

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 228**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2006 E 06739597 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2004217**

54 Título: **Vacuna para tratamiento terapéutico o profiláctico de la miastenia grave**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.04.2015**

73 Titular/es:

**CURAVAC, INC. (100.0%)**  
**1209 Orange Street**  
**Wilmington, New Castle, DE 19801-1120, US**

72 Inventor/es:

**BLALOCK, EDWIN J. y**  
**HUBERTY, STEPHANE P.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 534 228 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

Vacuna para tratamiento terapéutico o profiláctico de la miastenia grave.

5 La presente invención se refiere a un péptido que tiene al menos una secuencia complementaria a una región inmunógena principal de un receptor de acetilcolina de la miastenia grave, y más particularmente a una composición de vacuna del mismo para un tratamiento terapéutico o profiláctico de la miastenia grave, particularmente en animales domésticos o humanos.

La miastenia grave (MG) es un trastorno neuromuscular caracterizado por debilidad y fatigabilidad de los músculos esqueléticos. El efecto subyacente es una disminución en el número de receptores de acetilcolina disponibles (AChRs) en las uniones neuromusculares debida a un ataque autoinmune mediado por anticuerpos.

10 En la unión neuromuscular, la acetilcolina (ACh) se sintetiza en el terminal del nervio motor y se almacena en vesículas (quanta). Cuando un potencial de acción se desplaza hacia abajo en el nervio motor y alcanza el terminal del nervio, se libera ACh de 150 a 200 vesículas y se combina con AChRs que están densamente empaquetadas en los picos de los pliegues postsinápticos.

15 Cuando se combina ACh con los sitios de fijación en el AChR, los canales de los AChRs se abren, permitiendo la entrada rápida de cationes, principalmente sodio, lo que produce despolarización en la región de la placa terminal de la fibra muscular. Si la despolarización es suficientemente amplia, inicia un potencial de acción que se propaga a lo largo de la fibra muscular, disparando la contracción del músculo. Este proceso es terminado rápidamente por hidrólisis de ACh por la acetilcolinesterasa (AChE) y por difusión de ACh lejos del receptor.

20 En la MG, el defecto fundamental es una disminución en el número de AChRs disponibles en la membrana muscular postsináptica. Adicionalmente, los pliegues postsinápticos están aplastados, o "simplificados". Estos cambios dan como resultado una disminución de la eficiencia de la transmisión neuromuscular. Por tanto, aunque la ACh se libera normalmente, produce potenciales pequeños de la placa terminal que pueden fallar en lo que respecta al disparo de los potenciales de acción musculares. El fallo de la transmisión en muchas uniones neuromusculares da como resultado debilidad de la contracción muscular.

25 Las anomalías neuromusculares en la MG están causadas por una respuesta autoinmune mediada por anticuerpos anti-AChR específicos. Los anticuerpos anti-AChR se denominan anticuerpos patógenos y reducen el número de AChRs disponibles en las uniones neuromusculares por tres mecanismos distintos: (1) renovación acelerada de las AChRs por un mecanismo que implica reticulación y endocitosis rápida de los receptores; (2) bloqueo del sitio activo del AChR, es decir, el sitio que fija normalmente ACh; y (3) deterioro de la membrana muscular postsináptica por el anticuerpo en colaboración con el complemento. Los anticuerpos patógenos son IgG y son dependientes de las células T.

30

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad MG autoinmune están correlacionadas con la presencia de estos anticuerpos patógenos localizados en la unión neuromuscular.

35 Hasta la fecha, existe únicamente un pequeño número de terapias que son, o bien tratamiento sintomático, o inmunoterapia.

Estas terapias proporcionan beneficio clínico a los pacientes que puede ser de larga duración pero requiere un procedimiento clínico bastante complicado. Además, estos regímenes de tratamiento actuales siguen siendo sólo parcialmente eficaces en muchos pacientes afectados y son necesarios cambios de estilo de vida para grandes porcentajes de quienes padecen estas enfermedades.

40 El tratamiento ideal de las enfermedades autoinmunes podría ser la supresión selectiva de los componentes patógenos de la respuesta inmune (es decir, los anticuerpos patógenos) por la anergia dirigida o ablación de clones de células autorreactivas.

45 La vacunación con un péptido diseñado como mimetizador del receptor de antígeno (ARM) para los antígenos principales de autoinmunidad ha demostrado eficacia clínica notable contra modelos de enfermedades autoinmunes en animales, véase la Patente US NO5.212.072.

Dicho tratamiento induce la anergia de clones autorreactivos específicos para estas proteínas inmunodominantes, a pesar de su origen heterólogo, así como una debilitación de las respuestas contra otros antígenos próximos. Parece ser que el uso de vacunas peptídicas cuyos contornos se complementan estrechamente con los de los antígenos principales en la autoinmunidad puede conducir a respuestas anti-idiotípicas (Id) específicas de antígeno e indiferentes de la clase del receptor antigénico.

50

Estos péptidos, denominados péptidos complementarios, pueden fijar el determinante diana y se comportan en cierto sentido como mimetizadores de los receptores de antígeno (Ag) (ARM). Por consiguiente, cuando se utilizan como vacunas los mismos provocan respuestas de anticuerpos anti-idiotípicos (Id) y anti-clonotípicos (anticuerpos) contra los sitios de combinación de antígeno en ciertos linfocitos autorreactivos.

A este fin, se estudió la miastenia grave en las ratas, en las cuales puede inducirse la miastenia grave de manera artificial. Se trata de la Miastenia Grave Autoinmune Experimental (EAMG).

En la EAMG, las ratas inmunizadas con AChR purificada desarrollan una enfermedad similar. Basándose en la idea de que el antígeno y el anticuerpo interactúan en términos de complementariedad hidropática, se ha buscado inducir inmunidad anti-Id hacia los anticuerpos patógenos por vacunación con un péptido complementario a la región inmunógena principal (MIR) del AChR. Se ha encontrado que la región inmunógena principal del receptor AChR está constituida por los residuos 61 a 76 de la cadena  $\alpha$  del receptor AChR. El péptido complementario se designó RhCA 67-16. Las ratas se vacunaron con el péptido complementario RhCA 67-16 que estaba conjugado a hemocianina de lapa bocallave (KLH). Se demostró que tanto el suero como preparaciones de anticuerpos monoclonales de los animales vacunados con el péptido complementario se fijaban a los anticuerpos patógenos, y la incidencia de la enfermedad en tales ratas se reducía notablemente en los animales vacunados (25%) comparados con los inmunizados con KLH y con controles sin tratar (90%), mientras que el registro de gravedad clínica en los animales con enfermedad promediaba 1,0 en los animales vacunados comparado con 3,5 en los controles positivos. Además, la administración pasiva de anticuerpo monoclonal anti-Id a las ratas durante el curso de la inducción de la enfermedad reducía análogamente la incidencia y la gravedad de la EAMG [Araga A et al., Prevention of Experimental Auto-immune Myasthenia Gravis by a Monoclonal Antibody to a Complementary Peptide for the Main Immunogenic Region of the Acetylcholine Receptor. *J Immunol.* 157, 386-392 (1996)].

Teniendo en cuenta los resultados precedentes de la vacunación con el péptido complementario RhCA 67-16, se ha llegado a la conclusión de que el inmunógeno era estructuralmente similar al paratope de los anticuerpos patógenos, y por tanto esta vacuna puede considerarse como un mimetizador del receptor del antígeno (Ag) de las células B (ARM).

Con objeto de confirmar los resultados obtenidos con el péptido complementario RhCA 67-16, se produjo un segundo lote del péptido RhCA 67-16. El péptido del segundo lote exhibía el peso molecular teórico esperado.

El péptido del segundo lote RhCA 67-16 se ensayó de nuevo en ratas pero, lamentablemente, no se observaron los resultados satisfactorios obtenidos previamente en cuanto a la incidencia de la enfermedad.

Es un objeto de la invención proporcionar un péptido que tiene un comportamiento antigénico que puede ser útil en el tratamiento de la miastenia grave en mamíferos, en particular en perros mascotas y en humanos (al ser la MG anecdótica en los gatos).

A este fin, la invención proporciona un péptido caracterizado por que el péptido tiene al menos una secuencia SEQ. ID. NO1 con un triptófano en posición 8 que lleva al menos un grupo 2,4,6-trimetoxibencilo.

Ventajosamente, la secuencia del péptido es complementaria a los residuos 61-76 de la cadena  $\alpha$  del AChR. El péptido que tiene al menos una secuencia complementaria a la región inmunógena principal (MIR) del receptor AChR es el péptido RhCA 67-16. Este péptido comprende un triptófano en posición 8. Hasta la fecha, no se comprendía bien por qué, pero se ha encontrado sorprendentemente que el grupo 2,4,6-trimetoxibencilo tiene una importancia crucial para la fijación del péptido al anticuerpo anti-Id para los anticuerpos patógenos direccionados hacia los residuos 61-76 de la cadena  $\alpha$  del receptor AChR de los perros.

Dado que la MG de los cánidos y la humana se caracterizan por tener una respuesta de anticuerpos AChR (anticuerpos patógenos) que es predominantemente (68%) contra la MIR (residuos 61-76 de la cadena  $\alpha$  del AChR), se pensó que podía ser ventajoso proporcionar un péptido complementario dirigido hacia la MIR, a fin de obtener una composición terapéutica que pueda ser útil para el tratamiento de la MG en mamíferos con objeto de desarrollar una vacuna humana ulterior. La MG de los cánidos es muy similar a la MG humana.

Las semejanzas incluyen la aparición natural del trastorno, entornos compartidos entre humanos y perros, presentaciones clínicas similares, autoanticuerpo AChR de diagnóstico con especificidad de epítipo afín y comorbilidad de la MG con otras enfermedades autoinmunes.

Por tanto, es otro objeto de la invención proporcionar una composición terapéutica que comprende el péptido de la invención, que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1 y al menos un portador.

Como se ha mencionado anteriormente en esta memoria, en la MG canina y la humana, los anticuerpos patógenos están direccionados hacia la MIR del AChR. Al proporcionar un péptido complementario a esta MIR, sería posible inducir anticuerpos (anticuerpos anti-idiotípicos) dirigidos hacia el péptido complementario. Los anticuerpos anti-idiotípicos tendrán un sitio de fijación antigénico que sería similar a la MIR del AChR dado que el péptido es complementario a este sitio de fijación. Por tanto, los anticuerpos anti-idiotípicos serán capaces de neutralizar los anticuerpos patógenos y debería inducirse una respuesta inmune mediada por las células B.

Para obtener una composición que pudiera dar resultados satisfactorios en mamíferos, ha sido necesario optimizar la composición. Para ello, se ha encontrado que el péptido de la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID

NO1 debería estar presente en una cantidad que oscila desde 750 a 25 microgramos, preferiblemente desde 500 a 50 microgramos, y ventajosamente desde 100 a 50 microgramos en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato.

5 Ventajosamente, la composición terapéutica está destinada a ser utilizada como una composición de vacuna para el tratamiento terapéutico o profiláctico de la MG. La composición de vacuna comprende preferiblemente un adyuvante y un portador peptídico a fin de reforzar la respuesta inmune. Dado que esta composición está destinada a reforzar la respuesta mediada por las células B, la misma debería ser útil para utilizar un adyuvante de esta clase conocido para este propósito. Tales adyuvantes y portadores son bien conocidos para las personas expertas en la técnica.

Adyuvantes ilustrativos pueden ser adyuvantes de agua en aceite, en particular TiterMax®, adyuvante alumbre, adyuvante de Freund y análogos.

10 Portadores ilustrativos pueden ser toxoide de la difteria, toxoide del tétanos, hemocianina de lapa bocallave y análogos.

Estos adyuvantes y portadores para la aplicación terapéutica en la MG de las ratas se exponen en detalle en McNally JL, Xu L, Villain M, Blalock JE.: The role of adjuvants in the efficacy of a peptide Vacuna for myasthenia gravis. *Exp Biol Med* 2001; 226:307-311.

15 Se ha comunicado también que la respuesta de inmunidad de las células T actúa en la miastenia grave. De hecho, los anticuerpos patógenos son dependientes de IgG-células T. Por tanto, además de la región 61-76 de AChR $\alpha$  implicada en la respuesta inmune mediada por las células B, se investigó si existiría otra región del receptor que sea reconocida específicamente por la célula T.

20 Se ha publicado en [Araga S. et al., A peptide Vacuna that prevents experimental autoimmune myasthenia gravis by specifically blocking T-cell help, *FASEB journal* vol 14, 2000] que la producción de anticuerpos patógenos en la rata Lewis se ve favorecida por células T específicas para los residuos 100 a 116 de la cadena  $\alpha$  del AChR. Araga S. et al. han inmunizado así ratas Lewis con un péptido complementario a los residuos 100-116 de la cadena  $\alpha$  del receptor AChR (que se designó RhCA 611-001). Se observó que las interacciones anticuerpo anti-ARM/receptor del antígeno resultantes interferían en la ayuda de las células T autorreactivas y desactivaban las células B autorreactivas, reduciendo así los títulos de autoanticuerpos AChR reactivos, lo que conducía a una mejora clínica notable, mortalidad reducida y preservación de los niveles de AChR en los músculos de la rata Lewis.

25 El péptido complementario a estos residuos 100-116 de la cadena  $\alpha$  del receptor AChR es el péptido RhCA 611-001 que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO2.

30 Este péptido se ensayó en ratas a fin de determinar el potencial de una composición de vacuna terapéutica que comprende el péptido complementario al sitio de reconocimiento por las células T del receptor AChR.

Se ha encontrado que el péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO2 puede ser un candidato probable en una composición terapéutica para la MG.

35 Por ello, se ha pensado que una combinación del péptido B complementario RhCA 67-16 y un péptido complementario a un sitio de reconocimiento por las células T puede dar como resultado una incidencia reducida de la EAMG en las ratas.

Lamentablemente, (véase el ejemplo comparativo 3) la incidencia y la gravedad de la EAMG en las ratas no se reducían por la combinación de ambos péptidos (fuese secuencial o simultáneamente).

40 Cuando se administraron ambos péptidos juntos, en ratas, la gravedad media y el porcentaje de mortalidad eran similares a los valores observados con el péptido que tenía al menos la secuencia SEQ ID NO2, lo que sugería que no existía efecto sinérgico alguno de ambos péptidos en las ratas.

45 Aunque el AChR está altamente conservado a lo largo de la evolución y aunque la inmunidad de las células T es, a su vez, muy dependiente de la especie, se encontró sorprendentemente que una composición que comprendía el péptido complementario de la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1 y el péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO2, secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento por las células T del receptor de acetilcolina, así como al menos un portador, proporciona un efecto mejorado sobre la MG en los perros.

De hecho, se encontró un efecto sinérgico del péptido B-complementario y del péptido T-complementario en los perros.

50 Este resultado es aún más sorprendente considerando el hecho de que el péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO2 es complementario de un sitio de reconocimiento por las células T de AChR en las ratas. La inmunidad de las células T, aunque AChR está altamente conservado a lo largo de la evolución, debería ser diferente en ratas y en perros.

Ventajosamente, la secuencia SEQ ID NO2 es complementaria a los residuos 100 a 116 de una cadena  $\alpha$  de dicho sitio de reconocimiento por las células T del receptor de acetilcolina.

La producción de los anticuerpos patógenos se ve favorecida por las células T, específicas para los residuos 100-116 de la cadena  $\alpha$  del receptor AChR.

- 5 Ventajosamente, la composición de vacuna comprende de 750 a 25 microgramos, preferiblemente de 500 a 50 microgramos, ventajosamente de 100 a 50 microgramos de cada péptido de la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1 y/o SEQ ID NO2, respectivamente, en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con al menos un adyuvante.

Preferiblemente, ambos péptidos están acoplados con un portador peptídico que es el mismo o diferente.

- 10 Conforme a una realización variante de la invención, la composición que comprende ambos péptidos comprende una primera y una segunda formulación.

La primera formulación comprende el péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1 conforme a la invención y la segunda formulación comprende el péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO2.

- 15 Ventajosamente, cada primera y segunda formulación comprende independientemente de 750 a 25 microgramos, preferiblemente 500 a 50 microgramos, ventajosamente de 100 a 50 microgramos de péptido en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con al menos un adyuvante.

Preferiblemente, el péptido de cada formulación debería estar acoplado con un portador peptídico adecuado.

- 20 La composición que comprende la primera y la segunda formulación está destinada a ser utilizada como composición de vacuna para el tratamiento terapéutico o profiláctico de la MG en los mamíferos, estando destinada cada formulación para ser administrada simultánea o secuencialmente.

En cada realización variante, la composición se proporciona para la inducción de una activación de la inmunidad mediada por las células dependiente de los linfocitos B y T.

- 25 La invención proporciona también un kit de detección que comprende el péptido de la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1 provista para detección de anticuerpos anti-idiotípicos de la región inmunógena principal de la miastenia grave.

El péptido de la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1 se encuentra ventajosamente en el estado de un complejo peptídico para ser utilizado como complejo de recubrimiento en un ensayo Elisa, para la fijación de anticuerpos anti-idiotípicos en sueros de perros mascota o en humanos, inmunizados con la composición conforme a la invención. Debería añadirse una anti-IgG humana o de perro marcada con fosfatasa alcalina a los pocillos de una placa Elisa para revelar la fijación y detectar con ello los anticuerpos anti-Id con un sustrato cromógeno.

- 30

Alternativamente, la anti-IgG puede estar marcada con una peroxidasa de rábano picante.

- 35 En una variante, el péptido se encuentra directamente en el estado de un complejo peptídico que comprende por una parte el péptido de la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1 y por otra parte una etiqueta como una etiqueta de fosfatasa alcalina o una etiqueta de peroxidasa para ser utilizado en un ensayo Elisa o en una transferencia Western para la detección de anticuerpos anti-idiotípicos.

Es también un objeto de la invención proporcionar un método para fabricación de un péptido de la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1, que comprende los pasos de:

- síntesis del péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1, y

- 40 - hidrocarbonación de un residuo triptófano localizado en posición 8, en dicha secuencia SEQ ID NO1, por adición de al menos un grupo 2,4,6-trimetoxibencilo a dicho triptófano.

Es todavía objeto de la invención proporcionar un método para fabricación de un medicamento para ser aplicado en la miastenia grave, que comprende los pasos de:

- síntesis del péptido conforme a la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1, y

- 45 - acoplamiento del péptido de la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1 con al menos un portador.

Es también un objeto adicional de la invención proporcionar un método para fabricación de un medicamento para ser aplicado en la miastenia grave, que comprende los pasos de:

- síntesis del péptido conforme a la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1,

- síntesis del péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO2, y
- acoplamiento de ambos péptidos con al menos un portador.

En una realización variante, la invención proporciona un método para fabricación de un medicamento para aplicación en la miastenia grave, que comprende los pasos de:

- 5 - fabricación de una primera formulación por síntesis del péptido conforme a la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1, y por acoplamiento del mismo con al menos un portador, y
- fabricación de una segunda formulación por síntesis del péptido complementario que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO2, y por acoplamiento del mismo con al menos un portador.

10 Ventajosamente, es también un objeto de la invención referirse a un método para fabricación de un medicamento destinado a aplicación terapéutica o profiláctica en la miastenia grave, que comprende los pasos de:

- síntesis del péptido de SEQ ID NO1 conforme a la invención,
- síntesis del péptido de SEQ ID NO2,
- acoplamiento de los péptidos con un portador,
- mezcla de ambos péptidos acoplados al portador con una solución salina y un adyuvante.

15 Otras realizaciones conforme a la invención se describen adicionalmente en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere también a un método de tratamiento de la miastenia grave en mamíferos que comprende la administración de una composición terapéutica que comprende el péptido de la invención que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1 y opcionalmente el péptido complementario que tiene al menos la secuencia de SEQ ID NO2.

20 Como se ha mencionado anteriormente, el péptido complementario que tiene al menos la secuencia de SEQ ID NO1 es complementario a la región inmunógena principal (MIR) de los residuos 61-76 de la cadena  $\alpha$  del receptor de acetilcolina (AChR) de la miastenia grave (MG).

La secuencia de los residuos 61-76 de la cadena  $\alpha$  del receptor de acetilcolina (AChR  $\alpha$  61-76) es la siguiente:

**NH<sub>2</sub>-Ile-Asp-Val-Arg-Leu-Arg-Trp-Asn-Pro-Ala-Asp-Tyr-Gly-Gly-Ile-Lys**

25 El péptido complementario al AChR  $\alpha$  61-76 tiene la secuencia siguiente y se designó RhCA 67-16:

**Asn-Ile-His-Pro-Lys-Ala-Pro-Ile-Trp-Gly-Ile-Ile-Thr-Ser-Asn-Phe-NH<sub>2</sub>**

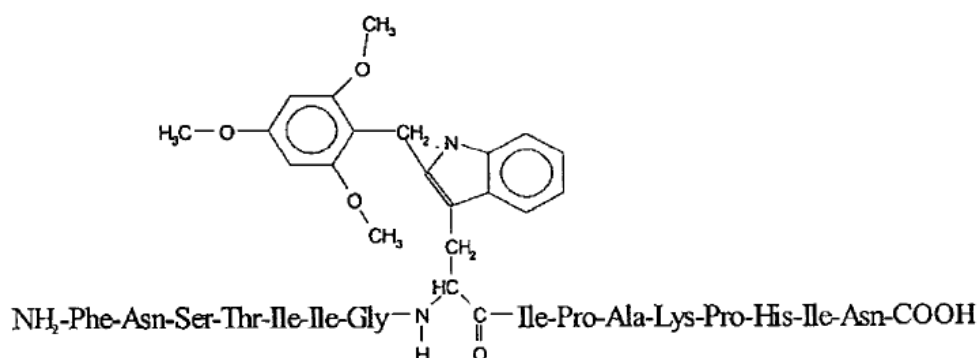
Por tanto, SEQ ID NO1 es como sigue:

**NH<sub>2</sub>-Phe-Asn-Ser-Thr-Ile-Ile-Gly-Trp-Ile-Pro-Ala-Lys-Pro-His-Ile-Asn**

30 El péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO1 se sintetizó en un Sintetizador de Péptidos Biosearch, Modelo 9500, utilizando química de f-moc y se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa utilizando una columna Dynamax C18 300 Angstrom 15  $\mu$  (19 x 300 mm) y un gradiente de 90% H<sub>2</sub>O (ácido trifluoroacético al 0,1%)/10% acetonitrilo (0,1% ácido trifluoroacético) a 10% H<sub>2</sub>O (ácido trifluoroacético al 0,1%)/90% acetonitrilo (0,1% ácido trifluoroacético) durante 60 minutos a una tasa de flujo = 5 ml/min, siendo el tiempo de retención 39-42 minutos y el peso molecular del péptido con 2,4,6-trimetoxibencilo era 1988.

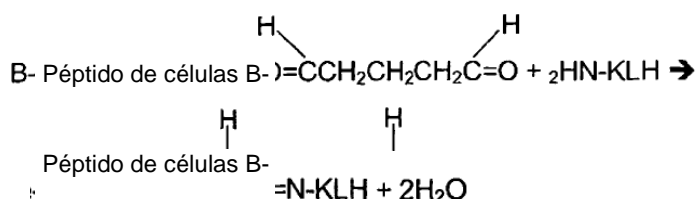
35 El RhCA 67-16, que es el péptido ARM para AChR  $\alpha$  61-76, comprende un triptófano en posición 8 que está hidrogenado con un grupo 2,4,6-trimetoxibencilo.

El grupo hidrocarburo es un grupo 2,4,6-trimetoxibencilo y la secuencia química es la siguiente



El péptido de las células B se sintetizó y se añadió un grupo 2,4,6-trimetoxibencilo al triptófano en posición 8 por adición de T-mob cuando se escindió el péptido del soporte sólido en condiciones ácidas (por ejemplo durante la elución con ácido trifluoroacético).

- 5 La hidrocarbonación, particularmente la arilación del péptido ocurre durante la escisión del péptido del soporte sólido en condiciones ácidas en presencia de Tmob. El péptido RhCA 67-16 se acopló a hemocianina de lapa bocallave (KLH) como proteína portadora, como se ha descrito anteriormente. La KLH se acopló al péptido de las células B utilizando una conjugación de aldehído glutárico a fin de preservar las características químicas, físicas y biológicas tanto de KLH como del péptido. El péptido de las células B y la proteína portadora (KLH) se añaden a una solución de aldehído glutárico. La reacción se muestra a continuación:



El aldehído glutárico no reacciona con las proteínas o los péptidos en su forma libre, sino como un polímero insaturado, lo que proporciona enlaces imino estabilizados por conjugación.

- 15 Conforme a la invención, la proteína portadora puede ser la KLH mencionada anteriormente, pero debe entenderse que pueden utilizarse otras proteínas portadoras, tales como, por ejemplo, toxoide de la difteria o toxoide del tétanos o cualquier molécula grande de naturaleza proteínica que actúe como soporte para el péptido a fin de que el péptido no esté solo y sea demasiado pequeño. De este modo, el péptido con la proteína portadora no será destruido inmediatamente por el sistema inmunológico y es más inmunógeno.
- 20 Un experto en la técnica comprendería también teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente que ambos péptidos (péptido de las células B y péptido de las células T) pueden estar acoplados a la misma proteína portadora o a proteínas portadoras diferentes, que sea de naturaleza idéntica o distinta.

Para el presente estudio, las pruebas clínicas se realizaron en perros. Una dosis simple de vacuna comprendía 500 microgramos en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato del conjugado péptido RhCA 67-16-KLH, emulsionado en 0,5 ml de un adyuvante de agua en aceite, preferiblemente el adyuvante TiterMax® (TiterMax USA, Inc., Norcross GA).

El péptido que tiene la secuencia SEQ ID NO2 es complementario al epítipo de las células T (residuos 100-116) de la cadena  $\alpha$  del AChR. El péptido se sintetizó en un Sintetizador de Péptidos Biosearch, modelo 9500, utilizando química f-moc y se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa utilizando una columna Dinamax C18 300 Angstrom 15  $\mu$  (19 x 300 mm) y un gradiente de 90% H<sub>2</sub>O (0,1% ácido trifluoroacético)/10% acetonitrilo (0,1% ácido trifluoroacético) a 10% H<sub>2</sub>O (0,1% ácido trifluoroacético)/90% acetonitrilo (0,1% ácido trifluoroacético) durante 60 minutos a una tasa de flujo = 5 ml/min, siendo el tiempo de retención 18-20 minutos y el PM 2036.

El péptido que tiene SEQ ID NO2 tiene la secuencia siguiente:

35 **NH<sub>2</sub>-Tyr-Phe-Ser-Arg-Ile-Ile-Gln-Lys-Gln-Phe-Gly-His-Val-Asn-Asn-Gly-Lys**

Como se ha descrito previamente, el péptido RhCA 67-16, denominado también en esta memoria péptido B y el péptido RhCA 611-001 al que se hace referencia también en esta memoria como péptido T se ensayaron aisladamente en ratas. Los resultados indicaban que el péptido B solo o el péptido T solo dan lugar a una

disminución importante en el nivel de anticuerpos patógenos. Cuando se ensayaron en pruebas no publicadas en ratas, los péptidos B y T juntos no daban resultados mejores en los niveles de anticuerpos patógenos que cuando se administraba el péptido T sólo. Éstos resultados indicaban que no existía efecto sinérgico alguno en las ratas cuando se utilizaban ambos péptidos.

5 La invención se detallará en los ejemplos no limitantes siguientes.

#### EJEMPLO 1

**Materiales y Métodos.** Veintinueve perros diagnosticados con MG autoinmune con títulos de anticuerpos AChR positivos ( $>0,6$  nM) por un radioinmunoensayo clínico establecido fueron inscritos inicialmente en el estudio. Cinco animales (17%) murieron de neumonía por aspiración y uno murió bruscamente después de cirugía por un timoma antes de terminar la vacunación. La tasa de muerte en el presente estudio es comparable al 6/35 (17%) y 2/12 (17%) consignados previamente en los controles históricos. Se perdió el seguimiento de tres perros, y cuatro se retiraron del estudio por incumplimiento; uno fue retirado del estudio por su propietario antes de completar la vacunación debido a una reacción de la piel en el sitio de inmunización. Cinco animales remitieron espontáneamente después de la diagnosis pero antes del comienzo de la vacunación. Por tanto, 10 perros (5 machos y 5 hembras, de 1 a 10 años) completaron el estudio y ninguno de estos animales padecía timoma o seguía siendo tratado con corticosteroides u otros inmunosupresores. El tiempo desde la aparición de los síntomas clínicos hasta la diagnosis confirmada con el ensayo de anticuerpos AChR para estos animales fue de 2 a 4 semanas. La remisión se define como retorno de larga duración del título de anticuerpos AChR al campo normal ( $<0,6$  nM) con normalidad clínica en ausencia de inhibidores de la acetilcolinesterasa. La remisión transitoria se refiere a una o más medidas de los títulos de anticuerpos AChR por debajo de 0,6 nM antes de la resolución completa de la MG y el retorno de larga duración de los anticuerpos AChR a valores normales. Los propietarios de las mascotas prestaron su consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee de la Universidad de Florida.

En las pruebas se utilizaron las diversas composiciones de vacuna enumeradas en la Tabla 1.

Tabla 1: Composiciones de prueba en los perros

Composición No.	Péptido de SEQ ID NO1 (microgramos)	Péptido de SEQ ID NO2 (microgramos)	Portador	Tampón de solución salina de fosfato	Adyuvante
1	500	0	KLH	0,5 ml	Titer Max ®
2	0	500	KLH	0,5 ml	Titer Max ®
3	500	500	KLH	0,5 ml	Titer Max ®

En las pruebas clínicas en perros, las composiciones se administraron subcutáneamente en un mínimo de cuatro puntos. Las vacunaciones se iniciaron en el momento de la diagnosis confirmada hasta cuatro meses después de la diagnosis para ciertos animales. Los animales se inmunizaron y reforzaron a intervalos de 2 semanas.

El propósito de la presente invención era evaluar las vacunas de células T y B mencionadas anteriormente respecto a la capacidad para reducir los niveles de anticuerpos AChR en comparación con controles históricos en una prueba clínica de MG autoinmune adquirida espontáneamente en perros mascota (Shelton GD et al., *Neurology* 2001; (57): 2139-2141). Un grupo de control de perros mascota miasténicos inmunizados con proteína portadora (sin péptidos ARM) en adyuvante no se incluyó esta vez debido a la probable ausencia de beneficio basada en estudios de EAMG en ratas (Araga S, et al.) de proteína portadora sin péptido complementario acoplado en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con adyuvante.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando software de bioestadística InStat (software GraphPad, San Diego, CA). Para comparación de los valores de anticuerpos en suero y tiempos hasta la remisión entre grupos, se utilizaron test *t* no apareados excepto cuando las limitaciones de la serie de datos indicaban el uso del test *t* no apareado con la corrección Welch o el test de Mann-Whitney; la hipótesis nula era que la vacunación no reducía los títulos de anticuerpos AChR o el tiempo hasta remisión. Se utilizaron tests *t* apareados para el análisis de los títulos de anticuerpos en suero antes y después de la vacunación. Para las evaluaciones de punto final tales como estadísticas de remisión, se realizó análisis de tablas de contingencia con el test exacto de Fisher.



**Discusión.***Resultados prospectivos.*

5 El grupo de control histórico estudiado prospectivamente se compone de 40 perros miasténicos de ambos sexos, 35 de los cuales se siguieron a largo plazo y se conocían los resultados. Estos animales se identificaron como positivos respecto a anticuerpos AChR en una serie de 152 perros con megaesófago idiopático. Estos animales se compararon con los 20 perros (con exclusión del animal que murió después de la cirugía por timoma) del estudio de los autores de la invención para los cuales se conocía el resultado. Los ensayos de anticuerpos AChR fueron realizados por el mismo servicio veterinario (UC San Diego, Laboratorio Neuromuscular Comparativo) para todos los perros (controles históricos y el estudio presente).

10 Tabla 2. Resultados prospectivos para perros miasténicos vacunados y controles históricos.

Grupo	Perros Totales	Remitidos (%)	No Remitidos (%)	Eutanasia (%)	Muerte de neumonía por aspiración
Controles	35	6 (17%)	11 (31%)	12 (34%)	6 (17%)
Históricos Vacunados	20	15 (75%) <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>C</sup>	5 (25%) <sup>D</sup>

A:  $p < 0,0001$ , B:  $p = 0,0044$ , C:  $p = 0,0022$ , y D:  $p = 0,504$ , todos ellos por el test exacto de Fisher. Cada comparación considera los perros con los resultados indicados contra la totalidad de los perros restantes en el grupo.

15 La Tabla 2 muestra que no había diferencia significativa alguna entre el número de animales que murieron de neumonía por aspiración o asfixia en la población de los inventores en comparación con los controles históricos (25% frente a 17%, respectivamente). Cinco de 20 perros en nuestro estudio remitieron espontáneamente a niveles de anticuerpos AChR de larga duración en el intervalo normal ( $< 0,6$  nM) después de la diagnosis pero antes de la vacunación. Así pues, no había tampoco diferencia alguna en la tasa de remisión espontánea entre los dos grupos (25% frente a 17%). Estos resultados sugieren que los dos grupos estaban bien emparejados. Existía una diferencia significativa en el número de animales sacrificados. Doce perros (34%) en el grupo de control histórico se sacrificaron debido al mal pronóstico asignado. En las pruebas clínicas conforme a la invención no se sacrificó ningún animal. Existía una diferencia altamente significativa en las tasas de remisión globales de larga duración entre los dos grupos. Mientras que los controles históricos tenían sólo 6 de 35 perros (17%) que remitieron con niveles de anticuerpos AChR vueltos al rango normal, 75% de los 20 perros vacunados remitieron. Considerando sólo los animales que sobrevivieron a la neumonía por aspiración o la eutanasia, el control histórico tenía una tasa de remisión de 35% (6/17) frente al 100% de tasa de remisión (15/15) ( $p < 0,0001$ ) en el presente estudio. Este aumento en la tasa de remisión estaba explicado totalmente por el resultado de 10 de 10 perros que remitieron en asociación con la vacunación. Si se considera el escenario mejor posible para los controles históricos y el escenario peor posible para los animales vacunados, existe todavía una remisión significativamente aumentada. Específicamente, si se supusiera que los 5 perros cuyo seguimiento se perdió en el grupo de control habían logrado remisión (11 de 40 remitidos, 27,5%) suponiendo en cambio que los 9 perros de nuestro grupo que dejaron de seguirse o se retiraron del estudio no habían remitido (15 de 29 remitidos, 51,7%), la vacunación causaba todavía un aumento estadísticamente significativo en la tasa de remisión ( $p = 0,0482$ , Tests Exacto de Fisher).

35 La vacunación conduce a un tiempo acelerado para la remisión cuando se compara con la remisión espontánea de la MG canina.

El grupo de control histórico estaba constituido por 47 perros miasténicos que remitieron espontáneamente, se analizaron retrospectivamente, y eran comparables a los 10 animales vacunados en varios aspectos importantes. Los perros en ambos grupos no se trataron con corticosteroides u otros inmunosupresores; los ensayos de anticuerpos AChR fueron realizados por el mismo servicio veterinario; el tiempo transcurrido desde los signos clínicos a la diagnosis confirmada para los perros vacunados (2 a 4 semanas) caía dentro del periodo para los controles históricos (1 semana a 5 meses); y los dos grupos estaban constituidos por ratios comparables a grandes rasgos de machos y hembras con intervalos de edad similares y fueron estudiados durante un periodo de tiempo solapante (control histórico, 1990-2000 y animales vacunados, 1997-2003).

45 Es interesante que en la evaluación del conjunto de datos para los controles históricos, se observó que los niveles de anticuerpos AChR seguían uno de dos cursos. Algunos casos tenían una disminución monofásica en los niveles

de anticuerpos AChR que conducía a la remisión, mientras que otros exhibían un patrón fluctuante de niveles de anticuerpos AChR crecientes y decrecientes antes de la remisión de larga duración. Los niveles de anticuerpos AChR con el tiempo en los perros vacunados se segregaban también en uno u otro de estos dos mismos grupos (véase más adelante). Así pues, un análisis apropiado dictaba que deberían hacerse comparaciones entre grupos.

5 La Figura 1 (panel superior) muestra que en el momento de la diagnosis confirmada de los perros que exhibían una disminución monofásica, no había una diferencia estadística en los niveles de anticuerpos AChR entre el grupo vacunado ( $n = 5$ ) y los controles históricos ( $n = 40$ ). Sin embargo, el grupo vacunado exhibía una tasa acelerada de disminución en los títulos de anticuerpos AChR. Esto se reflejaba por una tasa de remisión más rápida en el grupo vacunado (Fig. 1, panel central). Esta remisión acelerada entre los perros vacunados es más evidente en el momento puntual de 3 meses, en el que la probabilidad relativa de remisión era 3,56 para los perros vacunados frente a los controles por el test exacto de Fisher ( $p = 0,019$ ).

La Figura 2 muestra los niveles de anticuerpos AChR con el tiempo después de la diagnosis confirmada para los grupos históricos (2a) y los animales vacunados (2b) que exhibe un patrón fluctuante de concentraciones de autoanticuerpos. Mientras que los títulos iniciales de anticuerpos AChR ( $nM \pm SEM$ ) no eran significativamente diferentes entre los perros vacunados ( $5,98 \pm 2,33$ ) y los controles históricos ( $4,54 \pm 1,4$ ), parecía existir una disminución acusada en la amplitud global de las fluctuaciones para los perros vacunados en los momentos posteriores a la diagnosis. En contraste, el tiempo medio hasta la remisión de larga duración era el mismo para los dos grupos. Así pues, parece ser que si bien la duración de la enfermedad es la misma en los dos grupos, los perros vacunados pueden precisar más tiempo en la remisión durante el curso de la enfermedad. Esto se veía respaldado por la observación de que 100% (5/5) de los perros vacunados en comparación con 29% (2/7) de los controles históricos tenían al menos un periodo de remisión antes de la resolución completa de la enfermedad. Para asegurarse de que el aumento en los animales que exhibían un retorno transitorio a los niveles normales de anticuerpos AChR no era debido a un muestreo más frecuente del grupo vacunado con relación a los controles históricos (muestreo a intervalos de 3 meses), los niveles de anticuerpos AChR se consideraron solamente a intervalos de 3 meses después de la diagnosis. Los resultados demostraban que 5/5 de los perros vacunados frente a 2/7 de los controles históricos tenían al menos una muestra de sangre dentro del intervalo normal ( $< 0,6 nM$ ) para anticuerpos AChR después de la vacunación y antes de la resolución completa de la enfermedad. En total, había 8 episodios de títulos normales de anticuerpos AChR en los 5 animales vacunados [1 perro con 3, 1 perro con 2 y 3 perros con 1 episodio(s)] comparados con 3 episodios en los 7 controles históricos [1 perro con 2, 1 perro con 1 y 5 perros con 0 episodio(s)]. Así pues, el número medio de episodios de remisiones transitorias por perro para el intervalo de 3 meses era significativamente mayor ( $p < 0,0251$ , Test de Mann-Whitney) en los animales vacunados que en los controles históricos (Fig. 2d).

Antes de la resolución de larga duración de la MG y considerando todas las muestras de sangre disponibles (no simplemente los intervalos de 3 meses), 4 de 5 perros vacunados con niveles oscilantes de anticuerpos AChR exhibían más de un episodio de remisión transitoria (2 animales con 3 episodios y 2 animales con 2 episodios, de un total de 10), lo que correspondía a la iniciación de un curso de vacunación.

La Figura 3 (panel superior) muestra una correlación altamente significativa ( $r = 0,955$ ,  $p < 0,0001$ ) entre el tiempo de iniciación de un curso de vacunación y el tiempo del comienzo del periodo de remisión subsiguiente. Así pues, temporalmente, la vacunación está asociada muy fuertemente con la remisión transitoria y es independiente del momento en que se inicia la vacunación con relación a la diagnosis. Es importante que la ordenada en el origen  $Y$  para esta relación es 2,4 meses, lo que corresponde muy estrechamente al tiempo medido para la remisión ( $2,35 \pm 0,96$  meses) de los perros vacunados que muestran una disminución monofásica en los títulos de anticuerpos AChR (Fig. 1, panel inferior). Cuando se analiza este dato como el tiempo transcurrido entre vacunación y remisión, el tiempo medio para la remisión era  $1,775 \pm 0,43$  meses (valores CI's de 95% inferior y superior = 0,805 y 2,745, respectivamente). Esto no es estadísticamente diferente del tiempo medio hasta la remisión para perros que estaban vacunados y exhibían una disminución monofásica (Fig. 1, panel inferior). Así, con indiferencia del patrón de los niveles de anticuerpos AChR, la vacunación conduce a un tiempo muy similar hasta la remisión, sugiriendo que puede estar implicado un mecanismo similar en ambos cursos.

Existía también una relación cuantitativa entre los eventos simples de vacunación y una reducción de los niveles de anticuerpos AChR en el tiempo de muestreo siguiente (2 a 4 semanas) que se observaba en la totalidad de los 5 perros con títulos de anticuerpos AChR fluctuantes. De 35 eventos de vacunación, 28 (80%) daban como resultado una disminución en el título de anticuerpos AChR (Fig. 3, panel inferior). Los 7 eventos de vacunación que no lograron reducir los niveles de anticuerpos AChR se distribuían entre los 5 animales, observándose uno de ellos para cada uno de 3 perros y 2 para cada uno de 2. Globalmente, los niveles medios de anticuerpos AChR disminuían desde  $1,63 \pm 0,21$  antes a  $1,14 \pm 0,17 nM$  después de la vacunación ( $P = 0,0015$ , Test t apareado de dos colas).

La administración combinada de vacunas de células T y células B es superior a su administración secuencial.

El protocolo de vacunación se realizó de una de dos maneras. Las vacunas de células T y B se administraron al mismo tiempo o un curso de 3 dosis de vacunas de células T a intervalos de 2 semanas fue seguido por 3 dosis de

vacunas de células B a intervalos de 2 semanas. Dado que el tiempo medio entre la vacunación y la remisión de larga duración para los perros que exhibían una disminución monofásica (2,35 meses, Fig. 1) no era diferente del tiempo medio entre la iniciación de un curso de vacunación y la remisión transitoria subsiguiente para perros con niveles fluctuantes de anticuerpos AChR (2,4 meses, Fig. 3) y en este último grupo era independiente del tiempo de vacunación después de la diagnosis, fueron posibles comparaciones respecto a la eficacia de los dos protocolos de vacunación con indiferencia del patrón de los niveles de anticuerpos AChR. El panel superior de la Figura 4 muestra que el tiempo medio hasta la primera remisión (fuese de larga duración o transitoria) después de la iniciación de la vacunación estaba próximo a la significación ( $p = 0,0639$ , test  $t$  no apareado con corrección de Welch) y era 2,7 veces más rápido cuando las vacunas de células T y B se administraron simultáneamente en lugar de hacerlo secuencialmente. Además, cuando las vacunas se administraron secuencialmente, sólo 4 de 7 animales exhibieron una remisión después de la vacunación con células T aislada. Asimismo, por término medio, se requirieron más vacunaciones por animal cuando las vacunas de células T y B se administraron secuencialmente ( $3,86 \pm 1,06$ ) en oposición a la administración simultánea ( $2,67 \pm 0,333$ ) para conseguir una remisión. Cuando se incluye como factor el número de dosis de vacuna ARM de células T y/o B para alcanzar una remisión, junto con el tiempo hasta la remisión, existe una disminución significativa ( $p = 0,0167$ , test Mann-Whitney de 2 colas) en el tiempo hasta la remisión por dosis cuando las vacunas se administran simultáneamente en lugar de la administración secuencial (Fig. 4, panel inferior). Así, la eficacia óptima parece requerir que ambas vacunas se administren uniones. Dado que se utilizaron los mismos adyuvante (TiterMax®) y proteína portadora (KLH) en ambos protocolos de vacunación, es improbable que éstos fueran responsables del efecto. En tal caso, habría sido de esperar la observación de tiempos medios similares hasta la primera remisión siguiente a la misma cantidad de vacunas para los dos protocolos. Por consiguiente, el efecto de la vacuna es dependiente de los péptidos ARM T y B e independiente del adyuvante y el portador y, en la MG espontánea en los perros, es necesaria de hecho una combinación de vacuna de células B y T para llegar a la remisión rápida observada por los inventores.

El tiempo medio para el cual el 50% de los animales lograban la remisión era 2 meses. Este tiempo medio de remisión es 3,2 veces más rápido que los controles históricos (6,4 meses).

EJEMPLO 2: EJEMPLO COMPARATIVO EN RATAS LEWIS/

Se inmunizaron ratas Lewis con AChR purificado a fin de desarrollar una M.G. autoinmune experimental. Las ratas Lewis se trataron luego con los péptidos B y T conjugados a hemocianina de lapa bocallave (KLH). Se demostró que tanto el suero como las preparaciones procedentes de animales vacunados con el péptido complementario se fijaban a los anticuerpos patógenos. Con la composición del péptido B la incidencia de la enfermedad era notablemente reducida en los animales vacunados (25%) comparada con los inmunizados con KLH así como con los controles sin tratar (90%), mientras que el registro clínico de gravedad en los animales con enfermedad promediaba 0,25 en los animales vacunados comparada con 1,3 en los controles positivos. Con la composición del péptido T, la incidencia de la enfermedad se reducía también en los animales vacunados (55%) comparada con los inmunizados con KLH así como con los controles sin tratar (89%), mientras que el registro clínico de gravedad en los animales con enfermedad promediaba 1,2 en los animales vacunados comparado con 2,5 en los controles positivos.

Además, la administración pasiva de anticuerpos monoclonales anti-Id a ratas durante el curso de la inducción de la enfermedad reducía análogamente la incidencia y gravedad de la EAMG (Araga et al., 1996). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados recogidos de las pruebas en modelos animales para la vacuna ARM de la EAMG

EAMG				
	Incidencia de la enfermedad		Gravedad de la enfermedad	
	controles (n)	tratados (n)	controles (n)	tratados (n)
Composición del péptido B	90 % (39)	25 % (16)	1,3 (39)	0,25 (39)
Composición del péptido T	89 % (18)	55 % (18)	2,5 (18)	1,2 (18)

EJEMPLO 3: EJEMPLO COMPARATIVO EN RATAS LEWIS

Para evaluar si la vacunación con péptido T junto con péptido B con un grupo hidrocarbonado causa un efecto diferente en la miastenia grave experimental autoinmune (EAMG) que el péptido B con un grupo hidrocarbonado y el péptido T solo y por separado, se inmunizaron tres veces ratas Lewis con hemocianina de lapa bocallave (KLH) o péptido T o péptido B con un grupo hidrocarbonado acoplado a KLH, sea solo o en combinación. Se indujo luego la EAMG con AChR Torpedo purificado y se monitorizó la enfermedad.

5 Los resultados se presentan en la Tabla 4 en la que puede verse que el péptido T o el péptido B solos reducían la incidencia, gravedad y mortalidad de la EAMG en comparación con ratas de control inmunizadas con KLH. La vacunación simultánea con péptido T junto con péptido B causaba un beneficio menor y estadísticamente no significativo con relación a cualquiera de las vacunas de péptidos aisladamente considerada. Por tanto, en la rata Lewis, la vacunación simultánea con ambos péptidos T y B no aumentaba ni disminuía la eficacia de cualquiera de las vacunas de péptidos aislada, lo que sugiere que no existe efecto sinérgico alguno en las ratas de estos dos péptidos.

Tabla 4

Vacuna	Gravedad				Gravedad Media	Mortalidad (%)	Incidencia de EAMG (%)
	0	1	2	3 4			
KLH	3	2	1	4	2,00±0,58	40,00	70,00
Péptido T	4	3		2	1,22±0,55	22,22	55,56
Péptido B	4	2	1	2	1,33±0,55	22,22	55,56
Péptido T y B	5	2	1	2	1,20±0,51	20,00	50,00

10 Por consiguiente, la MG canina y humana, así como la EAMG en las ratas, se caracterizan por tener una respuesta de anticuerpos AChR que es predominante (68%) contra la MIR. Adicionalmente, los anticuerpos específicos de MIR pueden transferir pasivamente un fenotipo miasténico. Considerando esto junto con la capacidad de la vacuna de células B para inducir una respuesta de anticuerpos anti-idiotípicos a los anticuerpos específicos de MIR y las células B en la EAMG de las ratas, la disminución de los niveles de anticuerpos AChR y la mejora de la enfermedad, no parece particularmente sorprendente que esta vacuna disminuyera los niveles de anticuerpos AChR en los perros. Dicha eficiencia en la EAMG de la rata, así como la MG canina adquirida espontáneamente acoplada con una respuesta predominante de anticuerpos anti-MIR en la MG humana, sugiere una utilidad potencial de la vacuna del péptido B en la enfermedad humana. De hecho, se han registrado anticuerpos anti-idiotípicos existentes naturalmente contra los anticuerpos AChR en el 40% de los pacientes de MG humanos, y su presencia está asociada con títulos más bajos de anticuerpos anti-AChR y mejora clínica.

Además, la vacuna diseñada contra el epítipo de células T dominante del AChR para la rata Lewis es aparentemente eficaz en los perros. Un escenario posible es que los anticuerpos anti-clonotípicos contra la vacuna de células T pueden inducir o expandir las células T reguladoras CD25+ CD4+ recién descritas y existentes naturalmente por una interacción con su receptor de células T. Si fuera éste el caso, estas células reaccionarían específicamente con AChR  $\alpha$ 100-116 pero suprimirían de forma inespecífica otras células T autorreactivas para epítipos más dominantes del AChR en la unión neuromuscular. Un mecanismo de este tipo, si fuera operativo, sugeriría que las vacunas pueden ser eficaces contra la MG humana al igual que contra la canina.

Estos resultados positivos en una segunda especie hacen aumentar la esperanza de la aplicación final de estas vacunas en humanos con portador/adyuvante ad hoc. En caso de que éstas den los mismos resultados que el estudio presente, las vacunas ARM pueden representar una nueva clase de terapias direccionadas que pueden llevar las enfermedades autoinmunes a remisión de larga duración.

Para un tratamiento profiláctico o terapéutico en humanos, se determinaron el portador y el adyuvante óptimos adecuados para uso humano.

35 Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo con los mismos péptidos que se utilizarán en humanos y que son el objeto de esta solicitud de patente.

Durante los experimentos, se acoplaron aquéllos a diferentes portadores y se combinaron con diferentes adyuvantes. Se ha demostrado que los portadores y el adyuvante son necesarios pero que su naturaleza real no es de importancia primaria. Se llevaron a cabo experimentos a fin de demostrar que una combinación de un portador y un adyuvante adecuada para uso humano funcionaba tan bien o incluso mejor que el portador y el adyuvante fáciles de manipular y el uso en laboratorios con experimentos en animales (McAnally J.L. et al., 2000).

Tabla 5: Prevención de la EAMG con vacuna ARM de células B con combinación diferente de proteína portadora y adyuvante

EAMG				
	Incidencia de enfermedad		Gravedad de enfermedad	
	controles (n)	tratados (n)	controles (n)	tratados (n)
KLH en CFA		40% (10)		0,50 (10)
KLH en IFA		86 % (7)		1,57 (7)
KLH en Alumbre		60 % (10)		0,90 (10)
DT en CFA		40 % (10)		0,60 (10)
DT en IFA		89 % (9)		1,33 (9)
DT en Alumbre		50 % (10)		0,50 (10)
PBS	100 % (10)		2,10 (10)	

5 La combinación DT/alumbre dio la respuesta pico más rápida que KLH/alumbre y era también ligeramente más eficaz contra la EAMG (McAnally et al., 2000).

Aunque las realizaciones preferidas de la invención han sido descritas para propósito ilustrativo, los expertos en la técnica apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones o sustituciones, sin desviarse del alcance de la invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Curavac, Inc. Corporation Trust Center

<120> Vacuna peptídica para tratamiento terapéutico o profiláctico de la miastenia grave

<130> 139514CL

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido complementario para los residuos 61-76 de la región inmunógena principal del receptor de acetilcolina implicado en la Miastenia grave

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (8)..(8)

<223> el triptófano en posición 8 comprende un grupo 2,4,6-trimetoxibencilo

<400> 1

Phe Asn Ser Thr Ile Ile Gly Trp Ile Pro Ala Lys Pro His Ile Asn  
1 5 10 15

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético complementario para los residuos 100-116 de la cadena alfa del receptor de acetilcolina implicado en la Miastenia grave

<400> 2

Tyr Phe Ser Arg Ile Ile Gln Lys Gln Phe Gly His Val Asn Asn Gly  
1 5 10 15

Lys

## REIVINDICACIONES

1. Péptido que tiene al menos una secuencia complementaria a una región inmunógena principal de un receptor de acetilcolina implicado en la miastenia grave, caracterizado por que el péptido tiene al menos una secuencia SEQ. ID. NO. 1 con un triptófano en posición 8, que lleva al menos un grupo 2,4,6-trimetoxibencilo.
- 5 2. Péptido conforme a la reivindicación 1, en donde la secuencia SEQ. ID. NO. 1 es complementaria a los residuos 61 a 76 de una cadena  $\alpha$  de dicha región inmunógena humana principal del receptor de acetilcolina.
3. Composición terapéutica que comprende el péptido conforme a la reivindicación 1 y al menos un portador.
4. Composición terapéutica que comprende el péptido conforme a la reivindicación 1 y péptido que tiene al menos una secuencia SEQ ID NO. 2, secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento por las células T del receptor de acetilcolina, así como al menos un portador.
- 10 5. Composición terapéutica conforme a la reivindicación 4, en donde la secuencia SEQ ID NO. 2 es complementaria a los residuos 100 a 116 de una cadena  $\alpha$  de dicho sitio de reconocimiento por las células T del receptor de acetilcolina.
6. Composición terapéutica conforme a la reivindicación 4 que comprende una primera y una segunda formulación, comprendiendo la primera formulación dicho péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO. 1 con al menos un portador, y comprendiendo la segunda formulación dicho péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO. 2 con al menos un portador
- 15 7. Composición terapéutica conforme a la reivindicación 3 que comprende desde 750 a 25 microgramos de dicho péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO. 1 en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con al menos un adyuvante.
- 20 8. Composición terapéutica conforme a la reivindicación 3 que comprende desde 100 a 50 microgramos de dicho péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO. 1 en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con al menos un adyuvante.
9. Composición terapéutica conforme a la reivindicación 4 que comprende desde 750 a 25 microgramos de cada péptido en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con al menos un adyuvante.
- 25 10. Composición terapéutica conforme a la reivindicación 4 que comprende desde 100 a 50 microgramos de cada péptido en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con al menos un adyuvante.
11. Composición terapéutica conforme a la reivindicación 6 en donde la primera formulación comprende desde 750 a 25 microgramos del péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO. 1 en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con al menos un adyuvante, y la segunda formulación comprende desde 750 a 25 microgramos del péptido que tiene la secuencia SEQ ID NO. 2 en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con al menos un adyuvante.
- 30 12. Composición terapéutica conforme a la reivindicación 6, en donde la primera formulación comprende desde 100 a 50 microgramos del péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO. 1 en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con al menos un adyuvante y comprendiendo la segunda formulación desde 100 a 50 microgramos del péptido que tiene la secuencia SEQ ID NO. 2 en 0,5 ml de solución salina tamponada de fosfato con al menos un adyuvante.
- 35 13. Uso de la composición conforme a la reivindicación 3 para fabricación de una vacuna para ser utilizada en un tratamiento terapéutico o profiláctico de la miastenia grave en los mamíferos.
- 40 14. Uso de la composición conforme a la reivindicación 4 para fabricación de una vacuna para ser utilizada en un tratamiento terapéutico o profiláctico de la miastenia grave en los mamíferos.
15. Uso de la composición conforme a la reivindicación 6 para fabricación de una vacuna para ser utilizada en un tratamiento terapéutico o profiláctico de la miastenia grave en los mamíferos, debiendo administrarse dichas formulaciones primera y segunda simultánea o secuencialmente.
- 45 16. Kit de detección que comprende el péptido conforme a la reivindicación 1 para detección de anticuerpos anti-idiotípicos de la región inmunógena principal de la miastenia grave.
17. Método para fabricación del péptido conforme a la reivindicación 1, que comprende los pasos de:
  - síntesis del péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO. 1, e
  - hidrocarbonación de un residuo triptófano localizado en posición 8, en dicha secuencia SEQ ID NO. 1, por
- 50 adición de al menos un grupo 2,4,6-trimetoxibencilo a dicho triptófano.

18. Método para fabricación de un medicamento para aplicación en la miastenia grave, que comprende los pasos de:
- síntesis del péptido conforme a la reivindicación 1, y
  - acoplamiento del péptido con al menos un portador.
- 5 19. Método para fabricación de un medicamento para aplicación en la miastenia grave, que comprende los pasos de:
- síntesis del péptido conforme a la reivindicación 1,
  - síntesis del péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO. 2, y
  - mezcla de ambos péptidos con al menos un portador.
- 10 20. Método para fabricación de un medicamento para aplicación en la miastenia grave, que comprende los pasos de:
- fabricación de la primera formulación por síntesis del péptido conforme a la reivindicación 1, y por acoplamiento del mismo con al menos un portador, y
  - fabricación de la segunda formulación por síntesis del péptido que tiene al menos la secuencia SEQ ID NO. 2, y por acoplamiento del mismo con al menos un portador.
- 15



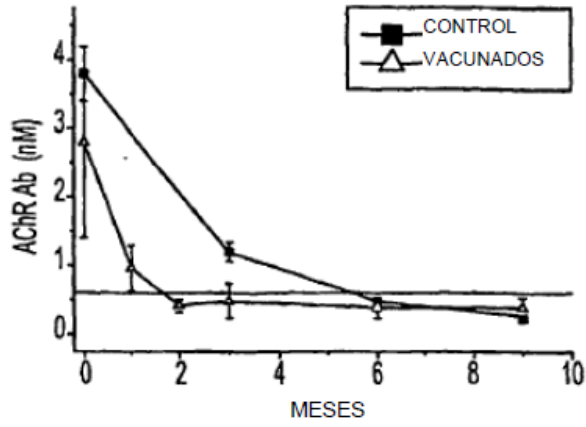


FIG. 1A

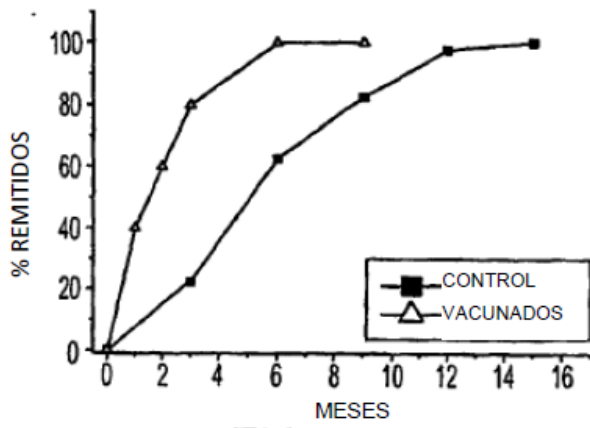


FIG. 1B

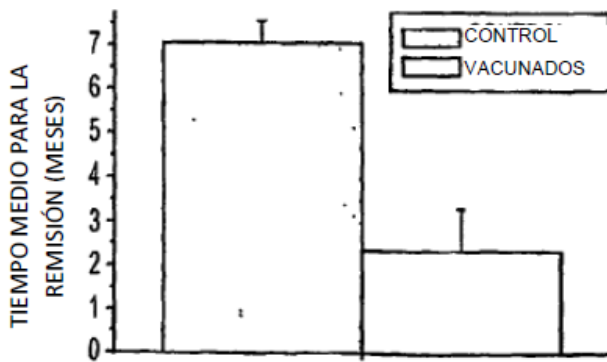


FIG. 1C

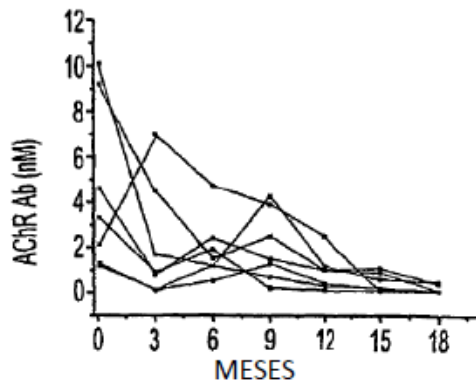


FIG. 2A

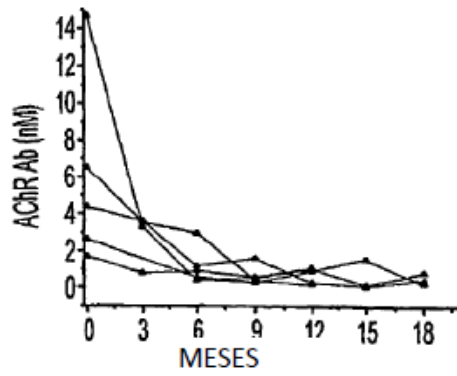


FIG. 2B

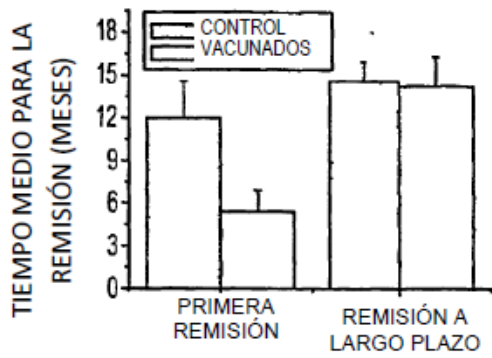


FIG. 2C

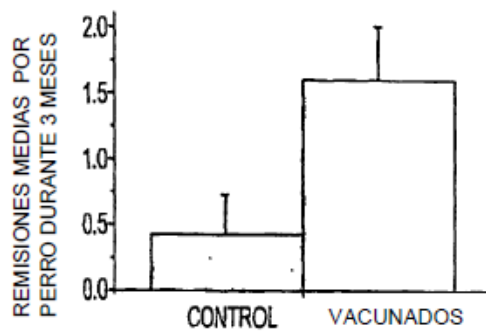


FIG. 2D

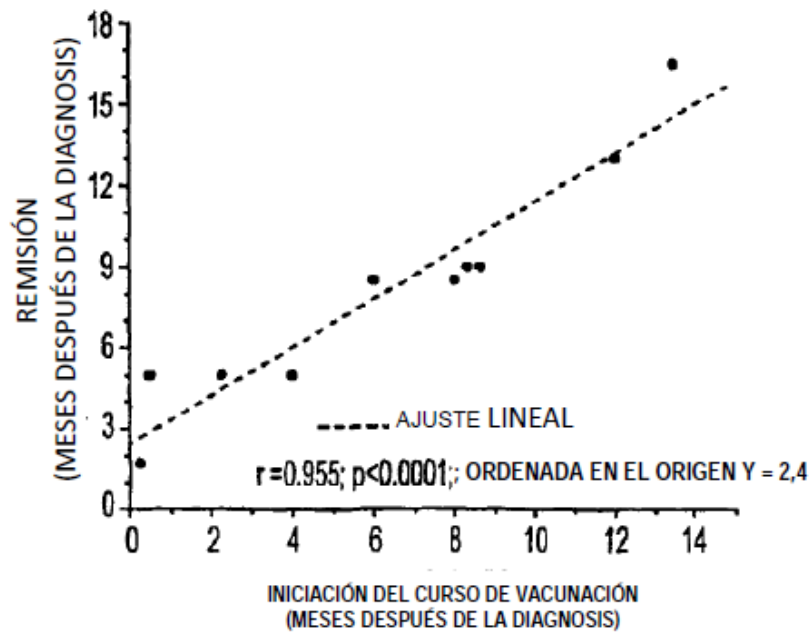


FIG. 3A

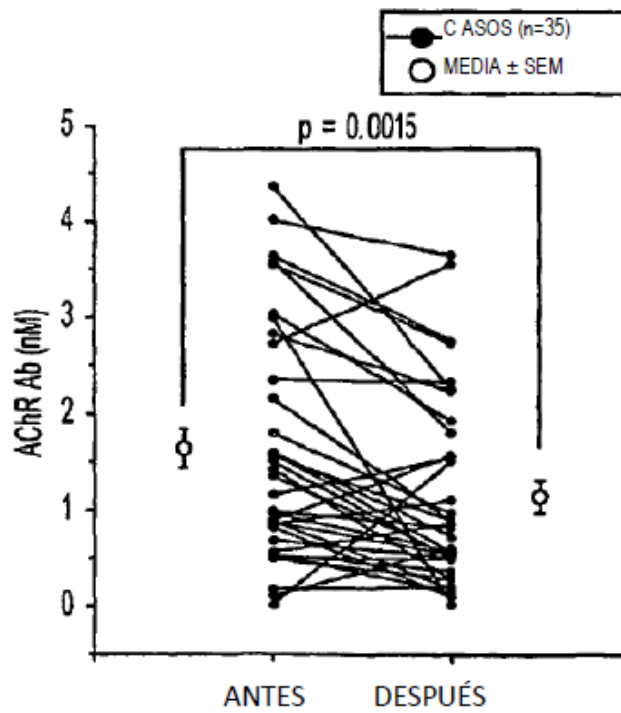


FIG. 3B

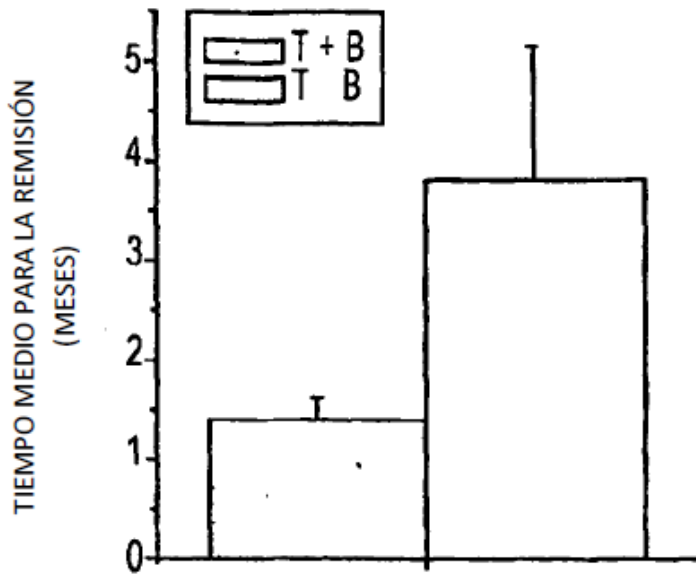


FIG. 4A

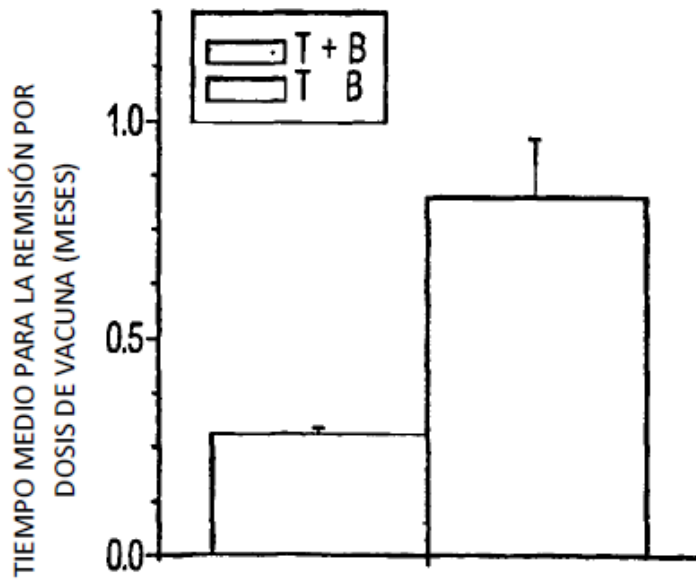


FIG. 4B