

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 697**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2005 E 05774723 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1781315**

54 Título: **Inhibidores peptídicos para mediar respuestas de estrés**

30 Prioridad:

**23.08.2004 US 603255 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.04.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HERKEL, JOHANNES;  
COHEN, IRUN R;  
ROTTER, VARDÁ;  
LOHSE, ANSGAR W;  
EREZ, NETA;  
MIMRAN, AVISHAI y  
KAM, NA'AMAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 533 697 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**

Inhibidores peptídicos para mediar respuestas de estrés

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos reconocidos por anticuerpos anti-idiotípicos dirigidos contra un anticuerpo anti-p53, siendo capaces estos péptidos de inhibir las respuestas de estrés celular e inmune en una célula eucariota, para el tratamiento de trastornos degenerativos e inflamación en seres humanos.

10

Antecedentes de la invención

Apoptosis

15

La apoptosis, o muerte celular programada, tiene una importancia fundamental para los procesos biológicos normales, incluyendo la embriogénesis, mantenimiento de la homeostasis de tejidos, desarrollo celular de organismos multicelulares, eliminación de células infectadas por virus, y el desarrollo del sistema inmune (Ellis *et al.*, 1991). Es un tipo de muerte celular que es fundamentalmente distinto de la muerte degenerativa o la necrosis en que es un proceso activo de autodestrucción celular dirigida por genes, el cual, en algunos casos, cumple una función homeostática biológicamente significativa.

20

p53

25

La proteína p53, originalmente identificada como un antígeno asociado a tumores, es el producto de un gen supresor de tumores que funciona deteniendo el crecimiento de células mutadas o aberrantes (Baker *et al.*, 1990). Se cree que la p53 funcional detecta el daño en el ADN (Lee *et al.*, 1995) y por consiguiente induce la reparación del ADN (Kastan *et al.*, 1991), la detención del crecimiento (Kuerbitz *et al.*, 1992), o la apoptosis (Yonish-Rouach *et al.*, 1991) de las células aberrantes. En particular, p53 controla la estabilidad genómica eliminando células genéticamente dañadas de la población de células, y una de sus principales funciones es prevenir la formación de tumores.

30

La proteína p53 tiene al menos dos sitios de unión a ADN:

35

(1) el núcleo de la proteína p53, que interactúa específicamente con una secuencia de ADN en la región promotora de genes que responden a p53 (el-Deiry *et al.*, 1992); y

(2) el extremo C-terminal de la proteína p53, que puede reconocer características comunes al ADN dañado en general (Lee *et al.*, 1995; Foord *et al.*, 1991).

40

La proteína p53 es un factor de transcripción que se une específicamente a un sitio consenso presente en las secuencias reguladores de genes dependientes de p53 (el-Deiry *et al.*, 1992). La mutación del gen de p53 en el dominio que codifica las secuencias implicadas en la unión a los sitios reguladores de ADN específicos causa una pérdida de supresión tumoral. Por lo tanto, no es sorprendente que una proporción significativa de tumores humanos naturales porten p53 mutada (Hollstein *et al.*, 1991).

45

p53 tiene una semivida corta, y, por consiguiente, se sintetiza y degrada en la célula de manera continua. Sin embargo, cuando se somete a una célula a estrés, p53 se estabiliza. Los ejemplos de estreses celulares que inducen la estabilización de p53 son:

50

- a) daño en el ADN, tal como daño causado por radiación UV (ultravioleta), mutaciones celulares, quimioterapia, y radioterapia;
- b) hipertermia;
- c) hipoxia; y
- d) desregulación de los microtúbulos causada por algunos fármacos quimioterapéuticos, por ejemplo, tratamiento usando taxol o alcaloides de la vinca.

55

La p53 activada por estrés induce una cascada de eventos que dan como resultado una detención del crecimiento o la apoptosis de la célula estresada, de este modo previniendo el sobrecrecimiento de células aberrantes y la formación de tumores (Ko, 1996). Sin embargo, la activación excesiva de p53 después de un estrés grave puede ser perjudicial para el organismo, y puede deteriorarse la función de los tejidos por una apoptosis excesiva (Komarova, 2001).

60

Específicamente, la radioterapia y la quimioterapia muestran efectos secundarios graves, tales como daño grave al sistema linfóide y hematopoyético y a los epitelios intestinales, que limitan la eficacia de estas terapias. Otros efectos secundarios, como la pérdida del cabello, también están mediados por p53 y desvirtúan además las terapias contra el cáncer. Por lo tanto, para eliminar o reducir efectos secundarios adversos en los tejidos normales asociados con el

65

tratamiento del cáncer, podría ser beneficioso inhibir la actividad de p53 en los tejidos normales durante el tratamiento de tumores deficientes en p-53, y de este modo proteger a los tejidos normales.

La inactivación de p53 se ha considerado un suceso indeseable y no deseado, y se ha efectuado un esfuerzo considerable para facilitar el tratamiento del cáncer restaurando la función de p53. Sin embargo, la restauración o imitación de p53 causa los problemas anteriormente descritos con respecto al daño de células de tejidos normales durante la quimioterapia o radioterapia. Estas células normales están sometidas a estrés durante la terapia contra el cáncer, lo que conduce a que p53 en la célula cause una muerte programada. El tratamiento del cáncer, por lo tanto, elimina tanto a células tumorales como a células normales.

La Patente de los Estados Unidos N° 6.593.353 divulga inhibidores de p53 en el tratamiento de enfermedades, afecciones y lesiones mediadas por p53.

La Patente de los Estados Unidos N° 6.420.136 divulga métodos para modular la actividad de la proteína p53 en células mediante la adición de una proteína que potencia o inhibe la actividad bioquímica de p53.

La Patente de los Estados Unidos N° 6.630.584 divulga un anticuerpo monocatenario que reconoce un epítipo expuesto en p53 mutante, pero no en la de tipo silvestre, y una molécula de ADN que codifica al Fv monocatenario, composiciones farmacéuticas que comprenden al anticuerpo y métodos de tratamiento usando las composiciones farmacéuticas.

p53 y respuesta asociada al estrés

Los efectos adversos de la actividad de p53 en un organismo no están limitados a las terapias contra el cáncer. p53 se activa como consecuencia de una variedad de estreses asociados con lesiones (por ejemplo, quemaduras), enfermedades de origen natural (por ejemplo, hipertermia asociada con la fiebre, y afecciones de hipoxia local asociadas con un suministro bloqueado de sangre, ictus, e isquemia) y con el envejecimiento celular (por ejemplo, senescencia de fibroblastos), así como una terapia contra el cáncer. La inhibición temporal de p53, por lo tanto, también puede ser terapéuticamente eficaz en: (a) reducir o eliminar la muerte neuronal dependiente de p53 en el sistema nervioso central, es decir, lesión en el cerebro y médula espinal, (b) la conservación de tejidos y órganos antes de trasplantarlos, (c) preparación de un hospedador para un trasplante de médula ósea, y (d) reducir o eliminar el daño neuronal durante ataques, por ejemplo.

Además, varias enfermedades degenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ictus isquémico (Mattson, 2001; Martin, 2001), glaucoma (Nickells, 1999) degeneración secundaria después de un traumatismo (Raghupathi, 2000), infarto de miocardio (Haunstetter, 1998) están asociadas con la muerte celular excesiva del tejido sensible en respuesta al estrés. Por lo tanto, la inhibición temporal de la muerte celular relacionada con estrés puede servir para la prevención y terapia de enfermedades degenerativas (Komarova, 2001).

Anticuerpo monoclonal para el dominio de unión a ADN de p53

Los anticuerpos para ADN son característicos de muchas enfermedades autoinmunes, de manera destacable, lupus sistémico eritematoso (LSE) y particularmente nefritis por lupus. Sin embargo, actualmente no hay una explicación aceptada de manera general para la prevalencia de anticuerpos anti-ADN en trastornos autoinmunes. La inmunidad para el ADN parece estar dirigida por un antígeno (Radic *et al.*, 1994), pero es improbable que el ADN propio dirija al antígeno ya que normalmente en ADN de mamífero no induce una respuesta inmune anti-ADN (Pisetsky, 1996).

Se ha comunicado que la inmunización con anticuerpos monoclonales puede inducir respuestas inmunes que se extienden más allá de la especificidad del anticuerpo, probablemente, mediante conectividad anti-idiotípica basada en determinantes idiotípicos en las regiones variables del anticuerpo monoclonal inmunizante.

De acuerdo con la terminología de red de anticuerpo idiotípico, Ab1 es el primer anticuerpo, el anticuerpo que se une al antígeno, y Ab2 es el anticuerpo anti-idiotípico para Ab1. La región variable de Ab2 puede imitar la conformación del antígeno ya que tanto el antígeno como Ab2 pueden unirse mediante Ab1. Ab3 es el anticuerpo anti-idiotípico para Ab2. Debido a la cadena de complementariedad estructural, Ab1 y Ab3 pueden tener una especificidad similar para el antígeno original.

El anticuerpo PAb-421 es un anticuerpo monoclonal prototípico que reacciona con el dominio de unión a ADN C-terminal de p53. Se han dilucidado las secuencias de las cadenas pesada variable ( $V_H$ ) y ligera variable ( $V_L$ ) de PAb-421 anti-p53 (véase el documento WO 98/56416). Se sugirió el uso del anticuerpo PAb-421 para el tratamiento del cáncer, ya que activó la unión a ADN de p53 *in vitro* (véase el documento WO 94/12202).

Los inventores comunicaron previamente que la inmunización de ratones con PAb-421 indujo la formación de anticuerpos anti-idiotípicos que también se unen a ADN (Herkel *et al.*, 2000; y documento WO 00/23082). Dos de estos anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos, denominados Idi-1 e Idi-2, imitaron las propiedades de unión del dominio regulador de p53 y reaccionaron específicamente con PAb-421 y con ADN mono- y bicatenario.

Además, el documento WO 00/23082 se refiere al lupus sistémico eritematoso (LSE), que puede prevenirse o tratarse mediante la regulación negativa de la respuesta autoinmune al dominio de unión a ADN C-terminal de la proteína p53 (p53) por medio de un principio activo seleccionado del grupo que consiste en: (i) un péptido de, o que comprende, el dominio de unión a ADN C-terminal de la proteína p53; (ii) un anticuerpo monoclonal (AcM) específico para dicho dominio de p53 (Ab1), y fragmentos del mismo; (iii) un AcM específico para Ab1 (en lo sucesivo Ab2), y fragmentos del mismo; (iv) un péptido basado en una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada o ligera de dicho Ab1 o Ab2; (v) una molécula de ADN que codifica a (i) o (iv) o a la región variable de dichos Ab1 y Ab2 de (ii) y (iii); y (vi) linfocitos T específicos para de (i) a (iv), fragmentos de los mismos, receptores de linfocitos T (TCR) de los mismos y péptidos que comprenden la región variable de dichos TCR. El LSE también puede diagnosticarse ensayando con anticuerpos (Ab1) contra el dominio de unión a ADN C-terminal de p53 o con anticuerpos (Ab2) específicos para los anticuerpos Ab1.

Además, el documento WO 03/099868 describe un método para identificar moléculas que imitan un idiotipo de un auto-anticuerpo asociado a una enfermedad autoinmune (autoanticuerpos). El método comprende las siguientes etapas: (a) purificar autoanticuerpos del suero de uno o más pacientes afectados por la enfermedad autoinmune; (b) unir los autoanticuerpos a una fase sólida para formar una matriz de afinidad; (c) poner en contacto plasma agrupado o linfocitos B que comprenden inmunoglobulinas con la matriz de afinidad seguido de la retirada de componentes del plasma no unidos; (d) eluir las inmunoglobulinas unidas, que son anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) para autoanticuerpos, de la matriz; (e) proporcionar una biblioteca molecular que comprende una pluralidad de moléculas miembro; y (f) poner en contacto el anti-Id con la biblioteca molecular y aislar aquellas moléculas unidas que están unidas mediante el anti-Id, siendo las moléculas unidas aquellas que imitan a un idiotipo de autoanticuerpos. También se describen dichas moléculas.

Los presentes inventores sugirieron (después de la fecha de prioridad de la presente invención) que el ADN dañado tiene una estructura química definida que es reconocida por p53 y por anticuerpos Idi-1 e Idi-2 (Herkei, *et al*, 2004). En ninguna parte de la técnica antecedente se ha enseñado o sugerido que sea posible identificar nuevos péptidos que tengan propiedades anti-apoptóticas y antiinflamatorias usando dichos anticuerpos anti-idiotípicos.

Hay una necesidad no satisfecha de nuevas composiciones que puedan servir para atenuar la respuesta a estrés celular e inmune en el tejido normal, de modo que sea específica, segura y eficaz, de este modo reduciendo la gravedad del estrés asociado con enfermedades degenerativas y la inflamación inducida por estrés.

#### Sumario de la invención

La presente invención proporciona las realizaciones como se divulgan en las reivindicaciones. Específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

Un péptido que comprende un epítipo inmunorreactivo con un anticuerpo anti-idiotípico dirigido contra un anticuerpo anti-p53, en el que el anticuerpo anti-p53 es inmunorreactivo con al menos una parte del dominio regulador del extremo C-terminal de p53, y en el que el péptido muestra al menos una actividad seleccionada entre actividad anti-apoptótica y actividad antiinflamatoria, en el que el péptido tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEC ID N°: 1-4.

Una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, un péptido de la presente invención y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

El uso de un péptido de la presente invención para la preparación de un medicamento para modular las respuestas celulares e inmunes asociadas con el estrés en una célula de un organismo.

El uso de un péptido de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una afección o trastorno degenerativo en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el tratamiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido.

El uso de un péptido de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o afección inflamatoria en un sujeto que lo necesite.

La presente divulgación proporciona compuestos y métodos que comprenden péptidos para inhibir la respuesta celular e inmune al estrés para una variedad de afecciones asociadas con el estrés- Los péptidos muestran actividad anti-apoptótica y antiinflamatoria, de este modo aumentando la supervivencia en células o tejidos que están expuestos a estrés.

Aunque se ha descrito el uso de anticuerpos para p53 para inducir inmunidad antitumoral, en el presente documento se describen que también pueden usarse anticuerpos anti-idiotípicos inmunorreactivos con anticuerpos anti-p53 para definir terapias útiles para prevenir o disminuir la muerte celular.

Inesperadamente, ahora se divulga que los péptidos, reconocidos por anticuerpos monoclonales generados mediante inmunización idiotípica para un anticuerpo monoclonal anti-p53 tienen un uso potencial para terapia de enfermedades degenerativas en seres humanos y para modificar respuestas inflamatorias. En otras palabras, los anticuerpos anti-p53 (Abs) pueden generar Abs anti-idiotípicos, en los que estos últimos Abs reconocen epítopos útiles para prevenir la muerte celular o la inflamación.

En el presente documento se divulgan experimentos que demuestran la eficacia de los péptidos para mejorar la muerte celular inducida por estrés y la respuesta mediada por p53, inducida por estímulos tales como agentes que dañan al ADN, hipertermia, estrés tóxico y radiación  $\gamma$ .

Sorprendentemente, se descubrió además que los péptidos muestran actividad antiinflamatoria, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, los péptidos son útiles para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

En el presente documento se divulgan péptidos que comprenden un epítipo inmunorreactivo con un anticuerpo anti-idiotípico dirigido contra un anticuerpo anti-p53, en los que el anticuerpo anti-p53 es inmunorreactivo con al menos una parte del dominio regulador en el extremo C-terminal de p53. Los péptidos muestran al menos una actividad seleccionada entre actividad anti-apoptótica y actividad antiinflamatoria.

Los péptidos son inmunorreactivos con un anticuerpo anti-idiotípico dirigido contra el anticuerpo PAb-421 anti-p53 (Herke *et al.*, 2000). Los péptidos son inmunorreactivos con los anticuerpos monoclonales denominados Idi-1 e Idi-2, que tienen propiedades miméticas estructurales con el dominio regulador de p53 (Herke *et al.*, 2004).

El anticuerpo anti-idiotípico es una molécula que comprende secuencias de  $V_L$ -CDR3 y  $V_H$ -CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID N°: 15 y 18 y SEC ID N°: 21 y 24. En otra realización, el anticuerpo anti-idiotípico es una molécula que comprende regiones  $V_L$  y regiones  $V_H$  seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 9 y 10, SEC ID N°: 11 y 12, análogos y derivados de los mismos.

Los péptidos se caracterizan y sintetizan mediante métodos conocidos en la materia.

Los péptidos se caracterizan mediante espectrometría de masas y se sintetizan mediante síntesis química.

Los péptidos pueden tener complementariedad estructural con el dominio de unión a ADN de p53. Sin desear quedar ligados a cualquier teoría o mecanismo de acción particular, se postula que los péptidos pueden ser capaces de unirse a p53, por lo tanto evitando que p53 se una al ADN dañado. En otra realización, los péptidos descritos en el presente documento muestran la actividad de unión a una proteína implicada en la apoptosis. En otra realización, los péptidos muestran la actividad de prevenir que dicha proteína se una al ADN dañado.

El péptido comprende un total de aproximadamente 5 a 25 aminoácidos, preferentemente, el péptido comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácidos, preferentemente de aproximadamente 7 a 12 aminoácidos.

Los péptidos descritos en el presente documento tienen la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 4, análogos, derivados o fragmentos activos de los mismos que tienen actividad anti-apoptótica y/o actividad antiinflamatoria. Los péptidos de la presente invención son como sigue:

- SEC ID N°: 1 - LPPLPYP, denominado Stressin-1;
- SEC ID N°: 2 - DLSTDALHYRTA, denominado Stressin-2;
- SEC ID N°: 3 - HPTNQQSLWRWP, denominado Stressin-3;
- SEC ID N°: 4 - SSSLVDYPTRYYP, denominado Stressin-4.

En otras realizaciones particulares, el péptido es un péptido retro-inverso, que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEC ID N°: 5-8:

- SEC ID N°: 5 - PYPLPPL (todos los restos en la forma isomérica "D");
- SEC ID N°: 6 - ATRYHLADTSLD (todos los restos en la forma isomérica "D");
- SEC ID N°: 7 - PWRWLSQQNTPH (todos los restos en la forma isomérica "D");
- SEC ID N°: 8 - PYRTPYDVSLSS (todos los restos en la forma isomérica "D").

En una realización particular, el péptido tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEC ID N°: 1, 2 y 5.

De acuerdo con otras realizaciones, los péptidos de la presente invención son útiles para prevenir de manera selectiva la muerte celular de tejidos normales. En una realización, los péptidos inhiben la actividad apoptótica de células de mamíferos. En otra realización, los péptidos inhiben la actividad apoptótica de células de ser humano.

De acuerdo con determinadas realizaciones preferidas, los péptidos de la presente invención son capaces de inhibir la actividad apoptótica en al menos un 25 %, preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente en al menos un 75 % y lo más preferentemente en al menos un 95 %.

5 La presente invención proporciona péptidos que tienen la capacidad para inhibir de manera eficaz las respuestas a estrés celular e inmune en el tejido normal, y son útiles para tratar una enfermedad o afección donde la inhibición de la actividad de la proteína intracelular proporcione un beneficio.

10 De acuerdo con algunas realizaciones, los péptidos de la invención son útiles para tratar enfermedades degenerativas asociadas con el estrés en seres humanos. De acuerdo con otras realizaciones, los péptidos son capaces de regular negativamente las respuestas inmunes mediadas por estrés.

15 También se divulga una molécula de anticuerpo que comprende secuencias de  $V_L$ -CDR3 y  $V_H$ -CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID N°: 15 y 18 y SEC ID N°: 21 y 24, y usos de los mismos para el aislamiento de péptidos divulgados en el presente documento. La molécula de anticuerpo comprende regiones  $V_L$  y regiones  $V_H$  seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 9 y 10 y SEC ID N°: 11 y 12.

20 De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo un péptido de la invención o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

25 También se describe un método para modular las respuestas celulares e inmunes asociadas con el estrés en una célula de un organismo que comprende exponer a la célula a una cantidad eficaz de un péptido divulgado en el presente documento, un análogo, un derivado, o una sal del mismo.

30 Las enfermedades y afecciones inflamatorias que pueden tratarse mediante los péptidos de la invención incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, degeneración secundaria después de traumatismo, ictus, intoxicación del SNC, glaucoma, degeneración macular, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, uveítis autoinmune, enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de injertos, artritis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), psoriasis, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad por radiación, hipertermia, hipoxia, hígado tóxico fulminante, insuficiencia renal e infertilidad.

35 También se divulga un método para tratar una enfermedad o afección degenerativa en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido descrito en el presente documento, un análogo, un derivado, o una sal del mismo.

La enfermedad o afección es un trastorno degenerativo asociado al estrés.

40 El sujeto puede tener un trastorno neoplásico y puede estar sometido a quimioterapia y/o radioterapia para el tratamiento del cáncer.

45 La enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, degeneración secundaria después de traumatismo, ictus, intoxicación del SNC, glaucoma, degeneración macular, infarto de miocardio, enfermedad por radiación, hipertermia, hipoxia, hígado tóxico fulminante, insuficiencia renal e infertilidad.

50 También se divulga en el presente documento un método para tratar una enfermedad o afección inflamatoria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido descrito en el presente documento, un análogo, un derivado, o una sal del mismo.

La enfermedad o afección tiene una etiología asociada con la producción de al menos una citocina proinflamatoria seleccionada entre IL-6 y TNF- $\alpha$ .

55 La enfermedad puede ser una enfermedad autoinmune.

60 La enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en: diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso (LSE), uveítis autoinmune, artritis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), psoriasis, aterosclerosis, rechazo de injerto y enfermedad de injerto contra hospedador.

La enfermedad puede ser esclerosis múltiple.

65 El péptido inhibe la actividad apoptótica en respuesta a trastornos de estrés celular e inmune en tejido o células normales.

Los péptidos divulgados en el presente documento modulan la actividad de proteínas intracelulares en una célula *in vivo*. Los péptidos divulgados en el presente documento modulan la actividad de proteínas intracelulares en una célula *ex vivo*.

- 5 El péptido divulgado en el presente documento puede administrarse al sujeto que lo necesite a través de cualquier ruta de administración adecuada, incluyendo, pero sin limitación, por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral.

La presente invención será evidente junto con las figuras, descripción y reivindicaciones siguientes.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1: contenido de ADN de células L12 tratadas con el agente que daña al ADN, cisplatino, como medida para la muerte celular mediada por p53.

- 15 Figura 2: Muerte celular mediada por p53 inducida por Cisplatino (80 mM) de fibroblastos embrionarios de ratón.

Figura 3: El efecto de péptidos de Stressin en ratones BALB/c cuando se someten a irradiación del cuerpo a una dosis de 6,5 Gy.

- 20 Figura 4: La secreción de TNF- $\alpha$  de macrófagos RAW 264.7 en respuesta a lipopolisacárido (LPS) u oligonucleótidos de CpG se inhibe mediante Stressin-1.

Figura 5: La secreción de interleucina-6 de macrófagos RAW 264.7 en respuesta a lipopolisacárido (LPS) u oligonucleótidos de CpG se inhibe mediante Stressin-1.

- 25 Figura 6: Efecto inhibitorio de Stressin-1 en el desarrollo de enfermedad autoinmune experimental (EAE) en ratones.

- 30 Figura 7: Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de PAb-421, Idi-1 e Idi-2. Se alinean las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena ligera o de la cadena pesada.

Descripción detallada de la invención

- 35 La presente divulgación proporciona compuestos y métodos que comprenden péptidos para inhibir la respuesta celular e inmune al estrés para una variedad de afecciones asociadas con el estrés- La divulgación proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades degenerativas y la inflamación en seres humanos, utilizando péptidos reconocidos por anticuerpos monoclonales anti-ADN, teniendo los péptidos actividad anti-apoptótica y antiinflamatoria.

40 Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "péptido lineal" significa un péptido o polipéptido en el que los aminoácidos están enlazados entre sí mediante un enlace amida formado entre el grupo alfa-amino de uno y el grupo alfa-carboxílico de otro.

- 45 Tal como se usa en el presente documento, "célula" se refiere a una célula eucariota. Típicamente, la célula es de origen animal y puede ser una célula madre o células somáticas. Las células animales adecuadas pueden ser, por ejemplo, de origen de mamífero o aves. Los ejemplos de células de mamífero incluyen células humanas, bovinas, ovinas, porcinas, murinas y de conejo. La célula puede ser una célula embrionaria, célula madre de la médula ósea u otra célula progenitora. Cuando la célula es una célula somática, la célula puede ser, por ejemplo, una célula epitelial, fibroblasto, célula de músculo liso, célula sanguínea (incluyendo una célula hematopoyética, glóbulo rojo, linfocito T, linfocito B, etc.), célula del músculo cardíaco, macrófago, célula dendrítica, célula neuronal (por ejemplo, una célula glial o un astrocito).

- 55 En el contexto de esta invención, "modulación" significa inhibición; es decir, una disminución en la expresión. Esta modulación puede medirse de maneras rutinarias en la técnica, por ejemplo, mediante transferencia de Western o un ensayo ELISA de expresión de proteínas, o mediante un ensayo de inmunoprecipitación de expresión de proteínas.

- 60 El término "tratar", tal como se usa en el presente documento incluye usos profilácticos y terapéuticos, y se refiere al alivio de los síntomas de un trastorno particular en un paciente, a la mejora de una medición comprobable asociada con un trastorno particular, o la prevención de una respuesta inmune particular (tal como rechazo de trasplante).

- 65 Los anticuerpos o inmunoglobulinas comprenden dos cadenas pesadas unidas mediante enlaces disulfuro y dos cadenas ligeras, estando cada cadena ligera unida a una cadena pesada respectiva mediante enlaces disulfuro en una configuración en forma de "Y". La digestión proteolítica de un anticuerpo produce dominios de Fv (Fragmento variable) y de Fc (Fragmento cristalino). Los dominios de unión a antígeno, Fab', incluyen regiones donde la

secuencia de polipéptido varía. El término  $F(ab')_2$  representa dos brazos Fab' unidos mediante enlaces disulfuro. El eje central del anticuerpo se denomina fragmento Fc. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes (CH). Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en cada extremo y un dominio constante (CL) en su otro extremo, alineándose el dominio variable de cadena ligera con el dominio variable de cadena pesada y el dominio constante de cadena ligera alineándose con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1).

Los dominios variables de cada par de cadenas ligera y pesada forman el sitio de unión a antígeno. Los dominios en las cadenas ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco conservadas, cuyas secuencias están relativamente conservadas, unidas por tres dominios hipervariables conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR1-3). Estos dominios contribuyen a la especificidad y afinidad del sitio de unión a antígeno.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un ligando polipeptídico sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que se une y reconoce específicamente a un epítipo (por ejemplo, un antígeno). Tal como se usa en el presente documento, este término se refiere a moléculas intactas, tales como anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales (AcM), anticuerpos recombinantes o diseñados por ingeniería genética, así como a fragmentos de los mismos, tales como Fab,  $F(ab')_2$ , minianticuerpos Fab (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. 5.910.573, la Patente de los EE.UU. 6.294.353, el documento WO 96/37621, la Solicitud de Patente de los EE.UU. 08/999.554), Fv, scFv (por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 4.946.778, 5.091.513 y 5.096.815) que son capaces de unirse al determinante epitópico. Los anticuerpos pueden prepararse usando polipéptidos intactos o fragmentos que contiene péptidos pequeños de interés como antígeno inmunizante. El polipéptido u oligopéptido usado para inmunizar a un animal puede derivarse de la traducción de ARN o sintetizarse químicamente y puede conjugarse a una proteína transportadora, si se desea. Los transportadores usados de manera común que se acoplan químicamente a péptidos se ejemplifican mediante albúmina de suero bovino, tiroglobulina y hemocianina de lapa californiana. El péptido acoplado se usa a continuación para inmunizar al animal (por ejemplo, un ratón, una rata o un conejo). Los métodos no limitantes para generar anticuerpos se describen en los Ejemplos más adelante en el presente documento; sin embargo, pueden usarse fácilmente otros métodos bien conocidos en la técnica.

Por la expresión "anticuerpo anti-idiotípico" se entiende un anticuerpo dirigido contra (dicho de otro modo, inmunorreactivo con) un determinante idiotípico de otro anticuerpo. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "determinante idiotípico" se refiere a un determinante antigénico o epítipo único para el producto de inmunoglobulina de un solo clon de células. El idiotipo se encuentra en la región variable del anticuerpo. El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula que es reconocido por anticuerpos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunorreactivo" significa que el anticuerpo es capaz de unirse al antígeno con una afinidad de unión que es indicativa de una reacción inmune con el antígeno. Dichas afinidades son bien conocidas para los expertos en la materia e incluyen afinidades de  $10^5$  a  $10^{14}$   $M^{-1}$ . Los métodos para determinar la afinidad de una composición de anticuerpos se describen en Day, *Advanced Immunochemistry*, (2ª edición) Wiley-Liss, Nueva York, N.Y. (1990).

#### Péptidos de Stressin

La invención se dirige a péptidos específicos que comprenden un epítipo inmunorreactivo con un anticuerpo anti-idiotípico dirigido contra un anticuerpo anti-p53, en los que el anticuerpo anti-p53 es inmunorreactivo con al menos una parte del dominio regulador en el extremo C-terminal de p53. Los péptidos de la invención muestran al menos una actividad seleccionada entre actividad anti-apoptótica y actividad antiinflamatoria, como se especificará más adelante en el presente documento.

Los péptidos se seleccionan mediante anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos que tienen propiedades miméticas estructurales con el dominio regulador de p53. De acuerdo con determinadas realizaciones, los péptidos son inmunorreactivos con anticuerpos monoclonales provocados contra anticuerpos anti-p53. En una realización particular, el anticuerpo anti-p53 es PAb-421 (Herke *et al.*, 2000). En otras realizaciones particulares, los péptidos son inmunorreactivos con los anticuerpos monoclonales denominados Idi-1 e Idi-2, que tienen propiedades miméticas estructurales con el dominio regulador de p53 (Herke *et al.*, 2004).

En otras realizaciones, los péptidos son inmunorreactivos con una molécula de anticuerpo anti-idiotípico que comprende las secuencias de  $V_L$ -CDR3 y  $V_H$ -CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID N°: 15 y 18, y SEC ID N°: 21 y 24. El anticuerpo anti-idiotípico divulgado en el presente documento es una molécula que comprende secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID N°: 13-18, y SEC ID N°: 19-24.

El anticuerpo anti-idiotípico es una molécula que comprende regiones  $V_L$  y regiones  $V_H$  seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 9 y 10, SEC ID N°: 11 y 12, y análogos del mismo.

Los péptidos se caracterizan y sintetizan mediante métodos conocidos en la materia. En una realización, los péptidos se caracterizan mediante espectrometría de masas y se sintetizan mediante síntesis química, como se describe más adelante.

- 5 Los péptidos descritos en el presente documento son de 5 a 25 aminoácidos, de 5 a 15 aminoácidos y preferentemente de 7 a 12 aminoácidos.

De acuerdo con una determinada realización particular, la presente invención proporciona cuatro péptidos seleccionados, denominados Stressin-1 a 4 (para inhibidor peptídico de respuesta específica al estrés, del inglés *STress RESponse Specific peptide INhibitor*). Las secuencias de aminoácidos de determinados péptidos de la invención se listan en la Tabla 1 y se denominan SEC ID N°: 1 hasta SEC ID N°: 4.

A menos que se especifique lo contrario, se prefiere que los restos de aminoácidos descritos en el presente documento se encuentren en la forma isomérica "L". Sin embargo, puede sustituirse cualquier resto de L-aminoácido por restos en forma isomérica "D", siempre que el péptido mantenga la propiedad funcional deseada.

También se divulgan en el presente documento análogos, fragmentos y derivados funcionales de los péptidos denominados SEC ID N°: 1 hasta SEC ID N°: 4, como se describirá detalladamente más adelante en el presente documento. Los péptidos de la presente invención pueden ser péptidos retro-inverso que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEC ID N°: 5-8, como se especifica más adelante. En una realización particular, el péptido tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEC ID N°: 1, 2 y 5.

Anteriormente, se demostró que los AcM Idi-1 e Idi-2 se unen específicamente tanto a PAb-421 y a ADN, mono o bicatenario (Herke *et al.*, 2000, de algunos de los inventores de la presente invención). Hay moléculas de anticuerpo divulgadas que se dirigen a PAb-421, que comprenden regiones variables seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 9 y 10 y SEC ID N°: 11 y 12, y moléculas de anticuerpo que comprenden a CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID N°: 13-18 y SEC ID N°: 19-24. Dichos anticuerpos excluyen a los AcM conocidos denominados Idi-1 e Idi-2.

La molécula de anticuerpo comprende las secuencias de  $V_L$ -CDR3 y  $V_H$ -CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID N°: 15 y 18 (correspondientes a la región determinante de la complementariedad 3 de la cadena ligera de Idi-1 y la región determinante de la complementariedad 3 de la cadena pesada de Idi-1, respectivamente) y las SEC ID N°: 21 y 24 (Idi-2). La molécula de anticuerpo comprende secuencias de CDR tal como se presentan en la Tabla 4 más adelante, que tienen la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 13-18 (Idi-1) y SEC ID N°: 19-24 (Idi-2). La molécula de anticuerpo comprende regiones  $V_L$  y regiones  $V_H$  (regiones variables de una cadena ligera y pesada de inmunoglobulina) seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 9 y 10 (Idi-1), SEC ID N°: 11 y 12 (Idi-2). Las moléculas de anticuerpo también incluyen moléculas que comprenden análogos y derivados de dichas regiones  $V_L$  y  $V_H$ , siempre que el análogo o derivado sea inmunorreactivo con la porción de unión a antígeno de PAb-421.

También se describe el uso de moléculas de anticuerpo tal como se describen anteriormente para aislar péptidos que muestran al menos una actividad seleccionada del grupo que consiste en actividad anti-apoptótica y actividad antiinflamatoria. Los métodos adecuados que utilizan estos anticuerpos para la identificación y aislamiento de los péptidos de la invención se describen más adelante en el presente documento.

#### Bibliotecas de presentación de fagos

Las bibliotecas peptídicas de presentación de fagos han surgido como un método potente para identificar dichos agonistas y antagonistas peptídicos. Véase, por ejemplo, Scott *et al.* (1990), Devlin *et al.* (1990), Patente de los Estados Unidos N° 5.223.409; Patente de los Estados Unidos N° 5.733.731; Patente de los Estados Unidos N° 5.498.530; Patente de los Estados Unidos N° 5.432.018; Patente de los Estados Unidos N° 5.338.665; Patente de los Estados Unidos N° 5.922.545; documento WO 96/40987; y documento WO 98/15833. En dichas bibliotecas, se muestran secuencias peptídicas al azar mediante fusión con proteínas de recubrimiento o fagos filamentosos. Típicamente, los péptidos mostrados se eluyen por afinidad frente al dominio extracelular inmovilizado con anticuerpo de un receptor. Los fagos retenidos pueden enriquecerse mediante ciclos sucesivos de purificación de afinidad y repropagación. Los péptidos de mejor unión pueden secuenciarse para identificar restos clave dentro de una o más familias de péptidos estructuralmente relacionadas. Véase, por ejemplo, Cwirla *et al.* (1997), en el que se identifican dos familias distintas. Las secuencias peptídicas también pueden sugerir qué restos pueden reemplazarse de manera segura mediante barrido de alanina o mediante mutagénesis a nivel de ADN. Pueden crearse bibliotecas de mutagénesis y explorarse para optimizar adicionalmente la secuencia de los de mejor unión (Lowman, 1997).

Los péptidos de la invención se seleccionaron y aislaron a partir de una biblioteca de presentación de fagos (Ph.D.-7 o Ph.D.-12 de New England Biolabs, Frankfurt, Alemania) con un subrogado de anticuerpo del dominio regulador de p53. El subrogado de anticuerpo de p53 se había generado mediante inmunización idiotípica para el anticuerpo

monoclonal PAb-421 (Herkel *et al.*, 2000) que se une al dominio regulador de p53; dos anticuerpos monoclonales, denominados Idi-1 e Idi-2, imitaron las propiedades de unión del dominio regulador de p53.

Se ensayó la capacidad de los péptidos candidatos seleccionados para interferir con la respuesta a estrés celular mediada por p53 ensayando su capacidad para inhibir la respuesta a hipertermia de la línea celular L12 (Wolf, 1984), que carece de actividad de p53 endógena y se había transfectado de manera estable con el gen de p53 o un vector de control. En estas células, la actividad de p53 induce la detención del crecimiento y la supervivencia celular en vez de la apoptosis en respuesta a la hipertermia (Nitta, 1997).

Se identificó que cuatro péptidos, denominados Stressin-1 a -4 (para inhibidor peptídico de respuesta específica al estrés, del inglés *STress RESponse Specific peptide INhibitor*), a concentraciones de 100 mg/ml inhibieron la detención del crecimiento mediada por p53 después de la hipertermia e indujeron la muerte celular de prácticamente todas las células con p53 activa, lo que es la respuesta de las células L12 que carecen de actividad de p53 (Tabla 1); las secuencias peptídicas se muestran en la Tabla 2.

Métodos alternativos para identificar y aislar péptidos

También puede usarse el análisis estructural de la interacción proteína-proteína para sugerir péptidos que imiten la actividad de unión de ligandos proteicos grandes. En dicho análisis, la estructura cristalina puede sugerir la identidad y orientación relativa de restos críticos del ligando proteico grande, a partir de los cuales puede diseñarse un péptido (véase, por ejemplo, Takasaki *et al.*, 1997). Estos métodos analíticos también pueden usarse para investigar la interacción entre una proteína receptora y péptidos seleccionados mediante presentación de fagos, lo que puede sugerir una modificación adicional de los péptidos para aumentar la afinidad de unión.

Otros métodos compiten con la presentación de fagos en la investigación con péptidos. Puede fusionarse una biblioteca de péptidos al extremo carboxilo del represor lac y expresarse en *E. coli*. Otro método basado en *E. coli* permite la presentación en la membrana externa de la célula mediante la fusión con una lipoproteína asociada a peptidoglucano (PAL). En lo sucesivo, estos y los métodos relacionados se citan colectivamente como "presentación de *E. coli*". En otro método, se interrumpe la traducción de ARN al azar antes de la liberación del ribosoma, lo que da como resultado una librería de polipéptidos con su ARN asociado aún unido. En lo sucesivo, este y otros métodos relacionados se citan colectivamente como "presentación de ribosomas". Otros métodos emplean unión química de péptidos a ARN; véase, por ejemplo, Roberts y Szostak (1997). En lo sucesivo, este y otros métodos relacionados se citan colectivamente como "exploración de ARN-péptidos". Se han desarrollado bibliotecas de péptidos derivados químicamente en las que los péptidos se inmovilizan sobre materiales estables no biológicos, tales como varillas de polietileno o resinas permeables a disolvente. Otra biblioteca de péptidos derivados químicamente usa fotolitografía para escanear los péptidos inmovilizados sobre portaobjetos de vidrio. En lo sucesivo, estos y otros métodos relacionados se citan colectivamente como "exploración de péptidos químicos". La exploración de péptidos químicos puede ser ventajosa en tanto que permite el uso de D-aminoácidos y otros análogos no naturales, así como elementos no peptídicos. Los métodos tanto biológicos como químicos se revisan en Wells y Lowman (1992).

La presentación de fagos, en particular, es útil para generar péptidos para su uso en la presente invención. Se ha afirmado que la selección por afinidad a partir de bibliotecas de péptidos al azar puede usarse para identificar ligandos peptídicos para cualquier parte de un producto génico (Dedman *et al.*, 1993). La presentación de fagos es particularmente adecuada para identificar péptidos que se unen a dichas proteínas de interés, tales como receptores de la superficie celular o cualquier proteína que tenga epítomos lineales (Wilson *et al.*, 1998; Kay *et al.*, 1998).

Síntesis de péptidos de la invención

Los péptidos de la invención pueden producirse mediante cualquier método químico y recombinante conocido para producir una secuencia de aminoácidos, incluyendo metodologías peptidomiméticas (Allen G., 1989; Young, 1963; Meienhofer, 1973; Schroder y Lupke, 1965). La síntesis química se lleva a cabo normalmente mediante acoplamiento de los restos de aminoácidos o fragmentos peptídicos entre sí en el orden correcto en fase líquida para producir el péptido deseado. Otra estrategia común es el acoplamiento de los aminoácidos entre sí comenzando con una fase sólida (resina) a la que se acopla el extremo C-terminal del último aminoácido de la secuencia, tras lo cual el extremo C-terminal del penúltimo aminoácido se acopla al extremo N-terminal del último aminoácido, etc., liberando finalmente el péptido construido de la fase sólida (denominado técnica de fase sólida).

El término "péptido" se refiere a moléculas de 2 a 25 aminoácidos, con moléculas de 5 a 20 aminoácidos y prefiriéndose aquellas de 7 a 12 aminoácidos. Los péptidos ejemplares pueden generarse al azar mediante cualquiera de los métodos citados anteriormente, portados en una biblioteca de péptidos (por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos), o derivarse mediante digestión de proteínas.

También se describe en el presente documento cualquier análogo, derivado, y conjugado que contiene a los péptidos de la invención, cuya secuencia se muestra en el presente documento siempre que el péptido sea capaz de inhibir la apoptosis y/o la inflamación. Por lo tanto, la presente divulgación abarca péptidos que contienen derivados de aminoácidos no naturales o cadenas laterales no proteicas.

El término "análogo" incluye cualquier péptido o polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una de las secuencias específicamente mostradas en el presente documento en la que uno o más restos se han sustituido de manera conservativa con un resto de funcionalidad similar y que muestra las capacidades descritas en el presente documento. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un resto no polar (hidrófobo), tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un resto polar (hidrófilo) por otro tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina, la sustitución de un resto básico, tal como lisina, arginina o histidina por otro, o la sustitución de un resto ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, por otro.

Un derivado peptídico se refiere a una molécula que comprende a la secuencia de aminoácidos de un péptido de la invención sujeto a varios cambios, incluyendo, pero sin limitación, modificaciones químicas, sustituciones, inserciones, extensiones y eliminaciones donde dichos cambios no destruyen la actividad antiinflamatoria o anti-apoptótica del péptido, y dicho derivado no es un péptido o proteína conocido. Se pretende que "derivado peptídico" incluya peptidomiméticos, tal como se describen más adelante en el presente documento. En este sentido, un péptido se corresponde a, y preferentemente es idéntico a, uno de los péptidos listados en la Tabla 1, donde se efectúan uno o más cambios en tanto que el polipéptido mantiene la función inhibidora del péptido de la invención en uno o más de los ensayos, tal como se define en el presente documento. Con respecto a las moléculas de anticuerpo, un derivado de región variable mantiene la capacidad de unirse específicamente (es decir, es inmunorreactivo con) el determinante idiotípico de PAb-421.

Los derivados peptídicos que tienen modificaciones químicas incluyen, por ejemplo, péptidos que tienen uno o más restos derivados químicamente mediante reacciones de cadenas laterales o grupos funcionales. Dichas moléculas derivadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que se han derivado grupos amino libres para formar clorhidratos, grupos p-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoilo, grupos t-butoxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivarse para formar sales, ésteres de metilo y etilo u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivarse para formar derivados O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno de imidazol de la histidina puede derivarse para formar N-imbencilhistidina. También se incluyen como derivados químicos aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte restos de aminoácidos convencionales. Por ejemplo, la 4-hidroxi prolina puede sustituirse por prolina; la 5-hidroxiserina puede sustituirse por serina; la 3-metilhistidina puede sustituirse por histidina; la homoserina puede sustituirse por serina; y la ornitina puede sustituirse por lisina.

Además, un derivado peptídico puede diferir de la secuencia natural de los péptidos de la invención mediante modificaciones químicas que incluyen, pero sin limitación, acilación del NH<sub>2</sub> terminal, acetilación, o amidación del ácido tioglicólico, y mediante amidación carboxilo terminal, por ejemplo, con amoniaco o metilamina.

Los péptidos de la presente divulgación también incluyen cualquier péptido que tenga una o más adiciones y/o eliminaciones de restos en relación a la secuencia de péptidos de la invención, cuyas secuencias se muestran en el presente documento, en tanto que se mantenga el requisito de actividad sobre la apoptosis y/o la inflamación. La expresión "fragmento activo", por lo tanto, se refiere a una porción peptídica de un péptido de Stressin de longitud completa de la invención que tiene al menos una actividad que es característica del correspondiente péptido de longitud completa. Los ejemplos de métodos adecuados para medir la inhibición de la apoptosis y la inflamación se demuestran en el presente documento.

La adición de restos de aminoácidos puede llevarse a cabo en ambos extremos de los péptidos de la invención con el fin de proporcionar un "enlazante" mediante el cual los péptidos de la invención pueden unirse a un vehículo de manera conveniente. Dichos enlazantes son normalmente de al menos un resto de aminoácido y pueden ser de 40 o más restos, más a menudo de 1 a 10 restos. Los restos de aminoácidos típicos usados para enlazar son tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico y aspártico, o similares.

Un péptido de la divulgación también puede conjugarse consigo mismo o agregarse de tal modo que se produzca un gran complejo que contenga al péptido. Dicho gran complejo puede ser ventajoso ya que tiene nuevas propiedades biológicas, tales como una semivida mayor en la circulación o una actividad mayor.

#### Péptido miméticos

Los peptidomiméticos son moléculas pequeñas que pueden unirse a proteínas imitando determinados aspectos estructurales de péptidos y proteínas. Se usan de manera extensiva en ciencia y medicina como agonistas y antagonistas de ligandos proteicos y peptídicos de receptores celulares y de otros tipos, y como sustratos y análogos de sustratos para enzimas.

Un objetivo principal del diseño de peptidomiméticos ha sido reducir la susceptibilidad de imitaciones para la escisión e inactivación por peptidasas. En un enfoque, uno o más enlaces de amida se reemplazan de una manera esencialmente isostérica mediante una variedad de grupos funcionales químicos, incluyendo, pero sin limitación a enlace urea, enlace carbamato, enlace sulfonamida, enlace hidrazina, o cualquier otro enlace covalente. En otro

enfoque, se han usado una variedad de aminoácidos no codificados o modificados, tales como D-aminoácidos y N-metil aminoácidos para modificar péptidos de mamífero.

5 Para probar si el péptido de Stressin puede proteger a un organismo frente a la muerte por activación excesiva de p53 del fallo tisular se somete a ratones BALB/c a radiación y del cuerpo completo (6,5 Gy). Se usó un péptido retro-inverso para determinar si la semivida *in vivo* prolongada podría proporcionar una ventaja (véase el Ejemplo 6); los péptidos retro-inverso son resistentes a las proteasas y consisten en D-aminoácidos en orden inverso, dando como resultado una estructura peptídica alterada pero una orientación no cambiada en las cadenas laterales (Van Regenmortel, 1998).

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "péptido retro-inverso" del péptido de Stressin-1, por ejemplo, tal como se usa en una variación de la divulgación, pretende abarcar péptidos en los que la secuencia de los aminoácidos está invertida en comparación con la secuencia de Stressin-1 y consiste en D-aminoácidos en orden invertido.

15 La presente invención, por lo tanto, proporciona péptidos de Stressin retro-inversos que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEC ID N°: 5-8.

20 La estructura puede comprender una variedad de tipos de átomos, incluyendo carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo, consistiendo la mayoría de los átomos de la cadena estructural en carbono. Una pluralidad de restos de cadena lateral que incluyen un grupo guanidino o amidino se unen a la estructura. Aunque el espaciado entre restos de cadena lateral adyacentes es típicamente consistente, los transportadores potenciadores de la administración usados en la invención también pueden incluir un espaciado variable entre restos de cadena lateral a lo largo de la estructura.

25 Muerte celular e inhibición de p53

30 La apoptosis, o "muerte celular programada", es un proceso mediante el cual la célula ejecuta un programa de "suicidio celular". Hoy en día se cree que el programa de apoptosis está evolucionariamente conservado entre prácticamente todos los organismos multicelulares, así como entre todas las células en un organismo particular. Además, se cree que en muchos casos, la apoptosis puede ser un programa "por defecto" que debe inhibirse de manera activa en las células sanas supervivientes.

35 La decisión de una célula de someterse a apoptosis puede estar influenciada por una variedad de estímulos reguladores y factores ambientales (Thompson, 1995). Los activadores fisiológicos de la apoptosis incluyen al factor de necrosis tumoral (TNF), ligando Fas, factor de crecimiento transformante- $\beta$ , los neurotransmisores glutamato, dopamina, N-metil-D-aspartato, retirada de factores de crecimiento, pérdida de la unión de matriz, calcio y glucocorticoides. Los inductores relacionados con el daño incluyen choque térmico, infección viral, toxinas bacterianas, los oncogenes myc, rel y E1A, el supresor tumoral p53, linfocitos T citolíticos, oxidantes, radicales libres y privación de nutrientes (antimetabolitos). Los inductores de la apoptosis asociados con terapia incluyen radiación gamma, radiación UV y una variedad de fármacos quimioterapéuticos, incluyendo cisplatino, doxorubicina, bleomicina, arabinósido de citosina, mostaza de nitrógeno, metotrexato y vincristina. Los inductores de la apoptosis relacionados con toxinas incluyen etanol y péptido d-amiloide. La apoptosis puede tener consecuencias particularmente devastadoras cuando sucede de manera patológica en células que normalmente no se regeneran, tales como las neuronas. Debido a que dichas células no se reemplazan cuando mueren, su pérdida puede dar lugar a una disfunción debilitante y en ocasiones fatal del órgano afectado. Dicha disfunción se evidencia en una variedad de trastornos neurodegenerativos que se han asociado con la apoptosis aumentada, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa y degeneración cerebelar.

50 También se divulgan composiciones y métodos para prevenir o inhibir la apoptosis en células eucariotas. Independientemente del mecanismo mediante los cuales los péptidos de la invención median las respuestas a estrés, y sin desear quedar ligados a una teoría o mecanismo de acción particular, se postula que los péptidos pueden ser capaces de unirse a p53, por lo tanto evitando que p53 se una al ADN dañado.

55 Un inhibidor terapéutico potencial de p53 es un compuesto que actúa en cualquier etapa de la vía de señalización de p53, y que conduce a la inactivación funcional de una respuesta mediada por p53 (es decir, que bloquea la detención del crecimiento dependiente de p53, la apoptosis, o ambas). Los investigadores anteriores no consideraron inhibidores terapéuticos de p53 ya que se consideraba que la supresión terapéutica de p53 era una desventaja que conducía a la aparición y proliferación de tumores cancerosos. La presente divulgación, por lo tanto, se dirige a la inhibición terapéutica y reversible de la actividad de p53, y a péptidos capaces de dicha inhibición.

60 Sin embargo, hay varios objetivos que deben mencionarse antes de implementar una terapia que implica la supresión de p53 o cualquier otra proteína que juegue un papel en trastornos relacionados con la apoptosis o la inflamación, por ejemplo,

65

a) proporcionar un inhibidor que sea suficientemente eficaz *in vivo* para su administración práctica como fármaco terapéutico;

b) proporcionar un inhibidor que tenga una toxicidad lo suficientemente baja para su uso en terapia, y también que no cause efectos secundarios no deseados a concentraciones suficientes para inhibir la actividad de p53;

c) mostrar una inhibición que sea reversible. La activación de p53 a largo plazo, por ejemplo, puede aumentar de manera significativa el riesgo de cáncer;

d) durante la inactivación temporal de p53, las células deben recuperarse del estrés aplicado y la señal activadora de p53 debe eliminarse o reducirse, cualquier otra restauración de la actividad de p53 mientras la señal de activación de p53 esté activa puede dar como resultado el daño celular;

e) la terapia de supresión de p53 no está asociada con un aumento dramático en la frecuencia del desarrollo del cáncer.

Los péptidos divulgados en el presente documento pueden usarse solos, o, por ejemplo, en conjunción con quimioterapia o radioterapia durante el tratamiento del cáncer para proteger a las células normales de la muerte programada por p53 debido al estrés infligido mediante un tratamiento del cáncer por una enfermedad o traumatismo. Además, durante la quimioterapia, se destruyen tanto células tumorales como normales. Las células tumorales se eliminan preferentemente en comparación con las células normales, lo que es la base de una quimioterapia exitosa. Mediante la administración de un inhibidor de p53 terapéutico, por ejemplo, las células normales están protegidas, y la dosis del agente quimioterapéutico, por lo tanto, puede aumentarse para tratar de manera más eficaz el cáncer.

Debe entenderse que los péptidos de la presente invención no actúan necesariamente a través de la modulación de la actividad de p53 ya que algunos de estos péptidos muestran actividad anti-apoptótica en líneas celulares deficientes en p53 y en ensayos de actividad de p53.

#### Métodos para medir la apoptosis

La apoptosis es un proceso activo de autodestrucción dirigido por genes de la célula y está asociada con cambios morfológicos y bioquímicos característicos. La condensación nuclear y citoplásmica y la fragmentación de la célula que se está muriendo en cuerpos apoptóticos unidos a la membrana son características típicas de la apoptosis. Otra característica de la muerte celular apoptótica es la degradación del ADN cromosómico en fragmentos oligonucleosómicos después de la activación de nucleasas específicas.

Por "inhibición de la apoptosis" o "inhibición de la actividad apoptótica" se entiende cualquier disminución en el número de células que sufren apoptosis en relación a un control no tratado (es decir, células no expuestas a los péptidos de la invención). Preferentemente, la disminución es de al menos un 25 %, más preferentemente, la disminución es de al menos un 50 %, y la disminución puede ser de al menos una vez.

La citometría de flujo ofrece una amplia variedad de posibilidades para medir la apoptosis. Se han establecido e implementado diferentes métodos, algunos que tiñen en la superficie celular y algunos que tiñen intracelularmente.

Uno de los primeros enfoques fue, aparte de la observación de que las células apoptóticas encogen y tienen una mayor granularidad intracelular, teñir con fluorocromos específicos de ADN (por ejemplo, yoduro de propidio [PI], bromuro de etidio [EtBr]). Tan pronto como se induce el golpe letal, el ADN comienza a cambiar su perfil. El ADN apoptótico no solo consiste en ADN fragmentado (visualizado como bandas más cortas, denominado ADN en escalera, en un gel de agarosa) sino que también se digiere parcialmente en nucleótidos individuales, de tal forma que los fluorocromos, tales como PI o EtBr, tienen menos ADN para teñir (Nicoletti *et al.*, 1991). Esto se observa típicamente mediante un desplazamiento a la izquierda, llamado pico sub-G1, en el canal de detección de fluorocromo específico en el FACScan™ (de Becton Dickinson, EE.UU.).

Otro método es el marcado terminal mediado por desoxinucleotidil transferasa (TdT) terminal de las roturas de la hebra de ADN (TUNEL). El método TUNEL detecta roturas de la hebra de ADN en las células que sufren apoptosis. TdT es una enzima que cataliza la adición de desoxirribonucleótidos trifosfato al extremo 3'-OH de ADN mono o bicatenario. A diferencia de las células normales, los núcleos de células apoptóticas incorporan nucleótidos exógenos (dUTP)-DIG en presencia de TdT. Un fragmento de anticuerpo anti-DIG con un fluorocromo unido permite la visualización de células apoptóticas. Un aumento de células apoptóticas causa un mayor número de fragmentos de ADN y en consecuencia una fluorescencia más brillante. Una ventaja de este método es una especificidad muy elevada (Gavrieli *et al.*, 1992). Una desventaja de este método es que es caro y solo puede usarse para un pequeño conjunto de muestras, debido a que requiere mucho tiempo. Por lo tanto, no es aplicable para grandes programas de exploración.

La pérdida de polaridad de la membrana celular y la presentación de cantidades aumentadas de fosfatidil serina (PS) en el exterior de la membrana celular durante la fase temprana de la apoptosis ha conducido a otro nuevo enfoque.

La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio con una elevada afinidad por la PS. La integridad de la membrana celular se mantiene en las fases tempranas e intermedias de la apoptosis. Las células en apoptosis temprana e intermedia muestran una mayor unión de anexina-FITC y son principalmente negativas a la tinción por PI. Las etapas tardías de la apoptosis y las células necróticas se convierten en dobles positivos, debido a la presentación de PS sobre la superficie y a la tinción de con PI de ácidos nucleicos intracelulares debido a la desintegración de la membrana. Este método también es costoso y requiere mucho trabajo.

Otros métodos para medir la apoptosis *in vivo* e *in vitro* se divulgan en las Patentes de los Estados Unidos Nº 6.726.895 y 6.723.567.

Respuestas a estrés inflamatorio e inflamación mediada por TNF- $\alpha$  e IL-6

La respuesta de mamíferos al estrés incluye no solo la respuesta de la célula estresada, sino también la actividad compleja del sistema inmune conocida como inflamación (Nathan *et al.*, 2002), lo que incluye un gran número de actividades inmunes que sirven para el mantenimiento de tejidos y la curación (Cohen, 2000).

El factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-6 (IL-6) son entidades biológicas importantes citadas colectivamente como citocinas proinflamatorias. Estas, junto con otras varias moléculas relacionadas, median la respuesta inflamatoria asociada con el reconocimiento inmunológico de agentes infecciosos. La respuesta inflamatoria juega un papel importante en la limitación y control de infecciones patogénicas.

Los niveles elevados de citocinas proinflamatorias están también asociados con una variedad de enfermedades de autoinmunidad, tal como síndrome del choque tóxico, artritis reumatoide, artrosis, diabetes y enfermedad inflamatoria del intestino (Dinarello, *et al.*, 1984). En estas enfermedades, la elevación crónica de la inflamación exagera o causa gran parte de la patofisiología observada.

Un enfoque terapéutico importante y aceptado para una intervención farmacéutica potencial en estas enfermedades es la reducción de las citocinas proinflamatorias, tales como TNF (también citada en su forma secretada libre independiente de las células como TNF- $\alpha$ ) e IL-6. Actualmente una variedad de terapias anti-citocinas se encuentran en ensayos clínicos. La eficacia se ha demostrado con un anticuerpo monoclonal dirigido contra TNF- $\alpha$  en una variedad de enfermedades autoinmunes (Heath, 1997). Estos incluyen el tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (Rankin, 1997, y Stack *et al.*, 1997). Se cree que el anticuerpo monoclonal funciona uniéndose tanto a TNF- $\alpha$  soluble como a TNF unido a membrana.

La lesión cerebral traumática activa una cascada de eventos que dan como resultado un edema retardado, necrosis y función deteriorada. Los mediadores perjudiciales se acumulan en el cerebro después de la lesión y recientemente, se ha sugerido el papel de las citocinas en la patofisiología de la lesión cerebral. Se ha comunicado anteriormente la inducción espacial y temporal de la actividad de TNF- $\alpha$  e IL-6 en el cerebro de rata después de una lesión encefálica cerrada. Un inhibidor de la producción de TNF- $\alpha$ , HU-211, demostró mejorar el resultado de la lesión encefálica cerrada en un modelo experimental (Shohami, *et al.*, 1997). Se sabe que la aterosclerosis tiene un componente inflamatorio y se ha sugerido que las citocinas, tales como IL-1 y TNF promueven la enfermedad.

La citocina proinflamatoria IL-6 se ha implicado con la respuesta de fase aguda. La IL-6 es un factor de crecimiento en una variedad de enfermedades oncológicas que incluyen mieloma múltiple y discrasias de las células plasmáticas relacionadas (Treon, *et al.*, 1998). También ha demostrado ser un mediador importante de la inflamación en el sistema nervioso central. Se encuentran niveles elevados de IL-6 en varios trastornos neurológicos incluyendo complejo de demencia del SIDA, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, traumatismo del SNC y la meningitis viral y bacteriana (Gruo *et al.*, 1997). La IL-6 también juega un papel significativo en la osteoporosis. En modelos murinos, se ha demostrado que efectúa la resorción ósea y que induce la actividad de osteoclastos (Ershler *et al.*, 1997).

El documento WO 01/01986 divulga compuestos particulares de los que se dice que tienen la capacidad de inhibir al TNF- $\alpha$ . El documento WO 98/52558 divulga compuestos de heteroaril urea de los que se indica que son útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por citocinas. El documento WO 99/23091 divulga otra clase de compuestos de urea que son útiles como agentes antiinflamatorios. El documento WO 99/32463 se refiere a aril ureas y a su uso para tratar enfermedades de citocinas y enfermedades mediadas por enzimas proteolíticas.

La presente invención demuestra que los péptidos de Stressin son útiles para interferir con y bloquear la secreción de tanto TNF- $\alpha$  como de IL-6 por macrófagos en respuesta a activadores innatos, tales como lipopolisacárido (LPS) y oligonucleótidos de CpG (véase el Ejemplo 7). Por lo tanto, estos péptidos son capaces de modificar la vía de señalización proinflamatoria en células inmunes. Tal como se demuestra para Stressin-1 más adelante, los péptidos de la invención juegan un papel en la regulación negativa de las respuestas inmunes inflamatorias al estrés.

La presente invención demuestra además el uso de las propiedades antiinflamatorias de los péptidos de Stressin en enfermedades inflamatorias autoinmunes, tal como se ejemplifica en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo animal de esclerosis múltiple humana (véase el Ejemplo 8).

## Composiciones farmacéuticas y uso terapéutico

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los agentes descritos en el presente documento, o sales fisiológicamente aceptables o disolventes de los mismos, con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

La preparación de composiciones farmacéuticas, que contiene péptidos o polipéptidos como principios activos, es bien conocida en la técnica. Típicamente, dichas composiciones se preparan como inyectables, tanto como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, las formas sólidas, que pueden suspenderse o solubilizarse antes de la inyección, también pueden prepararse. La preparación también puede emulsionarse. El principio activo terapéutico se mezcla con vehículos inorgánicos y/u orgánicos, que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los transportadores son excipientes farmacéuticamente aceptables (vehículos) que comprenden sustancias más o menos inertes cuando se añaden a una composición farmacéutica para conferir la consistencia o forma adecuada a la composición. Los vehículos adecuados son, por ejemplo, agua, suero salino, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes y agentes tamponadores de pH, que potencian la eficacia del principio activo.

La toxicidad y eficacia terapéutica de los péptidos descritos en el presente documento puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, determinando la  $CI_{50}$  (la concentración que proporciona una inhibición del 50 %) y la  $DL_{50}$  (dosis letal que causa la muerte al 50 % de los animales ensayados) para un compuesto objetivo. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse para formular una variedad de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden seleccionarse por el médico individual a la vista del estado del paciente. (Véase, por ejemplo, *Fingl et al.*, 1975).

La cantidad de agente activo para su uso de acuerdo con la presente invención es una cantidad eficaz para lograr el fin del agente activo particular para la indicación objetivo. La cantidad de agente activo en las composiciones es típicamente una cantidad farmacológicamente, biológicamente, terapéuticamente o químicamente eficaz. Sin embargo, la cantidad puede ser menor de esa cantidad cuando la composición se usa en una forma de dosis unitaria debido a que la forma de dosificación unitaria puede contener una pluralidad de compuestos o agentes activos en una sola composición o puede contener una cantidad farmacológicamente, biológicamente, terapéuticamente o químicamente eficaz dividida. La cantidad total eficaz puede usarse para la administración en unidades acumulativas que contienen, en total, una cantidad eficaz del agente activo.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención es una cantidad que cuando se usa para la administración a un paciente sea capaz de ejercer una actividad anti-apoptótica y/o una actividad antiinflamatoria. Los ensayos para detectar la actividad anti-apoptótica del péptido de la invención incluyen, pero sin limitación, la tinción de ADN con fluorocromos específicos, tales como yoduro de propidio y bromuro de etidio, ensayos de anexina V o ensayos TUNEL; determinados ejemplos no limitantes de dichos ensayos se presentan en los Ejemplos más adelante. Los ensayos para detectar la actividad antiinflamatoria de los péptidos también se conocen bien en la técnica; los ejemplos no limitantes de dichos métodos se presentan en los Ejemplos más adelante.

Aunque una dosificación adecuada de un péptido de la invención varía dependiendo del uso de la vía de administración, la edad, el peso corporal, el sexo o estado del paciente, y debe determinarse en última instancia por el médico, la dosis adecuada para seres humanos adultos puede estar generalmente entre aproximadamente 0,2-2000 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 2-200 mg/kg.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más compuestos de la presente invención, y uno o más excipientes o diluyentes. En una realización, uno o más de los compuestos, o solvatos, o sales de estos compuestos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a sales que son sustancialmente no tóxicas para organismos vivos. Las sales farmacéuticamente aceptables típicas incluyen aquellas sales preparadas mediante la reacción de los compuestos de la presente invención con un ácido mineral u orgánico farmacéuticamente aceptable. Dichas sales también se conocen como sales de adición de ácido.

Las composiciones que comprenden a los compuestos y agentes activos pueden usarse en la administración de agentes activos a sistemas biológicos seleccionados y con una biodisponibilidad aumentada o mejorada del agente activo en comparación con la administración del agente activo sin el agente de administración. La administración puede mejorarse administrando más agente activo durante un periodo de tiempo, o administrando agente activo

durante un periodo de tiempo particular (tal como para efectuar una administración más rápida o retardada) o durante un periodo de tiempo (tal como administración sostenida).

5 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesado de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada es dependiente de la ruta de administración elegida.

10 Las composiciones farmacéuticas para su uso pueden administrarse local o sistémicamente mediante cualquier ruta convencional y adecuada incluyendo, pero sin limitación, oral, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intratecal, tópica, rectal, bucal, por inhalación o intranasal.

15 Para inyección, los compuestos de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer, o suero salino fisiológico tamponado. Para el uso de administración transmucosal, se usan penetrantes adecuados para la barrera a permear en la formulación. Dichos penetrantes, por ejemplo, DMSO, o polietilenglicol se conocen generalmente en la técnica.

20 Las composiciones farmacéuticas para su uso, que pueden usarse oralmente, incluyen cápsulas duras hechas de gelatina así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con cargas, tales como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes.

25 En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para su uso para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

30 Como alternativa, los compuestos de la presente invención para su uso pueden incorporarse en preparaciones líquidas orales, tales como suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, por ejemplo. Además, las formulaciones que contienen estos compuestos pueden presentarse como producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, como agentes de suspensión, tales como jarabe de sorbitol, metilcelulosa, glucosa/jarabe de glucosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio, y grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, tales como lecitina, monooleato de sorbitán, o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), tales como aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol, y alcohol etílico; y conservantes, tales como p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico.

40 Para administración por inhalación, los péptidos para su uso de acuerdo con la presente invención se administran de manera conveniente en forma de presentación de spray de aerosol en un paquete a presión o un nebulizador usando un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol a presión, la dosis unitaria puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla de polvo del péptido y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

50 Las composiciones farmacéuticas de la invención también son útiles para aplicación tópica o intralesional. Tal como se usa en el presente documento, el término "tópico" significa "que pertenece a una determinada zona superficial particular", por ejemplo, piel y mucosa, y el agente tópico aplicado a una zona determinada de dicha superficie solo afectará a la zona a la que se aplica. Las formulaciones de los péptidos/análogos peptídicos para su uso pueden administrarse tópicamente como un gel, pomada, crema, emulsión, formulación de liberación sostenida incluyendo un parche transdérmico, y puede comprender liposomas y cualquier otro vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración del fármaco por vía tópica. Las composiciones farmacéuticas para su uso pueden también comprender vehículos o excipientes de fase sólida o de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero sin limitación, carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros, tales como polietilenglicoles.

60 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para modular las respuestas celulares e inmunes asociadas con el estrés en una célula de un organismo que comprende exponer a la célula a una cantidad eficaz de un péptido de la invención.

65 En otros aspectos, la presente divulgación se refiere a métodos para tratar o prevenir los síntomas de afecciones inflamatorias y/o enfermedades y trastornos degenerativos, que comprenden administrar a un paciente que padece la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención. Otro aspecto más de la presente divulgación es proporcionar un método para reducir o eliminar la muerte de células normales atribuible a un

traumatismo o a una enfermedad que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido divulgado en el presente documento a un organismo para inhibir la actividad proteica relacionada con el estrés.

5 El péptido está en forma de una composición farmacéutica para su uso que comprende una cantidad eficaz de dicho péptido y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 Las respuestas asociadas al estrés están asociadas a enfermedades y trastornos, incluyendo, por ejemplo, afecciones patológicas, tales como enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, ictus, Parkinson, y enfermedad de Alzheimer), infarto de miocardio, exposición a radiación o agentes quimioterapéuticos, inflamación, lesiones (por ejemplo, quemaduras y lesiones en el sistema nervioso central), envejecimiento celular, hipertermia, ataques, hipoxias (por ejemplo, isquemia e ictus), y en tejidos y órganos trasplantados antes del trasplante.

15 Estas afecciones también incluyen enfermedades autoinmunes, caracterizadas por un estado de inmunización de un individuo contra al menos uno de los constituyentes normales del cuerpo. Estos fenómenos se observan en particular en patologías incluyendo, pero sin limitación, a infecciones asociadas con LSE (enfermedad de lupus sistémico eritematoso), síndrome de Gougerot-Sjorgren (o enfermedad de Sjorgren) y poliartritis reumatoide, así como patologías tales como sarcoidosis y osteopenia, espondiloartritis, escleroderma, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, hipertiroidismo, enfermedad de Addison, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Crohn, síndrome de Goddpasture, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, hemorragia púrpura idiopática, diabetes insulino dependiente, miastenia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, glomerulonefritis post-estreptocócica, psoriasis y esterilidad espontánea, así como fenómenos inmediatos o retardados observados durante el rechazo de trasplantes y la enfermedad de injerto contra hospedador. En una realización particular, los péptidos de la invención son útiles para el tratamiento de la esclerosis múltiple, como se ilustra en el Ejemplo 8 en el presente documento.

25 El fenómeno del rechazo de trasplantes es un estado de inmunización de un individuo contra constituyentes exógenos (fluidos corporales, tales como sangre, fluido cefalorraquídeo, etc., células, tejidos, órganos, anticuerpos, etc.) implantados deliberadamente en el paciente.

30 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "trastorno degenerativo", "enfermedad degenerativa" y "afección degenerativa" se refieren a cualquier trastorno, enfermedad o afección caracterizada por una proliferación celular inadecuada o muerte celular inadecuada o en algunos casos, ambas, o apoptosis aberrante o no regulada. Estas afecciones también incluyen afecciones en las que, aunque sea adecuada y regulada al nivel de una célula individual, se asocia la apoptosis excesiva con la disfunción o insuficiencia orgánica.

35 Los péptidos son útiles para prevenir la muerte celular en tejido no maligno o células en un sujeto que tiene un trastorno neoplásico y se esté sometiendo a quimioterapia y/o radioterapia para el tratamiento del cáncer.

40 Las expresiones "enfermedad inflamatoria" y "afección inflamatoria", tal como se usan en el presente documento, significan cualquier enfermedad o afección en la que una respuesta inflamatoria excesiva o no regulada conduce a síntomas inflamatorios excesivos, daño tisular del hospedador, o pérdida de la función del tejido.

La enfermedad o afección inflamatoria puede ser una enfermedad autoinmune. La enfermedad autoinmune puede ser esclerosis múltiple.

45 La enfermedad o afección inflamatoria puede tener una etiología asociada con la producción de al menos una citocina proinflamatoria seleccionada entre IL-6 y TNF- $\alpha$ , tal como se ha discutido en el presente documento.

### Ejemplos

50 Ejemplo 1: Selección de péptidos a partir de bibliotecas de presentación de fagos:

Los anticuerpos Idi-1 e Idi-2 monoclonales anti-PAb-421 se generaron y caracterizaron tal como se ha descrito (Herkel *et al.*, 2004). En resumen, se inmunizó tres veces a ratones BALB/c con Pab-421 y se fusionaron los esplenocitos que producían las titulaciones mayores de anti-PAb-421 con células de mieloma NSO. Se exploró mediante ELISA la unión de los sobrenadantes de las células en crecimiento a PAb-421 y a ADN. Se aislaron los hibridomas de Idi-1 e Idi-2 y se clonaron dos veces mediante dilución limitante.

60 Se exploraron las bibliotecas Ph.D.-7 o Ph.D.-12 de New England Biolabs, Frankfurt, Alemania, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se efectuaron tres rondas de selección mediante los anticuerpos monoclonales Idi-1 o Idi-2 y se identificaron secuencias peptídicas consenso mediante secuenciación de ADN de fago. Los péptidos candidatos fueron sintetizados por Sigma-Genosis (Pampisford, R.U.) y se estudiaron adicionalmente en ensayos funcionales, tal como se describen más adelante en el presente documento.

Ejemplo 2: Examinación del efecto de los péptidos candidatos sobre la detención del crecimiento mediada por p53.

65

Se ensayó la capacidad de los péptidos candidatos seleccionados para interferir con la respuesta a estrés celular mediada por p53 ensayando su capacidad para inhibir la respuesta a hipertermia de la línea celular L12 (Wolf, 1984), que carece de actividad de p53 endógena y se había transfectado de manera estable con el gen de p53 o un vector de control. En estas células, la actividad de p53 induce la detención del crecimiento y la supervivencia celular en vez de la apoptosis en respuesta a la hipertermia (Nitta, 1997).

La cantidad de muerte celular se determinó tiñendo las células con el tinte vital azul tripán (sigma) y contando la proporción de células muertas/vivas por campo visual con un microscopio óptico.

Resultados: la incubación durante 2 horas a 42 °C indujo la muerte de todas las células que carecían de p53 y, por el contrario, una detención transitoria del crecimiento y una supervivencia de aproximadamente el 80 % de las células con p53 activa. Se identificó que cuatro péptidos, denominados Stressin-1 a -4 (para inhibidor peptídico de respuesta específica al estrés, del inglés *STress RESponse Specific peptide INhibitor*), a concentraciones de 100 mg/ml inhibieron la detención del crecimiento mediada por p53 después de la hipertermia e indujeron la muerte celular de prácticamente todas las células con p53 activa, lo que es la respuesta de las células L12 que carecen de actividad de p53 (Tabla 1); las secuencias peptídicas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1: Incidencia de muerte celular por hipertermia en células L12 con o sin p53 activa e inhibición de la respuesta a estrés dependiente de p53 por péptidos Stressin.

	Sin péptido	Stressin 1	Stressin 2	Stressin 3	Stressin 4
L12 sin p53	100 %	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L12 con p53	20 %	100 %	90 %	80 %	80 %

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de péptidos Stressin que modifican la respuesta celular al estrés.

SEC ID N°:	Secuencia de aminoácidos	Nombre
1	LPPLPYP	Stressin-1
2	DLSTDALHYRTA	Stressin-2
3	HPTNQQLWRWP	Stressin-3
4	SLSVDYPTRYP	Stressin-4

Ejemplo 3: Efecto de péptidos Stressin en la muerte celular mediada por p53 inducida por daño en el ADN.

Las células L12 se trataron durante 48 horas con 5 mM del agente que daña al ADN, cisplatino y se determinó la muerte celular mediada por p53 midiendo el contenido de ADN de células teñidas con yoduro de propidio (Figura 1). Las células incubadas en ausencia del péptido respondieron al tratamiento con cisplatino con muerte celular mediada por p53.

Resultados: El análisis FACS demuestra que el tratamiento con Stressin-1 o Stressin-2 rescató al 35 % o al 25 % de las células, respectivamente, de la muerte celular mediada por p53.

Ejemplo 4: Efecto de péptidos Stressin sobre la muerte celular mediada por p53 en células no transformadas.

Se trató a fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) con cisplatino (80 mM) en presencia o ausencia de péptido Stressin-1 tal como se describe en el Ejemplo 3, y se determinó la muerte celular incorporando el tinte vital rojo neutro (Sigma, Taufkirchen, Alemania), se leyó la D.O. a 540 nm en un lector de ELISA.

El porcentaje de células viables se presenta en la Figura 2A; la viabilidad se calculó mediante la ecuación:

$$\text{Viabilidad celular} = \text{DO}_{540} \text{ de la muestra} \times 100 / \text{DO}_{540} \text{ de células no tratadas.}$$

Se presentan micrografías de las células tratadas en la Figura 2B.

La Figura 2 muestra que Stressin-1 inhibió la muerte celular de células MEF inducida por cisplatino 80 mM de manera dependiente de la dosis con una eficacia máxima a una concentración de 50 mM.

Ejemplo 5: Efecto de péptidos Stressin en la muerte celular inducida por estrés tóxico.

Para conocer si el péptido Stressin puede proteger del estrés tóxico, se incubaron cultivos de hepatocitos primarios con o sin etanol a una concentración del 0,6 %, y con Stressin-1 50 mM o sin péptido. Después de 48 horas, se determinó el número de células vivas y muertas mediante exclusión de azul tripán (Tabla 3).

Resultados: Todos los hepatocitos expuestos a etanol murieron en ausencia de Stressin-1; por el contrario, Stressin-1 rescató al 20 % de los hepatocitos de la muerte celular inducida por etanol.

Tabla 3: Supervivencia de hepatocitos expuestos a una dosis letal de etanol está promovida por el péptido Stressin-1.

	No tratados	Stressin-1
Hepatocitos sin etanol	100 %	100 %
Hepatocitos con etanol al 0,6 %	0 %	20 %

5 Ejemplo 6: Efecto de péptidos Stressin en ratones sometidos a radiación  $\gamma$ .

Se sometió a ratones BALB/c a irradiación  $\gamma$  del cuerpo entero (6,5 Gy). Una hora después de la irradiación, los ratones recibieron por vía intraperitoneal Stressin-1 (n = 7; SEC ID N°: 1) o un péptido modificado, retro-inverso Stressin-1 (n = 7; SEC ID N°: 5), ambos a una concentración de 500 mg/ratón, o una inyección de placebo con suero salino (n = 6). El péptido retro-inverso se usó para determinar si la semivida *in vivo* prolongada podría proporcionar una ventaja.

Resultados: Después de 17 días, el 66 % del grupo tratado con placebo estaban muertos; por el contrario, ninguno de los ratones tratados con péptido Stressin-1 y solo el 29 % de los ratones tratados con el péptido Stressin-1 modificado estaban muertos. Después de 40 días, solo el 33 % del grupo de placebo se recuperaron de la enfermedad por radiación; por el contrario, entre el 57 % y el 86 % de los ratones tratados con el péptido Stressin-1 modificado o no modificado se recuperaron de la enfermedad por radiación (Figura 3).

20 Ejemplo 7: Efecto de péptidos Stressin en secreción de citocinas inducida por LPS y CpG.

Para saber si los péptidos Stressin pueden modificar la respuesta inflamatoria a señales de estrés, se estudió la respuesta de la línea celular de macrófagos RAW 264.7 a señales microbianas proinflamatorias, lipopolisacárido (LPS) y oligonucleótidos CpG. Las células se incubaron con LPS u oligonucleótidos CpG en presencia o ausencia de Stressin-1 (50  $\mu$ M). Después de 6 horas, se determinaron las cantidades de TNF- $\alpha$  (Figura 4) o de interleucina-6 (Figura 5) secretadas en el sobrenadante de cultivo, como medida de la activación de macrófagos, mediante reactivos de ELISA específicos y anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  y anti-IL-6 (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania).

Resultados: Stressin-1 inhibió la activación de macrófagos y la secreción de TNF- $\alpha$  e interleucina-6 inducida tanto por LPS como por oligonucleótidos CpG.

30 Ejemplo 8: Stressin-1 protege a los ratones frente a la enfermedad autoinmune experimental (EAE).

Se inmunizó a ratones Tg4 transgénicos para receptor de linfocitos T específico de MBP Acl-9 (Liu *et al.*, 1995) por vía subcutánea con 200  $\mu$ g de péptido Ac1-9 modificado (Y en la posición 4) en adyuvante completo de Freund seguido de administración intraperitoneal de 200 ng de toxina de Partussis al día siguiente. Una hora después de la inmunización con MBP, un grupo de ratones (n = 4) recibió 100  $\mu$ l de PBS por vía intraperitoneal y otro grupo de ratones (n = 6) recibió 500  $\mu$ g de péptido Stressin-1 en 100  $\mu$ l de PBS por vía intraperitoneal. Después se ensayó el desarrollo de encefalomiелitis autoinmune experimental en los ratones determinando la puntuación clínica de EAE. Como puede observarse en la Figura 6, Stressin-1 protege a los ratones frente a la EAE.

40 Ejemplo 9: Secuenciación de regiones variables de Idi-1 e Idi-2.

Se extrajo el ARN total de hibridomas de Idi-1 e Idi-2 usando TriReagent (Molecular Research Center, INC.), y se usó el ARN como plantilla para la síntesis de ADNc usando Transcriptasa Inversa SuperScript (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). La amplificación mediante la PCR de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada se efectuaron usando cebadores específicos para la región constante flanqueante respectiva: 5' CGGGAATTCCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGG SEC ID N°: 25 y 3' GCGGGCCCTCGAGTCTATGTACATATGCAAGGCTTACAACC SEC ID N°: 26 para la cadena pesada; 5' CGCG-CAAGCTTGATATTGTGATAACCCAGGATGA SEC ID N°: 27 y 3' GATGGTGGGAAGATG SEC ID N°: 28 para la cadena ligera. Los productos de la PCR se purificaron y secuenciaron usando los mismos cebadores.

Las regiones variables de Idi-1 (Idi-1 V<sub>L</sub> - SEC ID N°: 9; Idi-1 V<sub>H</sub> - SEC ID N°: 10), Idi-2 (Idi-2 V<sub>L</sub> - SEC ID N°: 11; Idi-2 V<sub>H</sub> - SEC ID N°: 12) y de PAb-421 se presentan en la Figura 7. Las secuencias de las CDR de Idi-1 e Idi-2 se indican en la Figura 7 y se listan, junto con sus correspondientes SEC ID N°, en la Tabla 4 a continuación:

55

Tabla 4: Secuencias de las CDR de Idi-1 e Idi-2

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
13	Idi-1 V <sub>L</sub> CDR1	RQSLLYKNGKTYLN
14	Idi-1 V <sub>L</sub> CDR2	LMSIRAS
15	Idi-1 V <sub>L</sub> CDR3	QQLVEYPYT
16	Idi-1 V <sub>H</sub> CDR1	KASGYIFTSYWIN
17	Idi-1 V <sub>H</sub> CDR2	NISPADSSTNYN
18	Idi-1 V <sub>H</sub> CDR3	EEVRRRRDMDF
19	Idi-2 V <sub>L</sub> CDR1	QASESVSFAGTSLMH
20	Idi-2 V <sub>L</sub> CDR2	RASKLES
21	Idi-2 V <sub>L</sub> CDR3	MQSMEDPYT
22	Idi-2 V <sub>H</sub> CDR1	KASGYSFTGYTIN
23	Idi-2 V <sub>H</sub> CDR2	LINPYNGGTCYN
24	Idi-2 V <sub>H</sub> CDR3	RVWLRRDGFYAMDY

REFERENCIAS

5 1. Ellis *et al.*, Ann. Rev. Cell Biol. 7: 663-698 (1991).  
 2. Baker *et al.*, Science 249: 912-915 (1990).  
 3. Lee *et al.*, Cell 81: 1013-1020 (1995).  
 4. Kastan *et al.*, Cancer Res. 51: 6304-6311 (1991).  
 5. Kuerbitz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7491-7495 (1992).  
 10 6. Yonish-Rouach *et al.*, Nature 352: 345-347 (1991).  
 7. el-Deiry *et al.*, Nat. Genet. 1: 45-49 (1992).  
 8. Lee *et al.*, Cell 81: 1013-1020 (1995).  
 9. Shohat-Foord *et al.*, Nucleic Acids Res. 19: 5191-5198 (1991).  
 10. Hollstein *et al.*, Science 253: 49-53 (1991).  
 15 11. Ko LJ y Prives C. Genes Dev. 10: 1054-72 (1996).  
 12. Komarova EA y Gudkov AV. Biochem Pharmacol. 62: 657-67 (2001).  
 13. Mattson MP *et al.*, Apoptosis 6: 69-81 (2001).  
 14. Martin LJ. Int J Mol Med. 7: 455-78 (2001).  
 15. Nickells RW. Surv Ophthalmol. 43 Suppl 1: S151-61 (1999).  
 20 16. Raghupathi R *et al.*, J Neurotrauma 17: 927-38 (2000).  
 17. Haunstetter A e Izumo S. Circ Res 82: 1111-29 (1998).  
 18. Radic *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 12: 487-520 (1994).  
 19. Pisetsky, J. Immunol. 156: 421-423 (1996).  
 20. Herkel *et al.*, Eur J Immunol 30:977-984 (2000).  
 25 21. Herkel *et al.*, Eur J Immunol. Diciembre; 34(12):3623-32 (2004).  
 22. Scott *et al.*, Science 249: 386 (1990).  
 23. Devlin *et al.*, Science 249: 404 (1990).  
 24. Cwirla *et al.*, Science 276: 1696-9 (1997).  
 25. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 401-424 (1997).  
 30 26. Wolf *et al.*, Cell 38: 119-26 (1984).  
 27. Nitta *et al.*, Oncogene 15: 561-8 (1997).  
 28. Takasaki *et al.*, Nature Biotech. 15: 1266-1270 (1997).  
 29. Roberts y Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12297-303 (1997).  
 30. Wells y Lowman, Curr. Opin. Biotechnol. 3: 355-362 (1992).  
 35 31. Dedman *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 23025-23030 (1993).  
 32. Wilson *et al.*, Can. T. Microbiol. 44: 313-329 (1998).  
 33. Kay *et al.*, Drug Disc. Today 3: 370-378 (1998).  
 34. Allen G., Sequencing of proteins and peptides (1989) Elsevier Science Publishers B.V.  
 35. Van Regenmortel y Muller. Curr Opin Biotechnol 9: 377-82 (1998).  
 40 36. Thompson, Science 267(5203):1456-62 (1995).  
 37. Nicoletti *et al.*, J Immunol Methods. 3 de junio; 139(2):271-279 (1991).  
 38. Gavrieli *et al.*, J Cell Biol. Nov; 119(3):493-501 (1992).  
 39. Nathan C. Points of control in inflammation. Nature 420: 846-52 (2002).  
 40. Cohen IR. Semin Immunol 12: 215-9 (2000).  
 45 41. Dinarello, C. A., *et al.*, Rev. Infect. Disease 6:51 (1984).

42. Heath, P., IBC Meeting on Cytokine Antagonists, Philadelphia, Pa., Abr. 24-25, (1997).  
 43. Rankin, E. C. C., *et al.*, British J. Rheum. 35: 334-342 (1997).  
 44. Stack, W. A., *et al.*, Lancet 349: 521-524 (1997).  
 45. Shohami, *et al.*, J Neuroimmunol. 72, 169 (1997).  
 5 46. Treon, *et al.*, Current Opinion in Hematology 5: 42 (1998).  
 47. Gruol, *et al.*, Molecular Neurobiology 15: 307 (1997).  
 48. Ershler *et al.*, Development and Comparative Immunol. 21: 487 (1997).  
 49. Fingl, *et al.*, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 págs. (1975).  
 10 50. Liu *et al.*, Immunity 3:407-415 (1995).  
 51. Stewart, J. M. y Young, J. D. (1963), "Solid Phase Peptide Synthesis", W. H. Freeman Co. (San Francisco).  
 52. Meienhofer, J (1973). "Hormonal Proteins and Peptides", vol. 2, p. 46, Academic Press (Nueva York).  
 53. Schroder, G. y Lupke, K. (1965). "The Peptides", vol. 1, Academic Press (Nueva York).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Yeda Research and Development Co. Ltd.
- <120> INHIBIDORES PEPTÍDICOS PARA MEDIAR RESPUESTAS DE ESTRÉS
- 20 <130> YEDA 042 PCT
- <160> 28
- <170> patentIn versión 3.3
- 25 <210> 1  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial
- 30 <220>  
 <223> Péptido sintético
- <400> 1
- 35 **Leu Pro Pro Leu Pro Tyr Pro**  
**1 5**
- <210> 2  
 <211> 12  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial
- <220>  
 <223> péptido sintético
- 45 <400> 2
- Asp Leu Ser Thr Asp Ala Leu His Tyr Arg Thr Ala**  
**1 5 10**
- 50 <210> 3  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial
- 55 <220>  
 <223> Péptido sintético
- <400> 3
- His Pro Thr Asn Gln Gln Ser Leu Trp Arg Trp Pro**  
**1 5 10**
- 60

<210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 4  
 10  
 Ser Ser Leu Ser Val Asp Tyr Pro Thr Arg Tyr Pro  
 1 5 10  
 <210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> "D" aminoácidos  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-Pro  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> D-Tyr  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> D-Pro  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> D-Leu  
 45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> D-Pro  
 50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> D-Pro  
 55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> D-Leu  
 60  
 <400> 5

**Pro Tyr Pro Leu Pro Pro Leu**  
**1 5**

5 <210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético

15 <220>  
 <221> MIST\_FEATURE  
 <222> (1)..(12)  
 <223> "D" aminoácidos

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-Ala

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> D-Thr

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> D-Arg

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> D-Tyr

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> D-His

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> D-Leu

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> D-Ala

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-Asp

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> D-Thr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> D-Ser

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> D-Leu

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> D-Asp

<400> 6

Ala Thr Arg Tyr His Leu Ala Asp Thr Ser Leu Asp  
 1 5 10

15 <210> 7  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(12)  
 <223> "D" aminoácidos

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-Pro

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> D-Trp

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> D-Arg

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> D-Trp

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> D-Leu

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> D-Ser

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(8)  
 <223> D-Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> D-Asn

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> D-Thr

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> D-Pro

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> D-His

20 <400> 7

Pro Trp Arg Trp Leu Ser Gln Gln Asn Thr Pro His  
 1 5 10

25 <210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido sintético

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(12)  
 <223> "D" aminoácidos

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-pro

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> D-Tyr

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> D-Arg

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> D-Thr

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> D-Pro

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 533 697 T3

<222> (6)..(6)  
 <223> D-Tyr  
  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> D-Asp  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> D-val  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> D-Ser  
  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> D-Leu  
  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11) .. (12)  
 <223> D-Ser  
  
 30 <400> 8  
  

**Pro Tyr Arg Thr Pro Tyr Asp Val Ser Leu Ser Ser**  
**1 5 10**

  
 35 <210> 9  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> péptido sintético  
  
 <400> 9

Asp Ile val Ile Thr Gln Asp Glu Leu Ser Asn Pro val Thr Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser val Ser Ile Ser Cys Arg Gln Ser Leu Leu Tyr Lys Asn Gly  
 20 25 30  
 Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln  
 35 40 45  
 Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Ile Arg Ala Ser Gly val Ser Asp Arg  
 50 55 60  
 Phe Ser Gly Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg  
 65 70 75 80  
 val Arg Ala Glu Asp val Gly val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu val Glu  
 85 90 95  
 Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 100 105

5 <210> 10  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> péptido sintético  
 <400> 10

Asn Ile val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser val Ser Phe Ala  
 20 25 30  
 Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Lys Leu Glu Ser Gly val Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp  
 65 70 75 80  
 Pro val Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Met  
 85 90 95  
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 100 105

15 <210> 11  
 <211> 116

<212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Asn Ile Ser Pro Ala Asp Ser Ser Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Arg Pro Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Glu Val Arg Arg Arg Arg Asp Met Asp Phe Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val  
 115

10 <210> 12  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> péptido sintético

20 <400> 12

ES 2 533 697 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Thr Ile Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Cys Tyr Asn Pro Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Arg Val Trp Leu Arg Arg Asp Gly Phe Tyr Tyr Ala Met Asp  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val  
 115 120

5 <210> 13  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 13

Arg Gln Ser Leu Leu Tyr Lys Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn  
 1 5 10

15 <210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> péptido sintético  
 <400> 14

Leu Met Ser Ile Arg Ala Ser  
 1 5

25 <210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 15

Gln Gln Leu Val Glu Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

5 <210> 16  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 16

Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn  
 1 5 10

15 <210> 17  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético

25 <400> 17

Asn Ile Ser Pro Ala Asp Ser Ser Thr Asn Tyr Asn  
 1 5 10

30 <210> 18  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> péptido sintético

<400> 18

Glu Glu Val Arg Arg Arg Arg Asp Met Asp Phe  
 1 5 10

40 <210> 19  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido sintético

50 <400> 19

Gln Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His  
 1 5 10 15

<210> 20  
 <211> 7

<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 20

Arg Ala Ser Lys Leu Glu Ser  
1 5

10 <210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Péptido sintético

20 <400> 21

Met Gln Ser Met Glu Asp Pro Tyr Thr  
1 5

25 <210> 22  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> péptido sintético

<400> 22

Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Ile Asn  
1 5 10

35 <210> 23  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 23

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Cys Tyr Asn  
1 5 10

45 <210> 24  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> péptido sintético

55 <400> 24

ES 2 533 697 T3

Arg Val Trp Leu Arg Arg Asp Gly Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10 15

5 <210> 25  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 25  
 cgggaattcc ccaggtgcag ctgcagcagt ctgg 34

15 <210> 26  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 26  
 gcgggccctc gagtctatgt acatagcaa ggctacaac c 41

25 <210> 27  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 27  
 cgcgcaagct tgatattgtg ataaccagg atga 34

35 <210> 28  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 28  
 gatggtggga agatg 15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido que comprende un epítipo inmunorreactivo con un anticuerpo anti-idiotípico dirigido contra un anticuerpo anti-p53, en el que el anticuerpo anti-p53 es inmunorreactivo con al menos una parte del dominio regulador del extremo C-terminal de p53, y en el que el péptido muestra al menos una actividad seleccionada entre actividad anti-apoptótica y actividad antiinflamatoria, en el que el péptido tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEC ID N°: 1-8.
- 10 2. El péptido de la reivindicación 1,  
 en el que dicho péptido comprende 7 o 12 aminoácidos; o  
 en el que el anticuerpo anti-p53 es PAb-421; o  
 en el que el péptido inhibe la actividad apoptótica en al menos un 25 %, preferentemente en al menos un 50 %, más preferentemente en al menos un 75 % y lo más preferentemente en al menos un 95 %; o  
 15 en el que el péptido es capaz de regular negativamente las respuestas de estrés mediadas por el sistema inmune; o  
 en el que el péptido tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEC ID N°: 1, 2 y 5; o  
 en el que el anticuerpo anti-idiotípico es una molécula que comprende secuencias de V<sub>L</sub>-CDR3 y V<sub>H</sub>-CDR3 seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID N°: 15 y 18, y SEC ID N°: 21 y 24; o  
 20 en el que el anticuerpo anti-idiotípico es una molécula que comprende regiones V<sub>L</sub> y regiones V<sub>H</sub> seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 9 y 10, SEC ID N°: 11 y 12.
- 25 3. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido muestra la actividad de unirse a una proteína implicada en la apoptosis o prevenir que una proteína implicada en la apoptosis se una al ADN dañado.
4. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido inhibe la actividad apoptótica de células de mamífero, preferentemente células de ser humano.
- 30 5. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
6. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la preparación de un medicamento para modular las respuestas celulares e inmunes asociadas con el estrés en una célula de un organismo.
- 35 7. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en la modulación de las respuestas celulares e inmunes asociadas al estrés en una célula de un organismo.
8. El uso de la reivindicación 6 o el péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las respuestas son muerte celular o respuestas mediadas por p53 y en el que el estrés se induce mediante estímulos seleccionados del grupo que consiste en agentes que dañan al ADN, hipertermia, estrés tóxico y radiación y.
- 40 9. El uso de la reivindicación 6 o el péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la respuesta asociada al estrés está asociada a un trastorno seleccionado del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, degeneración secundaria después de traumatismo, ictus, intoxicación del SNC, glaucoma, degeneración macular, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, uveítis autoinmune, enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de injertos, artritis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), psoriasis, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad por radiación, hipertermia, hipoxia, hígado tóxico fulminante, insuficiencia renal e infertilidad.
- 50 10. El uso de la reivindicación 6 o el péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el péptido se administra a un sujeto que lo necesite a través de una ruta seleccionada entre oral, tópica, transdérmica y parenteral; o en el que el péptido inhibe la actividad apoptótica en respuesta a trastornos de estrés celular e inmune en tejido o células normales.
- 55 11. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una afección o trastorno degenerativo en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el tratamiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido.
- 60 12. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento de un trastorno o afección degenerativa en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el tratamiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido.
- 65 13. El uso de la reivindicación 11 o el péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho sujeto tiene un trastorno neoplásico y puede estar sometiéndose a quimioterapia y/o radioterapia para el tratamiento del cáncer; o en el que la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer,

esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, degeneración secundaria después de traumatismo, ictus, intoxicación del SNC, glaucoma, degeneración macular, infarto de miocardio, ataques, enfermedad por radiación, hipertermia, hipoxia, hígado tóxico fulminante, insuficiencia renal e infertilidad; o en el que el péptido se administra a un sujeto que lo necesite a través de una ruta seleccionada entre oral, tópica, transdérmica y parenteral.

5 14. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o afección inflamatoria en un sujeto que lo necesite.

10 15. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria en un sujeto que lo necesite.

15 16. El uso de la reivindicación 14 o el péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la enfermedad es una enfermedad autoinmune; o en el que la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en: diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, uveítis autoinmune, artritis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), psoriasis, aterosclerosis, rechazo de injerto y enfermedad de injerto contra hospedador; o  
20 en el que la enfermedad es esclerosis múltiple; o  
en el que el péptido se administra a un sujeto que lo necesite a través de una ruta seleccionada entre oral, tópica, transdérmica y parenteral.

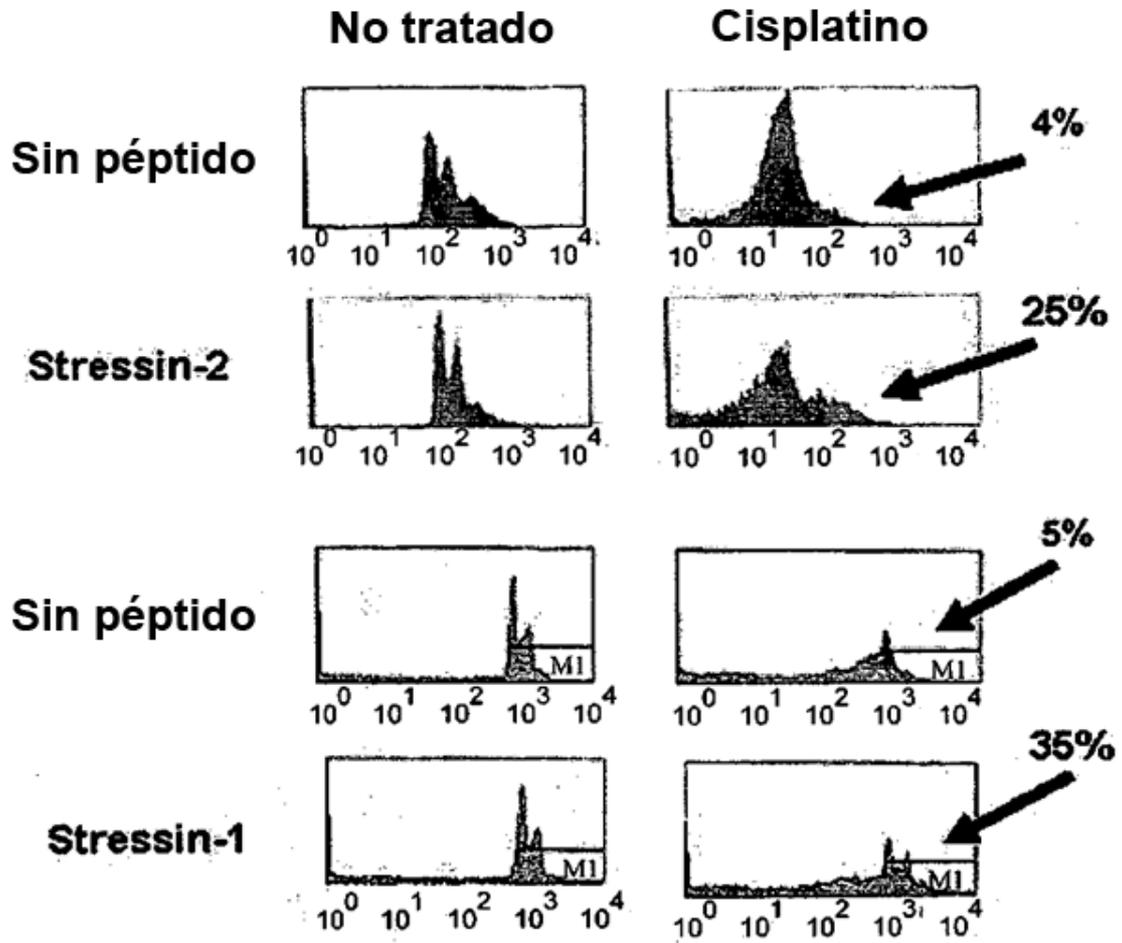


Figura 1

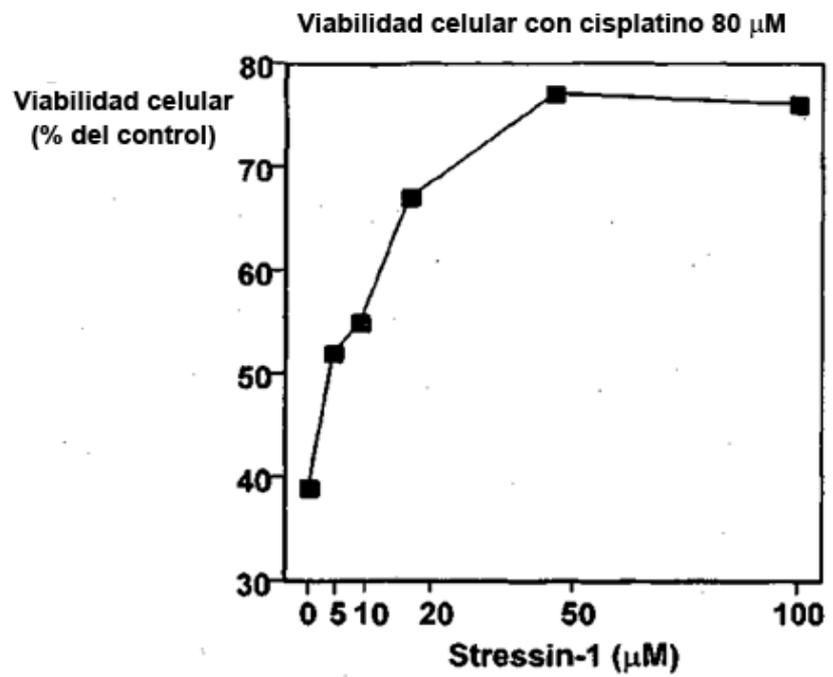


Figura 2A

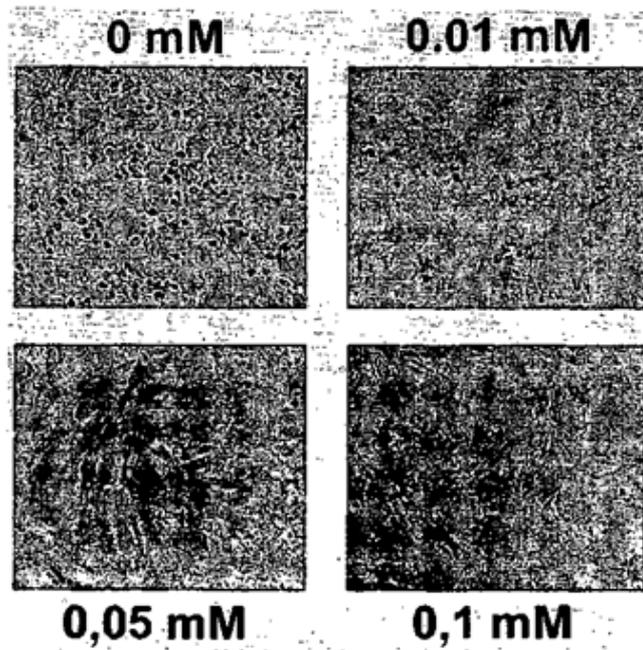


Figura 2B

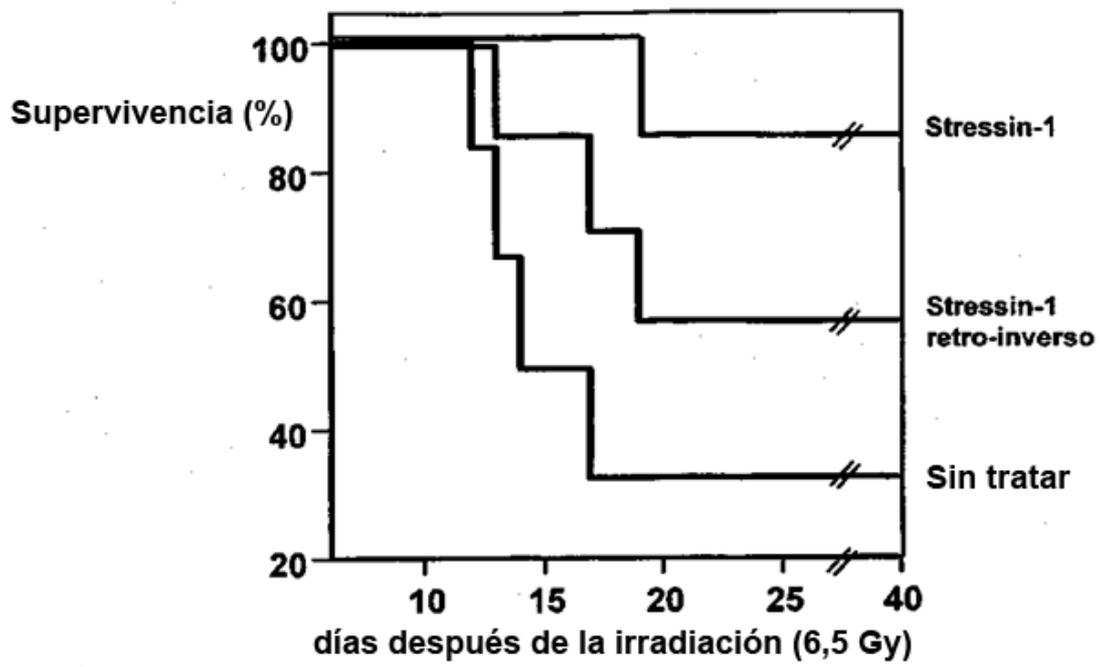


Figura 3

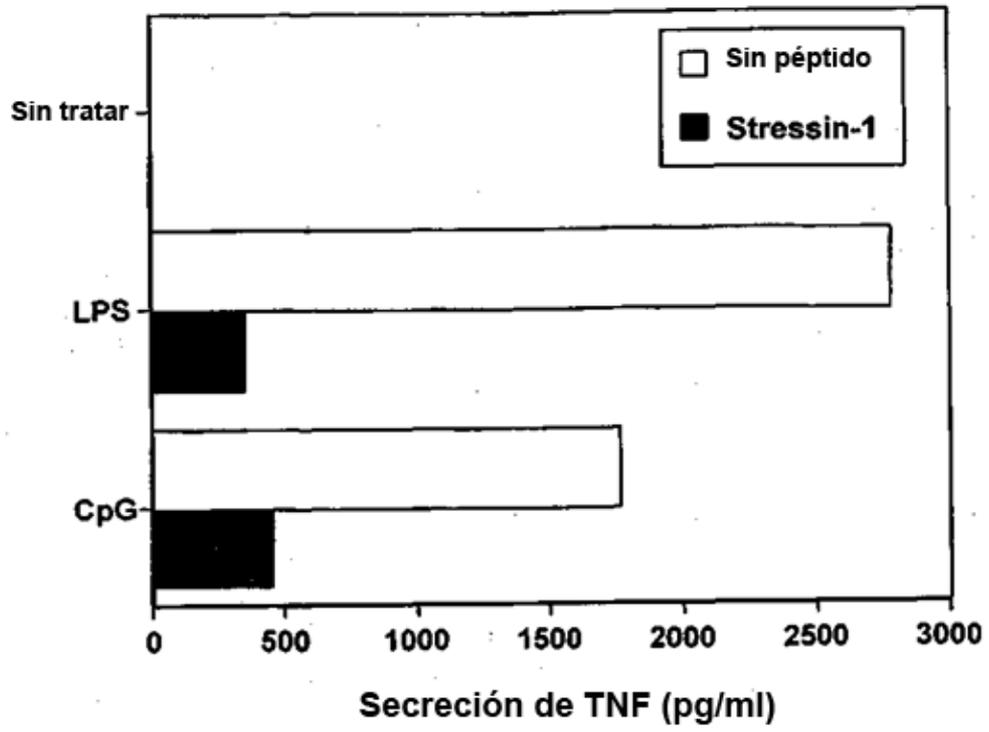


Figura 4

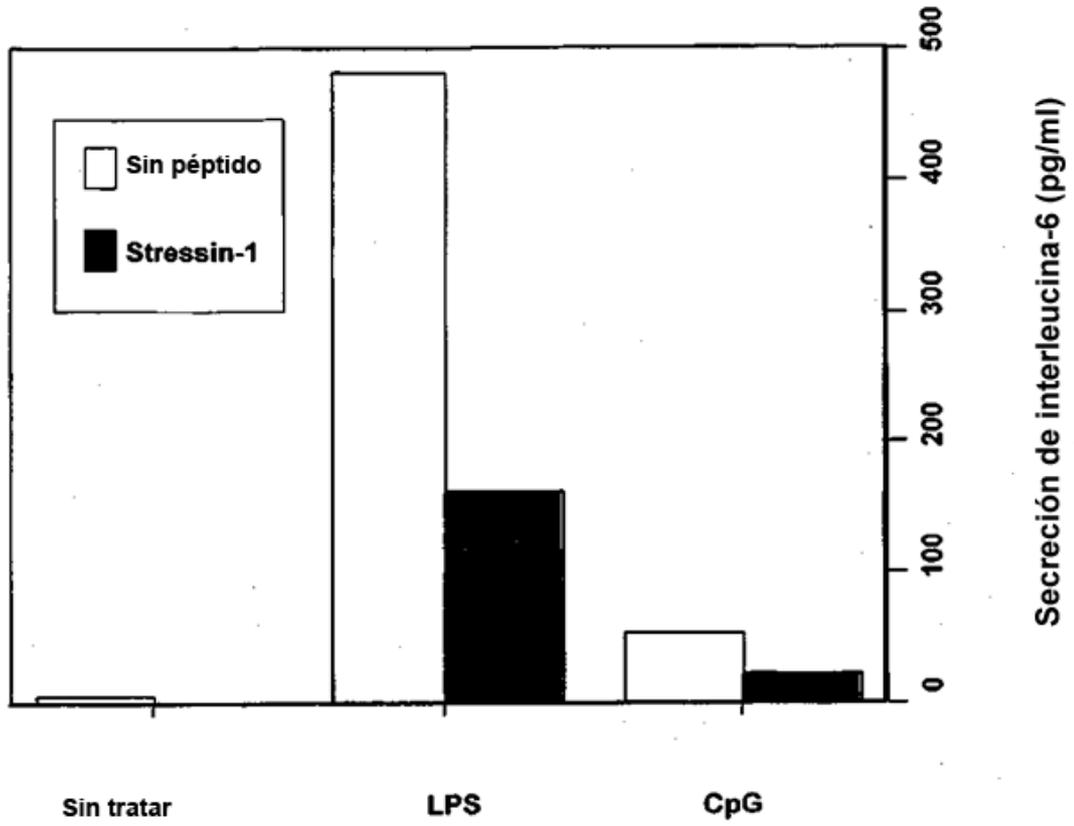


Figura 5

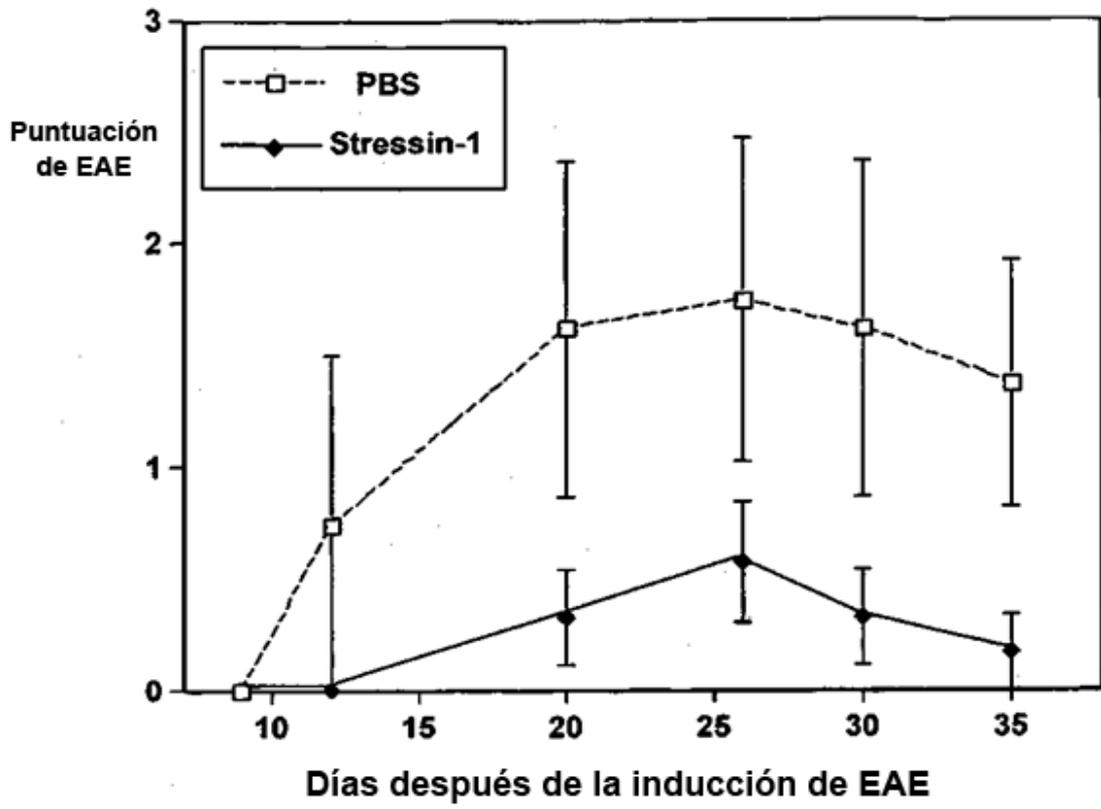


Figura 6

**A)**

	<b>CDR 1</b>	<b>CDR 2</b>
<b>PAb-421_VL</b>	<u>DIQLTQSP</u> LTLSVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDS	
<b>Idi-1_VL</b>	DIVITQDELSNPVTSGESVSISCR..QSLLYKNGKTYLNWFLQRPQGSPQLLIYLM SIRAS	
<b>Idi-2_VL</b>	NIVMTQSPASLAVSLGQRATISCOASEVSF.AGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYRASKLES	
<b>CDR 3</b>		
<b>PAb-421_VL</b>	GVPDRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVIYCWQGTHTSPLTFGAGTKL	
<b>Idi-1_VL</b>	GVSDRFGNGSGTDFTEISRVAEDVGVIYCCQLVEIYPTFFGGGTKL	
<b>Idi-2_VL</b>	GVPARFSGGSEDFTLTIDPVEEDDAAMYCMQSMEDPYTFGGGTKL	

**B)**

	<b>CDR 1</b>	<b>CDR 2</b>
<b>PAb-421_VH</b>	<u>QVKLQESGAEL</u> VRSGASVKLSCTASGFNITDYMHVVKQRPEQGLEWIGWIDPENG DTEYA	
<b>Idi-1_VH</b>	QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYIFTSYWINWVRQRPQGQLEWIGNISPADSSTNYN	
<b>Idi-2_VH</b>	QVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTINWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTCYN	
<b>CDR 3</b>		
<b>PAb-421_VH</b>	QKFKGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNFYGDAL.....DYWGQGTTVTVSS	
<b>Idi-1_VH</b>	QKFKDKATLTVDKSSTTAYMQLSRPTFEDSAVYYCAREEVRRRDM....DFWGQGTSV	
<b>Idi-2_VH</b>	PKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLTSED SAVYYCARRVWLRDRDGFYYAMDYWGQGTSV	

Figura 7