEC ID NO: 22); alanina - lisina - fenilalanina - alanina - ácido glutámico (AKFAE) (SEC ID NO: 23); y ácido glutámico - alanina - lisina - fenilalanina - alanina (EAKFA) (SEC ID NO: 24).

En otra realización, el polipéptido es un copéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- AKEYAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 25)
- AAEYAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 26)
- AAKYAEAAAAKAAAA (SEC ID NO: 27)
- EAKYAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 28)
- AEKYAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 29)
- KEAYAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 30)
- AEEYAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 31)
- EKAYAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 32)
- AAKYEAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 33)
- EAAKYAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 34)
- EKKYAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 35)
- AKKYEAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 36)
- AAEYKAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 37)
- AAKYEAAAAAAKAAAA (SEC ID NO: 38)

AAKYAEAAAAAAAAA (SEC ID NO: 39)

AEYAKAAAAAAAAA (SEC ID NO: 40)

AEKAYAAAAAAAAA (SEC ID NO: 41)

AYKAEAAAAAAAAA (SEC ID NO: 42) y

5 AKYAEAAAAAAAAA (SEC ID NO: 43),

en la que el péptido tiene alta afinidad por una proteína de clase II del MHC.

Todavía otro realización de la invención es un copéptido que tiene cualquiera de las secuencias precedentes en las que la tirosina (Y) se ha sustituido con valina (F) o fenilalanina (F).

10 Otra realización de la invención proporciona un copéptido con una secuencia de aminoácidos que puede inhibir la respuesta inmunitaria a un autoantígeno en un mamífero, en el que la identidad y posición de al menos un aminoácido en la secuencia de polipéptidos se corresponde con la identidad y posición de al menos un aminoácido en la ranura de unión al péptido de una proteína de clase II del MHC (en esta realización, el copéptido puede contener otros aminoácidos como se indica más adelante). Para tratar esclerosis múltiple o artritis reumatoide, la proteína de clase II del MHC puede seleccionarse del grupo que consiste en una proteína HLA-DR1, una proteína HLA-DR4 o una proteína HLA-DR2. En una  
15 realización preferida, la identidad y posición de al menos un aminoácido en el polipéptido se corresponde con la identidad y posición de un aminoácido en el sitio P1 del surco de unión al péptido de clase II del MHC. Más preferentemente, el copéptido tiene una tirosina, una valina o una fenilalanina correspondiente a la posición del sitio P1 del surco de unión al péptido de clase II del MHC. Esta realización proporciona además una composición de copéptido en la que el residuo de aminoácido correspondiente al primer aminoácido del sitio P1 en el surco de unión al péptido de clase II del MHC es  
20 alanina. La realización proporciona además un péptido, en el que el aminoácido que se corresponde con el octavo aminoácido del sitio P1 en el surco de unión al péptido de clase II del MHC es lisina o alanina, y el residuo de aminoácido que se corresponde con el sitio P1 es tirosina, valina o fenilalanina.

Otro ejemplo de la presente invención proporciona una composición que contiene un primer copéptido y un segundo copéptido en la que el primer copéptido tiene una lisina y el segundo copéptido tiene una alanina en la posición de  
25 aminoácido correspondiente al octavo aminoácido más allá del sitio P1 en el surco de unión al péptido de clase II del MHC.

Los presentes terpolímeros y copéptidos pueden formularse en composiciones farmacéuticas que contienen un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, edulcorantes y similares. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de un amplio intervalo de materiales que incluyen, pero no se limitan a, aromatizantes, edulcorantes y diversos materiales tales como tampones y absorbentes que pueden necesitarse con el fin de preparar una composición terapéutica particular. El uso de tales medios y agentes con sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se  
35 contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos adicionales en las composiciones.

Las presentes composiciones pueden formularse como una disolución o suspensión inyectable, una disolución en spray o una suspensión.

Procedimientos terapéuticos contemplados por la invención

40 La presente invención proporciona además procedimientos de tratamiento y prevención de enfermedades autoinmunitarias en un mamífero que incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que tiene un polipéptido que contiene al menos tres aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos que comprenden el copolímero 1, concretamente ácido glutámico, tirosina, lisina y alanina, en los que los aminoácidos seleccionados están aleatoriamente polimerizados en una configuración lineal. En una realización, el  
45 polipéptido es el copolímero 1 o un terpolímero.

Las enfermedades autoinmunitarias contempladas por la presente invención incluyen cualquier enfermedad medicadas por células (por ejemplo, linfocitos T) o trastornos mediados por anticuerpos (por ejemplo, linfocitos B). Tales trastornos pueden ser, entre otros, afecciones artríticas, enfermedades desmielinizantes y enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse por los presentes polipéptidos incluyen esclerosis múltiple,  
50 anemia hemolítica autoinmune, ooforitis autoinmune, tiroiditis autoinmune, uveoretinitis autoinmune, enfermedad de Crohn, púrpura trombocitopénica inmune crónica, colitis, enfermedad de sensibilidad por contacto, diabetes mellitus, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, mixedema idiopático, miastenia grave,

psoriasis, pénfigo vulgar, artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico, las presentes composiciones pueden usarse para tratar una o más de estas enfermedades.

El término "afección artrítica", como se usa en el presente documento, es una afección en la que al menos un síntoma de la artritis reumatoide se observa en al menos una articulación de un mamífero, por ejemplo, en un hombro, rodilla, cadera, esqueleto o un dedo del mamífero. Ejemplos de afecciones artríticas incluyen "poliartritis", que es una afección artrítica que afecta a más de una única articulación; "artritis juvenil", una afección artrítica de seres humanos por debajo de la edad de 21; y síndrome de Felty, que puede incluir los síntomas de neutropenia, esplenomegalia, pérdida de peso, anemia, linfadenopatía y manchas de pigmento sobre la piel.

En una realización, cualquier enfermedad autoinmunitaria puede tratarse por los presentes polipéptidos, mientras que el polipéptido contemplado se una a una proteína de clase II del MHC que se ha asociado a la enfermedad autoinmunitaria. Un aspecto de esta realización proporciona un procedimiento que incluye seleccionar un polipéptido que inhibe la unión de un péptido antigénico a una proteína de clase II del MHC, por ejemplo, un procedimiento en el que la etapa (a) comprende además seleccionar el heteropolímero que inhibe las respuestas de linfocitos T específicos de clase II a un complejo de proteína de clase II del MHC-péptido, y un procedimiento en el que el péptido antigénico está asociado a una enfermedad autoinmunitaria; en otra realización de la invención se proporciona un procedimiento en el que la proteína de clase II del MHC está asociada a una enfermedad autoinmunitaria.

En otra realización, el procedimiento de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un mamífero implica adicionalmente inhibir la proliferación o función de linfocitos T que son sensibles a un autoantígeno. La AR es una enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos T que puede tratarse con los presentes polipéptidos. El proceso patológico de las enfermedades autoinmunitarias y el rechazo inmunitario está mediado por linfocitos T. Tras la unión y reconocimiento de un antígeno, los linfocitos T proliferan, secretan citocinas y reclutan células inflamatorias y citotóxicas adicionales al sitio. Los presentes polipéptidos previenen la proliferación de linfocitos T y las funciones de linfocitos T tales como secreción de citocinas y reclutamiento de células inflamatorias y citotóxicas al sitio. Cuando la enfermedad autoinmunitaria es una afección artrítica, el autoantígeno puede ser colágeno, y los presentes polipéptidos pueden inhibir la proliferación y función de linfocitos T sensibles al colágeno.

En otra realización, el procedimiento de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un mamífero implica unir el polipéptido a una célula presentadora de antígeno tal como un macrófago, una célula dendrítica de tejido linfoide o una célula epidérmica. La proliferación y funciones de un linfocito T se activan cuando un antígeno apropiado se presenta a él. Uniéndose a células presentadoras de antígeno, los presentes polipéptidos pueden bloquear o interferir de otro modo con la activación de linfocitos T.

En otra realización más, el procedimiento de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un mamífero implica unir el polipéptido a una proteína de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad que está asociada a una enfermedad autoinmunitaria. Las proteínas de clase II del MHC se expresan predominantemente sobre las superficies de linfocitos B y células presentadoras de antígeno tales como macrófagos. Estas proteínas de clase II del MHC tienen una hendidura de unión al péptido que es el sitio en el que los péptidos antigénicos se presentan a linfocitos T. Cuando los presentes polipéptidos se unen a una proteína de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, aquellos polipéptidos pueden bloquear o interferir de otro modo con la presentación de antígeno y/o activación de linfocitos T.

En otra realización, el procedimiento de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un mamífero implica unir el polipéptido a anticuerpos para linfocitos B reactivos con el copolímero 1 y/o linfocitos T reactivos con el copolímero 1. Los linfocitos T  $T_H2/3$  reactivos con el copolímero 1 facilitan los efectos terapéuticos del copolímero 1. Cuando se unen a linfocitos T reactivos con el copolímero 1, los presentes polipéptidos estimulan aquellos linfocitos T para proliferar, secretar citocinas antiinflamatorias y potenciar los beneficios terapéuticos del tratamiento por los presentes procedimientos. Según la presente invención, los presentes polipéptidos también se unen a anticuerpos reactivos con autoantígenos que pueden bloquear el ataque del anticuerpo al tejido diana, ayudando así a prevenir el progreso de la enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, cuando los presentes polipéptidos están unidos a anticuerpos específicos para MBP, aquellos anticuerpos pueden no unirse a MBP y así conducir a la destrucción de MBP en la vaina de mielina.

Los presentes polipéptidos pueden administrarse por cualquier vía conveniente. En una realización, los presentes polipéptidos y péptidos pueden administrarse mediante inyección para facilitar la administración a los tejidos afectados por la enfermedad autoinmunitaria. Así, los presentes péptidos y polipéptidos pueden, por ejemplo, inyectarse, ingerirse, inhalarse o aplicarse tópicamente. Los polipéptidos objeto pueden incorporarse en una crema, disolución o suspensión para administración tópica. Los presentes polipéptidos se administran preferentemente por vía oral, tópicamente o mediante inyección sin adición de un adyuvante.

Kits útiles de la invención

Otra realización de la invención proporciona un kit para ensayar la unión de un analito a una proteína del MHC, que incluye una proteína del MHC soluble en agua que se ha producido recombinantemente en una célula no de mamífero, y

un medio para la detección del analito unido sobre la proteína del MHC, e instrucciones para su uso. La proteína del MHC usada en el kit es una proteína de clase II del MHC seleccionada del grupo que consiste en una proteína HLA-DR1 de clase II del MHC, una proteína HLA-DR2 de clase II del MHC y una proteína HLA-DR4 de clase II del MHC. El kit puede comprender además un péptido autoantigénico.

- 5 En una realización preferida, la proteína de clase II del MHC se produce en una célula de invertebrado o una microbiana, tal como una célula de insecto o una célula de levadura y, por tanto, carece de péptido unido en la hendidura del antígeno. El medio para detectar la unión del analito a la proteína del MHC puede ser cualquier medio radiactivo, fluorimétrico, quimioluminiscente, enzimático o colorimétrico conocido para un experto habitual en la materia. En una realización preferida, la proteína del MHC es una proteína HLA-DR1 o HLA-DR4 de clase II. Además, el kit también puede incluir un péptido autoantigénico, tal como un péptido de colágeno II, o un péptido derivado de proteína básica de mielina, proteína de oligodendrita de mielina, o un péptido de alguna otra proteína que participa en una enfermedad autoinmunitaria.

#### Síntesis de los terpolímeros de la invención

- 15 Los terpolímeros pueden prepararse por cualquier procedimiento disponible para un experto en la materia. Por ejemplo, los terpolímeros pueden prepararse bajo condiciones de condensación usando la fracción molar deseada de aminoácidos en disolución o por procedimientos de síntesis en fase sólida. Las condiciones de condensación incluyen condiciones de temperatura, pH y de disolvente apropiadas para condensar el grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro aminoácido para formar un enlace peptídico. Pueden usarse agentes de condensación, por ejemplo, dicitlohexit-carbodiimida, para facilitar la formación del enlace peptídico. Pueden usarse grupos de bloqueo para proteger grupos funcionales, tales como los restos de la cadena lateral y algunos de los grupos amino o carboxilo, de reacciones laterales no deseadas.

- 20 Por ejemplo, el procedimiento desvelado en la patente de EE.UU. 3.849.550 puede usarse cuando los N-carboxianhídridos de tirosina, alanina, glutamato de  $\gamma$ -bencilo y N-trifluoroacetil-lisina se polimerizan a temperatura ambiente en dioxano anhidro con dietilamina como iniciador. El grupo  $\gamma$ -carboxilo del ácido glutámico puede desbloquearse por bromuro de hidrógeno en ácido acético glacial. Los grupos trifluoroacetilo se eliminan de la lisina por piperidina 1 molar. Un experto en la materia entiende fácilmente que el procedimiento puede ajustarse para preparar péptidos y polipéptidos que contienen los aminoácidos deseados, por ejemplo, solo tres de los cuatro aminoácidos en el copolímero 1 eliminando selectivamente las reacciones que se refieren a uno cualquiera de ácido glutámico, alanina, tirosina o lisina. Para los fines de la solicitud, el término "temperatura ambiente" significa una temperatura que oscila de aproximadamente 20 a aproximadamente 26 grados centígrados ( $^{\circ}\text{C}$ ).

- 30 El peso molecular promedio de los terpolímeros puede ajustarse durante la síntesis de los polipéptidos o después de haberse preparado los terpolímeros. Para ajustar el peso molecular promedio durante la síntesis de los polipéptidos, las condiciones sintéticas o las cantidades de aminoácidos se ajustan de manera que la síntesis se pare cuando el polipéptido alcance la longitud aproximada que se desea. Después de la síntesis, los polipéptidos con el peso molecular promedio deseado pueden obtenerse por cualquier procedimiento de selección de tamaño disponible, por ejemplo, cromatografía de los polipéptidos sobre una columna o gel de exclusión de peso molecular, y recogida de los intervalos de peso molecular promedio deseados. Los presentes polipéptidos también pueden hidrolizarse parcialmente para eliminar especies de alto peso molecular, por ejemplo, por hidrólisis ácida o enzimática, y a continuación purificarse para eliminar el ácido o enzimas.

- 40 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de terpolímeros con un peso molecular promedio deseado que incluye hacer reaccionar un polipéptido protegido con ácido bromhídrico para formar el polipéptido que tiene el perfil de peso molecular promedio deseado. La reacción se realiza durante un tiempo y a una temperatura que está predeterminada por una o más reacciones de prueba. Durante las reacciones de prueba, el tiempo y las temperaturas se varían y se determina el intervalo de peso molecular promedio de un lote dado de polipéptidos de prueba. Las condiciones de prueba que proporcionan el intervalo de peso molecular promedio óptimo para ese lote de polipéptidos se usan para el lote. Así, los polipéptidos que tienen el perfil de peso molecular promedio deseado pueden producirse mediante un procedimiento que incluye hacer reaccionar el polipéptido protegido con ácido bromhídrico durante un tiempo y a una temperatura predeterminada por la reacción de prueba.

- 45 En una realización preferida, una muestra de prueba de polipéptido protegido de un lote dado se hace reaccionar con ácido bromhídrico durante aproximadamente 10-50 horas a una temperatura de aproximadamente 20-28  $^{\circ}\text{C}$ . Las mejores condiciones para ese lote se determinan realizando varias reacciones de prueba. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido protegido se hace reaccionar con ácido bromhídrico durante aproximadamente 17 horas a una temperatura de aproximadamente 26  $^{\circ}\text{C}$ .

- 55 Los ejemplos que siguen describen la invención en detalle con respecto a mostrar cómo ciertas realizaciones representativas específicas de los mismos pueden prepararse, entendiéndose los materiales, aparato y etapas de procedimiento como ejemplos que pretenden ser ilustrativos solo. En particular, la invención no pretende limitarse a los

procedimientos, materiales, condiciones, parámetros de proceso, aparato y similares específicamente citados en el presente documento.

## EJEMPLO I

### PREPARACIÓN DE POLIPÉPTIDOS

#### 5 Preparación de polipéptidos protegidos

Se preparan polipéptidos protegidos como se describe por Teitelbaum y col., usando los aminoácidos bloqueados con N-carboxianhídrido (NCA) tirosina, alanina, ácido glutámico y trifluoroacetil-lisina disueltos en dioxano. 1 EUR. J. IMMUN. 242 (1971). El grupo carboxilato sobre el ácido glutámico se bloquea con un grupo bencilo (BZ).

10 El procedimiento de polimerización se inicia mediante la adición de 0,01 - 0,02 % de dietilamina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 20 horas y a continuación se vierte en agua. El producto de polipéptido protegido se filtra, se lava con agua y se seca. La eliminación de los grupos de bloqueo  $\gamma$ -bencilo del residuo de glutamato se lleva a cabo tratando el polipéptido protegido con 33 % de ácido bromhídrico en ácido acético glacial a temperatura ambiente durante 6-12 horas con agitación. El producto se vierte en agua en exceso, se filtra, se lava y se seca, dando el polipéptido protegido.

#### 15 Preparación de polipéptidos con peso molecular $7.000 \pm 2.000$ Da

El tratamiento de polipéptidos de  $\gamma$ -bencilo protegidos con 33 % de HBr en ácido acético no solo asegura la eliminación del grupo protector bencilo del  $\gamma$ -carboxilato del residuo de glutamato, sino que también escinde los polipéptidos en polipéptidos más pequeños.

20 El tiempo necesario para obtener un polipéptido de peso molecular  $7.000 \pm 2.000$  dalton depende de la temperatura de reacción y el tamaño del polipéptido protegido. A temperaturas de entre 20 °C a 28 °C se realiza una reacción de prueba en cada lote durante diferentes periodos de tiempos, por ejemplo, de 10-50 horas. Se dibuja una curva de peso molecular promedio obtenida con el tiempo. El tiempo necesario para obtener el peso molecular  $7.000 \pm 2.000$  Da se calcula a partir de la curva y la reacción se realiza a mayor escala. En promedio, a 26 °C, el periodo de tiempo para obtener una mezcla de polipéptidos con un peso molecular de  $7.000 \pm 2.000$  Da es 17 horas. El producto se vierte en agua en exceso, se filtra, se lava y se seca, dando un polipéptido con un intervalo de pesos moleculares promedio deseado.

#### 25 Preparación de polipéptidos que contienen lisina de baja toxicidad

30 Se dispersa el polipéptido de trifluoroacetilo protegido (20 g) en 1 litro de agua y se añaden 100 g de piperidina. La mezcla se agita durante 24 horas a temperatura ambiente y se filtra. La disolución del polipéptido en bruto se distribuye en bolsas de diálisis y se dializa a 10-20 °C en agua hasta que se obtiene pH 8. La disolución de polipéptido se dializa en 0,3 % de ácido acético y a continuación de nuevo en agua hasta que se obtiene pH 5,5 a 6,0. Esta disolución se concentra a continuación y se liofiliza a sequedad.

#### Síntesis de: TGA de peso molecular 7.600, poli[L-Tyr<sup>0,136</sup>, L-Glu<sup>0,21</sup>, L-Ala<sup>0,648</sup>]

##### 1) Materiales de partida:

L-Ala-NCA	18,74 g
L-Tyr-NCA	6,5 g
5-BZ-L-Glu-NCA	13 g
Dietilamina	0,165 g
Dioxano	790 ml
Hbr/AcOH (33 %)	480 ml
Fenol	4,8 g
Piperidina	13,2 ml
Agua desionizada	
Ácido acético	

##### 2) Procedimiento:

Se dispone L-Tyr-NCA (6,5 g) en dioxano (211 ml) y se calienta a 60 °C durante 10 min, a continuación se filtra. Se dispone 5-BZ-L-Glu-NCA (13 g) en dioxano (226 ml) y se agita a 20-25 °C durante 10 min, a continuación se filtra. Se dispone L-Ala-NCA (18,74 g) en dioxano (350 ml) y se agita a 20-25 °C durante 10 min, a continuación se filtra.

5 Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con la disolución de L-Tyr-NCA, la disolución de 5-BZ-L-Glu-NCA y la disolución de L-Ala-NCA. Se introduce dietilamina (0,165 g) en dioxano (2,5 ml) a la mezcla de reacción y se agita a 20-25 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se añade a agua desionizada (1 l), se filtra y se seca a 60 °C a vacío. Rendimiento - 25,8 g.

10 Una disolución de fenol (4,8 g) en Hbr/AcOH (33%; 480 ml) se agita durante 20 horas. Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con una disolución de Hbr/AcOH, poli[5-BZ-L-Glu,L-Ala,L-L-Tyr] y se agita a  $26 \pm 1$  °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se añade a agua desionizada (2 l) y se agita durante 1 hora. El precipitado se filtra y se lava con agua desionizada hasta que el pH es 6. El producto se seca en una estufa de aire con circulación a 40 °C, durante aproximadamente 40 horas. Rendimiento - 24 g.

15 Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con una piperidina (13,2 ml), agua desionizada (1200 ml) y poli[L-Glu,L-Ala,L-L-Tyr], a continuación se agita a 20-25 °C durante 24 horas. La disolución resultante se ultrafiltra a través de membranas de poliétersulfona con un corte de 5000 dalton hasta que se eliminan dos tercios del volumen original. El volumen original se restaura mediante la adición de agua desionizada fresca. El procedimiento se repite 5 veces, hasta que el contenido de impurezas es inferior al 1 % por HPLC. La disolución resultante (a volumen completo) se acidifica hasta pH 4,4 con ácido acético. La disolución se ultrafiltra a pH 5,5-6 y el volumen se reduce a un tercio. La disolución resultante se liofiliza a sequedad.

## 20 **Síntesis de GAL de peso molecular 8850, poli[L-Glu<sup>0,153</sup>,L-Ala<sup>0,479</sup>,L-Lys<sup>0,365</sup>]**

### 1) Materiales de partida

L-Ala-NCA	14 g
N6-TFA-L-Lys-NCA	22,9 g
5-BZ-L-Glu-NCA	9,8 g
Dietilamina	0,12 g
Dioxano	850 ml
Hbr/AcOH (33 %)	480 ml
Fenol	4,8 g
Piperidina	13,2 ml
Agua desionizada	
Ácido acético	

### 2) Procedimiento

25 Se agita N6-TFA-L-Lys-NCA (22,9 g) en dioxano (420 ml) a 20-25 °C durante 10 min y se filtra. Se agita 5-BZ-L-Glu-NCA (9,8 g) en dioxano (170 ml) a 20-25 °C durante 10 min y se filtra. Se agita L-Ala-NCA (14 g) en dioxano (260 ml) a 20-25 °C durante 10 min y se filtra. Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con la disolución de N6-TFA-L-Lys-NCA, la disolución de 5-BZ-L-Glu-NCA y la disolución de L-Ala-NCA. Se añade dietilamina (0,12 g) en dioxano (2,5 ml) y la mezcla de reacción se agita a 20-25 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se añade a agua desionizada (1 l), se filtra y se seca a 60 °C a vacío.

30 Se agita una disolución de fenol (4,8 g) en Hbr/AcOH (33 %; 480 ml) durante 20 horas. Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con una disolución de Hbr/AcOH, poli[5-BZ-L-Glu,L-Ala,N6-TFA-L-Lys] (24 g) y se agita a  $26 \pm 1$  °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se añade a agua desionizada (2 l) y se agita durante 1 hora. El precipitado se filtra y se lava con agua desionizada hasta que el pH=6. El producto se seca en una estufa de aire con circulación a 40 °C, aproximadamente 40 horas.

35 Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con piperidina (13,2 ml), agua desionizada (1200 ml) y poli[L-Glu,L-Ala,N6-TFA-L-Lys] (24 g) y se agita a 20-25 °C durante 24 horas. La disolución se ultrafiltra a través de membranas de poliétersulfona con un corte de 5000 dalton hasta que se eliminan dos tercios del volumen original. El volumen original se restaura mediante la adición de agua desionizada fresca. El procedimiento se repite 5 veces, hasta

que el contenido de impurezas es inferior al 1 % (por HPLC). La disolución resultante (a volumen completo) se acidifica hasta pH 4,4 con ácido acético. La disolución se ultrafiltra hasta que el pH es 5,5-6 y el volumen se reduce a un tercio. La disolución resultante se liofiliza a sequedad.

**Síntesis de TGL de peso molecular 11.050, poli[L-Tyr<sup>0,162</sup>, L-Glu<sup>0,259</sup>, L-Lys<sup>0,579</sup>]**

5 1) Materiales de partida

5-BZ-L-Glu-NCA	10,34 g
N6-TFA-L-Lys-NCA	24,16 g
L-Tyr-NCA	5,2 g
Dietilamina	0,095 g
Dioxano	810 ml
Hbr/AcOH (33 %)	460 ml
Fenol	4,6 g
Piperidina	150 ml
Agua desionizada	
Ácido acético	

2) Procedimiento

Se calienta L-Tyr-NCA (5,2 g) en dioxano (180 ml) a 60 °C durante 10 min y se filtra. Se agita N6-TFA-L-Lys-NCA (24,16 g) en dioxano (450 ml) a 20-25 °C durante 10 min y se filtra. Se agita 5-BZ-L-Glu-NCA (10,35 g) en dioxano (180 ml) a 20-25 °C durante 10 min y se filtra.

10 Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con la disolución de N6-TFA-L-Lys-NCA, la disolución de L-Tyr-NCA y la disolución de 5-BZ-L-Glu-NCA. Se introduce dietilamina (0,095 g) en dioxano (2,5 ml), y la mezcla de reacción se agita a 20-25 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se añade a agua desionizada (0,7 l), se filtra y se seca a 60 °C a vacío.

15 Una disolución de fenol (4,6 g) en Hbr/AcOH (33 %; 460 ml) se agita durante 20 horas. Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con la disolución de HB/r/AcOH y poli[5-BZ-L-Glu, L-Tyr, N6-TFA-L-Lys]. Esta mezcla se agita a 26 ± 1 °C durante 16 horas y a continuación la mezcla se añade a agua desionizada (1,5 l) y se agita durante ½ hora. El precipitado se filtra y se lava con agua desionizada hasta que el pH es 5,5.

20 Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con una piperidina (150 ml), agua desionizada (1400 ml) y poli[L-Glu, L-Tyr, N6-TFA-L-Lys] (50 g) y se agita a 20-25 °C durante 24 horas. La disolución resultante de poli[L-Glu, L-Tyr, L-Lys] se ultrafiltra a través de membranas de poliétersulfona con un corte de 5000 dalton hasta que se eliminan dos tercios del volumen original. El volumen original se restaura mediante la adición de agua desionizada fresca. El procedimiento se repite 5 veces, hasta que el contenido de impurezas es inferior al 1 % (por HPLC). La disolución resultante (a volumen completo) se acidifica hasta pH 4,2 con ácido acético. La disolución se ultrafiltra a un pH de 5,5-6 y el volumen se reduce a un tercio. La disolución resultante se liofiliza a sequedad.

25 **Síntesis de TAL de peso molecular 20.000, poli[L-Tyr<sup>0,102</sup>, L-Ala<sup>0,542</sup>, L-Lys<sup>0,353</sup>]**

1) Materiales de partida

L-Ala-NCA	14 g
N6-TFA-L-Lys-NCA	22,9 g
L-Tyr-NCA	4,9 g
Dietilamina	0,1 g
Dioxano	850 ml
Hbr/AcOH (33 %)	500 ml

Fenol	5 g
Piperidina	162 ml
Agua desionizada	
Ácido acético	

## 2) Procedimiento

Se calienta L-Tyr-NCA (4,9 g) en dioxano (170 ml) a 60 °C durante 10 min y se filtra. Se agita N6-TFA-L-Lys-NCA (22,9 g) en dioxano (417 ml) a 20-25 °C durante 10 min y se filtra. Se agita L-Ala-NCA (14 g) en dioxano (260 ml) a 20-25 °C durante 10 min y se filtra.

- 5 Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con la disolución de N6-TFA-L-Lys-NCA, la disolución de Tyr-NCA en dioxano y la disolución de L-Ala-NCA. Se introduce dietilamina (0,1 g) en dioxano (2 ml) y la mezcla se agita a 20-25 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción se añade a continuación a agua desionizada (1 l), se filtra y se seca a 60 °C a vacío.

- 10 Una disolución de fenol (5 g) en HBr/AcOH (33 %; 500 ml) se agita durante 20 horas. Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con la disolución de HB/r/AcOH y poli[L-Ala,L-Tyr,N6-TFA-L-Lys] y se agita a  $26 \pm 1$  °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se añade a continuación a agua desionizada (2 l) y se agita durante ½ hora. El precipitado se filtra y se lava con agua desionizada hasta que el pH es 5,5.

- 15 Un Erlenmeyer de 2 l equipado con un agitador magnético se carga con una piperidina (162 ml), agua (1500 ml) y poli[L-Ala,L-Tyr,N6-TFA-L-Lys] (30 g) y se agita a 20-25 °C durante 24 horas. La disolución resultante de poli[L-Ala,L-Tyr,L-Lys] se ultrafiltra a través de membranas de poliétersulfona con un corte de 5000 dalton hasta que se eliminan dos tercios del volumen original. El volumen original se restaura mediante la adición de agua desionizada fresca. El procedimiento se repite 5 veces, hasta que el contenido de impurezas es inferior al 1 % (por HPLC). La disolución resultante (a volumen completo) se acidifica hasta pH 4,4 con ácido acético. La disolución se ultrafiltra a pH 5,5-6 y el volumen se reduce a un tercio. La disolución resultante se liofiliza a sequedad.

## 20 EJEMPLO 2

### POLIPÉPTIDOS DE BAJO PESO MOLECULAR

#### Pruebas *in vivo*

- 25 Tres lotes del copolímero 1 que tienen un peso molecular promedio de 7,3 y 8,4 KDa (menos del 2,5 % de las especies del copolímero 1 por encima de 40 KDa) y 22 KDa (más del 5 % de las especies del copolímero 1 por encima de 40 KDa) se sometieron a la prueba de toxicidad descrita más adelante. Se usaron cinco ratones en cada grupo experimental.

#### Procedimiento

- 30 El copolímero 1 se disuelve en agua destilada dando una disolución de 2 mg/ml del principio activo. Cada ratón se inyecta con 0,5 ml de la disolución de prueba en la vena lateral de la cola. Los ratones se observaron para mortalidad y signos clínicos relevantes durante un periodo de 48 horas. Las observaciones se registraron 10 minutos, 24 horas y 48 horas después de la inyección. Si, al final de 48 horas, todos los animales estaban vivos y no se observaron signos adversos, entonces el lote se designa "no tóxico". Si, sin embargo, uno o más de los ratones habían muerto o habían mostrado signos adversos, entonces el lote se designa "tóxico".

#### Resultados

- 35 Tres de los cinco ratones murieron después de 48 horas cuando se trataron con los polipéptidos del copolímero 1 de peso molecular promedio 22 kDa. Por consiguiente, este lote de alto peso molecular promedio se designa "tóxico". Los lotes del copolímero 1 que tienen pesos moleculares promedio de 7,3 y 8,4 KDa se designaron ambos "no tóxicos".

**Pruebas de desgranulación de células de leucemia basófila en ratas *in vivo***

La liberación de histamina (o serotonina) de basófilos es un modelo *in vitro* de hipersensibilidad inmediata. La línea de células de leucemia basófila en ratas, RBL-2H<sub>o</sub>, es uniforme y fácil de mantener en cultivo, pero es un sistema altamente sensible y reproducible para probar la desgranulación. E.L. Basumian y col., 11 Eur. J. IMMUNOL. 317 (1981). El estímulo fisiológico para la liberación de histamina implica la unión del antígeno a moléculas de IgE unidas a la membrana, que desencadena una compleja cascada química. La desgranulación se induce por estímulos no mediados por IgE, que incluyen diversos péptidos y polímeros sintéticos, por ejemplo, polilisina. R.P. Siraganian, TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES 432 (Oct. de 1983). La prueba de desgranulación de RBL se usa, por tanto, para cribar aquellos lotes de COP-1 que provocan desgranulación sustancial y así podrían provocar efectos secundarios locales y/o sistémicos no deseables.

**Procedimiento**

Se cargan células de leucemia basófila en ratas (RBL-2H<sub>o</sub>) con [H<sup>3</sup>]-serotonina, seguido de incubación con 100 µg de la COP-1 que va a probarse. Lotes de COP-1 que inducen desgranulación no específica liberan [H<sup>3</sup>]-serotonina en el medio. La radiactividad en el medio se cuenta por un contador de centelleo y la serotonina radiomarcada total incorporada en las células se determina en las células sedimentadas. El porcentaje de desgranulación se calcula como el porcentaje de serotonina liberada de la total incorporada.

**Resultados**

Se analizaron cuatro lotes del copolímero 1, con peso molecular promedio entre 8.250-14.500, para tanto el porcentaje de las especies con peso molecular superior a 40 kDa como para la desgranulación de RBL. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1**

M.W. promedio	% de especies con M.W. superior a 40 KDa	% de liberación de serotonina
6.250	< 2,5	12,4
7.300	< 2,5	21,0
13.000	> 5	66,9
14.500	> 5	67,8

Como puede apreciarse, cuando el porcentaje de especies de alto peso molecular promedio es bajo (inferior al 2,5 %), el porcentaje de liberación de serotonina también es bajo, y viceversa. Estos datos indican que se prefieren los polipéptidos del copolímero 1 de menor peso molecular promedio a los polipéptidos del copolímero 1 de mayor peso molecular promedio.

**EJEMPLO 3****SUPRESIÓN DE EAE POR LOS POLIPÉPTIDOS**

La inyección del copolímero 1 en adyuvante incompleto de Freund antes de la inducción de la enfermedad puede suprimir encefalomiелitis alérgica experimental (EAE). Esta supresión parece estar mediada por los linfocitos T supresores específicos del copolímero 1 de tipo T<sub>H</sub>2 que reaccionan de forma cruzada con la proteína básica de mielina. Lando y col., 123 J. IMMUNOL. 2156 (1979); Aharoni y col., 17 EUR. J. IMMUNOL. 23 (1993); Aharoni y col., 94 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 10821 (1997). Otros investigadores han observado que el efecto terapéutico del copolímero 1 en pacientes con esclerosis múltiple también está asociado con la inducción de células T<sub>H</sub>2. Lahat y col., 244 J. Neurol. 129 (1997). En este ejemplo, la EAE se suprime por diferentes polipéptidos de la presente invención.

**PROCEDIMIENTOS****Copolímero 1**

Se obtuvieron lotes del copolímero 1 n° 02095 y 55495, con pesos moleculares promedio de 6000 Da y 5800 Da, respectivamente, de Teva Pharmaceutical Industries (Petach Tikva, Israel).

**40 Terpolímeros**

Se obtuvieron cuatro terpolímeros de Teva Pharmaceutical Industries (Petach Tikva, Israel). Las propiedades de estos terpolímeros se proporcionan a continuación:

5 1) El terpolímero GAL (SD-1689) es una mezcla de polipéptidos que contiene la siguiente fracción molar de aminoácidos ácido glutámico (0,153), alanina (0,479) y lisina (0,365). El intervalo de pesos moleculares promedio de GAL es aproximadamente 4650 dalton a aproximadamente 20.050 dalton. El peso molecular promedio de esta preparación de GAL es 8850 dalton.

10 2) El terpolímero TGA (SD-1690) es una mezcla de polipéptidos que contiene la siguiente fracción molar de aminoácidos tirosina (0,136), ácido glutámico (0,210) y alanina (0,648). El intervalo de pesos moleculares promedio de TGA es aproximadamente 1000 dalton a aproximadamente 40.000 dalton. El peso molecular promedio de esta preparación de TGA es 7600 dalton.

3) El terpolímero TAL (SD-1691) es una mezcla de polipéptidos que contiene la siguiente fracción molar de aminoácidos tirosina (0,102), alanina (0,542) y lisina (0,353). El intervalo de pesos moleculares promedio de TAL es aproximadamente 5700 dalton a aproximadamente 34.400 dalton. El peso molecular promedio de esta preparación de TAL es aproximadamente 20.000 dalton.

15 4) El terpolímero GTL (SD-1697) es una mezcla de polipéptidos que contiene la siguiente fracción molar de aminoácidos ácido glutámico (0,259), tirosina (0,162) y lisina (0,579). El intervalo de pesos moleculares promedio de GTL es aproximadamente 4.000 dalton a aproximadamente 23.500 dalton. El peso molecular promedio de esta preparación de GTL es aproximadamente 11050 dalton.

20 Se usa un polipéptido de control, que consiste en una mezcla de polipéptidos que contiene una mezcla 1:1:1 de los aminoácidos alanina, ácido glutámico y tirosina, con un peso molecular promedio 26.700 Da. Este polipéptido se obtiene de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

#### Inducción de EAE

25 Se inyectan ratones hembra de dos a tres meses de edad (SJL/J x BALB/c) F<sub>1</sub> en las cuatro almohadillas plantares con homogeneizado de médula espinal de ratón (3,5 mg/ratón) emulsionado en una relación 1:1 en adyuvante completo de Freund (CFA) complementado con 4 mg/ml de H37Ra. Se inyecta toxina Pertussis (0,25 ml, 250 ng, Sigma) intravenosamente, inmediatamente después y 48 h después. Los ratones se examinan diariamente desde el día 10 después de la inducción para signos clínicos de EAE que se puntuaron en una escala 0-5 como se describe en Lando y col., 123 J. IMMUNOL. 2156 (1979).

#### Supresión de EAE mediante la inyección con adyuvante incompleto

30 Los polipéptidos probados (10 mg/ratón) se inyectan en adyuvante incompleto de Freund (ICFA) subcutáneamente en un área nual en 2-3 puntos. La EAE se induce 3 semanas después como se ha descrito anteriormente.

#### Supresión de EAE por administración por vía oral

35 En una segunda prueba, ratas Lewis hembra se alimentan con 5 mg/kg de BP de cobaya o copolímero 1 disuelto en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a intervalos de 2-3 días antes de la inducción de EAE. La EAE se induce dos días después de la última alimentación mediante inyección de 25 µg de MBP de cobaya emulsionado en 1:1 de CFA que contiene 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) (Difco Lab, Detroit, Mich.). Se inyecta un volumen total de 0,1 ml en cada una de las dos almohadillas plantares traseras. Las ratas de control se alimentan falsamente con solución salina tamponada con fosfato.

40 La eficacia del copolímero 1 administrado por vía oral para prevenir EAE en ratas se compara con la de ratas alimentadas con MBP de cobaya mediante el procedimiento de Higgins y col., 140 J. IMMUNOL. 440 (1988).

Los animales se examinaron diariamente desde el día 10 después de la inducción para signos de enfermedad. La EAE se puntúa del siguiente modo: 0 = sin enfermedad; 1 = cola débil; 2 = parálisis de las extremidades traseras; 3 = parálisis de las cuatro extremidades; 4 = condición moribunda; y 5 = muerte.

#### RESULTADOS

#### 45 Supresión de EAE mediante la inyección con adyuvante incompleto

La Tabla 2 ilustra los efectos de administrar los presentes polipéptidos mediante inyección en ICFA antes de la inducción de EAE. De los cuatro polipéptidos probados, el copolímero 1 y TAL provocaron la mayor supresión de EAE. GTL también presentó buena actividad supresora. GAL y TGA fueron algo menos eficaces.

Tabla 2

**Supresión de EAE en ratones mediante inyección de los presentes polipéptidos**

Polipéptido	Incidencia	PMM*	% de supresión	
			Incidencia	PMM*
Ninguno (control negativo)	11/11	4,0		
ICFA (control negativo)	11/11	3,4	0,0	15,0
Copolímero 1 (control positivo)	2/11	0,45	82,0	89,0
SD-1689 - GAL	7/8	3,5	12,5	12,5
SD-1690 - TGA	6/8	2,5	25,0	37,5
SD-1691 - TAL	3/8	1,1	62,5	72,5
SD-1697 - GTL	5/8	1,5	37,5	62,5
D-Copolímero 1	11/11	4,1	0,0	0,0

\*PMM = Puntuación máxima media

D-Copolímero 1 es un copolímero de d-lisina, d-tirosina, d-ácido glutámico y d-alanina en las relaciones molares del copolímero 1.

5

La Tabla 3 ilustra la eficacia del copolímero 1 administrado por vía oral en la prevención de las manifestaciones clínicas de EAE en ratas Lewis en comparación con ratas que reciben solo solución salina tamponada con fosfato (PBS) o proteína básica de cobaya (GPBP).

Tabla 3

**Supresión de EAE en ratas por administración por vía oral de los presentes polipéptidos**

Antígeno alimentado	Incidencia	PMM $\pm$ DE	Aparición media (días)
PBS (Control)	27/28 (96 %)	1,8 $\pm$ 0,5	11,9
GPBP	10/17 (59 %) p=0,0026	0,9 $\pm$ 0,5	11,4
Copolímero 1	13/28 (46 %) p=0,00005	0,78 $\pm$ 0,45	12,6

Cada valor numérico representa los resultados acumulados de 3-5 experimentos independientes. Los valores de p representan la significancia estadística de la diferencia del grupo de control (PBS). La puntuación máxima media se calcula para el grupo entero.

Estos datos indican que los presentes polipéptidos son terapéuticamente eficaces para prevenir la aparición y gravedad de EAE cuando se administran tanto por vía oral como mediante inyección.

15

**EJEMPLO 4****UNIÓN A CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO**

Varios de los presentes polipéptidos se unen eficazmente a células presentadoras de antígeno vivas.

**PROCEDIMIENTOS****20 Copolímero 1**

Se obtuvieron lotes del copolímero 1 n° 02095 y 55495, con pesos moleculares promedio de 6000 Da y 5800 Da, respectivamente, de Teva Pharmaceutical Industries (Petach Tikva, Israel).

**Terpolímeros**

GAL, TGA, TAL, GTL y polipéptidos de control son como se han descrito anteriormente bajo el Ejemplo 3.

**Biotinilación de antígenos**

La biotinilación del copolímero 1 y los terpolímeros se realiza a 0 °C con biotina-*N*-hidroxisuccinimida (Sigma) según Fridkis-Hareli y col. 91 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 4872 (1994).

**Unión de antígenos biotinilados a células presentadoras de antígeno**

- 5 Se examinaron péptidos biotinilados para unirse a células presentadoras de antígeno vivas de origen de ratón y humano, usando estreptavidina fluorescentemente marcada y análisis de FACS. Se incubaron células del bazo adherentes de ratones (SJL/J x BALB/c) F<sub>1</sub>, o linfocitos B humanos transformados con VEB de DR7, haplotipo w11 (1 x 10<sup>6</sup>/100 µl), a 37 °C durante 20 h con 50 µg de copolímero 1 biotinilado o terpolímeros disueltos en 100 µl de PBS que contenía 0,1 % de BSA. A continuación, las células se incubaron a 4 °C durante 30 min con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) a una concentración de 0,5 µg/100 µl de suspensión de células. Después de cada incubación, las células se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,1 % de BSA. Después, las células se analizaron por citometría de flujo usando FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA). Para cada análisis se examinaron 5000 células. Las células muertas se excluyeron basándose en dispersión de la luz directa de ángulo lateral.

**Líneas de células B transformadas con el virus de Epstein-Barr (VEB)**

- 15 Se iniciaron líneas de células B transformadas con VEB según Teitelbaum y col., 89 PROC. NATL. ACAD. Sci. USA 137 (1992). Se cultivaron aproximadamente 20 x 10<sup>6</sup> células mononucleares de sangre periférica con el sobrenadante de la línea celular B95.8, durante 1 h a 37 °C. A continuación, las células se lavaron y se cultivaron en medio RPMI con 10 % de SBF y ciclosporina A (10 µg/ml) para agotar los linfocitos T.

**RESULTADOS**

- 20 La Tabla 4 ilustra la unión de terpolímeros y polipéptidos del copolímero 1 a células presentadoras de antígeno vivas, que incluyen macrófagos del bazo de ratón, y líneas de células B transformadas con VEB humanas. Se proporcionan datos que ilustran tanto el porcentaje de unión como la intensidad de la tinción celular (Tabla 4 I+II). TAL se unió el más eficazmente - mejor incluso que el copolímero 1. GAL y GTL también se unieron muy bien - igual o incluso algo mejor que el copolímero 1. TGA se unió bien, pero algo menos que un copolímero 1.
- 25 TAL se unió más eficazmente tanto a macrófagos del bazo de ratones (SJL/J x BALB/c) F<sub>1</sub> como a linfocitos B transformados con VEB de un donante DR7.w11 normal, como se expresa por la intensidad de la unión (Tabla 4).

**Tabla 4****Unión de terpolímeros a células presentadoras de antígeno****I. Células presentadoras de antígeno de macrófagos del bazo de ratón**

Polipéptido	% de unión	IMF*
Copolímero 1 (control positivo)	85	493
SD-1689 - GAL	88	600
SD-1690 - TGA	74	39
SD-1691 - TAL	100	1929
SD-1697 - GTL	90	973

\*IMF = Intensidad media de fluorescencia

30

**II. Células presentadoras de antígeno de la línea de linfocitos B transformada con VEB humana**

Polipéptido	% de unión	IMF*
Copolímero 1 (control positivo)	96	727
SD-1689 - GAL	95	661

(continuación)

Polipéptido	% de unión	IMF*
SD-1690 - TGA	72	49
SD-1691 - TAL	100	1438
SD-1697 - GTL	97	1057

\*IMF = Intensidad media de fluorescencia

## EJEMPLO 5

### LOS PRESENTES POLIPÉPTIDOS SE UNEN A ANTÍGENOS LEUCOCITARIOS HUMANOS (HLA) PURIFICADOS

5 Este ejemplo ilustra que los polipéptidos de la presente invención se unen a linfocitos B humanos y a antígenos de linfocitos humanos purificados con alta afinidad, que incluyen las moléculas de HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4.

### PROCEDIMIENTOS

#### Líneas celulares y anticuerpos

10 Las líneas de linfocitos B humanas transformadas con VEB homocigóticas usadas para purificación por inmunoafinidad de las moléculas de HLA-DR1, -DR2 y -DR4 fueron LG-2 (DRB1\*), MGAR (DRB1\*1501) y Preiss (DRB\*0401/DRB4\*0101), respectivamente.

Las células se cultivaron en RPMI 1640 complementado con 10 % de SBF, glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina G y 50 µg/ml de estreptomycin en botellas rotatorias y se guardaron como sedimentos a -80 °C. El hibridoma anti-DR LB3.1 (IgG2b) se cultiva en medio sin suero (macrófagos-SFM, Gibco BRL). Véase Gorga y col., 103 CELL. IMMUNOL. 160 (1986).

#### 15 Purificación de proteínas

La purificación por inmunoafinidad de moléculas de HLA-DR1, -DR2 y -DR4 se realiza, con modificaciones menores, como se ha informado previamente por Gorga y col., 262 J. BIOL. CHEM. 16087 (1987). Brevemente, preparaciones de membrana solubles en detergente de células LG-2, MGAR y Priess se sometieron a pases a una velocidad de flujo de aproximadamente 11 ml/h mediante una serie de columnas en la siguiente secuencia: Sepharose CL-6B (30 ml), suero de ratón normal-Aff-gel 10 (10 ml), proteína A-Sepharose CL-4B (5 ml) y LB3.1-proteína A-Sepharose CL-4B (5 ml). DR2a (DRB5\*0101) y Drw53 (DRB4\*0101), los productos de genes DR ligados a los alelos DRB1 no se eliminaron de los lisados de MGAR y Priess antes de someterse a pases a través de la columna de inmunoafinidad LB3.1, y contaminan las preparaciones de DR2 y DR4 en la cantidad del 5-10 %. Todas las etapas posteriores fueron como se ha descrito previamente por Gorga y col., 262 J. BIOL. CHEM. 16087 (1987). El eluato se dializa contra 0,1 % de desoxicolato, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y se concentra sobre una membrana Centriprep 30 (Amicon). Las concentraciones de proteína se determinaron por ensayo de ácido bicinconínico (Pierce Chemical Co.).

#### Péptidos y polipéptidos

##### Copolímero 1

30 Se obtuvieron lotes del copolímero 1 n° 55495 y 52596, con peso molecular promedio de 5800 dalton y 8.150 dalton, respectivamente, de Teva Pharmaceutical Industries (Petach Tikva, Israel). El lote de copolímero 1 52596 tuvo una relación molar de 1 tirosina: 1,5 ácido glutámico: 4,3 alanina: 3,1 lisina.

##### Péptidos de proteína básica de mielina

35 Se sintetizaron péptidos de MBP sobre un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems usando técnicas en fase sólida. Barany y col., THE PEPTIDES 1 (1979). Los péptidos se purificaron por HPLC de fase inversa. Los péptidos usados fueron 306-318 de HA, que tiene la secuencia PKYVKQNTLKLAT (MW 1718) (SEC ID NO: 2) y 84-102 de MBP, que tiene la secuencia DENPVVHFFKNIVTPRTPP (MW 2529) (SEC ID NO: 1).

##### Terpolímeros

GAL, TGA, TAL, GTL y polipéptidos de control son como se han descrito anteriormente bajo el Ejemplo 3.

### Marcado de polipéptidos

La biotilación de los diversos polipéptidos se realiza como en el Ejemplo 4. Se elimina biotina no reaccionada por diálisis (membrana Spectra/Por® MWCO 500, Spectrum Medical Industries).

### Ensayos para polipéptido que se une a proteínas del MHC de clase II

- 5 **Disoluciones:** Las disoluciones usadas en este ensayo fueron las siguientes. El tampón de unión es ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico (MES) 20 mM, 1 % de n-octil-β-D-glucopiranosido, NaCl 140 mM, 0,05 % de NaN<sub>3</sub>, pH 5,0, a menos que se especifique de otro modo. La PBS es cloruro sódico 150 mM, fosfato de sodio 7,5 mM, dibásico, fosfato de sodio 2,5 mM, monobásico, pH 7,2. La TBS es cloruro sódico 137 mM, Tris 25 mM a pH 8,0, cloruro de potasio 2,7 mM. La TTBS es TBS más 0,05 % de Tween-20.
- 10 **Preparación de placas de ensayo de microtitulación:** Se recubrieron placas de inmunoensayo de microtitulación de noventa y seis pocillos (PRO-BIND™, Falcon) con 1 µg/pocillo de anticuerpos monoclonales LB3.1 purificados por afinidad en PBS (100 µl totales) durante 18 h a 4 °C. A continuación, los pocillos se bloquearon con TBS que contenía 3 % de BSA durante 1 h a 37 °C y se lavaron tres veces con TTBS. Antes de la adición de muestra, se añaden 50 µl de TBS/1 % de BSA a cada pocillo.
- 15 **Reacciones de unión:** Se incubaron moléculas de HLA-DR1, -DR2 y -DR4 (0,5 µg/muestra) solubilizadas en detergente con péptidos biotilados a diversas concentraciones durante 40 horas a 37 °C en 50 µl del tampón de unión y se transfirieron a placas de ensayo de microtitulación preparadas y se incubaron durante 1 h a 37 °C para la captura de complejos de polipéptido-clase II.
- 20 **Reacciones de inhibición:** Se co-incubaron péptidos biotilados a una concentración final de 1,5 µM en 50 µl de tampón de unión con polipéptidos no marcados, además de los péptidos 306-318 de HA (SEC ID NO: 2) o 84-102 de MBP (SEC ID NO: 1), usados como inhibidores, y moléculas de HLA-DR durante 40 h a 37 °C.

25 **Detección de complejos de clase II/polipéptido:** El polipéptido-biotina unido se detecta usando fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina del siguiente modo. Se lavaron tres veces las placas con TTBS y se incubaron con 100 µl de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina (1:3000, BioRad) durante 1 h a 37 °C, seguido de la adición de fosfato de p-nitrofenilo en tampón trietanolamina (BioRad). La absorbancia a 410 nm se monitoriza por un lector de microplacas (Dynatech MR4000).

## RESULTADOS

### Terpolímeros que se unen a proteínas del MHC de clase II

30 Las proteínas HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4 solubles en detergente se purificaron de líneas de linfocitos B transformadas con VEB homocigóticas LG-2 (DRB1\*0101), MGAR (DRB1\*1501) y Priess (DRB1\*0401), respectivamente, como se ha descrito previamente por Fridkis-Hareli y col., 160 J. IMMUNOL. 4386 (1998). Tres preparaciones diferentes del copolímero 1 se habían unido a estas moléculas con alta afinidad. *Id.* Para determinar la afinidad de los terpolímeros por proteínas HLA-DR, se llevaron a cabo ensayos de unión con terpolímeros biotilados, y se compararon con el copolímero 1. Los polipéptidos se incubaron a un intervalo de concentraciones con moléculas de HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4 purificadas a pH 5,0, seguido de captura con mAb específico de clase II y detección con fosfatasa alcalina-estreptavidina.

40 La unión por TAL y el copolímero 1 a moléculas de HLA-DR1 y HLA-DR4 solubles en detergente es mejor que la de GAL, TGA o GTL. Sin embargo, GTL y el copolímero 1 se unieron mejor que los otros polipéptidos a HLA-DR2, basándose en las curvas de unión de saturación (Fig. 2A) y en valores de K<sub>d</sub> calculados a partir de representaciones recíprocas dobles de los datos de unión (Fig. 2B, Tabla 5).

45 Los ensayos de unión competitiva se llevaron a cabo con copolímero 1 biotilado y los siguientes inhibidores no marcados: polipéptidos del copolímero 1, TAL, TGA, GAL, TGL, 84-102 de MBP y 306-318 de HA (Fig. 3). El péptido 84-102 de MBP (SEC ID NO: 1) es un mal inhibidor de la unión del copolímero 1 a HLA-DR2. La unión del copolímero 1 biotilado a moléculas de HLA-DR1 y -DR4 solubles en detergente se inhibe eficazmente por TGA, TAL, 306-318 de HA no marcados (SEC ID NO: 2) y el copolímero 1. Sin embargo, la unión del copolímero 1 biotilado a moléculas de HLA-DR1 y -DR4 solubles en detergente se inhibe más de 10 veces menos por TGL, como se indica por el 50 % de dosificaciones inhibitorias (CI<sub>50</sub>) (Fig. 3, Tabla 5). Similarmente, GAL también es un mal inhibidor del copolímero 1 que se une a moléculas de HLA-DR1 y -DR4. En general, el patrón de unión a HLA-DR2 es similar al observado para HLA-DR1 (Tabla 5). Estos resultados muestran que los polipéptidos de tres aminoácidos, en particular TAL y TGA, se unen a moléculas del MHC de clase II con un intervalo de afinidad similar al de péptidos antigénicos y del copolímero 1. Por tanto, TAL y TGA son competidores eficaces para las moléculas del MHC de clase II a las que se une el copolímero 1. Basándose en su capacidad de unión, los polipéptidos podrían estar dispuestos en el siguiente orden:

(A) Unión a HLA-DR1: Copolímero 1 > TAL > GTL > TGA >> GAL;

(B) Unión a HLA-DR2: Copolímero 1 > GTL > TAL > GAL > TGA;

(C) Unión a HLA-DR4: TAL > Copolímero 1 >> TGA > GTL > GAL.

**Tabla 5**

5 **Afinidad de los presentes polipéptidos por moléculas de HLA-DR1, -DR2 y -DR4 humanas purificadas**

Polipéptido <sup>1</sup>	DR1 <sup>2</sup>		DR2		DR4	
	K <sub>d</sub> <sup>3</sup>	Cl <sub>50</sub> <sup>4</sup>	K <sub>d</sub>	Cl <sub>50</sub>	K <sub>d</sub>	Cl <sub>50</sub>
Copolímero 1	7,4	8,8	8,2	10,1	1,5	10,8
TAL	2,0	3,3	1,7	2,7	2,0	6,5
GAL	0,5	<sup>5</sup>	1,7	<sup>5</sup>	0,3	<sup>5</sup>
TGA	1,0	1,3	0,8	9,5	0,8	1,0
TGL	0,4	43,0	5,0	25,4	0,8	43,0

<sup>1</sup>Polipéptidos del copolímero 1 con MW promedio de 5.800; TAL, MW 20.000; GAL, MW 8.850; TGA, MW 7.600; y TGL, MW 11.050, se incubaron a un intervalo de concentraciones con moléculas de HLA-DR1, -DR2 y -DR4 purificadas a pH 5,0 seguido de captura con mAb específico de clase II y detección de péptidos con fosfatasa alcalina-estreptavidina.

<sup>2</sup>Moléculas de HLA-DR1, -DR2 y -DR4 solubles en detergente se purificaron como se describe en Materiales y procedimientos.

<sup>3</sup>K<sub>d</sub>, la constante de disociación en equilibrio, se calcula a partir de la pendiente de la representación recíproca doble (Fig. 2B), y se expresa como x 10<sup>-8</sup>M.

<sup>4</sup>Cl<sub>50</sub>, concentración inhibitoria que da el 50 % de inhibición, se calcula basándose en los ensayos de unión competitiva (Fig. 3), y se expresa como x 10<sup>-6</sup>M.

<sup>5</sup>Los valores de Cl<sub>50</sub> para GAL no pudieron determinarse exactamente, pero fueron inferiores a 1000 μM (véase la Fig. 3).

**Efecto de superantígenos sobre la unión de polipéptidos a moléculas de HLA-DR**

Se ha mostrado que los superantígenos bacterianos SEA, SEB y TSST-1 inhiben el copolímero 1 que se une a moléculas de HLA-DR purificadas solo a muy altas concentraciones. Fridkis-Hareli y col., 160 J. IMMUNOL. 4386 (1998). Para examinar el efecto de estos superantígenos sobre la unión de terpolímeros a moléculas de HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4 purificadas, se llevaron a cabo ensayos de unión competitiva con SEA, SEB y TSST-1 no marcados.

La unión de TAL a HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4 solo se inhibe por los superantígenos a altas relaciones molares de superantígeno: por ejemplo, se necesitan cincuenta veces la cantidad de superantígeno para inhibir la unión de TAL (Fig. 4A). Sin embargo, la unión de TGA y GAL se inhibe más significativamente por los superantígenos (Fig. 4B y C), que indica que estos polipéptidos se unieron a los antígenos HLA con menor afinidad.

15 **EJEMPLO 6**

**INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T INDUCIDA POR MBP**

Este ejemplo ilustra que la proliferación de linfocitos T que normalmente se activan por proteína básica de mielina (MBP) puede inhibirse por exposición simultánea a los presentes polipéptidos.

**PROCEDIMIENTOS**

20 **Copolímero 1**

Se obtuvieron lotes de copolímero 1 n° 02095 y 55495, con pesos moleculares promedio de 6000 Da y 5800 Da, respectivamente, de Teva Pharmaceutical Industries (Petach Tikva, Israel).

**Péptidos de proteína básica de mielina**, que se sintetizaron sobre un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems

usando técnicas en fase sólida. Barany y col., THE PEPTIDES 1 (1979). Los péptidos se purificaron por HPLC de fase inversa. Los péptidos usados fueron 306-318 de HA, que tienen la secuencia PKYVKQNTLKLAT (MW 1718) (SEC ID NO: 2) y 84-102 de MBP, que tienen la secuencia DENPVVHFFKNIVTPRTPP (MW 2529) (SEC ID NO: 1).

### Terpolímeros

- 5 GAL, TGA, TAL, GTL y polipéptidos de control son como se han descrito anteriormente bajo el Ejemplo 3.

### Líneas y clones de linfocitos T

Se originaron **líneas de linfocitos T específicas de proteína básica de mielina (MBP)** a partir de los bazos de ratones que, diez días antes, se inmunizaron con 20 µg del péptido 84-102 de MBP emulsionado en adyuvante completo de Freund complementado con 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Las células se cultivaron y se seleccionaron *in vitro* usando el antígeno inmunizante (0,2-1 mg/placa), en medio de cultivo (RPMI, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales, 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M, 100 /ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina), complementado con 1 % de suero autólogo. Después de 4 días, las células se transfirieron a medio de cultivo que contenía 10 % de SBF y se complementaron con 10 % de sobrenadante de células del bazo normales activadas con Con A como factor de crecimiento de linfocitos T (TCGF). Cada catorce a veinte un días, las células se estimularon por exposición al antígeno inmunizante presentado sobre células del bazo irradiadas (3000 rad) singénicas ( $50 \times 10^6$ /placa) durante 3 días, seguido de propagación en medio TCGF. La clonación de líneas de linfocitos T se realiza por dilución limitante a 0,3 células/pocillo en placa de microtitulación en presencia del antígeno (2-10 µg/pocillo) y células del bazo singénicas irradiadas ( $5 \times 10^6$ /pocillo).

Se derivaron **líneas de linfocitos T humanos** de células mononucleares de sangre periférica según Teitelbaum y col., 89 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 137 (1992). Se incubaron aproximadamente  $5 \times 10^6$  células en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos con el copolímero 1 o MBP (50 µg/ml) en medio de cultivo complementado con 10 % de suero autólogo inactivado por calor. Después de 7 días de cultivo, las células se transfirieron a medio de cultivo que contenía 10 % de suero bovino fetal e interleucina 2 humana recombinante (20 unidades/ml). Las células se cultivaron continuamente en este medio con exposición periódica al antígeno presentado sobre células mononucleares autólogas irradiadas (3000 rad), cada 14-18 días.

### Ensayo de proliferación

Se probaron líneas o clones de linfocitos T para su respuesta proliferativa específica 10-21 días después de la estimulación antigénica. Se cultivaron linfocitos T ( $1,5 \times 10^4$ ) por triplicado con  $5 \times 10^5$  células del bazo irradiadas y con los antígenos indicados en un volumen final de 0,2 ml en 10 % de medio de cultivo de SBF. Al final de la incubación de 48 h, los cultivos se pulsaron con 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina (desviación estándar <20 % de las cpm medias), y se recogieron 6-12 h después.

### Estudios de inhibición

La inhibición de la respuesta proliferativa de linfocitos T se estudia añadiendo diversas concentraciones del copolímero 1 y los terpolímeros más el antígeno de MBP estimulante al sistema de ensayo de proliferación. La inhibición se calcula como porcentaje de inhibición usando la Ecuación 2:

$$\% \text{ de inhibición} = [1 - (\text{cpm con inhibidor} / \text{cpm sin inhibidor})] \times 100.$$

2

## RESULTADOS

La Figura 1 ilustra cómo el copolímero 1 y los terpolímeros afectan la proliferación de linfocitos T que son específicos para ciertos péptidos de la proteína básica de mielina (MBP). En general, los linfocitos T proliferan cuando se exponen al antígeno al que se sensibilizaron. Así, MBP y, en particular, ciertos péptidos antigénicos de MBP, estimulan la proliferación de linfocitos T específicos de MBP.

El copolímero 1 y los terpolímeros no estimularon la proliferación de linfocitos T que fueron específicos para el péptido 84-102 de MBP. En su lugar, inhibieron significativamente la proliferación de linfocitos T expuestos a este antígeno de MBP.

TAL presentó la inhibición más eficaz de la proliferación en linfocitos T específica para el antígeno 84-102 de MBP. La inhibición por TAL es incluso superior a la proporcionada por el copolímero 1. TGA indujo menor inhibición de la proliferación de linfocitos T. GAL y GTL inhibieron la proliferación de linfocitos T de un modo sensible a la dosis similar al copolímero 1.

### EJEMPLO 7

**LOS TERPOLÍMEROS SON RECONOCIDOS POR ALGUNOS LINFOCITOS T ESPECÍFICOS DEL COPOLÍMERO 1**

Los terpolímeros pueden estimular algunas líneas de linfocitos T específicas del copolímero 1 para proliferar y secretar la citocina, IL-4.

**PROCEDIMIENTOS****5 Copolímero 1**

Se obtuvieron lotes del copolímero 1 nº 02095 y 55495, con peso molecular promedio de 6000 Da y 5800 Da, respectivamente, de Teva Pharmaceutical Industries (Petach Tikva, Israel).

**Péptidos de proteína básica de mielina**, que se sintetizaron sobre un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems usando técnicas en fase sólida. Barany y col., THE PEPTIDES 1 (1979). Los péptidos se purificaron por HPLC de fase inversa. Los péptidos usados fueron 306-318 de HA, que tienen la secuencia PKYVKQNTLKLAT (MW 1718) (SEC ID NO: 2) y 84-102 de MBP, que tienen la secuencia DENPVVHFFKNIVTPRTPP (MW 2529) (SEC ID NO: 1).

**Terpolímeros**

GAL, TGA, TAL, GTL y polipéptidos de control son como se han descrito anteriormente bajo el Ejemplo 3.

**Líneas y clones de linfocitos T**

**15 Se establecieron líneas de linfocitos T de ratón** y clones según Aharoni y col., 23 Eur. J. Immunol. 17 (1993); Aharoni y col., 94 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 10821 (1997). Se originaron líneas específicas del copolímero 1 a partir de los bazos de ratones que, 15 a 35 días después, se habían vuelto insensibles a EAE inyectando subcutáneamente cada ratón con 5-10 mg del copolímero 1, emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (Difco). Alternativamente, se obtuvieron líneas específicas del copolímero 1 de los ganglios linfáticos de ratones que se había inmunizado diez días antes con 200 **20** µg de copolímero 1 emulsionado en adyuvante completo de Freund (Difco) complementado con 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco).

Se usaron líneas de linfocitos T específicas del copolímero 1 y los clones de linfocitos T LN-1, LN-2, S-3, 5-22-5, C-14 y C-52. Los anticuerpos LN-2 se derivaron de ganglios linfáticos de ratones (SJL/J x BALB/c) F<sub>1</sub> inyectados con el copolímero 1 en CFA. Los anticuerpos 5-22-5 se obtuvieron de bazos de ratones (SJL/J x BALB/C) F<sub>1</sub> inyectados con el **25** copolímero 1 en CFA, según Aharoni y col., 23 EUR. J. IMMUNOL. 17 (1993); Aharoni y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 10821 (1997).

Se derivaron **clones de linfocitos T humanos** de células mononucleares de sangre periférica según Teitelbaum y col., 89 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 137 (1992). Se incubaron aproximadamente  $5 \times 10^6$  células en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos con el copolímero 1 o MBP (50 µg/ml) en medio de cultivo complementado con 10 % de suero autólogo inactivado por calor. Después de 7 días de cultivo, las células se transfirieron a medio de cultivo que contenía 10 % de suero bovino fetal e interleucina 2 humana recombinante (20 unidades/ml). Las células se cultivaron continuamente en este medio con exposición periódica al antígeno presentado sobre células mononucleares autólogas irradiadas (3000 rad), cada 14-18 días. El clon de linfocitos T C-52 se derivó de un donante DR7, w11, también según Teitelbaum y col., 89 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 137 (1992).

**35 Ensayo de proliferación**

Se probaron células de líneas T o clones para su respuesta proliferativa específica 10-21 días después de la estimulación antigénica. Se cultivaron linfocitos T ( $1,5 \times 10^4$ ) por triplicado con  $5 \times 10^5$  de células del bazo irradiadas o con linfocitos B transformados con VEB humanos ( $5 \times 10^4$ ), y con los antígenos indicados en un volumen final de 0,2 ml en 10 % de medio de cultivo de SBF. Al final de la incubación de 48 h, los cultivos se pulsaron con 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina y a continuación se **40** recogieron 6-12 h después. Las variaciones de triplicados de su media estuvieron por debajo del 20 %.

La línea celular reaccionó de forma cruzada solo con TAL. No reaccionaron de forma cruzada líneas celulares con GTL o con AGT (1:1:1) que tienen los mismos aminoácidos que TGA, pero en una fracción molar diferente de TGA o el copolímero 1.

Tabla 6

**Reactividad cruzada de terpolímeros con el copolímero 1 para las líneas y clones de linfocitos T específicos del copolímero 1**

**I. Líneas y clones de linfocitos T murinos**

Polipéptido de linfocitos T	Reactividad cruzada con el copolímero 1 (%)							
	LN-3		S-3		LN-1		S-22-5	
	prol*	IL4 <sup>‡</sup>	prol*	IL-4 <sup>‡</sup>	Prol*	IL-4 <sup>‡</sup>	prol*	IL-4 <sup>‡</sup>
SD-1689 - GAL	130	<b>139</b>	<b>49</b>	11	0	1	0	0
SD-1690 - TGA	3	6	<b>102</b>	<b>107</b>	0	1	0	0
SD-1691 - TAL	3	7	2	3	<b>64</b>	<b>120</b>	0	0
SD-1697 - GTL	2	4	12	6	0	1	0	0
1:1-1 AGT	2	0	2	2	1	0	2	0T

\*Prol = como se mide por proliferación. <sup>‡</sup>IL-4 = como se mide por interleucina-4.

5

**II. Clones de linfocitos T humanos**

Polipéptido de linfocitos T	Reactividad cruzada con el copolímero 1 (%)	
	Proliferación de C-14	Proliferación de C-52
SD-1689 - GAL	4	<b>75</b>
SD-1690 - TGA	1	<b>58</b>
SD-1691 - TAL	0	0
SD-1697 - GTL	0	5

**EJEMPLO 8**

**LOS TERPOLÍMEROS REACCIONAN DE FORMA CRUZADA CON ANTICUERPOS ANTI-COPOLÍMERO 1**

Los anticuerpos dirigidos contra el copolímero 1 reaccionan de forma cruzada con terpolímeros que carecen de tanto tirosina, ácido glutámico como alanina. Sin embargo, los terpolímeros que carecen de lisina no son reconocidos eficazmente por anticuerpos anti-copolímero 1.

**Anticuerpos**

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales de ratón anti-MBP y anti-copolímero 1 por fusión de células del bazo inmunizadas con MBP o el copolímero 1 de ratones SJL/J con la línea celular de plasmacitoma murino NSO/1. Teitelbaum y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9528 (1991).

**Radioinmunoensayo**

Se recubrieron placas de microtitulación de plástico flexibles con el copolímero 1 o terpolímeros (2 µg/ml). Después de 16 h de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces y se saturaron durante 2 h con PBS que contenía 2 % de albúmina de suero bovino, 0,05 % de Tween 20, 0,1 % de azida de sodio, EDTA 10 mM y heparina a 5 unidades/ml ("tampón PBS"). Se añadieron sobrenadantes de anticuerpo monoclonal (50 µl) a los pocillos durante una incubación de 2 h, y los pocillos se lavaron de nuevo con tampón PBS. Se añadieron anticuerpos de cabra anti-Fab de ratón marcados con <sup>125</sup>I (1 x 10<sup>5</sup> cpm/pocillo) para la incubación durante la noche a 4 °C. Después de un exhaustivo lavado, la radiactividad se mide en un contador gamma.

**Procedimientos****Ensayo de ELISA para reactividad cruzada de anticuerpos**

Se emplea un ensayo de ELISA estándar usando anticuerpos policlonales anti-copolímero 1 y placas de microtitulación recubiertas con 2 µg/ml de la preparación de terpolímero.

**5 Copolímero 1**

Se obtiene el copolímero 1 con la siguiente composición de aminoácidos de Teva Pharmaceutical Industries (Petach Tikva, Israel).

<u>Aminoácido</u>	<u>Fracción molar</u>
Ácido L-glutámico	0,141
L-alanina	0,427
L-tirosina	0,095
L-lisina	0,338

**Terpolímeros**

Se usaron los cuatro terpolímeros del Ejemplo 1.

**10 Resultados**

La Tabla 7 indicó que los anticuerpos policlonales anti-copolímero 1 reaccionan de forma cruzada con terpolímeros que carecen de tanto tirosina, ácido glutámico como alanina. El porcentaje de unión relativamente alto de los terpolímeros que carecen de ácido glutámico (TAL) podría explicarse por su alto peso molecular promedio. Los terpolímeros que carecen de lisina no son eficazmente reconocidos por los anticuerpos anti-copolímero 1. Estos datos sugieren que los aminoácidos cargados como lisina pueden desempeñar una función en el reconocimiento y la unión del copolímero 1 y terpolímeros.

**Tabla 7**

Terpolímeros	MW*	Porcentaje de unión en experimentos separados				Media	D.E.
		1	2	3	3		
TAL	20.000	111,1	130,1	115,8	114,0	117,8	8,48
GAL	8,850	7,5	10,8	9,3	9,2	9,2	1,35
GTL	11,050	98,7	87,0	n.d. <sup>‡</sup>	n.d. <sup>‡</sup>	92,9	8,30
TGA	7,600	87,9	79,3	n.d. <sup>‡</sup>	n.d. <sup>‡</sup>	83,6	6,12

\* dalton. ‡n.d. – no determinado.

**Reactividad cruzada de terpolímeros con los anticuerpos monoclonales reactivos con el copolímero 1**

Se prueba la reactividad cruzada de los terpolímeros con el copolímero 1 al nivel de respuesta de linfocitos B usando anticuerpos monoclonales (mAb), que son o bien reactivos con tanto el copolímero 1 como MBP (mAb 2-2-18 y 3-1-45), o bien son reactivos con solo el copolímero I (mAb 3-3-9 y 5-7-2). Véase Teitelbaum y col., 88 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9528 (1991).

La Tabla 8 ilustra que los terpolímeros se diferenciaron en su capacidad para unirse a estos mAb. TGA y GTL no fueron reconocidos por ninguno de los mAb específicos del copolímero 1. Por otra parte, TAL y GAL se unieron al copolímero 1 y mAb específicos de MBP con una afinidad que es similar a la del copolímero 1. GAL y TAL se diferenciaron solo en la unión a un mAb, es decir, 5-7-2 que se unió a TAL y no a GAL.

Tabla 8

**Reactividad cruzada de terpolímeros con anticuerpos para linfocitos B reactivos con MBP y el copolímero 1**

Polipéptido de anticuerpo	Reactividad cruzada con el copolímero 1 (%)			
	2-2-18	3-1-45	3-3-9	5-7-2
SD-1689 - GAL	<b>96</b>	<b>98</b>	<b>107</b>	10
SD-1690 - TGA	3	2	1	10
SD-1691 - TAL	<b>96</b>	<b>98</b>	<b>103</b>	<b>106</b>
SD-1697 - GTL	1	2	1	1

2-2-18 es anticuerpo monoclonal anti-MBP de ratón **reactivo de forma cruzada** con el copolímero 1

3-1-45 es anticuerpo monoclonal anti-copolímero 1 **reactivo de forma cruzada** con MBP

3-3-9 es anticuerpo monoclonal anti-copolímero 1 **no reactivo de forma cruzada** con MBP

5-7-2 es anticuerpo monoclonal anti-copolímero 1 **no reactivo de forma cruzada** con MBP

### EJEMPLO 9

#### EL COPOLÍMERO 1 Y LOS TERPOLÍMEROS COMPITEN CON COLÁGENO PARA UNIRSE A ANTÍGENOS LEUCOCITARIOS HUMANOS E INHIBEN LA RESPUESTA DE LINFOCITOS T ESPECÍFICA DE COLÁGENO

- 5 Este ejemplo ilustra que el copolímero 1, TAL, GAL, GTL y TGA compiten para unirse a proteínas del MHC con el antígeno de colágeno inmunodominante asociado a artritis reumatoide, 261-273 de CII (SEC ID NO: 3).

#### Procedimientos

##### Expresión y purificación de proteínas

- 10 Se expresaron moléculas de HLA-DR1 y HLA-DR4 recombinantes (codificadas por DRA/DRB 1 \*0101 y \*0401, respectivamente) en células S2 de *Drosophila* como se describe en Stern, L. y col. 68 CELL 465 (1992) y Dessen, A. y col. 7 IMMUNITY 473 (1997). Las células se cultivaron en botellas rotatorias a 26 °C en medio Excell 401 (Sigma, St. Louis, MO) complementado con 0-5 % de suero bovino fetal (Sigma). Las células se indujeron mediante la adición de CuSO<sub>4</sub> a concentración final 1 mM, a continuación se incubaron 4-5 días adicionales. La purificación por inmunofinidad de HLA-DR1 y HLA-DR4 recombinantes se realiza como se ha informado previamente por Stern, L. y col. 68 CELL 465 (1992) y Dessen, A. y col. 7 IMMUNITY 473 (1997). El sobrenadante de células recogidas se pasa secuencialmente a través de columnas de proteína A, proteína G y proteína A-LB3.1, seguido de elución de HLA-DR unido con ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico (CAPS) 50 mM, pH 11,5, y se neutraliza con fosfato 200 mM (pH 6,0). El eluato se concentra sobre una membrana Centriprep 10 (Amicon). Las concentraciones de proteína se determinaron por ensayo con ácido bicinconínico (Pierce Chemical Co.).

##### 20 Marcado de polipéptidos

Los presentes polipéptidos y el péptido 306-318 de HA se biotinizaron como en los Ejemplos 4 y 7.

##### Ensayo de unión de proteína del MHC de clase II

- 25 En este ensayo, proteínas recombinantemente producidas solubles en agua se incubaron con péptidos biotinilados de la presente invención y cantidades variables de polipéptidos competidores no marcados, péptidos de colágeno CII o péptidos del virus de la gripe HA. Los ensayos se realizaron en placas de inmunoensayo de microtitulación de 96 pocillos (PRO-BOND™, Falcon) que se recubrieron con anticuerpos monoclonales LB3.1 purificados por afinidad. El recubrimiento de anticuerpo se realiza colocando 100 µl de 10,0 µg/ml de anticuerpos monoclonales LB3.1 en cada pocillo e incubando a 4 °C durante 18 h. A continuación, los pocillos de microtitulación se bloquearon con solución salina

5 tamponada Tris (TBS) que contenía 3 % de albúmina de suero bovino (BSA) durante 1 h a 37 °C y se lavaron tres veces con TTBS. Antes de la adición de muestra, se añaden 50 µl de TBS que contienen 1 % de BSA a cada pocillo. La solución salina tamponada con fosfato (PBS) es cloruro sódico 150 mM, fosfato de sodio dibásico 7,5 mM, fosfato de sodio monobásico 2,5 mM, pH 7,2. La solución salina tamponada con Tris (TBS) es cloruro sódico 137 mM, TRIS 25 mM a pH 8,0, cloruro de potasio 2,7 mM. TTBS es TBS con 0,05 % de Tween-2G. Otras disoluciones usadas en este ensayo se describen en Fridkis-Hareli, M. y col., 160 J. IMMUNOL. 4386 (1998).

10 El análisis de unión se realiza incubando las moléculas de DR solubles en agua con péptidos biotinilados de la presente invención y concentraciones variables de inhibidores no marcados (copolímero 1, TAL, GAL, GTL, TGA, péptido 281-273 de colágeno CII o péptido 306-318 de HA). El péptido 261-273 tipo CII de colágeno tiene SEC ID NO: 3 (AGFKGEQGPKEGEP) y un peso molecular de 1516. La concentración de DR empleada es 0,15 µM. La concentración final del copolímero 1 biotinilado o terpolímeros es 1,5 µM. La incubación es durante 40 h a 37 °C en 50 µl de tampón de unión a pH 5,0.

15 La marca unida se detecta usando fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina del siguiente modo. Se lavaron tres veces placas con TTBS y se incubaron con 100 µl de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina (1:3000, BioRad, Richmond, VA) durante 1 h a 37 °C, seguido de la adición de fosfato de p-nitrofenilo en tampón trietanolamina (BioRad). La absorbancia a 410 nm se monitoriza por un lector de microplacas (modelo MR4000, Dynatech, Chantilly, VA).

### Ensayos de unión de hibridoma de linfocitos T y células presentadoras de antígeno (APC)

20 Se probaron el copolímero 1 y terpolímeros para determinar si podrían inhibir la activación de linfocitos T sensibles al péptido de colágeno CII. Se usaron los hibridomas de linfocitos T 3.19 y 19.3 restringidos a DR1 de ratón y los hibridomas de linfocitos T 3838 y D3 restringidos a DR4 de ratón. Rosloniec, E. F., y col., 185 J. EXP. MED. 1113-1122 (1997); Andersson, E. C., y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1998). Las células presentadoras de antígeno (APC) fueron células L transfectadas con DR1 (la línea de células L57.23 proporcionada por Rosloniec, E. F., y col., 1997, 185 J. Exp. Med. 1113-1122 (1997)), células L transfectadas con DR4 y células Priess (DRB1\*0401/DRB4\*0101). Se realizaron experimentos de estimulación de linfocitos T en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de 0,2 ml. Se co-incubaron APC irradiadas (3000 rad) ( $2,5 \times 10^4$ /pocillo) con 26-273 de CII (40 µg/ml) y concentraciones variables de los presentes polipéptidos durante 2 h a 37 °C, a continuación se añadieron linfocitos T ( $5 \times 10^4$ /pocillo) y la incubación continuó durante 24 h a 37 °C. Los sobrenadantes (30 µl) se extrajeron y se incubaron con CTL-L dependientes de IL-2 ( $5 \times 10^4$ /pocillo) durante 12 h, seguido de marcado con  $^3\text{H}$ -timidina (1 µCi/pocillo) durante 12 h. Las placas se recogieron y la radiactividad se monitoriza usando un contador de centelleo líquido 1450 MicroBeta Plus (Wallac, Gaithersburg, MD).

## 30 RESULTADOS

### Ensayo de unión de proteínas del MHC de clase II

35 Las proteínas HLA-DR1 y -DR4 solubles en agua recombinantes producidas en células de insecto estuvieron ampliamente libres de autoantígenos unidos u otros péptidos. Por tanto, los datos obtenidos de proteínas producidas a partir de célula de insecto pueden indicar con más precisión las afinidades de unión actuales para polipéptidos. Fridkis-Hareli y col., 160 J. IMMUNOL. 4386 (1998).

40 La unión competitiva de cada uno del copolímero 1 y terpolímeros a moléculas de HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4 se representa en la Figura 5. La unión de cada uno del copolímero 1 (YAK, panel superior, Fig. 5A) y los terpolímeros es sustancialmente superior a la del péptido 261-273 de CII (SEC ID NO: 3), como se juzga por la cantidad de péptido 261-273 de CII (SEC ID NO: 3) requerida para el 50 % de inhibición. Como también se observa anteriormente, TAL se unió a HLA-DR1 y HLA-DR4 con mayor afinidad que el copolímero 1. La cinética de inhibición por polipéptidos TAL no marcados (YAK, panel inferior, Fig. 5A) también fue algo superior a la del péptido del virus de la gripe 306-318 de HA (SEC ID NO: 2). Sin embargo, el péptido 306-318 de HA del virus de la gripe inhibió la unión del copolímero 1 y de los terpolímeros más eficazmente que el péptido 261-273 de CII.

### Resultados del ensayo de unión de hibridomas de linfocitos T y células presentadoras de antígeno

45 El copolímero 1 y los terpolímeros también inhibieron la activación de linfocitos T restringidos a DR1 por el péptido de colágeno CII (Fig. 6). La activación de linfocitos T se detectó observando la producción de IL-2 por hibridomas de linfocitos T específicos de CII restringidos a DR1. Se co-incubó el péptido de colágeno CII 261-273 (SEC ID NO: 3) a concentraciones variables con uno de los presentes polipéptidos y a continuación se añadieron linfocitos T (clon 3.19 o 19.3 como se indica), y las mezclas se incubaron adicionalmente. Se extrajeron los sobrenadantes de estas células incubadas y se ensayaron para IL-2 observando si el sobrenadante indujo la proliferación de linfocitos T citotóxicos dependientes de IL-2 (CTL-L). El grado de inhibición por TAL se muestra como círculos negros (●), por TGA como triángulos negros (▲), por GTL como triángulos blancos (Δ) y por el copolímero 1 como cuadrados negros (■). El porcentaje de inhibición de la proliferación de CTL-L mostrada sobre la ordenada se calculó usando la Ecuación 1:

De nuevo, TAL es el inhibidor más potente. Sin embargo, GTL y el copolímero 1 también fueron potentes inhibidores de la activación de células T por el péptido de colágeno CII. TGA inhibió la activación menos eficazmente. Se obtuvieron resultados similares con otros lotes del copolímero 1 y terpolímeros.

Se observó una inhibición similar de la activación de linfocitos T restringidos a DR4, como se muestra en la Figura 7. La producción de IL-2 se usó para evaluar la activación de hibridomas de linfocitos T específicos de CII restringidos a DR4 (3838 y D3). La presencia de diferentes polipéptidos inhibió la producción de IL-2, que indica que inhibieron la activación de linfocitos T restringidos a DR4. La Fig. 7A muestra los efectos de co-incubar células de Priess 3838 o D3 irradiadas con el péptido 261-273 de colágeno CII (SEC ID NO: 3) a la concentración fija de 40 µg/ml, y con concentraciones variables de polipéptidos, durante 2 h a 37 °C. La Fig. 7B muestra los efectos de incubar células L transfectadas con un gen que codifica HLA-DR4 con el péptido 261-273 de colágeno CII (SEC ID NO: 3) a la concentración fija de 40 µg/ml, y con concentraciones variables de GAL, TAL, GTL, TGA, y el copolímero 1, durante 2 h a 37 °C. A continuación se añadieron linfocitos T (clones 3838 o D3 como se indica), las muestras se incubaron adicionalmente durante 24 h a 37 °C. A continuación se extrajeron los sobrenadantes (30 µl) y se ensayaron para activación por proliferación inducida por IL-2 de linfocitos T citotóxicos dependientes de IL-2 (CTL-L). Cada mezcla de polipéptidos se probó por duplicado. La concentración de los presentes polipéptidos se indica en la abscisa. El grado de inhibición por TAL se muestra como círculos negros (●), por TGA como triángulos negros (▲), por GTL como triángulos blancos (Δ) y por el copolímero 1 como cuadrados negros (■). El porcentaje de inhibición de la proliferación de CTL-L mostrada sobre la ordenada se calculó usando la Ecuación 1.

#### EJEMPLO 10

#### 20 MOTIVOS DE SECUENCIA DEL COPOLÍMERO 1 QUE SE UNEN A MOLÉCULAS DE HLA-DR1, HLA-DR2 Y HLA-DR4

##### Procedimientos

##### Expresión y purificación de proteínas

Se expresaron moléculas de HLA-DR1 y HLA-DR4 recombinantes (codificadas por DRA/DRB 1 \*0101 y \*0401, respectivamente) en células S2 de *Drosophila* como se describe en Stern, L. y col. 68 CELL 465 (1992) y Dessen, A. y col. 7 IMMUNITY 473 (1997). Las células se cultivaron en botellas rotatorias a 26 °C en medio Excell 401 (Sigma, St. Louis, MO) complementado con 0-5 % de suero bovino fetal (Sigma). Las células se indujeron mediante la adición de CuSO<sub>4</sub> a concentración final 1 mM, a continuación se incubaron 4-5 días adicionales. La purificación por inmutofinidad de HLA-DR1 y HLA-DR4 recombinantes se realiza como se ha informado previamente por Stern, L. y col. 68 CELL 465 (1992) y Dessen, A. y col. 7 IMMUNITY 473 (1997). El sobrenadante de células recogidas se pasa secuencialmente a través de columnas de proteína A, proteína G y proteína A-LB3.1, seguido de elución de HLA-DR unido con ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico (CAPS) 50 mM, pH 11,5, y se neutraliza con fosfato 200 mM (pH 6,0). El eluato se concentra sobre una membrana Centriprep 10 (Amicon). Las concentraciones de proteína se determinaron por ensayo con ácido bicinónico (Pierce Chemical Co.).

#### 35 Unión y cuantificación de polipéptido unido

El copolímero 1 se incuba con moléculas de HLA-DR1, -DR2 o -DR4 solubles en agua a una relación molar de 1:1 durante 40 h a 37 °C. El copolímero 1 no unido se separa del copolímero 1 unido por ultrafiltración en Centricon. A continuación, el copolímero 1 se extrae del complejo de HLA-DR por tratamiento con ácido (Chicz, R. y col. 178 J. EXP. MED. 27 (1993)) y se somete a análisis de aminoácidos.

40 Para la separación por HPLC y microsecuenciación después de la elución, aproximadamente el 5-10 % de las mezclas del copolímero 1 se fraccionan por HPLC Microbore usando una columna de fase inversa de 1,0 mm Zorbax C<sub>18</sub> sobre HPLC de Hewlett-Packard 1090 con detector de matriz de diodos 1040. A una velocidad de flujo de 54 µ/min, el copolímero 1 se eluye con un gradiente del 0,055 % de ácido trifluoroacético (TFA) en acetonitrilo (0 % a 0-10 min, 33 % a 73 min y 60 % a 105 min). Las estrategias para las elecciones de picos, separación en fase inversa y microsecuenciación de Edman se realizaron como en Chicz y col. 178 J. EXP. MED. 27 (1993), y Lane, W. y col. 10 J. PROT. CHEM. 151(1991).

##### Caracterización estructural del copolímero 1 unido

50 El fraccionamiento del copolímero 1 unido a moléculas de HLA-DR1, HLA-DR2 o HLA-DR4 humanas de líneas de linfocitos B transformadas con VEB homocigóticas indicaron que casi todo el copolímero 1 unido se encontró en las fracciones de peso molecular promedio alto y menos del 10 % del copolímero 1 unido estuvo en las fracciones de menor peso molecular promedio.

Para caracterizar la hidrofobia y el tamaño del copolímero 1 unido a moléculas de HLA recombinantes aisladas, muestras

del copolímero 1 unido y sin unir se separan sobre HPLC de fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo. El control, el copolímero 1 no tratado, eluye como un pico muy ancho con varios picos más pequeños, que se extienden entre tiempo de elución de aproximadamente 40 y 75 min. Este perfil de elución es característico de una mezcla de polipéptidos aleatorios y se parece a separaciones de HPLC de otros lotes del copolímero 1. Se obtuvieron perfiles similares cuando el copolímero 1 se eluyó de moléculas de HLA-DR1, HLA-DR2 o HLA-DR4, que indica que la fracción unida es similar a la preparación del copolímero 1 original en sus propiedades químicas.

Al menos el 95 % de las moléculas del copolímero 1 añadidas se observan en la fracción unida a proteínas HLA-DR1 aisladas; similarmente, al menos el 95 % de las moléculas del copolímero 1 añadidas se observan en la fracción unida a proteínas HLA-DR4 aisladas. Sin embargo, el 80 % de las moléculas del copolímero 1 añadidas están unidas a proteínas HLA-DR2. El copolímero 1 se eluyó de los complejos de HLA que tuvieron una relación de aminoácidos tirosina: ácido glutámico: alanina: lisina que era similar a la del copolímero 1 no tratado del control. Estos resultados indican que la fracción unida del copolímero 1 tuvo una composición de aminoácidos similar a la de la mezcla unida/no unida y que la población de las moléculas del copolímero 1 presentaron poca unión o ninguna unión preferencial a diferentes proteínas HLA-DR.

Para analizar la secuencia del copolímero 1 que se une a cada una de las moléculas de HLA-DR1, -DR2 y -DR4, las fracciones de HPLC obtenidas anteriormente se reunieron sometidas a degradación de Edman automatizada sobre un secuenciador de proteínas G1005A de Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) usando Routine 3.5 del fabricante.

Para cada proteína HLA-DR, el copolímero unido tuvo una distribución aleatoria de los cuatro aminoácidos que se correspondieron con las relaciones molares de entrada de aminoácidos usadas para preparar el copolímero 1. Se encontró alanina a niveles significativamente mayores en comparación con ácido glutámico, tirosina y lisina, como se espera de la relación molar inicialmente mayor de alanina en el copolímero 1. No se observó especificidad de secuencias o posicionamiento preferencial de ninguno de los aminoácidos del copolímero 1, que indica que la fracción unida también fue aleatoria y similar a la preparación del copolímero 1 no fraccionado.

#### Caracterización de epítomos del copolímero 1 unidos y no unidos

Se usaron anticuerpos policlonales anti-copolímero 1 para determinar si las fracciones del copolímero 1 eluidas de cada una de las moléculas de HLA-DR contuvieron los epítomos encontrados en el copolímero 1 no tratado de control. La reactividad cruzada entre el copolímero 1 y diversas fracciones eluidas se detectó por ensayo de ELISA directo usando anticuerpos policlonales anti-copolímero 1 biotinilados. El copolímero 1 o las fracciones del copolímero 1 se diluyeron a 0,4 µg/ml y 2,0 µg/ml y se sembraron 100 µg/pocillo por duplicado sobre una placa de inmunoensayo de microtitulación de 96 pocillos (PRO-BIND™, Falcon, Lincoln Park, N.J.), se incubaron durante 1 h a 37 °C y se lavaron tres veces con TBS que contenía 0,05 % de Tween-20. A continuación, los pocillos se bloquearon con TBS que contenía 3 % de BSA, seguido de la adición de anticuerpos anti-copolímero 1 biotinilados (a una dilución de 1:5000, 100 µl/pocillo). Se detectaron complejos anticuerpo-ligando usando fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina (a una dilución de 1:3000, BioRad) y fosfato de p-nitrofenilo en tampón trietanolamina (BioRad; Hercules, CA). La absorción a 410 nm se monitorizó por un lector de microplacas (Dynatech MR4000).

Los ensayos de unión de anticuerpos mostraron que todas las fracciones fueron similarmente reconocidas por los anticuerpos anti-copolímero, sugiriendo que estas fracciones de heteropolímero unidas compartieron epítomos similares o idénticos entre sí y con el copolímero 1 de control.

#### Caracterización de los motivos de unión de copolímero 1-HLA

Cuando se une, la proteína de clase II del MHC protege el sitio de unión del copolímero 1 de la digestión con peptidasa. Para obtener la(s) secuencia(s) de aminoácidos del (de los) sitio(s) de unión dentro del copolímero 1 para moléculas de HLA-DR, se incubó copolímero 1 1 mM por separado con 100 µm de cada tipo de molécula de HLA-DR en un volumen de 10 µl de PBS durante 40 horas a 37 °C, de manera que la relación molar del copolímero 1 con respecto a HLA-DR fue 10:1. Se añadieron dos unidades de aminopeptidasa I a la reacción durante las últimas 18 h de incubación. La aminopeptidasa I es una metaloproteína aislada de *Streptomyces griseus* (Spungin y col. 283 J. BIOCHEM 471 (1989)) y está disponible de Sigma Chemicals, St. Louis, MO. La aminopeptidasa 1 elimina los extremos terminales amino del copolímero 1 que sobresalen de las moléculas de HLA-DR, y digiere el copolímero 1 no unido restante (Mouritsen y col. 148 J. IMMUNOL. 1987 (1992); Larsen y col. 184 J. EXP. MED. 183 (1996)). Las posteriores digestiones del copolímero 1 con aminopeptidasa se realizan en volúmenes aumentados de escala un factor de veinte-cuarenta veces, por ejemplo, 300 µl de heteropolímero digeridos con 60 µl de aminopeptidasa. Las muestras se concentran por centrifugación a un volumen final de aproximadamente 100 µl usando dispositivos de ultrafiltración Centricon 10.

Los complejos de copolímero 1-HLA-DR y el copolímero 1 no unido se analizaron por SDS-PAGE, usando un sistema de electroforesis mini-cell de NOVEX, un gel de separación de acrilamida al 10 % y un gel de apilamiento de acrilamida al 5 %. Los complejos de copolímero 1-HLA-DR1 migraron bajo condiciones no reductoras durante 1 h a 200 V, se tiñeron con azul brillante de Coomassie, se fijaron durante 3 h en 10 % de metanol/10 % de ácido acético y se secaron sobre papel de

celofán (BioRad) a 25 °C. Se encontró que los complejos de copolímero 1-HLA-DR eran resistentes a la disociación mediada por SDS, formando complejo de mayor peso molecular con heterodímeros αβ de HLA-DR1, y se observaron como numerosas bandas sobre el gel de poliacrilamida con pesos moleculares superiores a 50 kD, que indica que los complejos de copolímero 1-HLA-DR se protegieron. El tratamiento con aminopeptidasa I hizo que el copolímero 1 pareciera una mancha en la parte inferior del gel, que indica que se digirió completamente por la enzima.

Las fracciones que contienen los picos de los complejos de copolímero 1-HLA-DR se seleccionaron en la región entre aproximadamente 40 y 75 min de tiempo de elución para cada clase de complejo de HLA-DR para obtener la secuencia de los motivos de unión. Los polipéptidos del copolímero 1 digeridos unidos, que carecen de los extremos N sobresalientes, se eluyeron de HLA-DR mediante la adición de ácido acético (10 %) e incubación a 70 °C durante 15 min, seguido de ultrafiltración y concentración a vacío en un SpeedVac (Savant Instruments, Farmingdale, NY). Fridkis-Hareli y col. 163 CELL. IMMUNOL. 229 (1995).

Los 20 a 25 aminoácidos del extremo N del copolímero 1 sobresalen más allá de las proteínas HLA-DR, y no son parte de los motivos de unión del copolímero 1 para estas proteínas. Los datos de secuencia (Tabla 9) muestran que los péptidos del copolímero 1 unidos a HLA-DR1 tienen niveles significativamente mayores de glutamina en la primera y segunda posiciones del dominio de unión del copolímero 1, mayores niveles de lisina en la segunda y tercera posiciones, y mayores niveles de tirosina en la tercera a quinta posiciones. La tercera posición del péptido del copolímero 1 unido (lisina o tirosina) puede corresponderse con la posición P1 del sitio de unión del péptido dentro del surco de clase II del MHC debido a que el sitio P1 es el tercer aminoácido en los sitios de unión de otros péptidos que se unen a HLA-DR1. Por ejemplo, la tirosina se encuentra en la tercera (P1) posición del péptido 306-318 de HA, que se corresponde con la posición Y308 de la proteína HA. Stern y col. 368 NATURE (Lond.) 215. Estos datos son a diferencia de los patrones aleatorios de las secuencias encontradas en el copolímero 1 no tratado, que no muestra especificidad de secuencia o posicionamiento preferencial dentro del surco de clase II del MHC para cualquiera de los cuatro aminoácidos dentro del copolímero 1.

Para HLA-DR2, tanto la tirosina como la alanina se detectan después del tercer ciclo de degradación de Edman (Tabla 9). No se observa especificidad de secuencia o posicionamiento preferencial para las posiciones correspondientes a las posiciones de anclaje siguientes a P1 (en las posiciones correspondientes a las posiciones P4, P6 o P9 de HLA-DR1 y HLA-DR4; y en las posiciones correspondientes a las posiciones P4 o P7 de moléculas de HLA-DR2b). En todas las muestras, los niveles de alanina son superiores a aquellos de glutamina, tirosina y lisina, que era de esperar debido a que una mayor relación molar de alanina está presente en el copolímero 1. Para cada una de las moléculas de HLA-DR1 y HLA-DR4, se encontró tirosina en la posición correspondiente a la primera posición de anclaje (el tercer residuo en el análisis de secuencias), seguido de alanina en las posiciones correspondientes a los sitios posteriores. En el copolímero 1 unido a HLA-DR-2, la tirosina también se enriqueció en la posición correspondiente a P1. El ácido glutámico se enriqueció en la primera posición del ciclo correspondiente a la posición P-2 y en la siguiente posición adyacente correspondiente a P-1, la lisina se enriqueció. Estos residuos pueden contribuir a las interacciones estables del copolímero 1 con las moléculas de HLA-DR y la interacción de este complejo con el receptor de linfocitos T (TCR).

Estos resultados indican que el copolímero 1 contiene motivos de unión de MHC de clase II. Puede ser que el copolímero 1 unido al surco del antígeno de moléculas de HLA-DR pueda actuar bien como un péptido de bloqueo o bien como un antagonista o agonista parcial, produciendo la supresión de respuestas de linfocitos T autoinmunes o anergia, o ambos. La invención de los solicitantes no depende de la teoría subyacente a la acción del copolímero 1 o terpolímeros.

40

**Tabla 9**

**Secuencias de unión de los péptidos del copolímero 1 unidos a moléculas de HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4**

HLA-DR	posiciones relativas de aminoácidos						
	-2	-1	1	4	6	7	9
DRBI*0101 DR-1	E	K	Y	A	A	A	A
DRBI*0401 DR-4	E	K	Y	A	A	A	A
DRBI*1501 DR-2	E	K	Y,A	A	A	A	A

**EJEMPLO 11**

**DESARROLLO DE PÉPTIDOS PARA LA UNIÓN DE MOLÉCULAS DE HLA-DR1 Y HLA-DR4**

- Los ejemplos previos indican que el copolímero 1 y los terpolímeros se unen a moléculas de HLA-DR humanas purificadas dentro de la ranura de unión al péptido e inhiben la unión de 306-318 de HA, un péptido del virus de la gripe que se une con alta afinidad a tanto moléculas de HLA-DR1 (DRB 1\*0101) como de HLA-DR4 (DRB 1\*0401). Además, los terpolímeros compuestos de solo tres aminoácidos (GAL, TGA, TAL y GTL) se unieron a moléculas de HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4 purificadas y compitieron con el péptido de colágeno, 261-273 de CII, para unirse a moléculas de proteínas HLA-DR1 (DR-B I \*0101) y -DR4 (DRB 1\*0401) asociadas a AR. Los terpolímeros también inhibieron clones de linfocitos T reactivos con CII.
- En este ejemplo, los péptidos de secuencia y longitud definidos (15 residuos) se sintetizaron usando las secuencias de los motivos de unión resumidos en la Tabla 9. Estos péptidos se analizaron para afinidad y especificidad de unión a moléculas de proteínas HLA-DR de clase II del MHC, para una capacidad para inhibir la unión de moléculas competidoras y para una capacidad para inhibir las respuestas de linfocitos T. Según la presente invención, estas propiedades son útiles en composiciones terapéuticas para tratar enfermedades inmunitarias.
- Los péptidos mostrados en la Tabla 10 se sintetizaron usando técnicas en fase sólida (Barany, G. y col., 1979. *The Peptides*, E. Gross y col., eds. (New York, NY: Academic Press) sobre un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems, y se purificaron por HPLC de fase inversa. Las secuencias de péptidos incluyeron 306-318 de HA, que tiene la secuencia PKYVKQNTLKLAT (SEC ID NO: 2) (MW 1718); CII 261-273, que tiene la secuencia AGFKGEQGPKEP (SEC ID NO: 3) (MW 1516); y 306-318 de HA agrupado por alaninas en los extremos N y C, APKYVKQNTLKLATA (SEC ID NO: 44). Los péptidos también se sintetizaron a una escala de 1 μmol usando el sistema de síntesis de péptidos Multipin (Chiron Technologies, Raleigh, NC). Los péptidos se sintetizaron como 15-meros con grupos amino libres en el extremo N y grupos carboxilo libres en el extremo C, y con biotina ligada al extremo N por el separador SGSG y que tiene un grupo carboxilo libre en el extremo C. La síntesis de péptidos se monitorizó incluyendo dos secuencias de péptidos estándar como controles, que se sometieron a HPLC y análisis de espectroscopía de masas. El péptido 306-318 de HA también se usó como control positivo para experimentos de unión. Se liofilizaron péptidos Pin y se resuspendieron a una concentración de 2 mg/ml en sulfóxido de dimetilo (DMSO). Bajo estas condiciones, la mayoría de los péptidos se solubilizaron completamente. La biotilación se realizó con exceso de N-hidroxisuccinimida-biotina (Sigma, St. Louis, MO) en DMSO como se describe en Fridkis-Hareli y col., 91 PROC. NAD. ACAD. Sci., USA 4872-4876 (1994). La biotina no reaccionada se eliminó por diálisis (membrana SpectraPor® MWCO 500, Spectrum Medical Industries, Houston, TX).
- Se prepararon péptidos que tenían motivos de secuencia de prueba para la unión a la ranura de moléculas de HLA-DR1 y -DR4 (véase la Tabla 10). Los péptidos generalmente contuvieron diversas combinaciones de ácido glutámico, lisina y alanina en el extremo N, seguido de tirosina en la posición correspondiente a P1 (mostrada en negrita en la Tabla 10), y a continuación alanina en los sitios de unión posteriores. Los motivos de secuencia de prueba se encuentran todos en tres grupos diferentes según estas posiciones en la consenso (Tabla 10). Los péptidos en el grupo I tuvieron lisina (K) en la posición correspondiente a P8 y tirosina (Y) en la posición correspondiente a P1 (en negrita en la Tabla 10). Previamente se ha sintetizado un péptido de referencia en este conjunto con lisina (K) en la posición correspondiente a P8 para aumentar la solubilidad y alanina en todos los otros residuos (SEC ID NO: 45). Jardetzky y col., 9 EMBO J. 1797-1803 (1990). Los péptidos en el grupo II tuvieron tirosina (Y) en la posición correspondiente a P1, pero tuvieron alanina (A) en la posición correspondiente a P8. Los péptidos en el grupo III tuvieron el aminoácido tirosina (Y) desplazado uno o dos residuos con respecto a la posición P1 en el péptido 306-318 de HA. Los péptidos en todos los grupos contuvieron uno o más residuos de ácido glutámico (E) y/o lisina (K), en posiciones variables como se observó en los motivos de unión arriba, y para potenciar la solubilidad. Tanto los conjuntos biotilados del extremo N como no marcados de péptidos se sintetizaron para estos estudios.

**Tabla 10**

**Grupos de péptidos sintéticos y posiciones consenso**

Grupo	SEC ID NO	secuencia de péptidos	posiciones consenso de aminoácidos
Control	44	APKYVKQNTLKLATA	A(306-318 de HA)A
I	45	AAAYAAAAAKAAAA	P1Y, P8K
	46	AKKYAAAAAKAAAA	

ES 2 527 760 T3

(continuación)

Grupo	SEC ID NO	secuencia de péptidos	posiciones consenso de aminoácidos
	47	AEYAAAAAAAAKAAA	
	25	AKEYAAAAAAAAKAAA	
	26	AEYAAAAAAAAKAAA	
	27	AAKYAEAAAAKAAA	
	28	EAKYAAAAAAAAKAAA	
	29	AEKYAAAAAAAAKAAA	
	30	KEYAAAAAAAAKAAA	
	31	AEEYAAAAAAAAKAAA	
	32	EKAYAAAAAAAAKAAA	
	33	AAKYEAAAAKAAA	
	34	EAAYAAAAAAAAKAAA	
	35	EKAYAAAAAAAAKAAA	
II	48	AEKYAAAAAAAAAAAA	P1Y, P8A
	49	AKEYAAAAAAAAAAAA	
	50	AKKYAEAAAAAAAA	
	51	AEYKAAAAAAAAAAAA	
	52	KEYAAAAAAAAAAAA	
	53	AEEKYAAAAAAAAAAAA	
	54	EKAYAAAAAAAAAAAA	
	55	EKKYAAAAAAAAAAAA	
	56	EAKYAAAAAAAAAAAA	
	36	AKKYEAAAAAAAA	
	37	AEYKAAAAAAAAAAAA	
	38	AAKYEAAAAAAAA	
	39	AAKYAEAAAAAAAA	
III	40	AEYAKAAAAAAAAAAAA	P1A, P8A
	41	AEKAYAAAAAAAAAAAA	
	57	EKYAAAAAAAAAAAA	
	42	AYKAEAAAAAAAA	
	43	AKYAEAAAAAAAA	

Se usan ensayos de unión competitiva para examinar si los péptidos sintéticos pueden competir satisfactoriamente con el copolímero 1 o con el péptido 306-318 de HA de alta afinidad para unirse a proteínas HLA-DR1 y HLA-DR4. En los ensayos de unión competitiva, tanto el copolímero 1 como el péptido 306-318 de HA agrupados por alaninas (APKYVKQNTLKLATA, SEC ID NO: 44) están biotinilados y se añaden el copolímero 1 no marcado o inhibidores de péptido. Estudios cinéticos indicaron que el copolímero 1 biotinilado inhibió la unión del copolímero 1 no marcado y de 306-318 de HA (SEC ID NO: 2) a HLA-DR1 recombinante mejor que los péptidos de grupos I-III. Sin embargo, varios péptidos que contienen lisina en la posición P8 (grupo I) son mejores inhibidores que los péptidos de secuencia similar, pero con una alanina en la posición P8 (grupos II y III de la Tabla 10). A diferencia, la unión del copolímero 1 biotinilado a moléculas de HLA-DR4 se inhibió eficazmente por muchos de los péptidos en grupos I-III. En cambio, la unión de 306-318 de HA biotinilado a HLA-DR4 se inhibió más por el copolímero 1 que por 306-318 de HA o por los péptidos de grupos I-III.

Para caracterizar adicionalmente la afinidad relativa de los péptidos del grupo I-III para unirse a moléculas de HLA-DR1, -DR2 y -DR4, se realizan ensayos de unión competitiva con péptidos Multipin biotinilados usando el copolímero 1 no marcado, 306-318 de HA o CII 261-273 como inhibidores. La unión de la mayoría de los péptidos del grupo I-III a HLA-DR1 y HLA-DR4 se inhibió por el copolímero 1 no marcado, 306-318 de HA (SEC ID NO: 2) y 261-273 de CII (SEC ID NO: 3), sin embargo, menos eficazmente que la unión de 306-318 de HA (SEC ID NO: 2). Algunos de los péptidos mostraron mayor afinidad por las proteínas HLA-DR1 (Tabla 11A) o HLA-DR4 (Tabla 11 B) que el copolímero 1, 306-318 de HA o 261-273 de CII.

Tabla 11A

## Afinidad de péptidos del grupo I-III por moléculas de HLA-DR1

SEC ID NO	secuencia de péptidos	306-318 de HA	Copolímero 1 inhibidor
44	APKYVKQNTLKLATA	13,0	3,3
25	AKEYAAAAAAKAAAA	19,0	
26	AAEYAAAAAAKAAAA	47,0	
27	AAKYAEAAAAKAAAA	42,0	16,0
28	EAKYAAAAAAKAAAA	33,0	
	Copolímero 1	10,0	8,0

20

Tabla 11B

## Afinidad de copéptidos seleccionados por HLA-DR4 (DRB1\*0401)

Grupo	SEC ID NO	secuencia de péptidos	306-318 de HA (µM)	Copolímero 1 (µM)
Control	44	APKYVKQNTLKLATA	26,0	8,2
I	45	AAAYAAAAAAKAAAA	7,0	
	25	AKEYAAAAAAKAAAA	4,5	
	26	AAEYAAAAAAKAAAA	3,2	1,6
	27	AAKYAEAAAAKAAAA	1,8	<1,0
	28	EAKYAAAAAAKAAAA	4,4	3,0
	29	AEKYAAAAAAKAAAA	6,5	
	30	KEAYAAAAAAKAAAA	4,5	
	31	AEEYAAAAAAKAAAA	2,0	
	32	EKAYAAAAAAKAAAA	3,3	

(continuación)

Grupo	SEC ID NO	secuencia de péptidos	306-318 de HA (µM)	Copolímero 1 (µM)
	33	AAKYEAAAAAKAAAA	4,0	
	34	EAYYAAAAAKAAAA	5,0	
	35	EKKYAAAAAKAAAA	1,8	
II	36	AKKYEAAAAA	2,2	
	37	AAEYKAAAAA	1,8	
	38	AAKYEAAAAA	1,2	
	39	AAKYAEAAAAA	1,2	
III	40	AEYAKAAAAA	3,0	
	41	AEKAYAAAAA	<1,0	
	42	AYKAEAAAAA	1,3	
	43	AKYAEAAAAA	3,0	
		Copolímero 1	2,5	20,0

Las afinidades se determinaron por competición con competidores biotinilados HA306-318 y el copolímero 1.

5 Todos los péptidos se probaron adicionalmente para la inhibición de respuestas de linfocitos T específicas de CII usando procedimientos descritos en los ejemplos previos. 306-318 de HA (péptido SEC ID NO: 2) inhibió tanto los clones de linfocitos T DR1 3.19 como 19.3 muy eficazmente (más del 95 % y 98 % para células 19.3 y 3.19, respectivamente). Sin embargo, los péptidos con SEC ID NO: 27, 48, 36 y 53 fueron tan buenos o mejores inhibidores de la respuesta de linfocitos T que el péptido de hemaglutinina del virus de la gripe de referencia 306-318 de HA.

10 Para linfocitos T restringidos a HLA-DR4, usando fibroblastos L transfectados con HLA-DR4 como célula presentadora de antígeno, se obtuvo el siguiente patrón de actividad: los péptidos SEC ID NO: 29, 31, 34, 35, 50, 51, 54, 38 y 41 fueron buenos inhibidores del clon de linfocitos T DR4 3838, mientras que el clon D3 se inhibió mejor por péptidos SEC ID NO: 46, 27, 34, 28 y 54. Estos péptidos produjeron niveles de inhibición de más del 80 % para las células D3 y 3838. El copolímero 1 tuvo solo un efecto mínimo sobre la respuesta de linfocitos T específica de CII, dando coherentemente menos del 20 % de inhibición. 306-318 de HA (SEC ID NO: 2) inhibió tanto los clones de linfocitos T DR4 3838 como D3 menos eficazmente (menos del 60 % de inhibición) que inhibió los clones DR1, 3.19 y 19.3.

15 Estos datos muestran que los péptidos de SEC ID NO: 46, 27, 34, 28 y 41 son significativamente mejores inhibidores de la respuesta de linfocitos T que el péptido de hemaglutinina del virus de la gripe de referencia 306-318 de HA. Los péptidos de SEC ID NO: 27 y 41 son inhibidores de alto nivel de linfocitos T específicos de CII restringidos a tanto HLA-DR-1- como a -DR-4.

20 Los datos en estos ejemplos, realizados con cada péptido al menos por duplicado, muestran que de 33 péptidos sintéticos únicos, varios inhibieron la unión de 306-318 de HA y el copolímero 1 a moléculas de HLA-DR1 y -DR4 recombinantes. Los péptidos que inhibieron la unión de 306-318 de HA o el copolímero 1 a moléculas de HLA-DR1 o -DR4 contuvieron tirosina en la posición P1. La presencia de ácido glutámico, alanina y lisina en diversas combinaciones sobre el lado del extremo N de P1 no pareció influir en la afinidad de la unión. De los residuos posteriores, la lisina en P8 fue importante para la inhibición de 306-318 de HA, pero no del copolímero 1 que se une a HLA-DR1. A diferencia de HLA-DR1, un mayor número de péptidos inhibieron la unión de tanto 306-318 de HA como del copolímero 1 a moléculas de HLA-DR4. Estos péptidos contuvieron tirosina en la posición correspondiente a P1 y tanto lisina como alanina en la posición correspondiente a P8, sin preferencia aparente para aminoácidos específicos en otras posiciones.

30 La afinidad de 306-318 de HA por HLA-DR4 recombinante fue menor, y la del copolímero 1 mayor, que por moléculas de HLA-DR1. Estas afinidades son similares a aquellas observadas con moléculas de HLA-DR1 y -DR4 purificadas de sangre humana. La unión de algunos de los péptidos biotinilados a tanto HLA-DR1 como -DR4 se inhibió por 261-273 de

CII, además de por 306-318 de HA y el copolímero 1, que muestra que estos péptidos pueden competir por la presentación a linfocitos T reactivos con CII, de un modo similar a aquel para la mezcla del copolímero 1 completo. Los péptidos con una afinidad próxima a o superior a la de las preparaciones de 261-273 de CII, 306-318 de HA y el copolímero 1 se enumeran en la Tabla 11A, para HLA-DR1, y la Tabla 11B, para HLA-DR4.

- 5 Varios de los péptidos 15-meros inhibieron los clones de linfocitos T específicos de colágeno tipo II. Estos péptidos tuvieron todos tirosina en la posición correspondiente a P1 y tanto lisina como alanina en la posición correspondiente a P8, sin otros patrones de secuencia específicos. Los ejemplos proporcionados aquí muestran la fuerte inhibición por varios heteropolímeros aleatorios compuestos de tres aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en tirosina, ácido glutámico, alanina y lisina. Estos heteropolímeros, especialmente TAL, compitieron con 261-273 de CII para unirse a moléculas de HLA-DR1 y -DR4 asociadas a AR, e inhibieron los clones de linfocitos T reactivos con CII. Además, el péptido SEC ID NO: 46, que incluye la secuencia directa tirosina-alanina-lisina, inhibió los linfocitos T reactivos con colágeno tipo II mejor que el copolímero 1, que indica que un péptido de aproximadamente 15 aminoácidos de longitud que tiene una única secuencia de tirosina-alanina-lisina puede sustituirse por la mezcla de polipéptidos aleatorios encontrada en el heteropolímero TAL.
- 10
- 15 Los resultados de los ejemplos anteriores indican que las realizaciones de la invención, con secuencias de aminoácidos individuales que incluyen al menos tres aminoácidos seleccionados de tirosina, ácido glutámico, alanina y lisina, tienen motivos de unión para posiciones de anclaje que se ajustan a moléculas de HLA-DR particulares y pueden actuar de agentes terapéuticos eficaces para enfermedades autoinmunitarias. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido corto sintético puro de una única secuencia puede tener menos efectos secundarios y mayor especificidad por un sitio de unión particular o enfermedad autoinmunitaria que una mezcla de polipéptidos de secuencia aleatoria. Por otra parte, las mezclas de polipéptidos contempladas por la presente invención pueden tener eficacia más amplia para muchos tipos de enfermedades autoinmunitarias. Por tanto, tanto los polipéptidos cortos de una única secuencia, como las mezclas de polipéptidos fácilmente proporcionadas por la presente invención, son valiosos agentes terapéuticos.
- 20

## EJEMPLO 12

### 25 EL COPOLÍMERO 1 INHIBE LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T SENSIBLES A UN PÉPTIDO ANTIGÉNICO DE MIASTENIA GRAVE

#### PROCEDIMIENTOS

##### Copolímero 1

El copolímero 1 se obtuvo de Teva Pharmaceutical Industries (Petach Tikva, Israel).

- 30 Se sintetizaron **péptidos relacionados con miastenia grave** sobre un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems usando técnicas en fase sólida. Barany y col., THE PEPTIDES 1 (1979). Los péptidos se purificaron por HPLC de fase inversa. Los péptidos usados fueron el péptido p259, véase Zisman y col., Hum Immunol 1995 Nov; 44(3):121-30; Brocke y col., Immunology 1990 Apr; 69(4):495-500

##### Secreción de IL-2

- 35 Se evaluó la secreción de IL-2 por la línea celular WCB AB en respuesta a los péptidos de miastenia grave y/o el copolímero 1. Se incubaron células ( $1,5 \times 10^4$ ) con el antígeno indicado. La secreción de IL-2 por la línea celular WCB AB se usó como medida de activación de aquella línea de linfocitos T.

#### RESULTADOS

- 40 La Tabla 12 indica que el péptido p259 estimula la secreción de linfocitos T. Sin embargo, cuando el copolímero 1 se incubaba con el péptido p259, la secreción de linfocitos T de IL-2 se inhibe de un modo relacionado con la dosis. Un copolímero 1 100  $\mu$ M inhibe aproximadamente el 91 % de secreción de IL-2 (Tabla 13), que indica que el copolímero 1 es un potente inhibidor de la activación de linfocitos T.

**Tabla 12**

**Secreción de IL-2 de la línea WCB AB en respuesta a p259**

Conc. de p259 (µM)	DO prom (450 nm)	DE	% de CV	IL-2 (pg/ml)
0	0,077	0,01		0
0,25	0,135	0,00		24
0,5	0,227	0,01	3,9	72
1	0,387	0,01	2,9	159
2	0,725	0,02	2,4	347

**Tabla 13**

**Secreción de IL-2 de la línea WCB AB en respuesta a Cop1 solo o p259 2 µM + Cop1**

Cop1 (µM)	DO prom (450 nm)	DE	% de CV	IL-2 (pg/ml)	% de inhibición
0	0,725	0,02	2,4	347	
1	0,086	0,01		0	
2	0,079	0,00		0	
10	0,086	0,00		0	
20	0,266	0,01	8,0	93	73
60	0,166	0,01		40	88
100	0,151	0,01	11,2	32	91

La absorbancia es el promedio de 3 muestras. Los valores de confianza se calcularon con respecto a la absorbancia de un blanco (% de CV = DE/(Prom-blanco)\*100).

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 5 <110> Aharoni, Rina  
Teitelbaum, Dvora  
Amon, Ruth  
Sela, Michael  
Fridkis-Harelli, Masha
- 10 Strominger, Jack  
<120> Tratamiento de afecciones autoinmunitarias con copolímero 1  
y copolímeros y péptidos relacionados  
<130> 1662/493762  
<140> presentada con la presente
- 15 <141> 23-07-1999  
<150> US 60/093.859  
<151> 23-07-1998

<150> US 60/101.825

<151> 25-09-1998

<150> US 60/102.960

<151> 02-10-1998

5 <150> US 60/106.350

<151> 30-10-1998

<150> US 60/108.184

<151> 12-11-1998

<150> US 60/123.675

10 <151> 09-03-1999

<160> 57

<170> WordPerfect 8.0 for Windows

<210> 1

15 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (residuos de MBP 84-102)

20 <400> 19

```

Asp  Glu  Asn  Pro  Val  Val  His  Phe  Phe  Lys  Asn  Ile  Val  Thr  Pro  Arg
  1              5              10              15
Thr  Pro  Pro
          19
    
```

<210> 2

25 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (residuos de HA 306-318)

30 <400> 2

```

Pro  Lys  Tyr  Val  Lys  Gln  Asn  Thr  Leu  Lys  Leu  Ala  Thr
  1      :              5              10              13
    
```

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> péptido sintético (aminoácidos de CII 261-273)

<400> 3

Ala Gly Phe Lys Gly Glu Gln Gly Pro Lys Gly Glu Pro  
1 5 10 13

<210> 4

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <400> 4

Ala Glu Lys Tyr Ala  
1 5

<210> 5

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 5

25 Ala Glu Lys Val Ala  
1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 6

Ala Glu Lys Phe Ala  
 1 5

<210> 7

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 7

Lys Glu Tyr Ala

10 1 4

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 8

Lys Tyr Ala Glu

20 1 4

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> péptido sintético

<400> 9

Lys Glu Val Ala

1 4

30 <210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 10

Lys Val Ala Glu  
1 4

5 <210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> péptido sintético

<400> 11

Lys Glu Phe Ala  
1 4

<210> 12

15 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

20 <400> 12

Lys Phe Ala Glu  
1 4

<210> 13

<211> 4

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 13

30 Lys Tyr Ala Ala  
1 4

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

5 <400> 14

Lys Lys Tyr Ala  
1 4

<210> 15

<211> 4

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 15

15 Lys Val Ala Ala  
1 4

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 16

25 Lys Lys Val Ala  
1 4

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> péptido sintético

<400> 17

Lys Phe Ala Ala  
1 4

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 18

Lys Lys Phe Ala

1 4

10

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido sintético

<400> 19

Ala Lys Tyr Ala Glu

1 5

20 <210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> péptido sintético

<400> 20

Glu Ala Lys Tyr Ala

1 5

<210> 21

30 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 21

Ala Lys Val Ala Glu

1 5

5 <210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> péptido sintético

<400> 22

Glu Ala Lys Val Ala

1 5

<210> 23

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

20 <400> 23

Ala Lys Phe Ala Glu

1 5

<210> 24

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 24

Glu Ala Lys Phe Ala

30 1 5

<210> 25

<211> 15

ES 2 527 760 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

5 <400> 25

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

<210> 26

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 26

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

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 27

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala  
25 1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> péptido sintético

<400> 28

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

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 29

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

10

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido sintético

<400> 30

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

20 <210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> péptido sintético

<400> 31

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

<210> 32

30 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 527 760 T3

<223> péptido sintético

<400> 32

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

5 <210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> péptido sintético

<400> 33

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

<210> 34

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

20 <400> 34

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

<210> 35

<211> 15

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 35

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

<210> 36

ES 2 527 760 T3

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> péptido sintético

<400> 36

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

<210> 37

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

15 <400> 37

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

<210> 38

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 38

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
25 1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 39

ES 2 527 760 T3

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

<210> 40

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 40

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

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 41

Ala Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
20 1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> péptido sintético

<400> 42

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

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

ES 2 527 760 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 43

Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

5            1                            5    10    15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 44

Ala Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Ala

1                            5    10    15

15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> péptido sintético

<400> 45

Ala Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1                            5    10    15

25 <210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> péptido sintético

<400> 46

Ala Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

1                            5    10    15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 47

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

10

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido sintético

<400> 48

Ala Glu Lys Tyr Ala  
 1 5 10 15

20 <210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> péptido sintético

<400> 49

Ala Lys Glu Tyr Ala  
 1 5 10 15

<210> 50

30 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 527 760 T3

<223> péptido sintético

<400> 50

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

5 <210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> péptido sintético

<400> 51

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

<210> 52

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

20 <400> 52

Lys Glu Ala Tyr Ala  
1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 53

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

<210> 54

<211> 15

ES 2 527 760 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

5 <400> 54

Glu Lys Ala Tyr Ala  
1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 55

15 Glu Lys Lys Tyr Ala  
1 5 10 15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 56

Glu Ala Lys Tyr Ala  
1 5 10 15

25 <210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> péptido sintético

<400> 57

Glu Lys Tyr Ala  
1 5 10 15

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una mezcla de polipéptidos que tienen un peso molecular promedio de 2.000 a 40.000 dalton, en el que cada polipéptido consiste en ácido glutámico, tirosina, alanina y lisina, en una cantidad eficaz para tratar un sujeto humano afectado con enfermedad de Crohn para la preparación de una composición farmacéutica que va a administrarse a un sujeto afectado con enfermedad de Crohn para el tratamiento de enfermedad de Crohn.  
5
2. El uso de la reivindicación 1, en el que en la mezcla de polipéptidos, el ácido glutámico está presente en una fracción molar de 0,14; la tirosina está presente en una fracción molar de 0,10; dicha alanina está presente en una fracción molar de 0,43; y la lisina está presente en una fracción molar de 0,34.
3. El uso de la reivindicación 1 o 2, en el que la mezcla de polipéptidos tiene un peso molecular promedio de 4.000 a 12.000 dalton.  
10
4. El uso de la reivindicación 3, en el que la mezcla de polipéptidos tiene un peso molecular promedio de 5.000 a 9.000 dalton.
5. El uso de la reivindicación 1, en el que en la mezcla de polipéptidos el ácido glutámico está presente en una fracción molar de 0,14; la tirosina está presente en una fracción molar de 0,10; dicha alanina está presente en una fracción molar de 0,43; y la lisina está presente en una fracción molar de 0,34, y en el que la mezcla de polipéptidos tiene un peso molecular promedio de 5.000 a 9.000 dalton.  
15
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la composición farmacéutica se administra por vía oral, tópicamente, por inhalación o mediante inyección.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la mezcla de polipéptidos es el copolímero 1.
8. Copolímero 1 para su uso en el tratamiento de enfermedad de Crohn.  
20

Figura 1

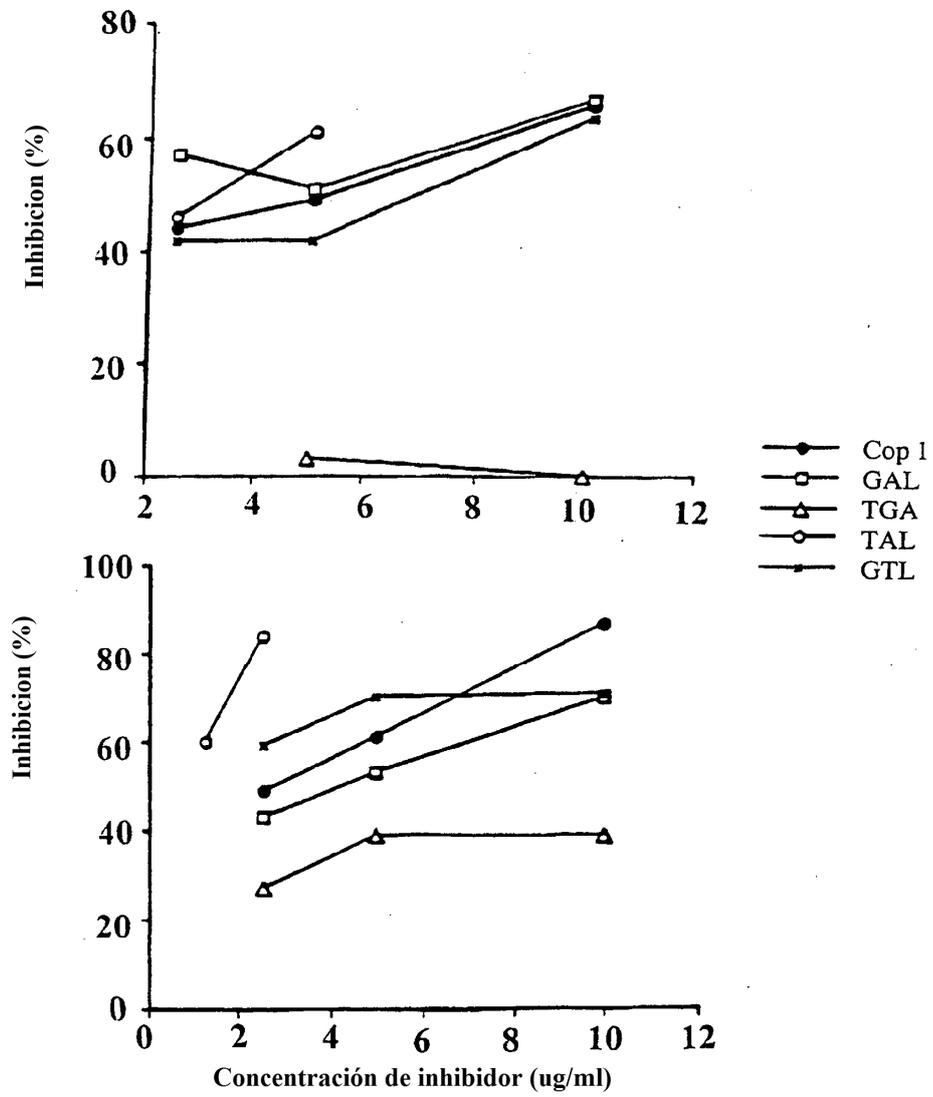


Figura 2A

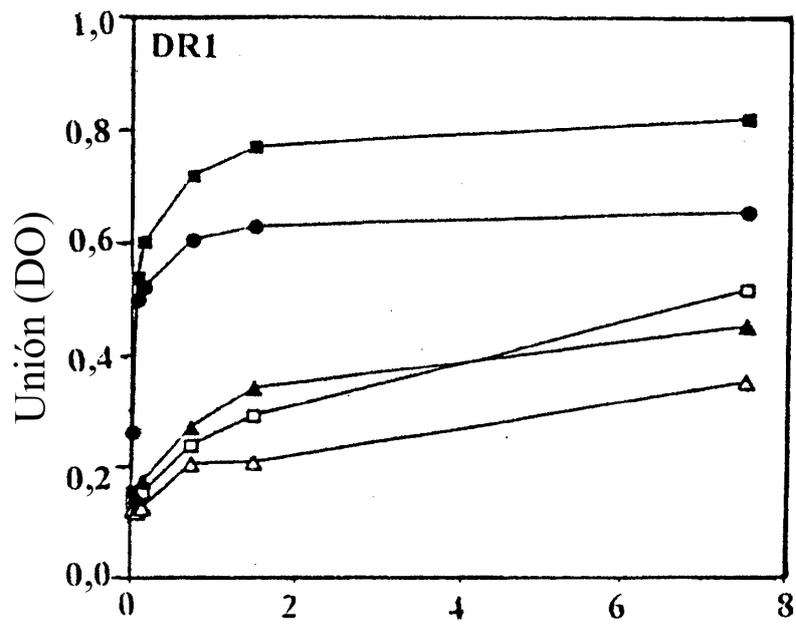


Figura 2A cont.

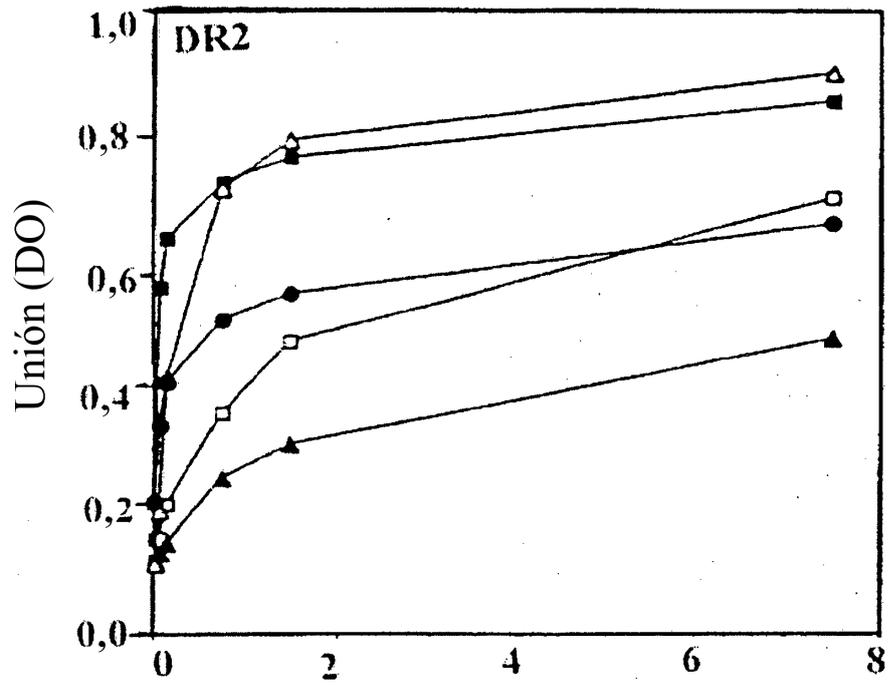


Figura 2A cont.

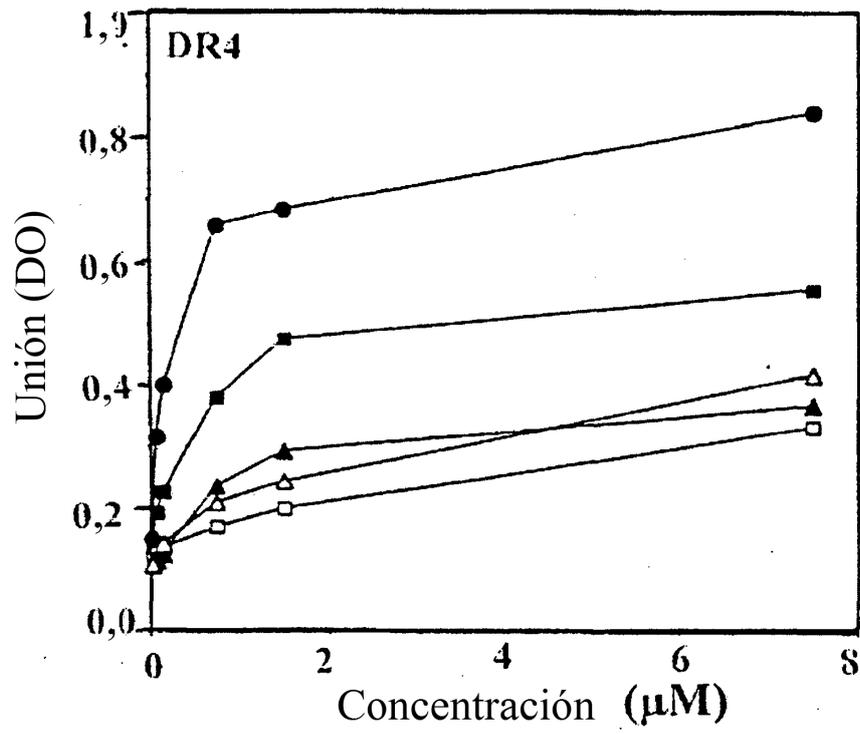


Figura 2B

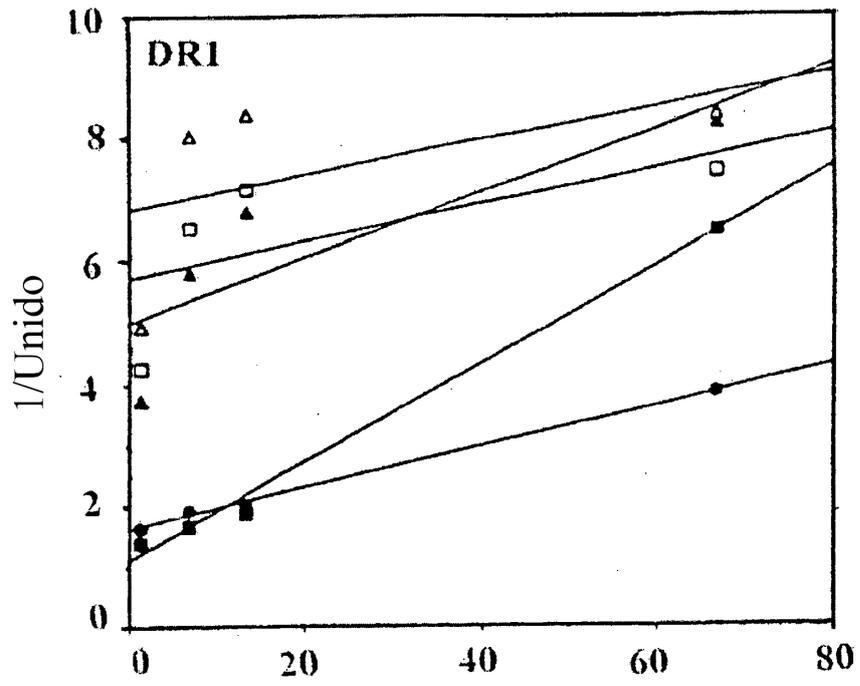


Figura 2B cont.

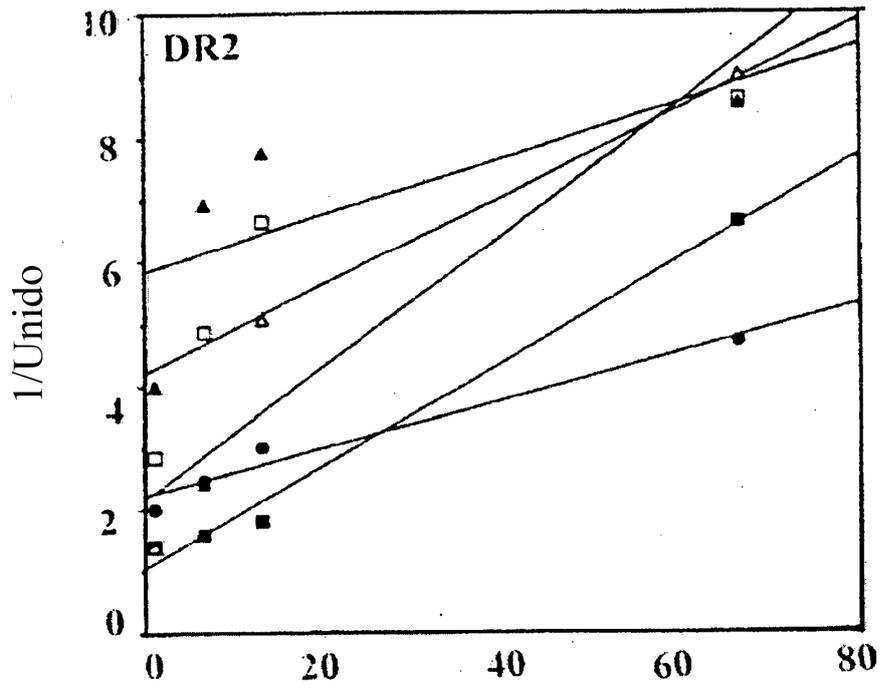


Figura 2B cont.

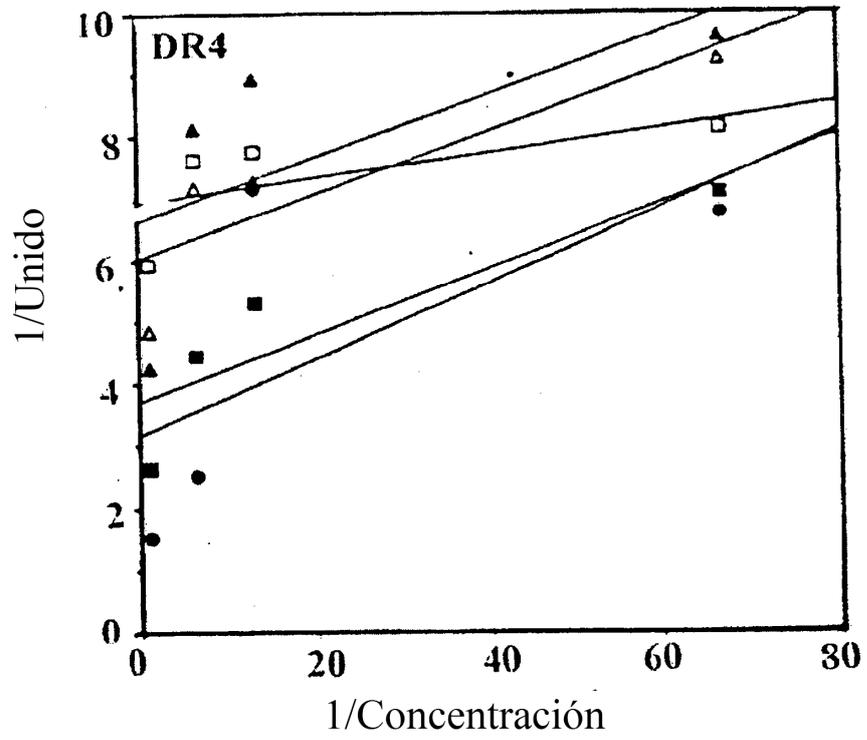


Figura 3

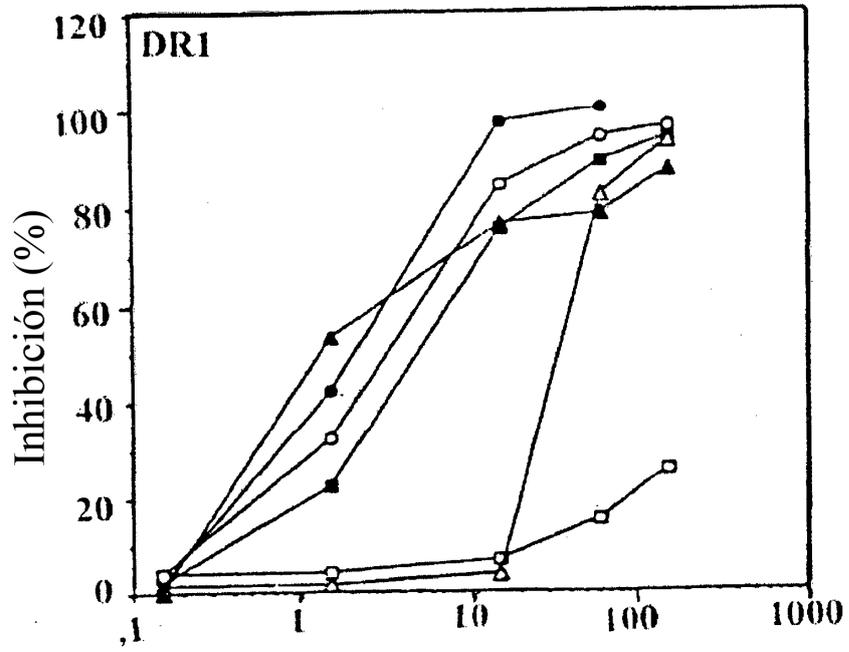


Figura 3 cont.

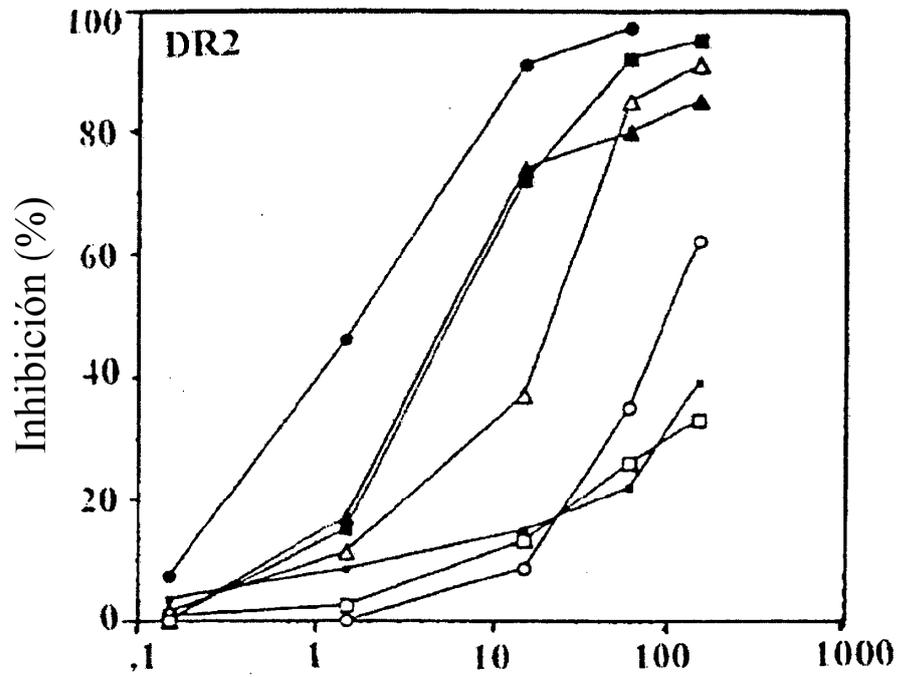


Figura 3 cont.

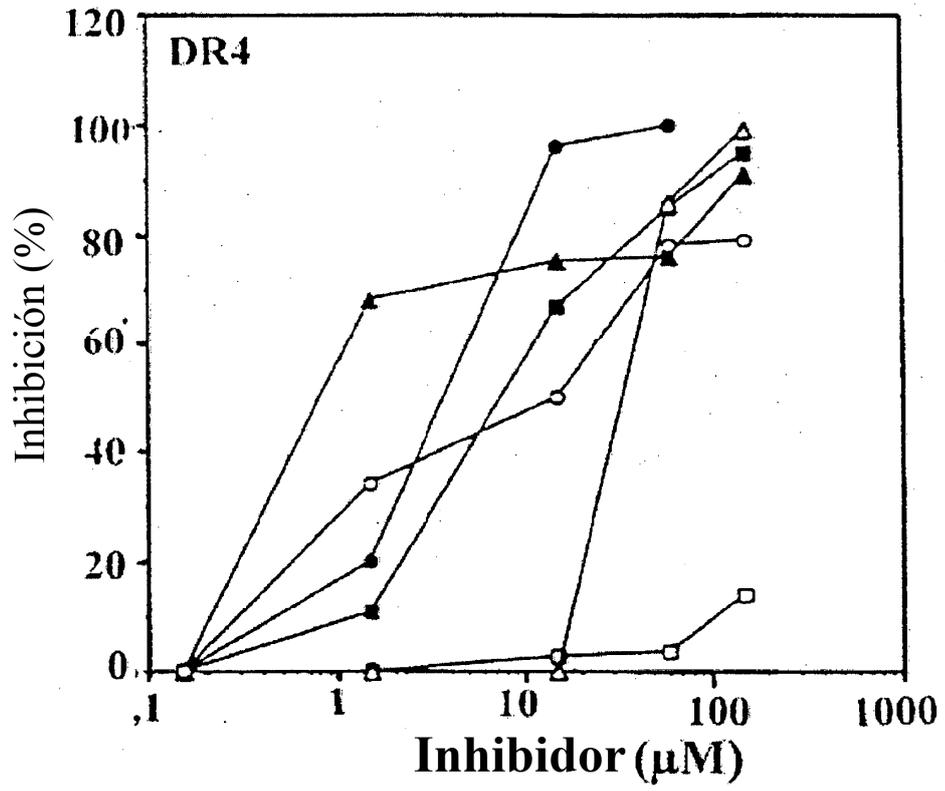


Figura 4A

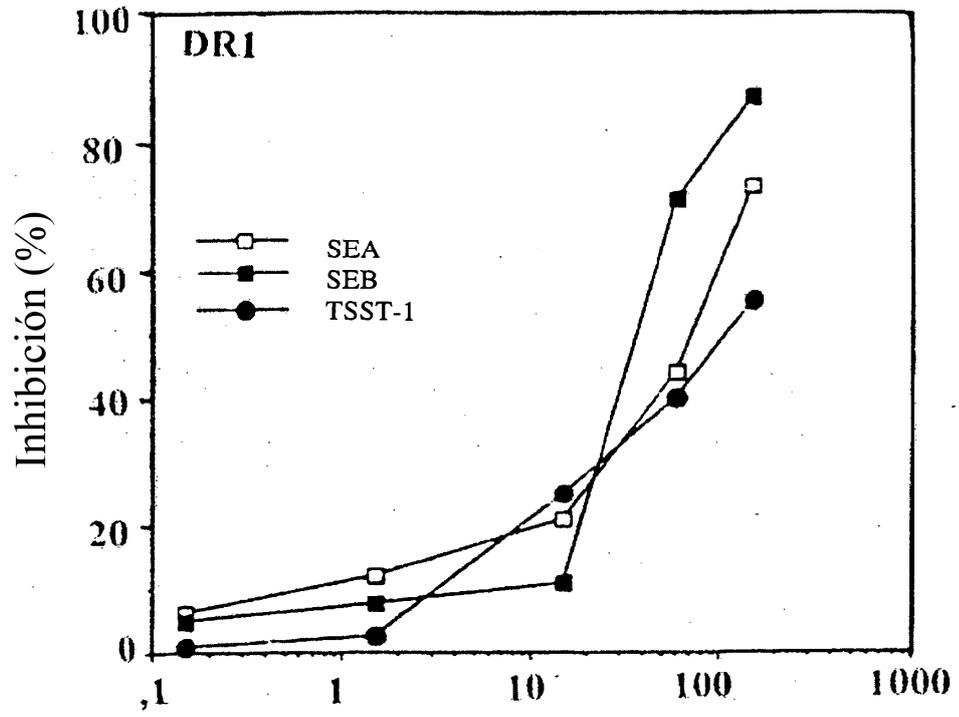


Figura 4A cont.

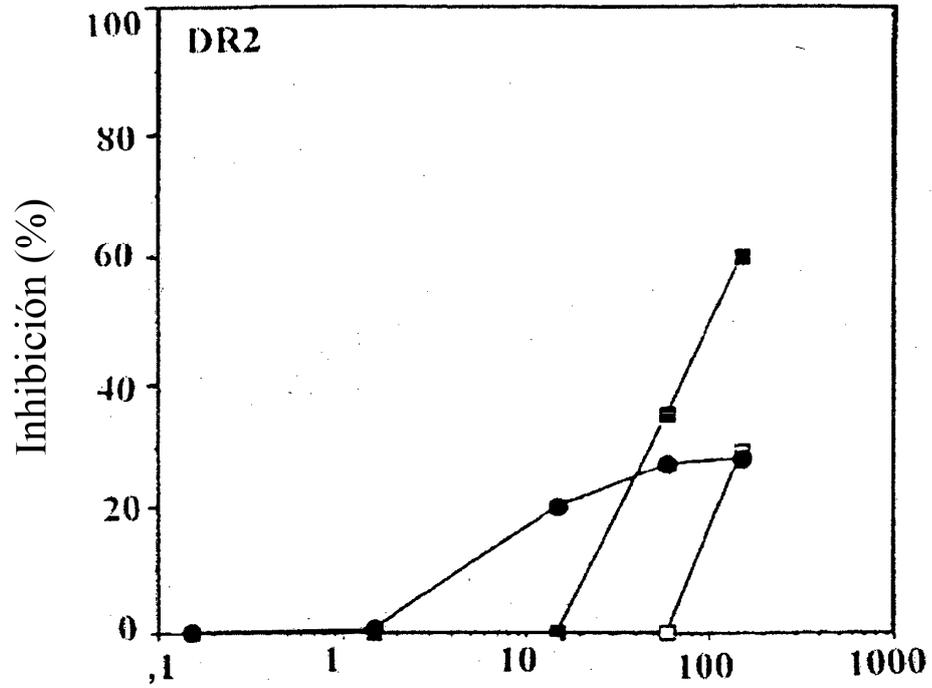


Figura 4A cont.

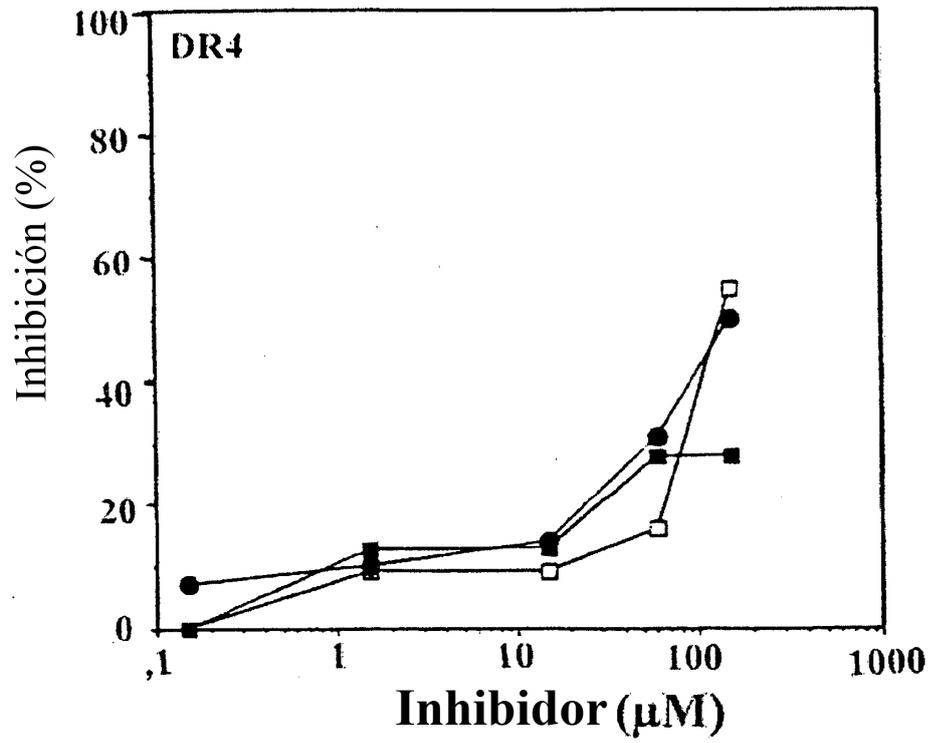


Figura 4B

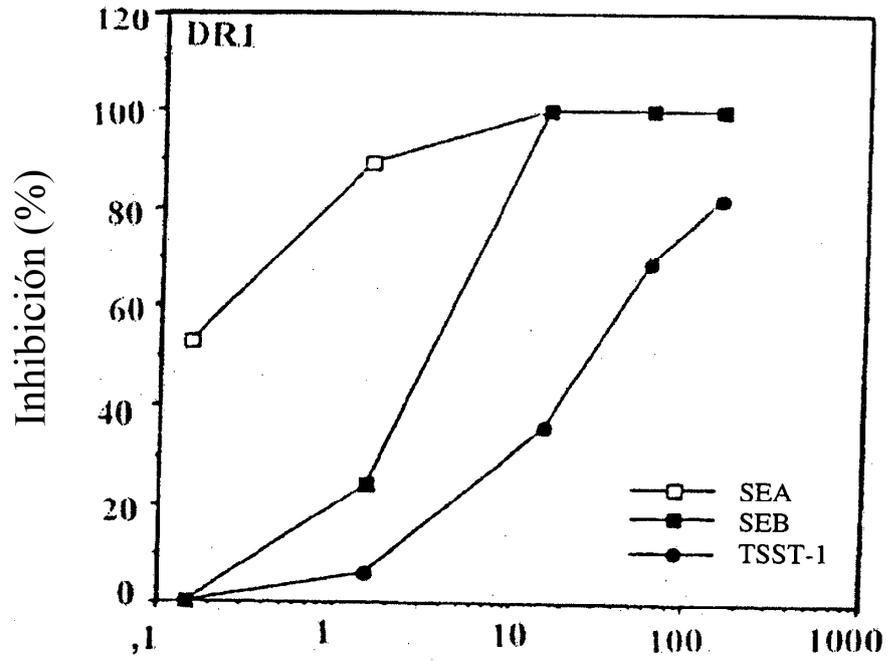


Figura 4B cont.

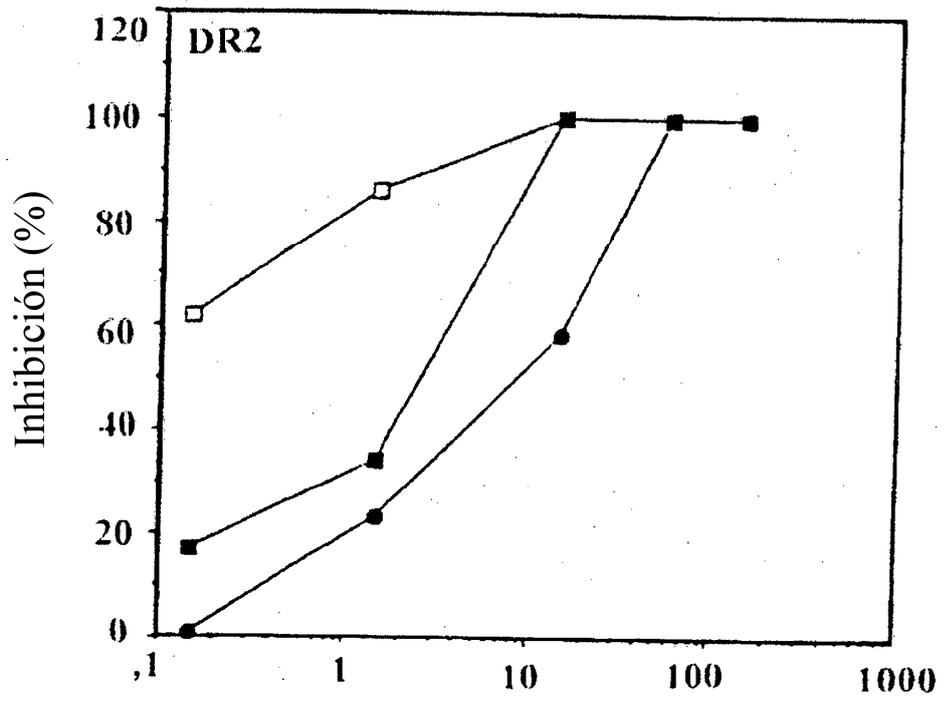


Figura 4B cont.

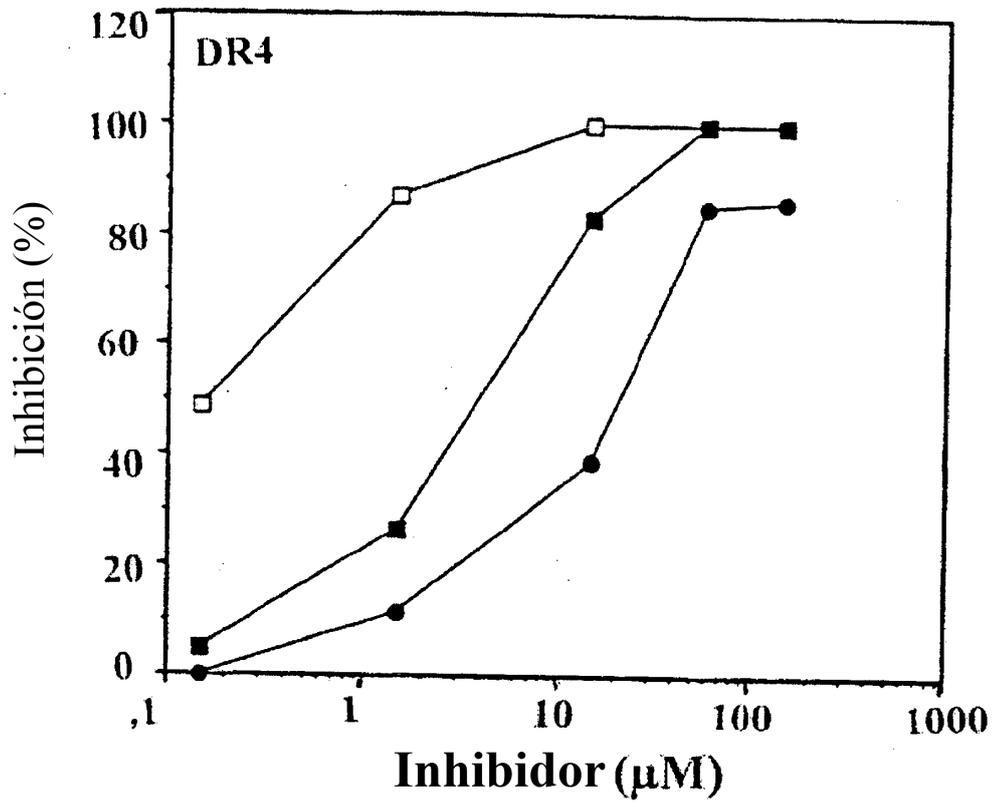


Figura 4C

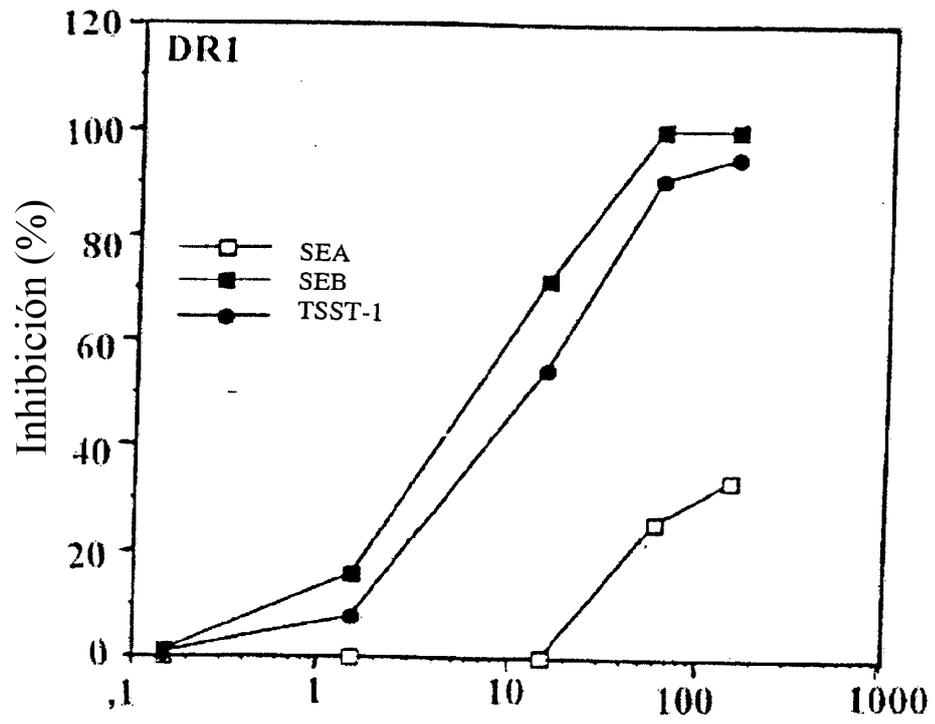


Figura 4C cont.

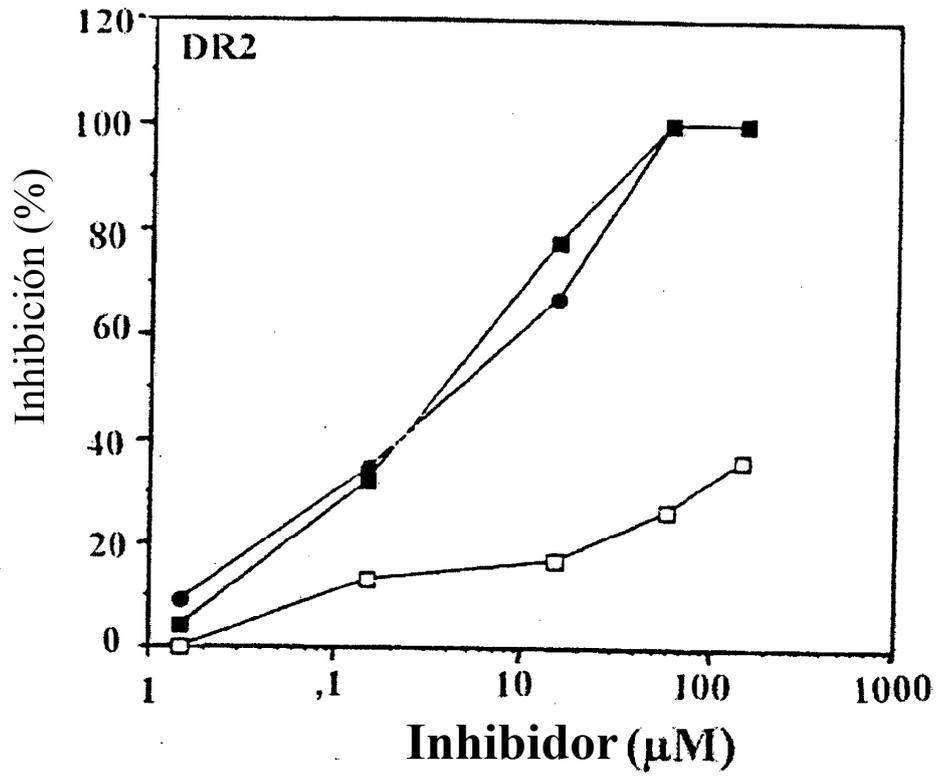


Figura 5A

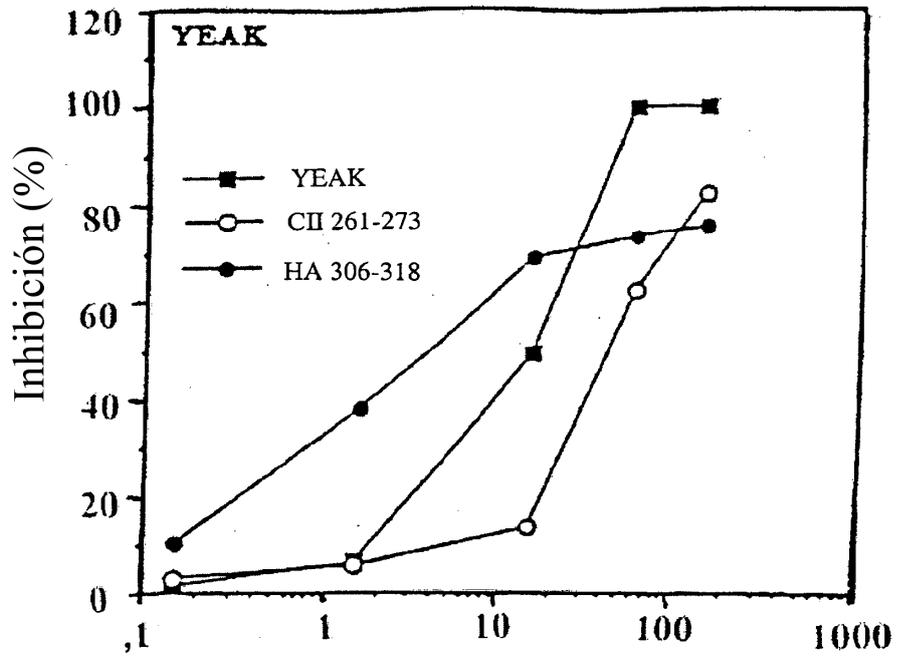


Figura 5A cont.

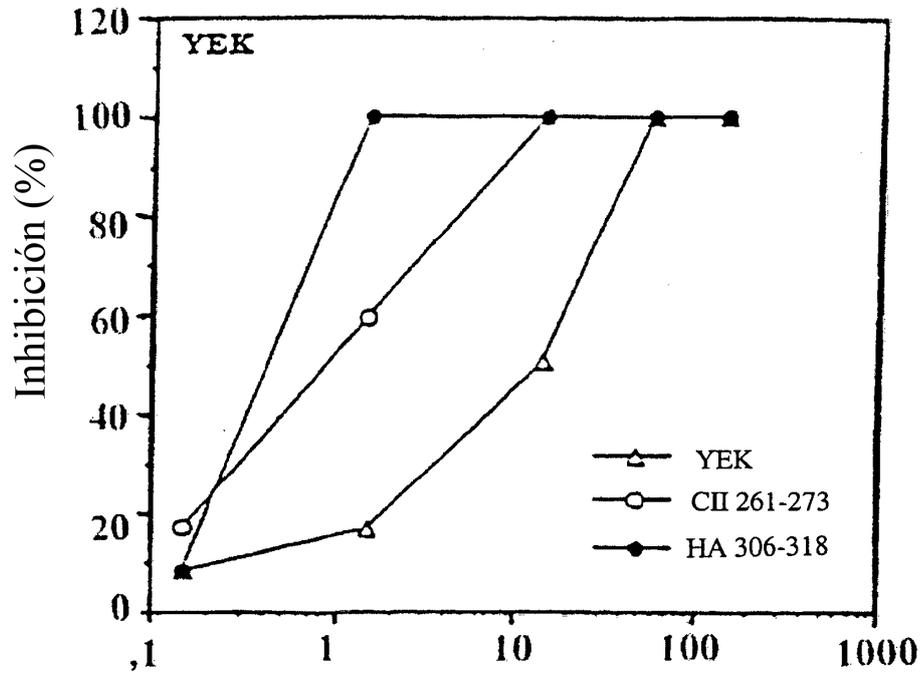


Figura 5A cont.

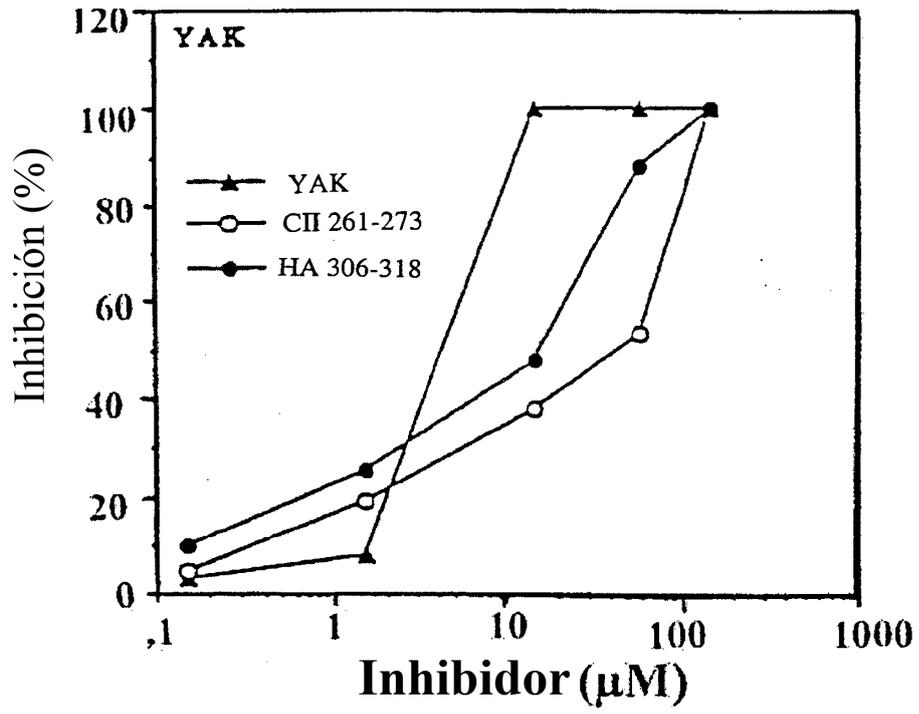


Figura 5B

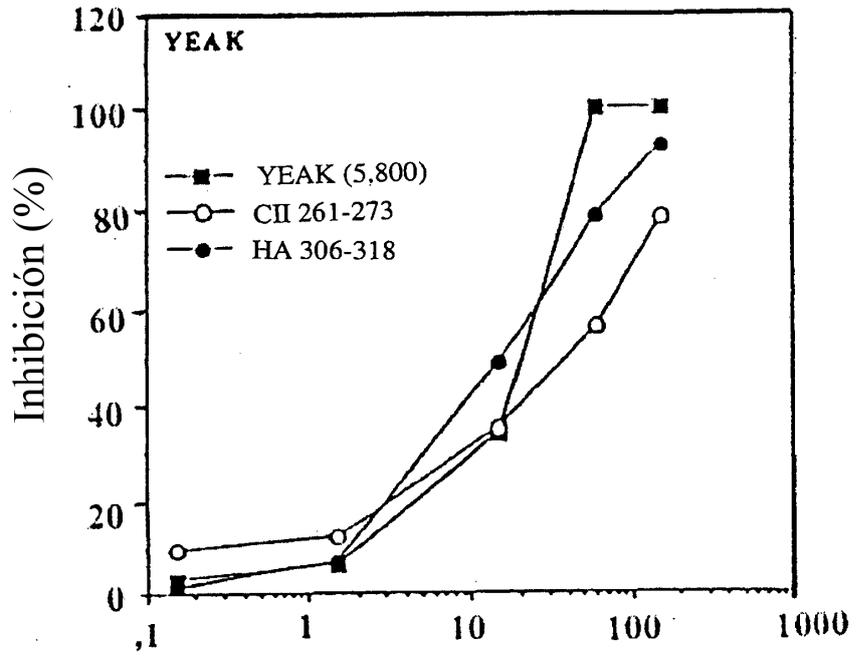


Figura 5B cont.

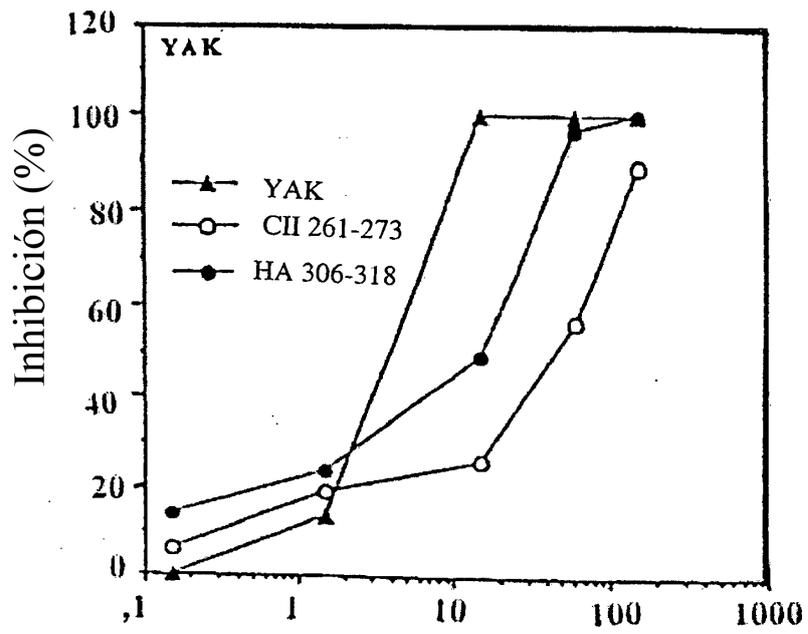


Figura 5B cont.

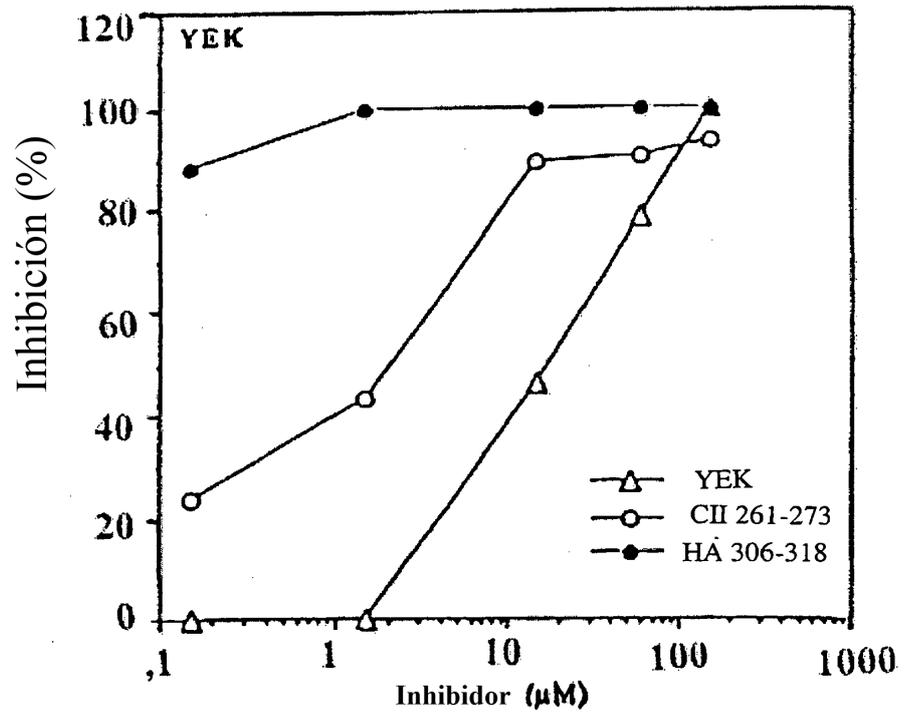


Figura 5B cont.

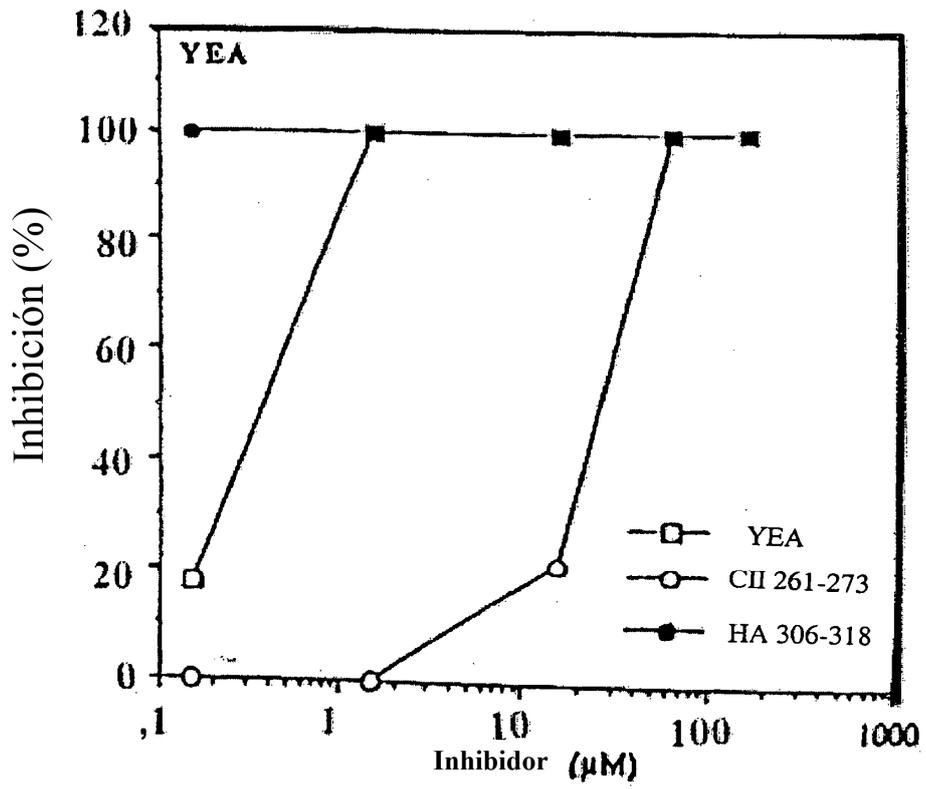


Figura 6

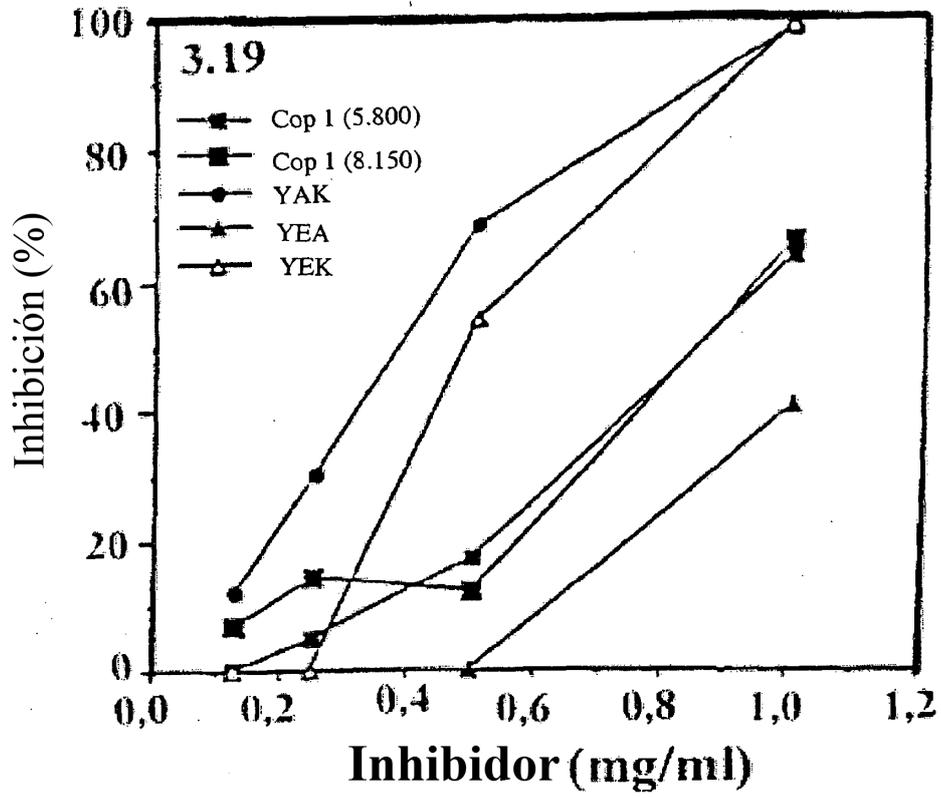


Figura 6 cont.

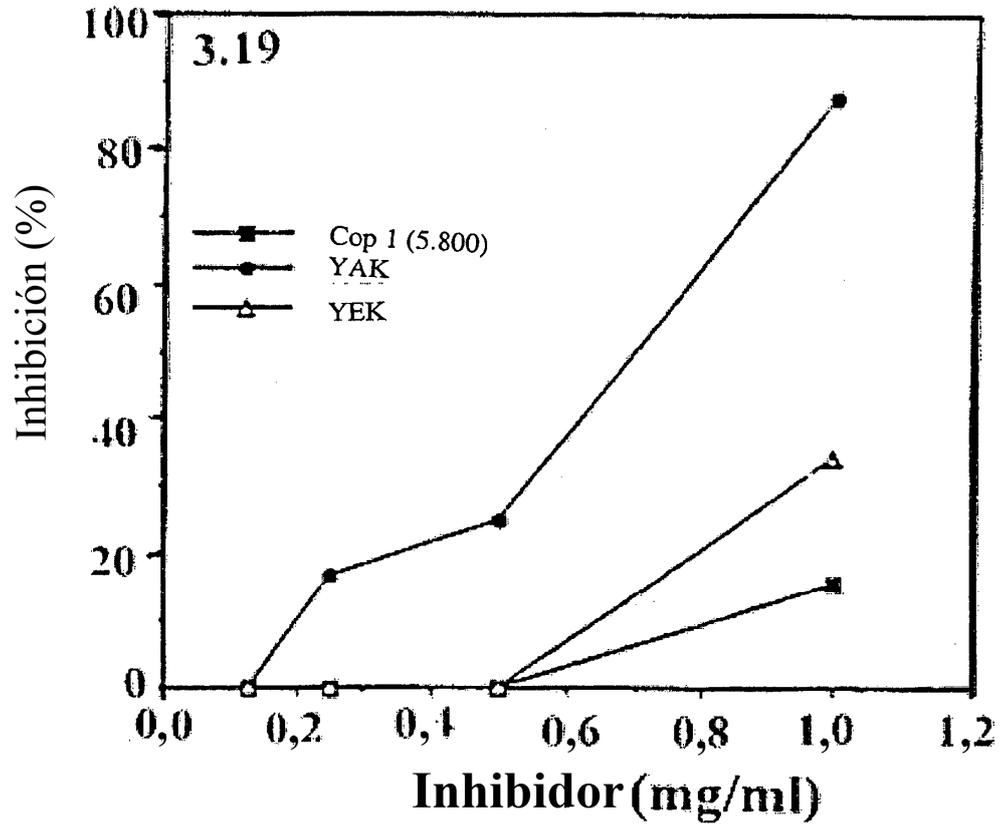


Figura 6 cont.

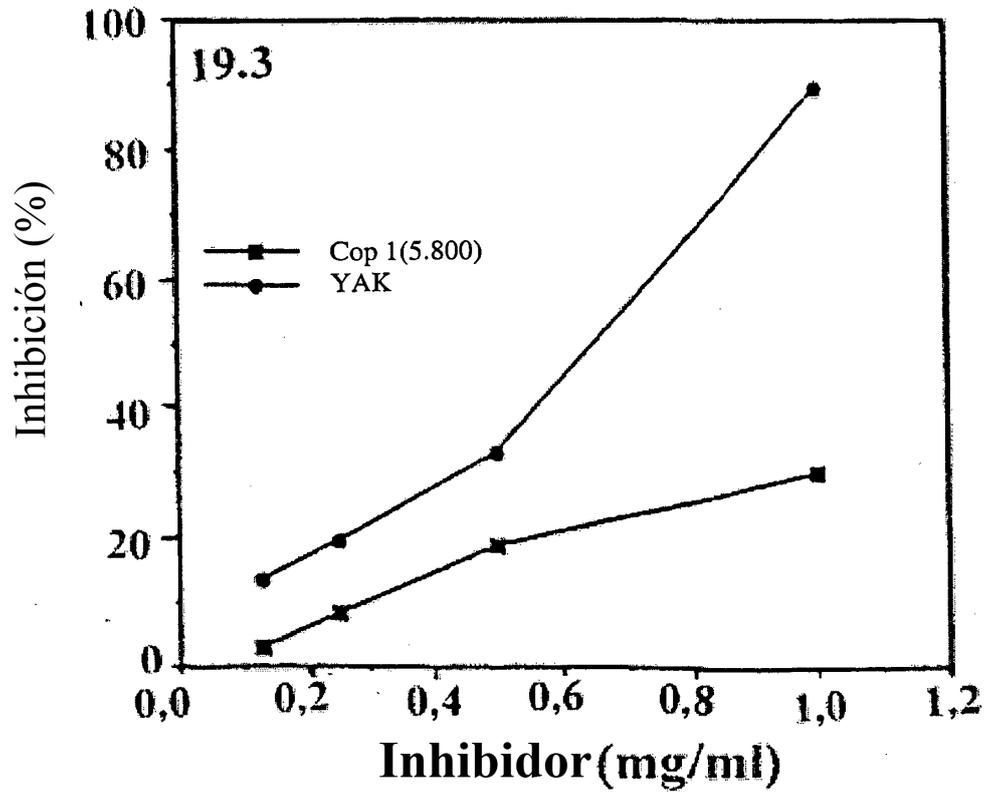


Figura 7A

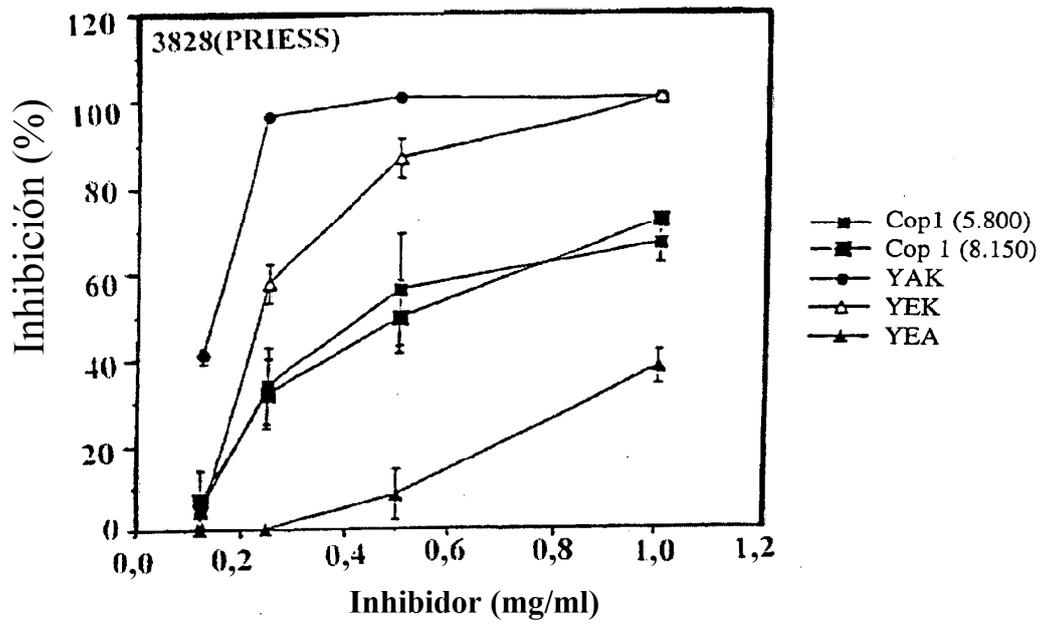


Figura 7A cont.

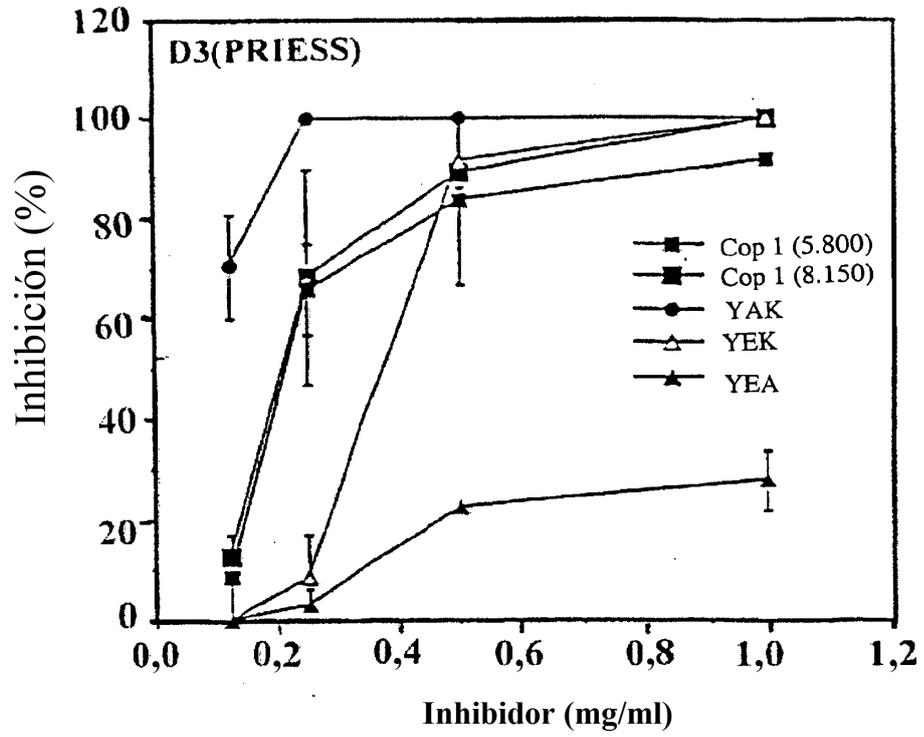


Figura 7B

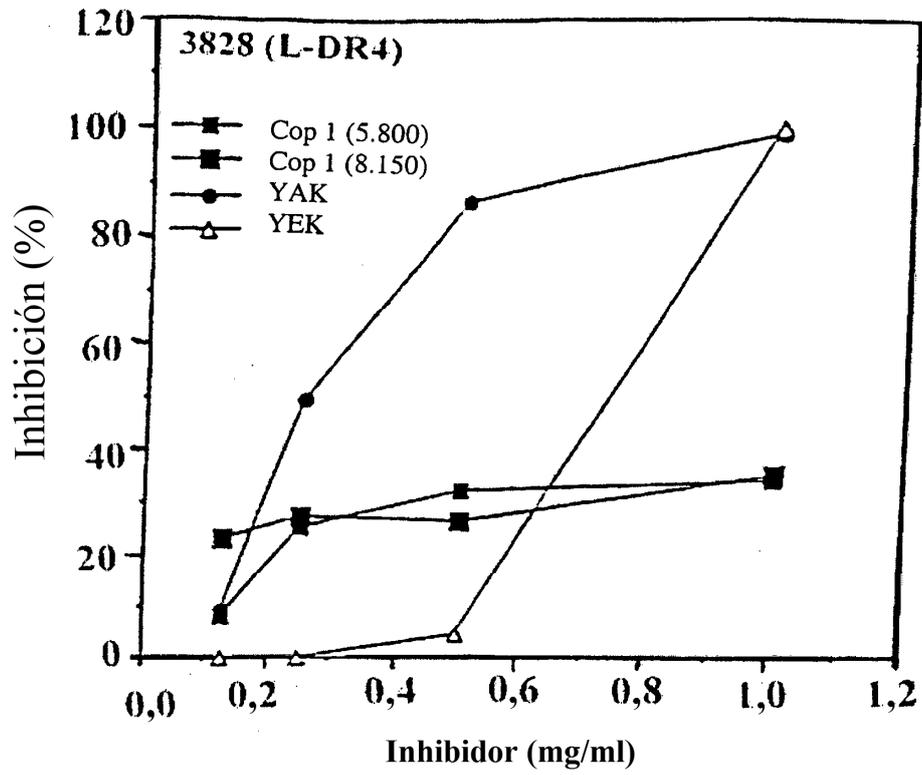


Figura 7B cont.

