

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 811**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/02 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2005 E 05795337 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 1797109**

54 Título: **Mezclas de polipéptidos, composiciones que las contienen y procedimientos para obtener los mismos, y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.09.2004 US 608844 P

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

02.06.2016

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:

**PINCHASI, IRIT;
DOLITZKY, BEN-ZION;
FRENKEL, ANTON;
SCHWARTZ, MICHAL;
ARNON, RUTH y
AHARONI, RINA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 572 811 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

Mezclas de polipéptidos, composiciones que las contienen y procedimientos para obtener los mismos, y usos de los mismos

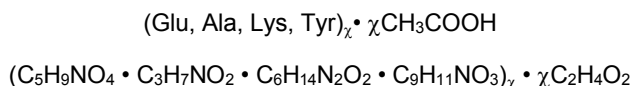
A lo largo de toda esta solicitud se hace referencia a diversas publicaciones de patente y no de patente, proporcionándose las citas completas.

Antecedentes de la invención

Se conocen desde hace mucho tiempo copolímeros de ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina y mezclas de los mismos. (Patente estadounidense n.º 3.849.550, expedida el 19 de noviembre de 1974 (Teitelbaum, *et al.*))

A lo largo de las dos últimas décadas se han estudiado ampliamente tales mezclas de copolímeros y se han identificado numerosas modificaciones así como posibles usos. Como resultado de estos esfuerzos, se desarrolló un producto comercial, COPAXONE®, que se comercializa ahora.

Específicamente, COPAXONE® es el nombre de marca para una composición farmacéutica que contiene acetato de glatirámero (GA) como principio activo. COPAXONE® contiene las sales de acetato de polipéptidos sintéticos, conteniendo cuatro aminoácidos que se producen de manera natural: ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina con una fracción molar promedio de 0,141, 0,427, 0,095 y 0,338, respectivamente. El peso molecular promedio del acetato de glatirámero es de 4.700 – 11.000 Dalton. Químicamente, el acetato de glatirámero se designa polímero de ácido L-glutámico con L-alanina, L-lisina y L-tirosina, acetato (sal). Su fórmula estructural es:



CAS - 147245-92-9

(“Copaxone”, Physician’s Desk Reference, (2000), Medical Economics Co., Inc., (Montvale, NJ), 3115.)

El acetato de glatirámero está aprobado para su uso en la reducción de la frecuencia de recaídas en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente. Véase también el documento US6054430.

La esclerosis múltiple se ha clasificado como una enfermedad autoinmunitaria. También se ha dado a conocer el acetato de glatirámero para su uso en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunitarias (publicación n.º US 2002/0055466 A1 por R. Aharoni *et al.*), enfermedades inflamatorias no autoinmunitarias (publicación n.º US 2005/0014694 A1 por V. Wee Yong *et al.*; y solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0077278 A1, publicada el 20 de junio de 2002 (Young *et al.*) y para promover la regeneración nerviosa y/o para prevenir o inhibir la degeneración secundaria que puede seguir a la lesión primaria del sistema nervioso (publicación n.º US 2003/0004099 A1 por M. Eisenbach-Schwartz *et al.*; y solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0037848 A1, publicada el 28 de marzo de 2002 (Eisenbach-Schwartz)). Además, se ha dado a conocer el acetato de glatirámero como tratamiento para enfermedades mediadas por el sistema inmunitario (por ejemplo, patente estadounidense n.º 6.514.938 B1, expedida el 4 de febrero de 2003 (Gad *et al.*); publicación internacional PCT n.º WO 01/60392, publicada el 23 de agosto de 2001 (Gilbert *et al.*); y publicación internacional PCT n.º WO 00/27417, publicada el 19 de mayo de 2000 (Aharoni *et al.*) así como enfermedades asociadas con desmielinización (publicación internacional PCT n.º WO 01/97846, publicada el 27 de diciembre de 2001 (Moses *et al.*)).

Como resultado del estudio y la mejora adicionales, se ha desarrollado una nueva mezcla de tales copolímeros que tiene potencial como medicación no esteroidea bien tolerada para el tratamiento de la esclerosis múltiple y otras enfermedades tal como se describe más completamente en el presente documento.

Sumario de la invención

La invención proporciona una composición que comprende una mezcla de polipéptidos, en la que cada polipéptido (a) es un copolímero de los aminoácidos ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina, y (b) puede estar en forma de un sal farmacéuticamente aceptable; y en la que en la mezcla (i) los polipéptidos tienen un peso molecular promedio en el intervalo de 13.500 a 18.500 Dalton, (ii) del 13% al 38% de los polipéptidos tienen un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en un extremo de los mismos, y (iii) el 68% de los polipéptidos tienen un peso molecular de entre 7.000 y 41.000 Dalton. En una realización, el peso molecular promedio es de 16.000 Dalton.

Esta invención también proporciona un procedimiento para obtener una composición que comprende una mezcla de polipéptidos, que comprende:

- a) polimerizar N-carboxianhídridos de L-tirosina, L-alanina, glutamato de γ -bencilo y trifluoroacetil-lisina con una cantidad predeterminada de dietilamina para formar una mezcla de polipéptidos protegidos;

b) retirar el grupo protector bencilo de los polipéptidos protegidos poniendo en contacto los polipéptidos con una disolución de bromuro de hidrógeno y ácido acético a una temperatura en el intervalo de 17°C a 23°C durante un periodo de 7 a 18 horas para producir una mezcla de polipéptidos protegidos con trifluoroacetilo;

5 c) retirar el grupo protector trifluoroacetilo de los polipéptidos protegidos con trifluoroacetilo poniendo en contacto los polipéptidos protegidos con una disolución de base orgánica para obtener el polipéptido desprotegido; y

d) someter los polipéptidos desprotegidos de la etapa c) a ultrafiltración,

formando así la composición tal como se describió anteriormente.

10 Los datos disponibles actualmente sugieren que el desarrollo de la mezcla de polipéptidos de la invención puede abordar las necesidades de pacientes y médicos proporcionando conveniencia (inyecciones menos frecuentes), eficacia aumentada y sostenida y potencial neuroprotector mejorado.

Breve descripción de las figuras

15 Figura 1. Secreción de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-10) a partir de esplenocitos de ratón tras una única inyección de la mezcla de polipéptidos de la invención o GA. [Las barras representan la media $\pm$ STD de los valores obtenidos en 2-3 experimentos. M=ratón.]

Figura 2. Efecto de una única inyección de la mezcla de polipéptidos de la invención a 25 μ g/ratón y a 75 μ g/ratón y de GA sobre la supervivencia de RGC tras toxicidad inducida por glutamato en ratones. [Las barras representan la media $\pm$ DE de los valores de % de protección en los grupos sometidos a prueba calculada frente al valor medio del grupo de control negativo. M=ratón.]

Figura 3. Efecto de tres inyecciones mensuales de la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC tras toxicidad inducida por glutamato en ratones (tres inyecciones sucesivas a 75 μ g/ratón). [Las barras representan la media $\pm$ DE de los valores de % de protección en los grupos sometidos a prueba calculada frente al valor medio del grupo de control negativo. M=ratón.]

25 Figura 4. Secreción de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-4) a partir de esplenocitos de ratón tras tres inyecciones sucesivas mensuales de la mezcla de polipéptidos de la invención (75 μ g/ratón).

Figura 5. Resultados de protección frente a toxicidad de glutamato del estudio de 6 meses de GA/mezcla de polipéptidos de la invención.

30 Figura 6. Secreciones de IL-2 tras el tratamiento mensual de la mezcla de polipéptidos de la invención y GA durante 6 meses.

Figura 7. Secreciones de IL-2 tras los tratamientos mensual y bimensual de la mezcla de polipéptidos de la invención durante 6 meses.

Figura 8 Efecto del tratamiento con la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC tras IOP elevada inducida por cauterización con láser en ratas. [Las barras representan la media $\pm$ DE de los valores de % de protección en los grupos sometidos a prueba calculada frente al valor medio del grupo de control con vehículo.]

Figura 9. EAE inducida por MOG en ratones, GA frente a la mezcla de polipéptidos de la invención.

Figura 10. Puntuación máxima media en EAE aguda en ratones, GA frente a lotes de mezclas de polipéptidos de diferente peso molecular promedio [KDa = kilodalton].

40 Figura 11. Puntuación media diaria en EAE aguda en ratones, RS de GA (7,5 KDa) frente a la mezcla de polipéptidos de la invención (16 KDa).

Figura 12. Respuesta a la dosis de la actividad la mezcla de polipéptidos de la invención en bloquear EAE en ratones, diferentes niveles de dosis de la mezcla de polipéptidos de la invención frente a 250 μ g/ratón de RS de GA [peso molecular promedio de la mezcla de polipéptidos de la invención ~16,0 Kda].

45 Figura 13. Unión de anticuerpos monoclonales anti-GA a la mezcla de polipéptidos de la invención y RS de GA (ELISA de tipo sándwich).

Figura 14. Secreción de IL-2 a partir de esplenocitos de ratón tras tres inyecciones semanales de la mezcla de polipéptidos de la invención o inyecciones diarias de GA.

Figura 15. Neuroprotección de la toxicidad por glutamato tras nueve inyecciones semanales de la mezcla de polipéptidos de la invención, GA o control con PBS.

Figura 16. Actividad de la mezcla de polipéptidos de la invención en el modelo de TNBS en ratones frente a acetato de glatirámero, budesonida y control sin tratar.

Figura 17. Puntuación histológica media de toda la longitud del colon en ratones tratados con el vehículo, budesonida y la mezcla de polipéptidos de la invención en dosificación de 75, 250, 500, 750 ó 2000 µg. La puntuación de cada campo de ampliación de tejido de colon osciló entre 0 y 4 (cuanto más alta es la puntuación, más grave es la enfermedad).

Figura 18. Secreciones de IFN-γ y secreciones de IL-10 tras una inmunización mensual o bimensual durante 6 meses.

Figura 19. Efecto protector de la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC (% de protección tras el tratamiento iniciado el día del segundo tratamiento con láser).

Figura 20. Efecto protector de la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC (% de protección después del tratamiento preventivo iniciado 63 días antes del 2º tratamiento con láser).

Figura 21. Espectro de RMN (RS) de la mezcla de polipéptidos de la invención.

Figura 22. Espectro de RMN de carbono-13 (RS) de la mezcla de polipéptidos de la invención.

Figura 23. Espectro ultravioleta de la mezcla de polipéptidos de la invención.

Figura 24. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier de la mezcla de polipéptidos de la invención.

Figura 25. Comparación gráfica entre tamaños moleculares del acetato de glatirámero y la mezcla de polipéptidos de la invención.

Figura 26. Análisis de dicroísmo circular de la mezcla de polipéptidos de la invención.

Figura 27. Respuesta a la dosis de la mezcla de polipéptidos de la invención y el acetato de glatirámero en la prueba de bloqueo de EAE.

Figura 28. a) Análisis de SDS-PAGE de los marcadores de polipéptido que se usan para calibrar una columna de HPLC para la determinación de la distribución de peso molecular de la mezcla de polipéptidos de la invención; b) curva de calibración que muestra linealidad; y c) resultados de masa medida con SDS-PAGE que son aproximadamente un 30% mayores de lo esperado debido al uso de marcadores comerciales.

Figura 29. Separación en columna Superose 6 de los cinco marcadores de polipéptido.

Figura 30. Superposición de la separación en columna Superpose 6 separación de los cinco marcadores de polipéptido y la mezcla de polipéptidos de la invención.

Figura 31. Comparación de cuatro conjuntos diferentes de marcadores de peso molecular: los marcadores de polipéptido 1-5, marcadores de acetato de glatirámero dados a conocer en la patente estadounidense n.º 6.800.287 B2 y marcadores de proteína disponibles comercialmente de dos vendedores, Sigma n.º de catálogo MW-GF-70 y Amersham n.º de catálogo 17-0442-01.

Descripción detallada de la invención

1. Realizaciones de la invención

La invención proporciona una composición que comprende una mezcla de polipéptidos, en la que cada polipéptido (a) es un copolímero de los aminoácidos ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina, y (b) puede estar en forma de un sal farmacéuticamente aceptable; y en la que en la mezcla (i) los polipéptidos tienen un peso molecular promedio en el intervalo de 13.500 a 18.500 Dalton, (ii) del 13% al 38% de los polipéptidos tienen un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en un extremo de los mismos, y (iii) el 68% de los polipéptidos tienen un peso molecular de entre 7.000 y 41.000 Dalton. En una realización, el peso molecular promedio es de 16.000 Dalton.

En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, los aminoácidos están presentes en la mezcla en una cantidad de manera que la fracción molar promedio de los aminoácidos es: ácido L-glutámico 0,129-0,153; L-alanina 0,392-0,462; L-tirosina 0,086-0,100; y L-lisina 0,300-0,374. En una realización, los aminoácidos están presentes en la mezcla en una cantidad de manera que la fracción molar promedio de los aminoácidos es: ácido L-glutámico 0,141; L-alanina 0,427; L-tirosina 0,095; y L-lisina 0,338.

En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, del 19% al 28% de los polipéptidos en la mezcla pueden tener dietilamida en un extremo de los mismos; el resto de polipéptidos en la mezcla pueden tener un grupo carboxilo en el extremo C-terminal.

En otra realización, el 35-45% de los polipéptidos en la mezcla tienen una L-alanina en el extremo N-terminal, preferiblemente el 37-41%, o el 38-39% o el 39%.

Aún en otra realización, menos del 5%, preferiblemente menos del 3%, de los polipéptidos en la mezcla tienen un peso molecular por debajo de 4.700 Dalton.

- 5 En una realización, los polipéptidos en la mezcla no tienen todos la misma secuencia de aminoácidos.

En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, la mezcla de polipéptidos puede tener un valor de dicroísmo circular de 0,91.

- 10 En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, los polipéptidos están en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, que puede ser una sal orgánica, una sal de adición de ácido. En una realización adicional, la sal es una sal de acetato o sal de cloruro.

En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, la composición dada a conocer puede caracterizarse adicionalmente por tener al menos el 90% de actividad supresora en una prueba de bloqueo de EAE cuando se administra a una dosis de 100 µg/ratón de la mezcla de polipéptidos.

En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, la composición puede liofilizarse.

- 15 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de cualquiera de las realizaciones dadas a conocer y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable comprende manitol.

La composición farmacéutica puede ser además un liposoma, comprende un adyuvante. Todavía en una realización adicional, el adyuvante tal como alumbre, un fosfolípido, un adyuvante de ADN, adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund.

- 20 En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, la mezcla de polipéptidos puede estar en o unida a una nanopartícula, por ejemplo, electrostáticamente.

- 25 En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, la cantidad eficaz puede ser de 0,1 mg a 70 mg. En una realización, la cantidad eficaz puede ser de 0,5 mg a 60 mg; de 1 mg a 50 mg; de 5 mg a 35 mg; de 10 mg a 30 mg; de 45 mg a 70 mg; de 50 mg a 70 mg; de 15 mg a 25 mg; de 18 mg a 22 mg; de 0,1 mg a 2 mg; de 0,5 mg a 1,5 mg; de 2 mg a 7 mg; de 4 mg a 6 mg; de 12 mg a 18 mg; de 14 mg a 16 mg; de 17 mg a 23 mg; de 19 mg a 21 mg; de 27 mg a 33 mg; de 29 mg a 31 mg; de 47 mg a 53 mg; o de 49 mg a 51 mg. En otra realización, la cantidad eficaz puede ser de 1 mg; 5 mg; 15 mg; 20 mg; 30 mg; o 50 mg.

- 30 En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, la composición puede tener un pH de entre 5,5 y 9,0; de entre 5,5 y 8,5; de entre 5,5 y 7,5; de entre 5,5 y 7,0; de entre 5,5 y 6; puede ser de 5,7; o puede ser de 5,5.

- 35 La invención también proporciona una composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, que comprende además al menos uno de riluzol, acetato de glatirámico, baclofeno, fenitoína, quinina, amitriptilina, fenotiazina, clorpromazina, neurolépticos de butirofenona, geldamicina, ARN de interferencia, trehalosa, cistamina, rapamicina, glucocorticoide, fármaco antiinflamatorio no esteroideo, minociclina, ácido fólico, creatina, dicloroacetato, nicotinamida, riboflavina, carnitina, ácido tauroursodesoxicólico, ginkgo biloba, coenzima Q10, vitamina A, vitamina C, vitamina E, selenio, ácido lipoico, arginina, mitramicina, remacemida, filuzol, lamotrigina, memantina, gabamentina, inhibidores de HDAC, ácido retinoico, reserpina, anticolinérgicos, difenoxilato, loperamida, tintura de opio desodorizada, codeína, metronidazol, sulfasalazina, corticosteroide, azatioprina, 6-mercaptopurina, bicaloprina, aféresis de linfocitos T, 4-aminoquinolinas, metotrexato, loperamida, ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), balsalazida, 40 olsalazina, ACTH 75, ACTH 120, antibiótico, pilocarpina, isoptocarpina-timolol hemihidratado, maleato de timolol, betaxolol, levobunolol, carteolol, metipranolol, epinefrina, dipivefrina, carbachol, apraclonidina, brimonidina, dorzolamida, latanoprost, travaprost, brimatoprost, brinzolamida, inhibidor de colinesterasa, demecario, isobuturofato, inhibidor de anhidrasa carbónica, manitol, glicerina oral y midriáticos, memantina, atropina, meclizina, dihidrocloruro, proclorperazina, escopolamina, difenhidramina, clonazepam, gabapentina, primidona, toxina botulínica, actazolamida y cabidopa-levodopa, isoniazida, diazepam, clonazepam, dantroleno sódico, tizanidina, clonidina, sildenafil, alprostadil, papaverina, bisacodilo, hidróxido de magnesio, glicerina, muciloide hidrófilo de psilio, fosfato de sodio, factor de necrosis antitumoral (TNF), docusato, oxiacetona, desmopresina, vasopresina, tolterodina, carbamazepina, imipramina, betanecol, fenoxibenzamina, terazosina, propantelina, oxibutona, hiosciamina, metenamina, nitrofurantoína, fenazopiridina, ciprofloxacina, amantadina, pemolina, derivado de vitamina D, modafinilo, fluoxetina, 50 sertralina, venlafaxina, citalopram, paroxetina, trazodona, nortriptilina, imipramina, dotiepin, lofepramina, doxepina, protriptilina, tranilcipromina, moclobemida, bupropión, nefazodona, mirtazapina, zolpidem, alprazolam, temazepam, buspirona, gabapentina, topiramato, zonisamida, desipramina, imipramina, doxepina, protriptilina, pentozifilina, hidrozicina, naltrexona, esteroides, relajantes musculares, prednisona, dexametasona, corticotropina, inmunosupresores, aciclovir, azatioprina, ciclofosfamida, mitoxantrona, ciclosporina, metotrexato, cladribina, interferones, laquinimod, alemtuzumab, 4-aminopiridina, 3,4-diaminopiridina, eliprodil, inmunoglobulina IV, pregabalina o ziconotida.

En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer, la composición puede liofilizarse.

Esta invención también proporciona un procedimiento para obtener una composición que comprende una mezcla de polipéptidos, que comprende:

- 5 e) polimerizar N-carboxianhídridos de L-tirosina, L-alanina, glutamato de γ -bencilo y trifluoroacetil-lisina con una cantidad predeterminada de dietilamina para formar una mezcla de polipéptidos protegidos;
- f) retirar el grupo protector bencilo de los polipéptidos protegidos poniendo en contacto los polipéptidos con una disolución de bromuro de hidrógeno y ácido acético a una temperatura en el intervalo de 17°C a 23°C durante un periodo de 7 a 18 horas para producir una mezcla de polipéptidos protegidos con trifluoroacetilo;
- 10 g) retirar el grupo protector trifluoroacetilo de los polipéptidos protegidos con trifluoroacetilo poniendo en contacto los polipéptidos protegidos con una disolución de base orgánica para obtener el polipéptido desprotegido; y
- h) someter los polipéptidos desprotegidos de la etapa c) a ultrafiltración,

formando así la composición tal como se describió anteriormente.

- 15 En una realización, la retirada del grupo protector bencilo en la etapa b) puede realizarse a una temperatura en el intervalo de 17-21°C. En una realización adicional, la retirada del grupo protector bencilo en la etapa b) puede llevarse a cabo a una temperatura en el intervalo de 19-20°C.

En cualquier realización del procedimiento, la retirada del grupo protector bencilo en la etapa b) puede llevarse a cabo a lo largo de un periodo de 7 a 15 horas, por ejemplo de aproximadamente 15 horas.

- 20 En cualquier realización del procedimiento, la base orgánica en la etapa c) puede ser una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, amoniaco metanólico, piperidina.

- 25 En cualquier realización del procedimiento, la disolución de bromuro de hidrógeno y ácido acético es desde el 10% hasta el 36% de ácido bromhídrico en ácido acético. En otra realización, el ácido bromhídrico en ácido acético es desde el 16% hasta el 33% de ácido bromhídrico en ácido acético; del 18% al 33% de ácido bromhídrico en ácido acético; del 20% al 37% de ácido bromhídrico en ácido acético; del 20% al 33% de ácido bromhídrico en ácido acético; del 22% al 33% de ácido bromhídrico en ácido acético; del 24% al 33% de ácido bromhídrico en ácido acético; del 25% al 35% de ácido bromhídrico en ácido acético; del 26% al 33% de ácido bromhídrico en ácido acético; del 28% al 33% de ácido bromhídrico en ácido acético; del 30% al 34% de ácido bromhídrico en ácido acético; del 30% al 33% de ácido bromhídrico en ácido acético; o del 32% al 33% de ácido bromhídrico en ácido acético. En una realización adicional, la disolución es el 33% de ácido bromhídrico en ácido acético. En otra realización, la disolución es el 16% de ácido bromhídrico en ácido acético.
- 30

La disolución de bromuro de hidrógeno y ácido acético puede tratarse previamente con eliminador de bromo, tal como fenol, con el fin de retirar el bromo libre.

En una realización, el procedimiento de cualquiera de las realizaciones dadas a conocer puede comprender además una etapa de liofilizar la composición.

- 35 El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones.

Esta invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de cualquiera de las realizaciones dadas a conocer con un portador farmacéuticamente aceptable dado a conocer en el presente documento.

- 40 En el presente documento se describe un método de tratamiento de un sujeto humano aquejado de una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones dadas a conocer, para tratar al sujeto humano.

- 45 En el presente documento se describe un método de tratamiento de un sujeto humano aquejado de una enfermedad inflamatoria no autoinmunitaria, una enfermedad mediada por el sistema inmunitario o una enfermedad asociada con desmielinización que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones dadas a conocer, para tratar al sujeto humano.

En el presente documento se describe un método de alivio de un síntoma de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto aquejado de tal enfermedad, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones dadas a conocer en una cantidad eficaz para aliviar el síntoma.

- 50 En el presente documento se describe un método de alivio de un síntoma de una enfermedad inflamatoria no autoinmunitaria, una enfermedad mediada por el sistema inmunitario o una enfermedad asociada con desmielinización en un sujeto aquejado de tal enfermedad, que comprende administrar al sujeto humano una

cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones dadas a conocer en una cantidad eficaz para aliviar los síntomas.

- 5 En el presente documento se describe un método de promover la regeneración nerviosa o impedir o inhibir la degeneración secundaria que de otro modo puede seguir a la lesión primaria del sistema nervioso en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones dadas a conocer.

En el presente documento se describe un método de tratamiento de un sujeto humano aquejado de una enfermedad neurodegenerativa que comprende administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones dadas a conocer para tratar así al sujeto humano.

- 10 En el presente documento se describe un método de alivio de un síntoma de una enfermedad neurodegenerativa que comprende administrar al sujeto humano la composición de cualquiera de las realizaciones o la composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones en una cantidad eficaz para aliviar el síntoma.

- 15 La enfermedad neurodegenerativa puede ser la enfermedad de Huntington, en cuyo caso, el método puede comprender además administrar al sujeto fenotiazina, neurolépticos de butirofenona, haloperidol, reserpina, o una combinación de los mismos.

La enfermedad neurodegenerativa puede ser glaucoma, en cuyo caso, el método conserva la integridad estructural del nervio óptico del sujeto humano aquejado de glaucoma, conserva las células retinianas en el sujeto humano aquejado de glaucoma y/o reduce la tasa de pérdida de campo visual en el sujeto humano aquejado de glaucoma.

- 20 Cuando la enfermedad neurodegenerativa es glaucoma, el método puede comprender además administrar al sujeto un segundo agente, en el que el segundo agente es acetato de glatirámico, pilocarpina, maleato de timolol, betaxolol, levobunolol, metipranolol, epinefrina, dipivefrina, carbacol, inhibidores de colinesterasa potentes, inhibidores de anhidrasa carbónica, atropina, midriáticos, o una combinación de los mismos. Preferiblemente, la cantidad de la composición y la dosis del segundo agente, tomados juntos, son eficaces para tratar al sujeto; cada uno de la cantidad de la composición tomada sola y la dosis del segundo agente tomado solo es eficaz para tratar al sujeto, o bien la cantidad de la composición tomada sola o bien la dosis del segundo agente tomado solo no es eficaz para tratar al sujeto humano.

En una realización, el sujeto humano no ha recibido nunca anteriormente el segundo agente para terapia.

En una realización, el sujeto humano puede haber recibido tanto la mezcla de polipéptidos de la invención como el segundo agente, pero posteriormente se interrumpe el segundo agente.

- 30 Cuando la enfermedad neurodegenerativa es glaucoma, el tratamiento puede comprender además trabeculoplastia láser, cirugía filtrante, iridectomía periférica o iridectomía láser.

- 35 Cuando la enfermedad neurodegenerativa es glaucoma, la composición puede administrarse una vez cada de 1 a 12 semanas; una vez cada de 3 a 12 semanas; una vez cada de 3 a 8 semanas; una vez cada de 2 a 6 semanas; una vez cada de 1 a 2 semanas; una vez cada de 3 a 5 semanas; una vez cada de 4 a 10 semanas; una vez cada 4 semanas; una vez cada 2 meses.

- 40 Cuando la enfermedad neurodegenerativa es glaucoma, la cantidad de la composición puede ser de 0,1 mg a 70 mg de la composición; de 0,5 mg a 60 mg de la composición; de 1 mg a 50 mg de la composición; de 5 mg a 35 mg de la composición; de 10 mg a 30 mg de la composición; de 45 mg a 70 mg de la composición; de 50 mg a 70 mg de la composición; de 15 mg a 25 mg de la composición; de 18 mg a 22 mg de la composición; de 0,1 mg a 2 mg de la composición; de 0,5 mg a 1,5 mg de la composición; de 2 mg a 7 mg de la composición; de 4 mg a 6 mg de la composición; de 12 mg a 18 mg de la composición; de 14 mg a 16 mg de la composición; de 17 mg a 23 mg de la composición; de 19 mg a 21 mg de la composición; de 27 mg a 33 mg de la composición; de 29 mg a 31 mg de la composición; de 47 mg a 53 mg de la composición; de 49 mg a 51 mg de la composición; 5 mg de la composición; 15 mg de la composición; 30 mg de la composición; y 50 mg de la composición.

- 45 Cuando la enfermedad neurodegenerativa es glaucoma, la administración puede ser a través de una vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, oral, intranasal, bucal, vaginal, rectal, intraocular, intratecal, tópica o intradérmica. En una realización, la composición puede administrarse por vía intranasal y la dosis puede ser de menos de 1 mg o la composición puede administrarse por vía oral y la dosis puede ser de 70 mg. Preferiblemente, la composición se administra mediante inyección.

- 50 En el presente documento se describe un método de tratamiento de un sujeto humano aquejado de una enfermedad inflamatoria del intestino que comprende administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier composición dada a conocer para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino.

En el presente documento se describe un método de alivio de un síntoma de una enfermedad inflamatoria del intestino que comprende administrar al sujeto humano cualquier composición dada a conocer en una cantidad eficaz

para aliviar el síntoma.

Cuando la enfermedad es una enfermedad inflamatoria del intestino, el método puede comprender además administrar al sujeto un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente anticolinérgico, difenoxilato, loperamida, tintura de opio desodorizada, codeína, antibióticos, metronidazol, sulfasalazina, corticosteroides, prednisona, hidrocortisona, antimetabolitos, azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina, metotrexato, 4-aminoquinolinas, loperamida, ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), sulfasalazina, olsalazina, prednisona, ACTH 75, ACTH 120, antibióticos, o una combinación de los mismos. En una realización, la cantidad eficaz de la composición y la dosis del segundo agente, tomados juntos, pueden ser eficaces para tratar al paciente aquejado de enfermedad inflamatoria del intestino; cada una de la cantidad eficaz de la composición, tomada sola, y la dosis del segundo agente, tomado solo puede ser eficaz para tratar al paciente aquejado de enfermedad inflamatoria del intestino; o bien la cantidad eficaz de la composición tomada sola o bien la dosis del segundo agente tomado solo puede no ser eficaz para tratar al paciente aquejado de enfermedad inflamatoria del intestino.

En una realización, el sujeto humano no ha recibido nunca anteriormente el segundo agente como tratamiento para la enfermedad inflamatoria del intestino.

En otra realización, el sujeto humano recibió tanto la mezcla de polipéptidos de la invención como el segundo agente, pero posteriormente se interrumpe el segundo agente.

En una realización adicional, el método puede comprender además la ingestión de una dieta elemental, hiperalimentación, cirugía, proctocolectomía con resección abdominoperineal, colectomía de urgencia, colectomía subtotal con ileostomía o fistula mucosa rectosigmoidea.

La enfermedad inflamatoria del intestino puede ser enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

En una realización del método, la cantidad de la composición puede ser de desde 0,1 mg hasta 70 mg de la composición; de 0,5 mg a 60 mg de la composición; de 1 mg a 50 mg de la composición; de 5 mg a 35 mg de la composición; de 10 mg a 30 mg de la composición; de 45 mg a 70 mg de la composición; de 50 mg a 70 mg de la composición; de 15 mg a 25 mg de la composición; de 18 mg a 22 mg de la composición; de 0,1 mg a 2 mg de la composición; de 0,5 mg a 1,5 mg de la composición; de 2 mg a 7 mg de la composición; de 4 mg a 6 mg de la composición; de 12 mg a 18 mg de la composición; de 14 mg a 16 mg de la composición; de 17 mg a 23 mg de la composición; de 19 mg a 21 mg de la composición; de 27 mg a 33 mg de la composición; de 29 mg a 31 mg de la composición; de 47 mg a 53 mg de la composición; de 49 mg a 51 mg de la composición; 5 mg de la composición; 15 mg de la composición; 30 mg de la composición; y 50 mg de la composición.

En una realización del método, la composición puede administrarse cada de 1 a 60 días; cada de 1 a 30 días; cada de 5 a 60 días; cada de 7 a 60 días; cada de 5 a 30 días; cada de 20 a 40 días; cada de 50 a 60 días; cada de 5 a 9 días; cada de 6 a 8 días; cada 7 días; cada 14 días; 30 días; 60 días; o cada 2 meses.

En el método, la administración de la composición puede ser a través de una vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, oral, intranasal, bucal, vaginal, rectal, intraocular, intratecal, tópica o intradérmica. Preferiblemente, la composición se administra mediante inyección. Más preferiblemente, la composición se administra por vía oral.

En el presente documento se describe un método de tratamiento de un sujeto humano aquejado de esclerosis múltiple que comprende administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier composición dada a conocer para tratar así al sujeto humano aquejado de esclerosis múltiple.

En el presente documento se describe un método de alivio de un síntoma de esclerosis múltiple en un sujeto humano aquejado de esclerosis múltiple que comprende administrar al sujeto humano una cantidad de cualquier composición dada a conocer en una cantidad eficaz para aliviar el síntoma de esclerosis múltiple.

En el presente documento se describe un método de reducción de la frecuencia de recaídas en un sujeto humano aquejado de esclerosis múltiple recurrente-remite que comprende administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier composición dada a conocer para reducir así la frecuencia de recaídas en el sujeto humano.

En el presente documento se describe un método de reducción de la incapacidad basándose en la escala EDSS de un sujeto humano aquejado de esclerosis múltiple que comprende administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier composición dada a conocer para reducir así la incapacidad basándose en la escala EDSS en el sujeto humano.

En el presente documento se describe un método de reducción de lesiones mediante obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) en un sujeto humano aquejado de esclerosis múltiple que comprende administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier composición dada a conocer para reducir así las lesiones detectadas mediante IRM en el ser humano aquejado de esclerosis múltiple.

Cuando la enfermedad es esclerosis múltiple, el método puede comprender además la administración de un segundo agente, en el que el segundo agente es acetato de glatirámico, un analgésico, un esteroide, un relajante muscular, prednisona, dexametasona, un inmunosupresor, azatioprina, ciclofosfamida, un interferón, natalizumab, riluzol, alfacalcidol, calcitriol, rasagilina, minociclina, mitoxantrona, simvastatina, o una combinación de los mismos.

5 Preferiblemente, el segundo agente es acetato de glatirámico. En una realización, la cantidad de la composición y la dosis del segundo agente tomados juntos son eficaces para tratar al sujeto; cada una de la cantidad de la composición tomada sola y la dosis del segundo agente tomado solo es eficaz para tratar al sujeto; o bien la cantidad eficaz de la composición tomada sola o bien la dosis del segundo agente tomado solo no es eficaz para tratar al sujeto. En una realización adicional, el sujeto no ha recibido nunca anteriormente el segundo agente para

10 terapia. En otra realización, el sujeto ha recibido el segundo agente para terapia, pero ya no está recibiendo el segundo agente para terapia.

En cualquier realización del método, puede comprender además plasmaféresis o irradiación linfode total.

En cualquier realización del método, la composición puede administrarse cada de 1 a 60 días; de 1 a 30 días; cada de 5 a 60 días; cada de 7 a 60 días; cada de 5 a 30 días; cada de 20 a 40 días; cada de 50 a 60 días; cada de 5 a 9

15 días; cada de 6 a 8 días; cada 7 días; cada 14 días; 30 días; 60 días; o cada 2 meses.

En el método, la cantidad de la composición puede ser de 0,1 mg a 100 mg de la composición; de 1 mg a 80 mg de la composición; de 1 mg a 50 mg de la composición; de 5 mg a 25 mg de la composición; de 25 mg a 75 mg de la composición; de 2 mg a 8 mg de la composición; de 4 mg a 6 mg de la composición; de 12 mg a 18 mg de la composición; de 14 mg a 16 mg de la composición; de 27 mg a 33 mg de la composición; de 29 mg a 31 mg de la

20 composición; de 47 mg a 53 mg de la composición; de 49 mg a 51 mg de la composición; 5 mg de la composición; 15 mg de la composición; 30 mg de la composición; o 50 mg de la composición.

En cualquier realización del método, la administración puede ser a través de una vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, oral, intranasal, bucal, vaginal, rectal, intraocular, intratecal, tópica o intradérmica. Preferiblemente, la administración de la composición es mediante inyección o por vía oral.

25 La invención también proporciona cualquiera de las composiciones dadas a conocer para su uso como medicamento.

La invención proporciona además un producto que contiene la composición de cualquiera de las composiciones dadas a conocer y un segundo agente farmacéutico, como preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial como medicamento. La invención todavía proporciona adicionalmente un uso de cualquier

30 composición dada a conocer para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto humano.

La invención también proporciona un uso de cualquier composición dada a conocer y de un segundo agente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto humano.

En el presente documento se describe un procedimiento para preparar una composición que comprende:

35 preparar una mezcla de polipéptidos, en el que cada polipéptido en la mezcla (a) es un copolímero de los aminoácidos L-alanina, ácido L-glutámico, L-tirosina y L-lisina, y (b) puede estar presente en forma de un sal farmacéuticamente aceptable; y en el que en la mezcla del 13% al 38% de los polipéptidos tienen un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en un extremo de los mismos;

40 determinar el peso molecular promedio de los polipéptidos en la mezcla mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna de cromatografía de permeación en gel calibrada usando una pluralidad de copolímeros de secuencia y peso molecular definidos; e

incluir en la composición sólo aquellas mezclas de polipéptidos que se ha determinado que tienen un peso molecular promedio de entre 13.500 y 18.500 Dalton,

45 en el que cada uno de los copolímeros es un polipéptido que consiste en L-alanina, ácido L-glutámico, L-tirosina y L-lisina con un peso molecular definido de entre 12.000 y 30.000 Dalton.

En el presente documento se describe un procedimiento para determinar si los polipéptidos en una mezcla tienen un peso molecular promedio de entre 13.500 Dalton y 18.500 Dalton, en el que cada uno de esos polipéptidos (a) es un copolímero de los aminoácidos L-alanina, ácido L-glutámico, L-tirosina y L-lisina, y (b) puede estar presente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y en el que del 13% al 38% de los polipéptidos en la mezcla tienen un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en un extremo de los mismos, que comprende someter la mezcla de polipéptidos a cromatografía de permeación en gel para determinar si los polipéptidos en la mezcla tienen el peso molecular promedio, en el que la cromatografía de permeación en gel se lleva a cabo en una columna calibrada sometiendo una pluralidad de marcadores de peso molecular a cromatografía en la columna para establecer una relación entre el tiempo de retención en la columna y el peso molecular, siendo cada uno de tales

50 marcadores un copolímero de L-alanina, ácido L-glutámico, L-tirosina, L-lisina, que tiene una secuencia definida y

55

que tiene un peso molecular definido de entre 12.000 y 30.000 Dalton.

En el presente documento se describe un procedimiento para determinar el peso molecular promedio de una mezcla de polipéptidos, en el que cada uno de esos polipéptidos (a) es un copolímero de los aminoácidos L-alanina, ácido L-glutámico, L-tirosina y L-lisina, y (b) puede estar presente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y en el que en la mezcla del 13% al 38% de los polipéptidos tienen un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en un extremo de los mismos, procedimiento que comprende someter la mezcla de polipéptidos a cromatografía de permeación en gel para determinar el peso molecular promedio de los polipéptidos en la mezcla, en el que la cromatografía de permeación en gel se lleva a cabo en una columna calibrada sometiendo una pluralidad de marcadores de peso molecular a cromatografía en la columna para establecer una relación entre el tiempo de retención en la columna y el peso molecular, siendo cada uno de tales marcadores un copolímero de L-alanina, ácido L-glutámico, L-tirosina y L-lisina, que tiene una secuencia definida y que tiene un peso molecular definido de 12.000 a 30.000 Dalton.

En una realización del procedimiento dado a conocer, el peso molecular promedio de los polipéptidos en la mezcla puede ser de 16.000 Dalton.

En otra realización, la columna de cromatografía de permeación en gel puede comprender una agarosa reticulada, por ejemplo, una agarosa reticulada con un límite de exclusión de 2×10^6 Dalton, un intervalo de separación óptimo de 1000 a 3×10^5 Dalton, y un diámetro de perla de 20-40 μm .

En una realización adicional, cada uno de la pluralidad de marcadores de peso molecular puede tener un peso molecular de entre 16.000 y 27.000 Dalton.

En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer del procedimiento, en cada marcador los aminoácidos pueden estar presentes en una cantidad de manera que la fracción molar de ácido L-glutámico es 0,129-0,153, de L-alanina es 0,392-0,462, de L-tirosina es 0,086-0,100 y de L-lisina es 0,300-0,374.

En cualquiera de las realizaciones dadas a conocer del procedimiento, la pluralidad de marcadores de peso molecular puede comprender cinco polipéptidos que tienen las siguientes secuencias:

AEKYKAKKAKEKAYKKKAKEAKKAKYKAKEAKAYKAEKKAKYAKAKEKAYAKAKEAKA
YAKAKAKAEKAKAKAKYAEKAKAAKYAEKAAKYAEKAKAAEAKYAAEAKEAAKAAEA
KYAAKAAEAAKYAAEKAAEKYAKAFAAAEAKEAA (SEQ ID NO: 1);

AKKKYKAKEKKAKKKAKEKKYKAKKAKYKEKAACYKAKKAKAKYKAKAEKAKAKAEKA
KAYAEKAKAKYAKEAKKYAEKAKKAHEYKAKEAAEKAKAYAKEAAKAEKAAKAAEKAAK
AYAKAEAAAKEAAAYAAKAEAKAAYAAEAAKAEYAAEAAKEAAAYAAAEYAAEAA (SEQ
ID NO: 2);

AKKKYKAKEKKAKKKAKEKKYKAKEKKAKKYKEKAACYKAKKAKKEAAKYKKAKAEK
AKYAKEKAEKAKAYAEKAKAKYAKEAKKYAEKAKKAHEYKAKEAAEKAKAYAKEAAKAE
AKAAKYAAEKAAEAAKAAAYAKAEAAKAAKEAAAYAAKAEAAKAAAYAAEAAKAEYAAEAA
KEAAAYAAAEYAAAEAA (SEQ ID NO: 3);

AKKKYKAKEKKAKAKKKAKEKKYKAKKEKKAKKYKEKAACYKAKKEKAKKEAAKYKK
AKKYKAEKAKYAKEKAKEKAKAYAEKAEKAAKYAAKEAKKYAEKAAEKKAHEYKAKEAA
EKYAAKAYAAKEAAKAYKEAKAAKYAKAAEKAAAKEAAKAAAYAAKAEAAKEAAKEAAY
AAKAEAAAKAAAYAAEAAKAEYAAEAAKEAAAYAAAEYAAAEAA (SEQ ID
NO: 4); o

AKKKYKAKEKKAKYKAKKEKKAKEKKAKKKYKAKKKAAEKKYAKEKKAKEKAAKKYKA
KKEKAKKEAAKYKKAKKYKAEKKAKYAAKEKAKEKAKAYAEKKAEKAAKYAAKEAKKY
AEKAAEKKAHEYKAKEAAEKYAAKKAHEYAAEKAAKAYKEAKAAKYAKAAEKAKAAKEA
AKAAAYAAKAEAAKEAAKEAAAYAAKAEAAAYAAKAAAYAAEAAKAEYAAAEAAK
EAAAYAAAEYAAAEAA (SEQ ID NO: 5),

en las que A representa L-alanina, K representa L-lisina, Y representa L-tirosina y E representa ácido L-glutámico.

Cualquier realización dada a conocer del procedimiento, puede comprender además combinar la composición con

un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, manitol.

Cualquier realización dada a conocer del procedimiento, puede comprender además esterilizar la composición.

Cualquier realización dada a conocer del procedimiento, puede comprender además liofilizar la composición.

En el presente documento se describe un polipéptido que consiste en aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia seleccionada las siguientes:

5

AEKYKAKKAKEKAYKKKAKEAKKAKYKAKEAKAYKAEKKAKYAKAKEKAYAKAK
EAKAYAKAKAKAEKAKAKAKYAEKAKAAKYAEKAAKYAEAKAKAAEAKYAAEAK
EAAKAAEAKYAAKAAEAAKYAAEKAAEKYAKAEAAAEAKEAA (SEQ ID NO:
1);

AKKKYKAKEKKAKKKAKEKKYKAKKAKYKEKAAKYKAKKAKAKYKAKAEKAKAK
AEKAKAYAEKAKAKYAKEAKKYAEKAKKAEYKAKEAAEKAKAYAKEAAKAEKAA
KAAEKAAKAYAKAEAAAKEAAAYAAKAEAKAAAYAAEAAKAEYAAEAAKEAAAYAA
EYAAEAA (SEQ ID NO: 2);

AKKKYKAKEKKAKKKAKEKKYKAKEKKAKKYKEKAAKYKAKKAKKEAAKYKKA
KAEKAKYAKEKAEKAKAYAEKAKAKYAKEAKKYAEKAKKAEYKAKEAAEKAKAY
AKEAAKAEAKAAKYAAEKAAEAAKAAAYAKAEAAKAAKEAAAYAAKAEAAKAAAYAA
EAAKAEYAAEAAKEAAAYAAEYAAAEAA (SEQ ID NO: 3);

AKKKYKAKEKKAKAKKKAKEKKYKAKKEKKAKKYKEKAAKYKAKKEKAKKEAA
KYKKAKKYKAEKAKYAKEKAKEKAKAYAEKAEKAAKYAAKEAKKYAEKAAEKKA
EYKAKEAAEKYAAKAYAAKEAAKAYKEAKAAKYAKAAEKAAAKEAAKAAAYAAKA
EAAKEAAKEAAAYAAKAEAAAKAAAYAAEAAKAEYAAEAAAKEAAAYAAAEYAA
AAEAA (SEQ ID NO: 4); o

10

AKKKYKAKEKKAKYKAKKEKKAKEKKAKKKYKAKKKAAEKKYAKEKKAKEKAAK
KYKAKKEKAKKEAAKYKKAKKYKAEKKAKYAAKEKAKEKAKAYAEKKAEKAAKY
AAKEAKKYAEKAAEKKAIEYKAKEAAEKYAAKKAIEYAAEKEAAKAYKEAKAAKYA
KAAEKAKAAKEAAKAAAYAAKAEAAKEAAKEAAAYAAAKAEAAAYAAKAAAYAA
EAAKAEYAAAEAAAKEAAAYAAAEYAAAEAA (SEQ ID NO: 5),

en las que A representa L-alanina, K representa L-lisina, Y representa L-tirosina y E representa ácido L-glutámico.

También se da a conocer un polipéptido que tiene la secuencia:

AEKYKAKKAKEKAYKKKAKEAKKAKYKAKEAKAYKAEKKAKYAKAKEKAYAKAKEAKA
YAKAKAKAEKAKAKAKYAEKAKAAKYAEKAAKYAEKAKAAEAKYAAEAKEAAKAAEA
KYAAKAEAAKYAAEKAAEKYAKAEAAAEAKEAA (SEQ ID NO: 1).

También se describe un polipéptido que tiene la secuencia:

15

AKKKYKAKEKKAKKKAKEKKYKAKKAKYKEKAAKYKAKKAKAKYKAKAEKAKAKAEKA
KAYAEKAKAKYAKEAKKYAEKAKKAEYKAKEAAEKAKAYAKEAAKAEKAAKAAEKAAK
AYAKAEAAAKEAAAYAAKAEAKAAAYAAEAAKAEYAAEAAKEAAAYAAAEYAAEAA (SEQ
ID NO: 2).

También se describe un polipéptido que tiene la secuencia:

AKKKYKAKEKKAKKKAKEKKYKAKEKKAKKYKEKAAKYKAKKAKKEAAKYKKAKAEK
AKYAKEKAEKAKAYAEKAKAKYAKEAKKYAEKAKKAEYKAKEAAEKAKAYAKEAAKAE
AKAAKYAAEKAAEAAKAAAYAKAEAAKAAKEAAAYAAKAEAAKAAAYAAEAAKAEYAAEAA
KEAAAYAAAEYAAAEAA (SEQ ID NO: 3).

También se describe un polipéptido que tiene la secuencia:

AKKKYKAKEKKAKAKKKAKEKKKYKAKKEKKAKKYKEKA AKYKAKKEKAKKEAAKYKK
AKKYKAEKAKYAKEKAKEKAKAYAEKAEKAAKYAAKEAKKYAEKAAEKKA EYKAKEAA
EKYAAKAYAAKEAAKAYKEAKAAKYAKAAEKAAAKEAAKAAAYAAKAEAAKEAAKEAAY
AAKAEAAAAKAAAYAAEAAAKAEYAAEAAAKEAAAYAAAEYAAAEAA (SEQ ID
NO: 4) .

También se describe un polipéptido que tiene la secuencia:

AKKKYKAKEKKAKYKAKKEKKAKEKKAKKKYKAKKKAAEKKYAKEKKAKEKAAKKYKA
KKEKAKKEAAKYKKAKKYKAEKKAKYAAKEKAKEKAKAYAEKKA EKAAKYAAKEAKKY
AEKAAEKKA EYKAKEAAEKYAAKKA EYAAEKEAAKAYKEAKAAKYAKAAEKAKAAKEA
AKAAYAAKAEAAKEAAKEAAYAAKAEAAAYAAAKAAAAYAAEAAAKAEYAAAEFAAK
EAAYAAAEYAAAAEAAA (SEQ ID NO: 5) .

También se describe ADN que codifica para cualquiera de las secuencias de polipéptido dadas a conocer.

- 5 También se describe ADN del polipéptido dado a conocer que tiene la secuencia:

ATGGCCGAGAAATACAAGGCTAAGAAAGCGAAGGAAAAAGCATACAAGAAAAAGGCCA
AAGAAGCAAAAAAGGCCAAATATAAGGCTAAGAAAGCGAAAGCGTATAAAGCAGAAAA
AAAGGCGAAATATGCAAAAGCAAAAGAAAAAGGCTTATGCTAAAGCCAAGGAGGCCAAA
GCATACGCGAAAGCCAAAGCAAAAGCCGAAAAGGCTAAAGCTAAAGCGAAATATGCTG
AGAAAGCTAAAGCCGCGAAGTATGCCGAAAAAGCGGCCAAATATGCGGAAGCCAAAGC
AAAGGCCGCTGAGGCCAAATATGCCGCGAAGCTAAAGAAGCTGCGAAAGCCGCGGAA
GCAAAATACGCGGCAAGGCAGAAGCGGCCAAATATGCCGCGGAGAAGGCCGCGGAA
AGTATGCGAAAGCTGAAGCCGCGGCCGAGGCGAAAGAGGCGGCGTAA (SEQ ID

NO: 6) .

También se describe ADN del polipéptido dado a conocer que tiene la secuencia:

ATGGCAAAGAAGAAATATAAGGCGAAAGAAAAAGAGGCTAAGAAGAAAGCAAAAGAGA
AGAAGTACAAAGCCAAGAAGGCGAAATACAAAGAAAAGGCGGCAAGTATAAGGCTAA
AAAGGCGAAAGCTAAATACAAAGCCAAAGCCGAGAAAGCGAAAGCTAAAGCAGAAAAA
GCGAAAGCTTATGCGGAAAAAGCGAAAGCAAAATATGCGAAAGAAGCCAAAAAGTATG
CGGAGAAAGCAAAAAAAGCTGAGTATAAAGCTAAAGAAGCCGAGAAAAAGCTAAAGC
TTATGCCAAAGAGGCTGCAAAAGCAGAAAAAGCTGCGAAAGCAGCGGAAAAAGCCGCT
AAGGCTTATGCGAAAGCGGAAGCCGAGCCAAAGAAGCTGCCTACGCCGCGAAAGCAG
AAGCTAAAGCGGCCTATGCCGCGAGGCGAGCCAAAGCGGAATACGCGGCTGAAGCGGC
AAAAGAGGCGGCTTACGCGAGCCGCGGAATACGCGGCCGAGGCGGCCTAA (SEQ ID
NO: 7) .

También se describe ADN del polipéptido dado a conocer que tiene la secuencia:

ATGGCAAAGAAGAAATATAAGGCGAAAGAAAAAGAGGCTAAGAAGAAAGCAAAAGAGA
AGAAGAAATACAAAGCCAAGGAAAAAGAAAGCCAAAAAGTACAAAGAAAAGGCGGCAAA
GTATAAGGCTAAAAAGGCGAAAAAGGAAGCGGCTAAATACAAAAAGGCCAAAGCCGAG
AAAGCGAAATATGCGAAGGAAAAAGCAGAAAAAGCGAAAGCTTATGCGGAAAAAGCGA
AAGCAAAATATGCGAAAGAAGCCAAAAAGTATGCGGAGAAAGCAAAAAAAGCTGAGTA
TAAAGCTAAAGAAGCCGAGAAAAAGCTAAAGCTTATGCCAAAGAGGCTGCAAAAGCA
GAAGCCAAAGCTGCGAAATATGCAGCGGAAAAAGCCGCTGAGGCTGCCAAAGCAGCCT
ATGCGAAAGCGGAAGCCGCAAAAGCAGCCAAAGAAGCTGCCTACGCCGCGAAAGCAGA
AGCTGCCAAAGCGGCCTATGCCGCGAGGCGAGCCAAAGCGGAATACGCGGCTGAAGCG
GCAAAAGAGGCGGCTTACGCGAGCCGCGGAATACGCGGCCGCGGAGGCGCGTAA
(SEQ ID NO: 8) .

También se describe ADN del polipéptido dado a conocer que tiene la secuencia:

ATGGCAAAGAAGAAATATAAGGCGAAAGAAAAGAAGGCTAAGGCTAAGAAGAAAGCAA
AAGAGAAGAAGAAATACAAAGCCAAGAAAGAAAAGAAAGCCAAAAAGTACAAAGAAAA
GGCGGCAAAGTATAAGGCTAAAAAGGAGAAAGCGAAAAAGGAAGCGGCTAAATACAAA
AAGGCCAAAAAGTACAAAGCCGAGAAAGCGAAATATGCGAAGGAAAAAGCAAAAGAAA
AAGCGAAAGCTTATGCGGAAAAAGCGGAGAAAGCTGCAAAATATGCGGCCAAAGAAGC
CAAAAAGTATGCGGAGAAAGCAGCTGAGAAAAAAGCTGAGTATAAAGCTAAAGAAGCC
GCAGAAAAATACGCGGCTAAAGCTTATGCCGCTAAAGAGGCTGCAAAAGCATATAAGG
AAGCCAAAGCTGCGAAATATGCGAAAGCTGCGGAAAAAGCCGCTGCGAAAGAGGCTGC
CAAAGCAGCCTATGCGGCCAAAGCGGAAGCCGCAAAAGAGGCAGCCAAAGAAGCTGCC
TACGCCGCGGCAAAAGCAGAAGCTGCCGCTGCGAAAGCGGCTGCCTATGCCGCAGAGG
CAGCCGCTAAAGCGGAATACGCGGCTGAAGCGGCAGCGAAAGAGGCGGCTTACGCAGC
CGCGGAATACGCGGCCGCGGAGGCCGCGTAA (SEQ ID NO:9) .

También se describe ADN del polipéptido dado a conocer que tiene la secuencia:

ATGGCGAAAAAAAAGTACAAAGCTAAGGAGAAAAAGGCGAAATATAAGGCAAAGAAGG
AGAAAAAGGCGAAAGAAAAGAAGGCTAAGAAGAAATATAAAGCGAAGAAGAAAGCCGC
TGAGAAGAAATACGCCAAAGAGAAAAAGGCGAAAGAAAAGGCGGCAAAGAAATATAAG
GCTAAAAAGGAGAAAGCGAAAAAGGAAGCGGCTAAATACAAAAAGGCCAAAAAGTACA
AAGCCGAGAAAAAGGCGAAATATGCGGCCAAGGAAAAAGCAAAAGAAAAAGCGAAAGC
TTATGCGGAAAAAAAAGGCGGAGAAAGCTGCAAAATATGCGGCCAAAGAAGCCAAAAAG
TATGCGGAGAAAGCAGCTGAGAAAAAAGCTGAGTATAAAGCTAAAGAAGCCGCAGAAA
AATACGCGGCTAAAAAGGCCGAGTATGCCGCTGAGAAAGAGGCTGCAAAAGCATATAA
GGAAGCCAAAGCTGCGAAATATGCGAAAGCTGCGGAAAAAGCCAAAGCTGCGAAAGAG
GCTGCCAAAGCAGCCTATGCGGCCAAAGCGGAAGCCGCAAAAGAGGCAGCCAAAGAAG
CTGCCTACGCCGCGGCAAAAGCAGAAGCTGCCGCTTATGCAGCGGCCAAAGCGGCGGC
TGCCTATGCCGCAGAGGCAGCCGCTAAAGCGGAATACGCGGCTGCAGAAGCGGCAGCG
AAAGAGGCGGCTTACGCAGCCGCGGAATACGCGGCCGCGGCCGAGGCGGCTGCATAA
(SEQ ID NO: 10) .

- 5 También se describe un procedimiento para obtener el polipéptido de cualquiera del ADN dado a conocer de las secuencias de polipéptido dadas a conocer, que comprende expresar en condiciones adecuadas el polipéptido a partir del ADN que codifica para el polipéptido en una célula adecuada y aislar el polipéptido así expresado. En una realización, el ADN consiste en nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia seleccionada de las siguientes:

ATGGCCGAGAAATACAAGGCTAAGAAAGCGAAGGAAAAAGCATACAAGAAAAAG
GCCAAAGAAGCAAAAAAGGCAAAATATAAGGCTAAAGAAGCGAAAGCGTATAAA
GCAGAAAAAAAGGCGAAATATGCAAAAGCAAAAGAAAAGGCTTATGCTAAAGCC
AAGGAGGCAAAAGCATACGCGAAAGCCAAAGCAAAAGCCGAAAAGGCTAAAGCT
AAAGCGAAATATGCTGAGAAAGCTAAAGCCGCGAAGTATGCCGAAAAAGCGGCC
AAATATGCGGAAGCCAAAGCAAAAGGCCGCTGAGGCAAAATATGCCGCAGAAGCT
AAAGAAGCTGCGAAAGCCGCGGAAGCAAAATACGCGGCAAAAGGCAGAAGCGGCC
AAATATGCCGCGGAGAAGGCCGCGGAAAAGTATGCGAAAGCTGAAGCCGCGGCC
GAGGCGAAAGAGGCGGCGTAA (SEQ ID NO: 6) ;

ATGGCAAAGAAGAAATATAAGGCGAAAGAAAAGAAGGCTAAGAAGAAAGCAAAA
 GAGAAGAAGTACAAAGCCAAGAAGGCGAAATACAAAGAAAAGGCGGCAAAGTAT
 AAGGCTAAAAAGGCGAAAGCTAAATACAAAGCCAAAGCCGAGAAAGCGAAAGCT
 AAAGCAGAAAAAGCGAAAGCTTATGCGGAAAAAGCGAAAGCAAAATATGCGAAA
 GAAGCCAAAAAGTATGCGGAGAAAGCAAAAAAAGCTGAGTATAAAGCTAAAGAA
 GCCGCAGAAAAAGCTAAAGCTTATGCCAAAGAGGCTGCAAAAGCAGAAAAAGCT
 GCGAAAGCAGCGGAAAAAGCCGCTAAGGCTTATGCGAAAGCGGAAGCCGCAGCC
 AAAGAAGCTGCCTACGCCGCGAAAGCAGAAGCTAAAGCGGCCTATGCCGCAGAG
 GCAGCCAAAGCGGAATACGCGGCTGAAGCGGCAAAAGAGGCGGCTTACGCAGCC
 GCGGAATACGCGGCCGAGGCGGCCTAA (SEQ ID NO: 7);

ATGGCAAAGAAGAAATATAAGGCGAAAGAAAAGAAGGCTAAGAAGAAAGCAAAA
 GAGAAGAAGAAATACAAAGCCAAGGAAAAGAAAGCCAAAAAGTACAAAGAAAAG
 GCGGCAAAGTATAAGGCTAAAAAGGCGAAAAAGGAAGCGGCTAAATACAAAAAG
 GCCAAAGCCGAGAAAGCGAAATATGCGAAGGAAAAAGCAGAAAAAGCGAAAGCT
 TATGCGGAAAAAGCGAAAGCAAAATATGCGAAAGAAGCCAAAAAGTATGCGGAG
 AAAGCAAAAAAAGCTGAGTATAAAGCTAAAGAAGCCGCAGAAAAAGCTAAAGCT
 TATGCCAAAGAGGCTGCAAAAGCAGAAGCCAAAGCTGCGAAATATGCAGCGGAA
 AAAGCCGCTGAGGCTGCCAAAGCAGCCTATGCGAAAGCGGAAGCCGCAAAAGCA
 GCCAAAGAAGCTGCCTACGCCGCGAAAGCAGAAGCTGCCAAAGCGGCCTATGCC
 GCAGAGGCAGCCAAAGCGGAATACGCGGCTGAAGCGGCAAAAGAGGCGGCTTAC
 GCAGCCGCGGAATACGCGGCCGCGGAGGCCGCGTAA (SEQ ID NO: 8);

ATGGCAAAGAAGAAATATAAGGCGAAAGAAAAGAAGGCTAAGGCTAAGAAGAAA
 GCAAAAGAGAAGAAGAAATACAAAGCCAAGAAAAGAAAAGCAAAAAGTAC
 AAAGAAAAGGCGGCAAAGTATAAGGCTAAAAAGGAGAAAGCGAAAAAGGAAGCG
 GCTAAATACAAAAAGGCCAAAAAGTACAAAGCCGAGAAAGCGAAATATGCGAAG
 GAAAAAGCAAAAGAAAAAGCGAAAGCTTATGCGGAAAAAGCGGAGAAAGCTGCA
 AAATATGCGGCCAAAGAAGCCAAAAAGTATGCGGAGAAAGCAGCTGAGAAAAAA
 GCTGAGTATAAAGCTAAAGAAGCCGCAGAAAAATACGCGGCTAAAGCTTATGCC
 GCTAAAGAGGCTGCAAAAGCATATAAGGAAGCCAAAGCTGCGAAATATGCGAAA
 GCTGCGGAAAAAGCCGCTGCGAAAGAGGCTGCCAAAGCAGCCTATGCGGCCAAA
 GCGGAAGCCGCAAAAGAGGCAGCCAAAGAAGCTGCCTACGCCGCGGCAAAAGCA
 GAAGCTGCCGCTGCGAAAGCGGCTGCCTATGCCGCAGAGGCAGCCGCTAAAGCG
 GAATACGCGGCTGAAGCGGCAGCGAAAGAGGCGGCTTACGCAGCCGCGGAATAC
 GCGGCCGCGGAGGCCGCGTAA (SEQ ID NO: 9); o

ATGGCGAAAAAAGTACAAAGCTAAGGAGAAAAAGGCGAAATATAAGGCAAAG
AAGGAGAAAAAGGCGAAAGAAAAAGAGGCTAAGAAGAAATATAAGCGAAGAAG
AAAGCCGCTGAGAAGAAATACGCCAAAGAGAAAAAGGCGAAAGAAAAGGCGGCA
AAGAAATATAAGGCTAAAAAGGAGAAAGCGAAAAAGGAAGCGGCTAAATACAAA
AAGGCCAAAAAGTACAAAGCCGAGAAAAAGGCGAAATATGCGGCCAAGGAAAAA
GCAAAAGAAAAAGCGAAAGCTTATGCGGAAAAAAGGCGGAGAAAGCTGCAAAA
TATGCGGCCAAAGAAGCCAAAAAGTATGCGGAGAAAGCAGCTGAGAAAAAAGCT
GAGTATAAAGCTAAAGAAGCCGCAGAAAAATACGCGGCTAAAAAGGCCGAGTAT
GCCGCTGAGAAAGAGGCTGCAAAAGCATATAAGGAAGCCAAAGCTGCGAAATAT
GCGAAAGCTGCGGAAAAAGCCAAAGCTGCGAAAGAGGCTGCCAAAGCAGCCTAT
GCGGCCAAAGCGGAAGCCGCAAAAGAGGCAGCCAAAGAAGCTGCCTACGCCGCG
GCAAAAGCAGAAGCTGCCGCTTATGCAGCGGCCAAAGCGGCGGCTGCCTATGCC
GCAGAGGCAGCCGCTAAAGCGGAATACGCGGCTGCAGAAGCGGCAGCGAAAGAG
GCGGCTTACGCAGCCGCGGAATACGCGGCCGCGGCCGAGGCGGCTGCATAA
(SEQ ID NO: 10) .

Usos terapéuticos

Basándose en los datos reunidos, se contempla la mezcla de polipéptidos de la invención para su uso en el tratamiento de al menos los mismos estados que se ha dado a conocer que trata el acetato de glatirámico. A continuación se comentan enfermedades y clases de enfermedades específicas.

Un trastorno o enfermedad autoinmunitaria es uno en el que el sistema inmunitario produce autoanticuerpos frente a un antígeno endógeno con lesión consiguiente para los tejidos (Merck Manual of Diagnosis and Therapy (1999), Merck Research Laboratories, (Whitehouse Station, NJ), 1061). Estas enfermedades pueden ser o bien una enfermedad mediada por células (por ejemplo células T) o bien trastornos mediados por anticuerpos (por ejemplo células B) (publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020055466 A1, publicada el 9 de mayo de 2002 (Aharoni, *et al.*)). Se contemplan las enfermedades autoinmunitarias para su tratamiento con la composición que comprende la mezcla de polipéptidos de la invención.

Enfermedades autoinmunitarias específicas contempladas para su tratamiento con la composición que comprende la mezcla de polipéptidos de la invención son poliartritis, artritis juvenil, síndrome de Felty, anemia hemolítica autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, uveorretinitis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa tal como en enfermedad inflamatoria del intestino, púrpura trombocitopénica inmunitaria crónica, enfermedad de sensibilidad al contacto, diabetes mellitus, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto (tiroiditis), mixedema idiopático, miastenia grave, psoriasis, pénfigo vulgar, artritis reumatoide, uveítis, nefritis por lupus, lupus del SNC o lupus eritematoso sistémico. Se ha dado a conocer el GA para su uso en el tratamiento de estas enfermedades, por ejemplo en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020055466 A1, publicada el 9 de mayo de 2002 (Aharoni, *et al.*); patente estadounidense n.º 6.514.938 B1, expedida el 4 de febrero de 2003 a Gad, *et al.*; publicación internacional PCT n.º WO 01/60392, publicada el 23 de agosto de 2001 (Gilbert, *et al.*); publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0006022, publicada el 8 de enero de 2004 (Strominger, *et al.*).

Las enfermedades inflamatorias no autoinmunitarias son enfermedades que afectan al sistema nervioso central, pero no incluyen un componente autoinmunitario y están asociadas con una respuesta inflamatoria en el sujeto aquejado de la enfermedad. Se contemplan las enfermedades inflamatorias no autoinmunitarias para su tratamiento con la composición que comprende la mezcla de polipéptidos de la invención. Enfermedades inflamatorias no autoinmunitarias específicas contempladas para su tratamiento con las mezclas de polipéptidos de la invención son enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, encefalopatía por VIH, tumor cerebral, glaucoma, neuropatía, demencia, infección del sistema nervioso central, infección bacteriana del sistema nervioso central, meningitis, accidente cerebrovascular y traumatismo craneoencefálico. Se ha dado a conocer el GA para su uso en el tratamiento de estas enfermedades, por ejemplo en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020077278 A1, publicada el 20 de junio de 2002 (Young, *et al.*).

También se contempla que la composición de la invención es útil para promover la regeneración nerviosa o para prevenir o inhibir la degeneración secundaria que de otro modo sigue a la lesión primaria del sistema nervioso (SN), por ejemplo, lesiones craneoencefálicas cerradas y traumatismo cerrado, tal como el producido por la participación en deportes peligrosos, traumatismo penetrante, tal como heridas de bala, accidente cerebrovascular hemorrágico, accidente cerebrovascular isquémico, glaucoma, isquemia cerebral o daños producidos por cirugía tales como

escisión de tumor.

Además, la composición de la mezcla puede usarse para mejorar los efectos de la enfermedad que da como resultado un proceso degenerativo, por ejemplo, degeneración que se produce o bien en la materia gris o bien en la materia blanca (o en ambas) como resultado de diversas enfermedades o trastornos (tales como enfermedades neurodegenerativas), incluyendo, sin limitación: neuropatía diabética, demencias seniles, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, uveítis, parálisis del nervio facial (de Bell), glaucoma, corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), estado epiléptico, neuropatía óptica no arterítica, hernia de disco intervertebral, deficiencia de vitaminas, enfermedades producidas por priones tales como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome del túnel carpiano, neuropatías periféricas asociadas con diversas enfermedades, incluyendo pero sin limitarse a, uremia, porfiria, hipoglucemia, síndrome de Sjorgren Larsson, neuropatía sensorial aguda, enfermedad pulmonar obstructiva, neuropatía atáxica crónica, neuropatía oftálmica, amiloidosis primaria, enfermedades pulmonares obstructivas, acromegalia, síndromes de malabsorción, policitemia vera, gammopatías de IgA y IgG, complicaciones de diversos fármacos (por ejemplo, metronidazol) y toxinas (por ejemplo, alcohol u organofosfatos), enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, ataxia telangectasia, ataxia de Friedreich, polineuropatías amiloides, adrenomieloneuropatía, neuropatía axonal gigante, enfermedad de Refsum, enfermedad de Fabry, lipoproteinemia, epilepsia, hiperalgesia, psicosis, convulsiones, presión intraocular anómalamente elevada, estrés oxidativo, tolerancia y dependencia de opiáceos. La esclerosis múltiple no se considera una enfermedad neurodegenerativa en esta divulgación, sino más bien una enfermedad desmielinizante. Además, se contempla que las mezclas de esta invención son útiles para su aspecto protector frente al glutamato, es decir, para lesión o enfermedad producida o agravada por toxicidad por glutamato, por ejemplo, tratamientos posoperatorios en general y extirpación quirúrgica de tumores del sistema nervioso central (SNC). Se ha dado a conocer el GA para su uso en el tratamiento de estas enfermedades, por ejemplo en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20020037848 A1, publicada el 28 de marzo de 2002 (Eisenbach-Schwartz) y en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20030004099 A1, publicada el 2 de enero de 2003 (Eisenbach-Schwartz).

Determinadas enfermedades mediadas por el sistema inmunitario contempladas para su tratamiento con una composición que comprende la mezcla de polipéptidos de la invención se caracterizan por hipersensibilidad inmunitaria indeseable a uno o más antígenos e incluyen enfermedad de huésped contra injerto (HVGD) y enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), que se ejemplifican, respectivamente, mediante rechazo de injerto por el sistema inmunitario del huésped y mediante el ataque al huésped por las células del donante. Estas enfermedades constituyen una barrera significativa a sistemas de trasplante tales como trasplantes de órganos y reconstituciones de médula ósea. Otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario que se contemplan para su tratamiento por la mezcla de polipéptidos de la invención incluyen hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) que está asociada con antígenos de contacto tales como hiedra venenosa y roble venenoso y diversos productos químicos, así como tuberculosis, lepra, leishmaniasis, infecciones fúngicas profundas, etc. Se ha dado a conocer el GA para su uso en el tratamiento de estas enfermedades, por ejemplo en la patente estadounidense n.º 6.514.938 B1, expedida el 4 de febrero de 2003 a Gad, *et al.*; y en la publicación internacional PCT n.º WO 01/60392, publicada el 23 de agosto de 2001 (Gilbert, *et al.*); publicación internacional PCT n.º WO 00/27417, publicada el 19 de mayo de 2000 (Aharoni, *et al.*).

También se contemplan las mezclas de polipéptidos de la invención como tratamiento para enfermedades asociadas con desmielinización de axones del sistema nervioso central tales como esclerosis múltiple, encefalomiелitis diseminada aguda, miелitis transversa, enfermedades genéticas desmielinizantes, lesión de la médula espinal, desmielinización inducida por virus, leucoencefalopatía multifocal progresiva, mielopatía asociada con virus linfotrófico de células T humanas (HTLVI) y trastornos metabólicos nutricionales tales como deficiencia de vitamina B12 y mielínolisis central pontina. Se ha dado a conocer el GA para su uso en el tratamiento de estas enfermedades, por ejemplo en la publicación internacional PCT n.º WO 01/97846, publicada el 27 de diciembre de 2001 (Moses, *et al.*).

Métodos de administración

Los métodos de administración incluyen todos los métodos convencionales, por ejemplo por vías parenteral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, mucosa, oral, intranasal, bucal, vaginal, rectal, intraocular, intratecal, tópica, transdérmica e intradérmica. La administración puede ser sistémica o local.

Para la administración oral, pueden usarse excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral de la mezcla de polipéptidos incluyen emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Además del/de los principio(s) activo(s), las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofúrilico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

Para la administración intraocular, la mezcla de polipéptidos puede formularse en composiciones farmacéuticas con portadores farmacéuticamente aceptables, tales como agua o solución salina y pueden formularse en colirios.

Para la administración oral, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o puede presentarse como un producto terminado para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Las preparaciones para administración oral pueden formularse de manera adecuada para producir la liberación controlada de la mezcla de polipéptidos. Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional. Las composiciones pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

La mezcla de polipéptidos también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Para la administración mediante inhalación, la mezcla de polipéptidos según la presente invención se administra de manera conveniente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden la mezcla de polipéptidos de la invención pueden administrarse opcionalmente con un adyuvante de la manera habitual para inmunización. Los ejemplos no limitativos de tales adyuvantes incluyen alumbre y adyuvante incompleto de Freund. Otras maneras de mejorar la inmunogenicidad del péptido o polipéptido administrado incluyen la administración en forma de una agregación o un complejo con albúmina u otros portadores, todos ellos tal como conocen bien los expertos habituales en la técnica de vacunas. Pueden usarse también emulsiones lipídicas metabolizables, tales como Intralipid o Lipofundin como vehículos para terapia Cop 1 de la manera dada a conocer en la publicación internacional PCT n.º WO 97/02016, publicada el 23 de enero de 1997 (Cohen *et al*), cuyo contenido completo se incorpora por el presente en el presente documento como referencia.

Cuando la mezcla de polipéptidos de la invención se administra por vía oral, puede mezclarse con otras formas alimenticias y consumirse en forma sólida, semisólida, de suspensión o emulsión; y pueden mezclarse con portadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo agua, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, potenciadores del sabor y similares. En una realización, la composición oral se recubre entéricamente. El uso de recubrimientos entéricos se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, Lehman enseña recubrimientos entéricos tales como Eudragit S y Eudragit L. (Lehman, K., "Acrylic Coatings in Controlled Release Tablet Manufacturer", Manufacturing Chemist and Aerosol News, pág. 39 (1973)) The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª ed., también enseña aplicaciones de Eudragit S y Eudragit L. Un Eudragit que puede usarse en la presente invención es L30D55.

La mezcla de polipéptidos de la invención también puede administrarse por vía nasal en determinadas de las formas mencionadas anteriormente mediante inhalación o gotas nasales. Además, la inhalación oral puede emplearse para administrar la mezcla de polipéptidos de la invención a los revestimientos mucosos de la tráquea y los conductos bronquiales.

La mezcla de polipéptidos también puede administrarse en forma de sistemas de administración en liposomas, tales como pequeñas vesículas unilamelares, grandes vesículas unilamelares y vesículas multilamelares. Los liposomas

pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como fosfatidilcolinas, o lípidos, tales como colesterol y estearilamina. Los compuestos pueden administrarse como componentes de emulsiones dirigidas a tejido.

Los ejemplos de liposomas que pueden usarse en esta invención incluyen los siguientes: (1) CellFectin, 1:1,5 (M/M) formulación en liposomas del lípido catiónico N,N,N,N'-tetrametil-N,N,N,N'-tetrapalmitil-espermina y dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE) (GIBCO BRL); (2) Cytofectin GSV, 2:1 (M/M) formulación en liposomas de un lípido catiónico y DOPE (Glen Research); (3) DOTAP (metilfulsato de N-[1-(2,3-dioleiloxi)-N,N,N-trimetil-amonio] (Boehringer Mannheim); y (4) Lipofectamine, 3:1. (M/M) formulación en liposomas del lípido policationico DOSPA y el lípido neutro DOPE (GIBCO BRL).

También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la invención.

La mezcla de polipéptidos dada a conocer en esta solicitud, que tienen una carga positiva neta, puede unirse electrostáticamente a nanopartícula o nanopartículas cargadas mezclando una disolución acuosa de la mezcla de polipéptidos de la invención con una suspensión de las nanopartículas o micropartículas. Por tanto, la suspensión formada de la mezcla de polipéptidos unida a la nanopartícula o nanopartículas puede liofilizarse para dar un polvo para el almacenamiento a largo plazo. El polvo liofilizado puede reconstituirse en tampón para volver a obtener la suspensión del fármaco. Las suspensiones del fármaco unido así obtenidas son particularmente adecuadas para administración oral. Si se realizan con partículas que tienen un diámetro promedio por debajo de 200 nm, la suspensión es adecuada para administración sublingual puesto que las nanopartículas pueden atravesar la membrana sublingual. Para la administración oral al tracto gastrointestinal, pueden usarse nanopartículas más grandes puesto que tienen el tamaño más fácilmente reconocido por las placas de Peyer y las células M. Para una administración oral de este tipo, puede administrarse una nanosuspensión, como polvo liofilizado o como suspensión reconstituida, al intestino delgado usando una cápsula con recubrimiento entérico. La estabilidad potenciada del péptido o la proteína cuando se une en una formulación de nanosuspensión permite que el fármaco de péptido se absorba durante más tiempo en el intestino antes de degradarse por enzimas en el tracto gastrointestinal. La producción de nanopartículas puede lograrse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de una nanopartícula que implica acetato de glatirámico se describe en la publicación internacional PCT n.º WO 2005/041933.

Terapias de combinación con la mezcla de polipéptidos

En diversas realizaciones, los métodos dados a conocer pueden englobar la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la mezcla de polipéptidos de la invención sola, o en combinación con otro agente terapéutico o profiláctico. Mediante administración en combinación, quiere decirse que la mezcla de polipéptidos de la invención puede administrarse o bien sustancialmente de manera simultánea con el segundo agente, o bien que el segundo agente puede administrarse de manera gradual con la mezcla de polipéptidos de la invención. Por tanto, en diversas realizaciones, dependiendo del régimen de tratamiento particular elegido por el médico, uno puede administrar la mezcla de polipéptidos de la invención al mismo tiempo que el segundo agente, o en otras realizaciones, la mezcla de polipéptidos de la invención y el segundo agente pueden administrarse con horas, días o posiblemente incluso semanas de diferencia. Alternativamente, la mezcla de polipéptidos de la invención y el segundo agente se administran juntos durante un periodo de tiempo, tras el cual, se interrumpe la administración del segundo agente mientras continúa la administración de la mezcla de polipéptidos de la invención. El régimen de tratamiento deseado puede determinarse por un experto en la técnica dependiendo de los datos clínicos del paciente que esté tratándose y del desenlace deseado.

Además, en diversas realizaciones dependiendo del régimen de tratamiento particular elegido por el médico, puede administrarse la mezcla de polipéptidos de la invención y el segundo agente, cuando se administran en una combinación tal como se describió anteriormente, en dosisaciones menores tal como determina un experto en la técnica. Cualquier agente terapéutico o profiláctico útil en el tratamiento de las enfermedades para las que puede usarse la mezcla de polipéptidos de la invención puede ser el segundo agente según esta invención.

La mezcla de polipéptidos de la invención puede usarse junto con el segundo agente desde el comienzo del tratamiento del paciente o la mezcla puede añadirse a un régimen de tratamiento una vez que el paciente ya está recibiendo el segundo agente durante algún tiempo. Asimismo, el segundo agente puede añadirse al régimen de tratamiento una vez que el paciente ha recibido la mezcla durante algún tiempo. Alternativamente, la mezcla puede usarse para reemplazar un agente cuando, por ejemplo, la respuesta del paciente al agente se deteriora o cuando el paciente experimenta efectos secundarios usando el otro agente.

Para el tratamiento de esclerosis múltiple o sus síntomas, el segundo agente puede ser acetato de glatirámico (COPAXONE®), natalizumab (TYSABRI®), esteroides, relajantes musculares, prednisona oral (DELTASONE®), metilprednisolona (DEPO-MEDROL®, SOLU-MEDROL®), prednisolona (DELTA-CORTEF®), dexametasona (DECADRON®, TOBRADEX®, AK-TROL®, DEXPAK, MEDROL®), hormona adrenocorticotropa (ACTH) (ACTHAR®), corticotropina, inmunosupresores, aciclovir, azatioprina (IMURAN®), ciclofosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®), mitoxantrona (NOVANTRONE®), ciclosporina (SANDIMMUNE®), metotrexato, cladribina (LEUSTATINE®), interferones (AVONEX®, BETASERON®, BETAIFERON®, REBIF®), laquinimod, ginkgo biloba,

natalizumab (ANTEGREN®), alemtuzumab (CAMPATH®-1H), 4-aminopiridina (FAMPRIDINE), 3,4-diaminopiridina, eliprodil, inmunoglobulina IV (GAMMAGARD®, GAMMAR®-IV, GAMMIMUNE® N, IVEEGAM®, PANGLOBULIN®, SANDOGLOBULIN®, VENOGLOBULIN®), ANERGIX®- MS, pregabalina o ziconotida.

5 Para el tratamiento de dolor y/o sensibilidad alterada (disestesia) relacionados con esclerosis múltiple, el segundo agente puede ser carbamazepina (TEGRETOL®, EPITOL®, ATRETOL, CARBATROL®), gabatentina (NEURONTIN®), topiramato (TOPAMAX®), zonisamida (ZONEGRAN®), fenitoína (DILANTIN®), desipramina (NORPRAMIN®), amitriptilina (ELAVIL®), imipramina (TOFRANIL®, IMAVATE, JANIMINE), doxepina (SINEQUAN®, ADAPIN, TRIADAPIN, ZONALON®), protriptilina (VIVACTIL®), pentozifilina (TRENTAL®), ibuprofeno (ADVIL®, MOTRIN®), aspirina, paracetamol o hidroxicina (ATARAX®).

10 Para el tratamiento de depresión, ansiedad y/o insomnio relacionados con esclerosis múltiple, el segundo agente puede ser fluoxetina (PROZAC®), sertralina (ZOLOFT®, LUSTRAL®), venlafaxina (EFFEXOR XR®), citalopram (CELEXA®), paroxetina (PAXIL®, SEROXAT), trazodona (DESYREL®, TRIALODINE), amitriptilina (ELAVIL®), nortriptilina (PAMELOR®, AVENTIL®), imipramina (TOFRANIL®, IMAVATE, JANIMINE), dotiepin (PROTHIADEN), lofepramina (GAMANIL), doxepina (SINEQUAN®, ADAPIN, TRIADAPIN, ZONALON®), protriptilina (VIVACTIL®), 15 tranilcipromina (PARNATE®), moclobemida (MANERIX, AURORIX), bupropión (WELLBUTRIN SR®, AMFEBUTAMONE), nefazodona (SERZONE®), mirtazapina (REMERNON®), zolpidem (AMBIEN®), alprazolam (XANAX®), temazepam (RESTORIL®), diazepam (VALIUM®), o buspirona (BUSPAR®).

20 Para el tratamiento de fatiga relacionada con esclerosis múltiple, el segundo agente puede ser amantadina (SYMMETREL®), pemolina (CILERT®), derivados de vitamina D tales como alfacalcidol y calcitrol o modafinilo (PROVIGIL®).

25 Para el tratamiento de problemas urinarios relacionados con esclerosis múltiple, el segundo agente puede ser oxibutinina (DIPTROPAN XL®), desmopresina (DDAVP®), vasopresina, tolterodina (DETROL®), carbamazepina (TEGRETOL®, EPITOL®, ATRETOL, CARBATROL®), imipramina (TOFRANIL®), betanecol (URECHOLINE®), fenoxibenzamina (DIBENCILINE®), terazosina (HYTRIN®), propantelina (PRO-BANTHINE), oxibutonina (DITROPAN®), hiosciamina (URISPAS®, CYSTOPAS), baclofeno (LIORESAL®), diazepam (VALIUM®), metenamina (HIPREX®, MANDELA MINE®), nitrofurantoína (MACRODANTIN®), fenazopiridina (PIRIDIUM®) o 30 ciprofloxacino (CIPRO®).

Para el tratamiento de afectación pseudobulbar relacionada con esclerosis múltiple, dextrometorfano (NEURODEX™).

30 Para el tratamiento de problemas intestinales relacionados con esclerosis múltiple, el segundo agente puede ser bisacodilo (DULCOLAX®, BISACOLAX), hidróxido de magnesio (leche de magnesio), glicerina (SANI-SUPP®), muciloide hidrófilo de psilio (METAMUCIL®), fosfato de sodio (FLEET ENEMA®), factor de necrosis antitumoral (TNF) (INFLIXIMAB, REMICADE®) o docusato (COLACE®, THEREVAC® PLUS).

35 Para el tratamiento de disfunción sexual relacionada con esclerosis múltiple, el segundo agente puede ser sildenafil (VIAGRA®), alprostadil (PROSTIN VR, MUSE) o papaverina.

Para el tratamiento de espasticidad, clonos y/o tics musculares relacionados con esclerosis múltiple, el segundo agente puede ser diazepam (VALIUM®), clonazepam (KLONOPIN®, RIVOTRIL), baclofeno (LIORESAL®), dantroleno sódico (DANTRIUM®), tizanidina (ZANAFLEX®, SIRDALUD), clonidina (CATAPRES®) o toxina botulínica (BOTOX®, NERUOBLOC®).

40 Para el tratamiento de temblores relacionados con esclerosis múltiple, el segundo agente puede ser clonazepam (KLONOPIN®, RIVOTRIL), gabapentina (NEURONTIN®), primidona (MYSOLINE®), toxina botulínica (BOTOX®, NEUROBLOC), actazolamida (DIAMOX®) y cabidopa-levodopa (SINEMET®) o isoniazida (LANIAZID, NYDRAZID®).

45 Para el tratamiento de vértigo, náuseas y/o mareos relacionados con esclerosis múltiple, el segundo agente puede ser meclizina (ANTIVERT®, BONAMINE), dienhidrinato (DRAMAMINE®), proclorperazina (COMPAZINE®), escopolamina (TRANSDERM®) o difenhidramina (BENADRIL®).

Para el tratamiento de esclerosis múltiple, la mezcla de polipéptidos de la invención puede administrarse con o tras terapia, tal como, plasmaféresis, reflexología o irradiación linfode total.

50 Para el tratamiento del glaucoma o sus síntomas, el segundo agente puede ser acetato de glatirámico (COPAXONE®), pilocarpina (PILOCAR®, ISOPTO® CARPINE, PILOPINE HS®), isoptocarpina-timolol hemihidratado (BETIMOL®), maleato de timolol (BLOCADREN®, COSOPT®, TIMOLIDE®, TIMOPTIC®, TIMOPTIC-XE®), betaxolol (BETOPTIC®), levobunolol (BETAGAN®), carteolol (OCUPRESS®), metipranolol (OPTIPRANOLOL®), epinefrina (EPIPEN®, EPIFRIN®, EPPY/N®), dipivefrina (PROPINE®), carbacol (ISOPTO® CARBACOL), apraclonidina (IOPIDINE®), brimonidina (ALPHAGAN®), dorzolamida (TRUSOPT®, COSOPT®), 55 latanoprost (ZALATAN®), travaprost (TRAVATAN®), brimatoprost (LUMIGAN®), brinzolamida (AZOPT®) inhibidores de colinesterasa potentes (por ejemplo yoduro de ecotiofato (FOSFOLINE IODIDE®), demecario, isobuturofato,

inhibidores de anhidrasa carbónica (por ejemplo diclorfenamida (DARANIDE®) o acetazolamida), manitol, glicerina oral y midríaticos (por ejemplo homatropina, ciclopentolato, fenilefrina), memantina o atropina.

Para el tratamiento de glaucoma, la mezcla de polipéptidos de la invención puede administrarse con o tras terapia, tal como, trabeculoplastia láser, cirugía filtrante, cirugía, iridectomía periférica, iridotomía láser, trabeculoplastia con láser de argón (ALT), trabeculoplastia con láser selectiva (SLT) o neodimio (ciclofotocoagulación con láser YAG).

Para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) o sus síntomas, el segundo agente puede ser acetato de glatirámico (COPAXONE®), anticolinérgicos, difenoxilato, loperamida, tintura de opio desodorizada, codeína, antibióticos, metronidazol (METROCREAM®, METROGEL®, METROGEL-VAGINAL®, METROLOTION®, METRO I.V.®, FLAGYL® I.V. RTU, FLAGYL® INJECTION, FLAGYL® ORAL, METRIC 21, PROTOSTAT, NORITATE® y HELIDAC®), sulfasalazina (AZULFIDINE EN-TABS y ASULFIDINE), terapia con corticosteroides (betametasona (CELESTONE®, SOLUSPAN®), budesonida (ENTOCORT® EC), prednisona (DELTASONE®), metilprednisolona (MEDROL®, MEPROLONE UNIPAK, DEPO-MEDROL®, DEOJECT, DEPOPRED, DURALONE, M-PREDNISOL, MEDRALONE, SOLU-MEDROL®, DEMEDALONE), hidrocortisona (ANUSOL-HC®, CIPRO® HC OTIC, HIDROCORTONE®, COLOCORT™, CORTANE-B®, CORTEF®, CORTIC®-ND, LACTICARE®-HC, PROTOCORT®, PROCTOCREAM® HC, VYTONE®, ZOTO®-HC, ANUCORT-HC, ANUMED HC, CORT-DOME® HIGH POTENCY, HEMORRHOIDAL HC, HEIRML-HC® UNISERTS, PROCTOCORT®), antimetabolitos, terapias inmunosupresoras (por ejemplo, azatioprina (IMURAN®), 6-mercaptopurina (PURINATOL®), ciclosporina (GENGRAF™, NEORAL®, SANDIMMUNE®), aféresis de linfocitos T, 4-aminoquinolinas, metotrexato (RHEUMATREX®, TREXALL®)), loperamida, ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) (mesalamina) (ASACOL®, PENTASA®, CLAVERSAL®, CANASA® SUPPOSITORY, ROWASA®), balsalazida (COLAZAL®), sulfasalazina (AZULFIDINE EN-TABS®), olsalazina (DIPENTUM®), azatioprina (AZASAN®, IMURAN®), ACTH 75, ACTH 120, ®), factor de necrosis antitumoral (TNF) (INFLIXIMAB, REMICADE®) o antibióticos (por ejemplo, ampicilina (PRINCIPEN), cefazolina).

Para el tratamiento de IBD, la mezcla de polipéptidos de la invención puede administrarse con o tras terapia, tal como, dieta elemental, hiperalimentación, cirugía, colectomía de urgencia, colectomía subtotal con ileostomía y fístula mucosa rectosigmoidea, o proctoclectomía con resección abdominoperineal.

Para el tratamiento de la enfermedad de Huntington o sus síntomas, el segundo agente puede ser acetato de glatirámico (COPAXONE®), fenotiazina (clorpromazina (THORAZINE®) de 100 a 900 mg/día), neurolépticos de butirofenona (haloperidol), geldamicina, ARN de interferencia, trehalosa, cistamina, rapamicina, glucocorticoides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (aspirina, paracetamol, ibuprofeno (ADVIL®, MIDOL®)), ácidos grasos omega-3 (ácido eicosapentanoico (EPA) (LAX-101), ácido docosahexanoico (DHA)), minociclina, ácido fólico, creatina, dicloroacetato, nicotinamida, riboflavina (BEVITAMEL® TABLETS, MEGA-B®, MASCOBAL® GEL, FOLGARD®, NIFREX®-150 FORTE CAPSULES, TRINSICON® CAPSULES), carnitina, ácido tauroursodesoxicólico, ginkgo biloba, coenzima Q10, vitamina A (MEGADOSE TABLETS, PALMITATE-A, VI-DAILIN® ADC), vitamina C (PROFLAVANOL® 90 TABLETS, ACES® ANTIOXIDANT SOFT GELS, PERIDIN-C® TABLETS, TRINSICON® TABLETS, VI-DAYZIN® ADC), vitamina E (MEGADOSE TABLETS, UNIQUE E®, ACES® ANTIOXIDANT SOFT GELS, E-GEMS® SOFT GELS, LACTINOL-E® CREME), selenio (ACES® ANTIOXIDANT SOFT GELS), ácido lipoico, arginina, mitramicina, remacemida, filizol, lamotrigina (LAMICTAL®), memantina, gabamentina, inhibidores de HDAC, ácido retinoico o reserpina.

Para el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o sus síntomas, el segundo agente puede ser riluzol (RILUTEK®), acetato de glatirámico (COPAXONE®), baclofeno, fenitoína (DILANTIN®), quinina o amitriptilina.

Para el tratamiento de ELA, la mezcla de polipéptidos de la invención puede administrarse con o tras terapia, tal como, gastrostomía y ventilación no invasiva (por ejemplo, BiPAP (presión de las vías respiratorias positiva de dos niveles), o una traqueotomía y un respirador).

2. Términos

La invención incluye sales de la mezcla de polipéptidos de la invención. Tal como se usa en el presente documento, el término “sales” se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de la molécula de péptido. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse mediante medios bien conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y similares, y las sales con bases orgánicas tales como las formadas por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico o ácido trifluoroacético. Tales sales se usan preferiblemente para modificar las propiedades farmacéuticas del péptido en lo que se refiere a la estabilidad, la solubilidad, etc.

El término “mezcla” tal como se usa en esta solicitud en la expresión “mezcla de polipéptidos de la invención” significa una mezcla de copolímeros de los aminoácidos que comprenden ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina, en la que algunos de los polipéptidos de la mezcla tienen grupos carboxilo C-terminales y otros tienen un grupo dietilamida en su lugar. El polipéptido en la mezcla puede incluir impurezas residuales como resultado del

procedimiento de fabricación. Puesto que ninguna reacción llega al 100% hasta la finalización y no todas las impurezas pueden eliminarse totalmente, pueden permanecer pequeñas cantidades y estar presentes en la mezcla. En general, dichas impurezas son de los siguientes tres tipos:

- 5 • Impurezas orgánicas, es decir polipéptidos que contienen residuos de aminoácido protegidos tales como residuos de 5-BZ-L-glutamilo y/o N6-TFA-L-lisilo, que se originan a partir de la eliminación incompleta de los grupos protectores durante el procedimiento de producción. Además, las moléculas de la mezcla de polipéptidos de la invención pueden contener residuos de L-tirosilo bromados, formados durante la producción debido a la presencia de bromo libre en el reactivo de HBr/ácido acético.
- 10 Las estructuras moleculares de las impurezas orgánicas identificadas están relacionadas con los monómeros participantes, es decir los materiales de partida. También pueden cuantificarse y denominarse tal como sigue:
 - Compuestos de trifluoroacetilo residuales (expresados como fluoruro)
 - Residuos de glutamilo bencilado residuales (expresados como bromuro de bencilo)
 - Residuos de tirosilo bromado residuales (expresados como bromotirosina)
- 15 • Impurezas orgánicas no identificadas (determinadas mediante RP-HPLC): son polipéptidos de pequeño tamaño molecular del mismo origen con estructuras similares. Estas sustancias tienen probablemente factores de respuesta similares y la concentración (%) de cada impureza puede calcularse como el % de área de pico en relación con el área de pico de la mezcla de polipéptidos de la invención.
- Disolventes residuales e impurezas inorgánicas cubiertas en la memoria descriptiva tal como el disolvente residual 1,4-dioxano, piperidina residual y metales pesados.
- 20 El término “peso molecular promedio” tal como se usa en esta solicitud significa el peso molecular de las especies de polipéptidos presentes en la mezcla en la proporción relativa más alta (es decir, el máximo de pico) cuando la mezcla se somete a separación por peso molecular en una columna de permeación en gel de HPLC. Este valor puede obtenerse de varias maneras, por ejemplo a partir del tiempo de retención en una columna calibrada; o a partir de una correlación entre la ubicación del pico y la ubicación de los marcadores de copolímero cromatografiados de secuencia y peso molecular definidos. Pueden emplearse otros métodos de determinación de un peso molecular promedio tal como mediante dispersión de la luz y corresponderán sustancialmente al valor obtenido a partir del máximo de pico.
- 25 El término “portador” se refiere a cualquier aglutinante, disgregante, deslizante, agente edulcorante, saborizante o cualquier otro vehículo con el que se administra la mezcla. Los portadores adecuados en la composición farmacéutica pueden comprender un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona (polividona o povidona), goma tragacanto, gelatina, almidón, lactosa o lactosa monohidratada; un agente disgregante, tal como ácido algínico, almidón de maíz y similares; un lubricante o tensioactivo, tal como estearato de magnesio o laurilsulfato de sodio; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; y/o un agente saborizante, tal como menta piperita, salicilato de metilo o saborizante de naranja.
- 30 El término “sustancialmente” tal como se usa en este documento significa considerable en cantidad o significativamente grande o que es en gran medida, pero no completamente, lo que se especifica.
- El término “sustancialmente libre” tal como se usa en este documento significa en gran medida, pero no completamente, no combinado químicamente o no asociado con, unido a, combinado con o mezclado con algo especificado.
- 40 El término “nanopartícula” tal como se usa en este documento se refiere a una partícula que tiene un diámetro promedio de 1-5000 nanómetros (nm).
- El término “marcadores de acetato de glatirámico” tal como se usa en este documento se refiere a los marcadores de acetato de glatirámico dados a conocer en la patente estadounidense n.º 6.800.287 B2, expedida el 5 de octubre de 2004 (Gad *et al.*).

45 Abreviaturas

BN	número de lote
DC	dicroísmo circular
CFA	adyuvante completo de Freund
UFC	unidades formadoras de colonias
50 DP	producto terminado

	DS	principio activo
	EAE	encefalomielitis autoinmunitaria experimental
	ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
	UE	unidades de endotoxinas
5	FTIR	espectro de absorción infrarroja con transformada de Fourier
	GA	acetato de glatirámero
	GP-HPLC	HPLC de permeación en gel
	HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
	IOP	presión intraocular
10	L-Ala	L-alanina
	L-Glu	ácido L-glutámico
	L-Lys	L-lisina
	L-Tyr	L-tirosina
	AcM	anticuerpos monoclonales
15	mHz	megahercio
	MMS	puntuación máxima media
	MSCH	homogenizado de médula espinal de ratón
	PM	peso molecular
	RMN	resonancia magnética nuclear
20	P	presión
	AcP	anticuerpos policlonales
	Ppm	partes por millón
	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	q.s.	cantidad suficiente
25	RGC	células ganglionares de la retina
	HR	humedad relativa
	RP-HPLC	HPLC de fase inversa
	RP-cromatografía	cromatografía de fase inversa
	RRT	tiempo de retención relativo
30	RS	patrón de referencia
	RT	tiempo de retención
	s.c.	subcutáneo
	DE	desviación estándar
	STD	patrón
35	TFA-	trifluoroacetil-
	TFE	trifluoroetanol
	UV	espectro de absorción ultravioleta

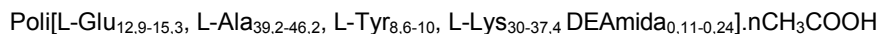
RP-HPLC

HPLC de fase inversa

DETALLES EXPERIMENTALES

PRINCIPIO ACTIVO

La mezcla de polipéptidos de la invención puede representarse mediante fórmulas alternativas tal como sigue:

5 1) FÓRMULA ESTRUCTURAL

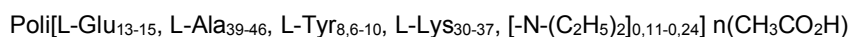
Los superíndices representan el intervalo de porcentaje molar de residuos de aminoácido y dietilamida que comprenden las diversas especies en la mezcla de polipéptidos de la invención donde la secuencia de los residuos de aminoácido varía entre estos componentes individuales.

10 n representa el número de moles de acetato por mol de la mezcla de polipéptidos de la invención (máx. 26).

2) LA FÓRMULA DE "RAZÓN MOLAR"

Los cálculos para las fórmulas 2-5 se basan en un intervalo de DEA de desde 700 ppm hasta 1500 ppm y AcOH al 10% (contenido observado promedio).

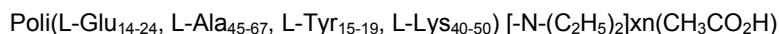
15 Los valores de superíndice son razones de cada mol de aminoácido y la suma de todos los moles (aminoácido y DEA) encontradas tras la hidrólisis total de la muestra.



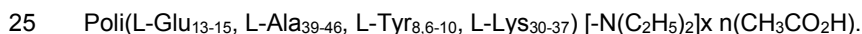
n es el número de contraiones de acetato para AcOH al 10% -n es 26, ó 26 residuos de acetato por molécula de polipéptido de la mezcla de polipéptidos de la invención.

3) LA FÓRMULA DE "COMPONENTE MOLAR"

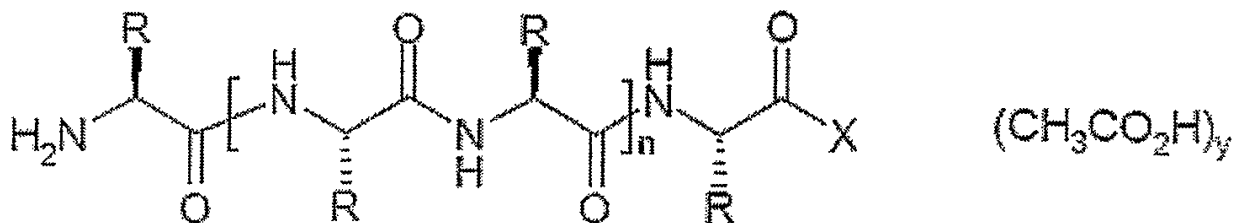
20 Los subíndices están presentes como razones entre los moles de cada componente encontrado y el número de moles de la mezcla de polipéptidos de la invención sometida a análisis.



donde x=0,13-0,38; es decir, el 13%-38% de las moléculas tienen una dietilamida C-terminal.

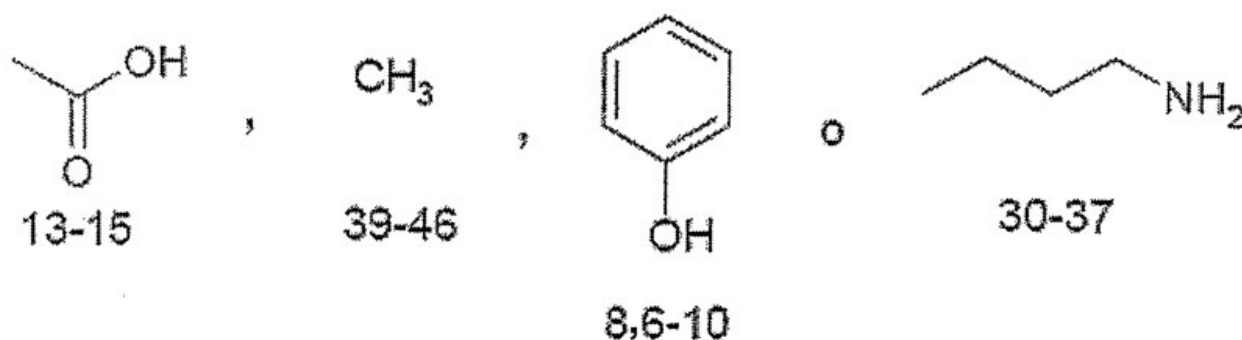
4) FÓRMULA HÍBRIDA

Los superíndices reflejan el intervalo de porcentaje molar de los residuos de aminoácido; X representa el porcentaje de moléculas con dietilamidas C-terminales (13-38); n es el número de contraiones de acetato por molécula (15-29). Peso molecular promedio: 16.000 Dalton (13.500-18.500).

5) LA FÓRMULA ESTRUCTURAL ALTERNATIVA

30

R = (basado en el porcentaje molar)



X=OH en el 68-81% de las moléculas y $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ en el 13-38% de las moléculas;

n = 111-144; e y = 15-29.

5 El peso molecular promedio de la mezcla de polipéptidos de la invención para todas las fórmulas puede ser de 16.000 Dalton, y en el intervalo de 13.500-18.500 Dalton.

Los polipéptidos con pesos moleculares por debajo de 5000 Dalton, y en una realización aquellos por debajo de 4.700 Dalton, pueden retirarse sustancialmente de un precursor de la mezcla de polipéptidos de la invención mediante ultrafiltración.

10 Aunque la mezcla de polipéptidos de la invención y GA, el principio activo de Copaxone®, se caracterizan por el mismo intervalo de fracción molar para cada residuo de aminoácido, difieren en otras características. Physician's Desk Reference (PDR), 56ª ed.: Med. Econ. Co., Montvale, EE.UU., 2002, págs. 3306-3310. El PM promedio de GA es de 4.700 a 11.000 Dalton, mientras que el PM promedio de la mezcla de polipéptidos de la invención es de 16.000 ± 2.500 Dalton. También hay diferencias en las propiedades químicas, la actividad biológica y la inmunogenicidad de la mezcla de polipéptidos de la invención en comparación con GA.

15 La mezcla de polipéptidos preferida de la invención es la sal de acetato de polipéptidos sintéticos preparados haciendo reaccionar químicamente cuatro derivados de aminoácido activados: ácido L-glutámico (L-Glu), L-alanina (L-Ala), L-tirosina (L-Tyr) y L-lisina (L-Lys) (dos de ellos protegidos, es decir, derivado de 5-BZ-glutamato y derivado de 6N-TFA-lisina) en una razón especificada en presencia de una cantidad catalítica del iniciador de dietilamina.

20 La mezcla de polipéptidos de la invención se obtiene y se almacena preferiblemente como un material liofilizado de blanco a ligeramente amarillento en condiciones normales.

Los siguientes análisis se llevan a cabo normalmente en la mezcla de polipéptidos: identificación, valoración (sobre una base libre de agua), contenido en acetato, pH, contenido en aminoácidos, contenido en DEA y distribución de peso molecular.

25 Aunque los polipéptidos de la mezcla de polipéptidos de la invención consisten en los mismos cuatro residuos de aminoácido que el acetato de glatirámico (GA), las características físicoquímicas y, en particular, las biológicas de los dos principios activos difieren.

30 En la mezcla de polipéptidos de la invención, el 13-38% de los polipéptidos tienen un grupo dietilamida en un extremo (en lugar de un grupo carboxilo), en determinadas realizaciones del 18-28%, mientras que en GA sólo aproximadamente el 6% son dietilamidas. La proporción aumentada de amidas C-terminales se logra mediante una modificación controlada introducida en el procedimiento de fabricación. Por tanto, los polipéptidos en la mezcla de la invención pueden tener ácidos carboxílicos C-terminales o dietilamidas C-terminales. Esto puede medirse sometiendo a ensayo la formación de un residuo de dietilamina tras degradar totalmente la mezcla de polipéptidos. La cantidad de residuos de dietilamina tras la degradación en la mezcla de polipéptidos de la invención puede ser de desde 700 ppm hasta 1500 ppm sobre una base libre de agua y acetato.

35 Además, las mediciones de dicroísmo circular (DC) mostraron una clara diferencia en la conformación de alfa-hélice de GA en comparación con la mezcla de polipéptidos de la invención.

40 GA y la composición de polipéptido que comprende la mezcla de la invención comparten reactividades cruzadas inmunológicas y por tanto se espera que el mecanismo de acción de la mezcla de polipéptidos de la invención sea similar a la de GA, aunque inesperadamente, la mezcla tiene una actividad inmunológica más alta. Estudios inmunológicos y biológicos comparativos realizados con la mezcla de polipéptidos de la invención y GA demostraron que la mezcla de polipéptidos de la invención induce una respuesta inmunitaria y actividad biológica más fuerte en un modelo de ratón para MS (EAE), y en un modelo de ratón para neurodegeneración de células ganglionares de la retina.

Adicionalmente, la mezcla de polipéptidos de la invención en realizaciones puede contener menos de 1000 ppm,

preferiblemente menos de 500 ppm, más preferiblemente menos de 100 ppm o lo más preferiblemente menos de 10 ppm de impurezas de iones metálicos. En realizaciones, la mezcla puede contener no más de 60 ppm, preferiblemente no más de 30 ppm, preferiblemente no más de 20 ppm y lo más preferiblemente no más de 10 ppm, o incluso puede estar sustancialmente libre de impurezas de metales pesados. En algunas realizaciones, la mezcla contiene no más del 0,10% de fluoruros, del 0,10% de polipéptidos con trifluoroacetilo residual en los polipéptidos, y no más del 0,10% de bromuro de bencilo, (es decir no más del 0,10% de residuos de glutamilo bencilados). En realizaciones adicionales, la mezcla contiene no más del 0,5%, del 0,2%, del 0,1% o del 0,05% de bromotirosina; no más de 1000 ppm de dioxano; y/o no más del 0,2% de piperidina.

Para el uso en investigación, el producto terminado se suministra en una jeringa precargada de un solo uso que contiene 1,0 ml de una disolución transparente de manitol y la mezcla de polipéptidos de la invención en diferentes concentraciones de dosis.

DIETILAMIDAS EN LA MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION

Durante la producción, se inicia la copolimerización de N-carboxianhídridos de los cuatro aminoácidos [L-alanina, L-ácido glutámico, L-tirosina y L-lisina] mediante la adición de dietilamina. Durante este procedimiento, la dietilamina se une covalentemente (punto en el que se denomina dietilamida) y permanece unida al extremo de las cadenas de polipéptido de los polipéptidos protegidos como resultado de la formación de un enlace amida donde de otro modo estaría presente un grupo carboxilo.

Como resultado de la escisión acidolítica de los polipéptidos protegidos, están presentes dos tipos de componentes de polipéptido en la mezcla:

- a) polipéptidos que contienen el resto de dietilamida en un extremo de los mismos ("derivados de dietilamida"),
- b) polipéptidos libres de dietilamida que constituyen la mayor parte de la mezcla.

Por consiguiente, en la mezcla de polipéptidos de la invención, están presentes derivados de dietilamida en el principio activo y se representan en la fórmula estructural molecular de la mezcla de polipéptidos de la invención facilitada anteriormente.

QUIRALIDAD

La actividad óptica de la mezcla de polipéptidos de la invención se origina a partir de los centros asimétricos de los cuatro residuos de L- α -aminoácidos que componen la especie de polipéptido.

ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN

ANÁLISIS ESPECTRAL CUALITATIVO

Espectro de RMN de protón

El espectro de RMN de protón muestra un patrón de absorción característico de los residuos de aminoácido que componen los polipéptidos de la mezcla de polipéptidos de la invención.

Tabla 1. Desplazamientos en RMN de protón (ppm) en disolución de óxido de deuterio de la mezcla de polipéptidos de la invención en un instrumento Bruker a 300 MHz (RS)

Desplazamiento (ppm)	Asignación
7,09	Protones aromáticos de Tyr
7,79	Protones aromáticos de Tyr
4,21	Protones de aminoácidos alfa
2,96	Lys (-CH ₂ -N)
2,27	Glu (-CH ₂ -CO ₂)
2,08	Tyr (-CH ₂ -Ph)
1,87	Acetato

Véase también la figura 21.

Espectro de RMN de carbono-13

Se realizó un espectro de C-13 en un instrumento Bruker DPX-300 (300,1 para protones y 75,5 MHz para carbonos),

en D₂O. Los desplazamientos químicos de los átomos de carbono se presentan en. Los desplazamientos de C-13 son característicos de los residuos de aminoácido presentes en la mezcla de polipéptidos de la invención.

Tabla 2. Desplazamientos químicos de ¹³C (ppm) de la mezcla de polipéptidos de la invención (en disolución de óxido de deuterio) (RS)

Desplazamiento químico	Asignación
16,4	β-Ala
22,7	γ-Lys
23,8	CH ₃ de acetato
26,8	δ-Lys
<i>aprox. 28</i>	β-Glu
30,6	β-Lys
34,1	γ-Glu
<i>aprox. 36</i>	β-Tyr
39,6	ε-Lys
<i>aprox. 51</i>	α-Ala
<i>aprox. 55</i>	α-(Lys, Glu, Tyr)
115,9	3'-Tyr
128,2	1'-Tyr
131,0	2'-Tyr
155,1	4'-Tyr
<i>aprox. 175</i>	carbonilos de amida
181,7	δ-Glu

5 Véase la figura 22.

Espectro ultravioleta

Se midió el espectro UV de la mezcla de polipéptidos de la invención (RS).

Tabla 3. Datos de absorción UV de una disolución 0,1 mg/ml de la mezcla de polipéptidos de la invención en agua

Longitud de onda	Absorbancia	Asignación
276	0,135	transición $\pi-\pi^*$ de resto de tirosilo
220	Hombro	transición $n-\pi^*$ de resto de tirosilo transición $\pi-\pi^*$ de conformación de alfa-hélice
204	1,789	transición $n-\pi^*$ de C(=)-NH

10 La absorptividad relativamente alta a 220 nm, acoplada con la fracción molar relativamente baja de tirosina (0,086 - 0,100) en la mezcla de polipéptidos de la invención sugiere que la absorción a 220 nm no se debe únicamente a su transición $n-\pi^*$. Una absorción de este tipo también es característica de regiones de alfa-hélice en moléculas de polipéptido. La presencia de alfa-hélice en la mezcla de polipéptidos de la invención se ha verificado adicionalmente mediante mediciones de dicroísmo circular. Véase la figura 23.

Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

15 Espectro de la mezcla de polipéptidos de la invención (RS)

Tabla 4. Máximos de absorción IR de una dispersión al 1% de la mezcla de polipéptidos de la invención en KBr

Absorción (cm ⁻¹)	Asignación
1655,0	Tensión de C=O (amida I)
1550,6	Curvatura en el plano de N-H modificada por tensión de C-N
1406,0	Vibración simétrica de CO ₂ "
1248,1	Modo de tensión de C-N modificado por curvatura en el plano de N-H (amida III)

La intensidad de absorción de amida I (1655,0 cm⁻¹) se correlaciona con el grado de la conformación α -hélice en la mezcla de polipéptidos de la invención que se verifica mediante medición de dicroísmo circular. Véase la figura 24.

Contenido en aminoácidos

- 5 Se determinó el contenido en aminoácidos mediante un método que incluyó la hidrólisis cuantitativa de la muestra, derivatización de los aminoácidos libres obtenidos tras la hidrólisis, con ortoftaldialdehído (OPA) y 2-mercaptoetanol y análisis mediante RP-HPLC con detección UV a 330 nm.

Tabla 5. Fracciones molares de aminoácidos en la mezcla de polipéptidos de la invención (RS)

Aminoácido	Fracción molar	Intervalo de fracción molar
L-Glu	0,144	0,129-0,153
L-Ala	0,441	0,392-0,462
L-Tyr	0,091	0,086-0,100
L-Lys	0,324	0,300-0,374

Degradación de Edman

- 10 La degradación de Edman es un método para el análisis secuencial gradual de los aminoácidos que componen un polipéptido, partiendo del extremo N-terminal molecular. Los resultados de la degradación de Edman indican la aparición relativa específica (expresada en fracción molar) de los cuatro residuos de aminoácido que comprenden los polipéptidos de la mezcla de polipéptidos de la invención.

- 15 Puesto que la mezcla de polipéptidos de la invención contiene polipéptidos de diferentes tamaños y composiciones, sólo se dispone de información limitada sobre la secuencia de residuos de aminoácido mediante un método de secuenciación convencional, tal como la degradación de Edman. La fracción molar promedio de los aminoácidos entre lotes, tal como se mide es: 0,427 de alanina, 0,337 de lisina, 0,141 de glutamato y 0,093 de tirosina. Sin embargo, los resultados de prueba indican que L-tirosina es más prevalente en o cerca del extremo N-terminal y L-lisina es más prevalente en o cerca del extremo C-terminal de los polipéptidos de la mezcla de la invención.
- 20 Además, aunque el contenido molar promedio de alanina en GA y en la mezcla de polipéptidos de la invención es el mismo, en la mezcla de polipéptidos de la invención, el primer ciclo de la degradación de Edman muestra que hay menos moléculas de polipéptido con alanina en el extremo N-terminal (0,393 moléculas) que en GA. Específicamente, en relación con el contenido molar promedio de alanina en la mezcla, hay un mayor porcentaje de moléculas de polipéptido con alanina en el extremo N-terminal en GA, pero un menor porcentaje de moléculas de
- 25 polipéptido con alanina en el extremo N-terminal en la mezcla de polipéptidos de la invención.

Tamaño molecular

En la figura 25 aparece una comparación gráfica entre los tamaños moleculares de GA y la mezcla de polipéptidos de la invención. La diferencia en el tamaño molecular entre una mezcla de polipéptidos de la invención (RS) y el acetato de glatirámico (RS) se ilustra mediante sus dos cromatogramas de GP-HPLC (Superose 6) superpuestos.

Análisis del contenido en dietilamida

- El procedimiento de polimerización se inicia mediante la reacción entre dietilamina (DEA) y precursores de aminoácido con N-carboxamida en la mezcla de reacción. Tras la reacción de escisión acidolítica, parte de las cadenas de polipéptido conservan sus dietilamidas C-terminales, aunque la mayoría de los polipéptidos de la invención son productos de escisión con carboxilatos C-terminales. Además, el procedimiento de ultrafiltración
- 35 elimina los péptidos cortos que pueden tener dietilamidas o carboxilatos C-terminales, mientras que los fragmentos más grandes permanecen en la mezcla de polipéptidos.

En la mezcla de polipéptidos de la invención, el 13-38% de las cadenas de polipéptidos tienen dietilamidas en el

extremo de los mismos donde habitualmente está presente un carboxilo (preferiblemente el 18-28%). Por tanto, el contenido en dietilamida libre medido, calculado sobre una base libre de agua y AcOH, puede variar de desde 700 ppm hasta 1500 ppm (70-150 miligramos de dietilamina por 100 gramos de mezcla de polipéptidos).

- 5 Puesto que ni GA ni la mezcla de polipéptidos de la invención contienen dietilamina libre, el porcentaje de derivados sustituidos de dietilamida en la mezcla de polipéptidos se determina realmente mediante hidrólisis completa de una muestra de mezcla de polipéptidos en condiciones fuertemente alcalinas seguido por cuantificación de la dietilamina liberada mediante cromatografía de espacio de cabeza y corrección con respecto a la base libre de agua y AcOH.

El porcentaje de cadenas de polipéptido con dietilamidas C-terminales (DTP) puede calcularse tal como sigue (por conveniencia, el cálculo se muestra para 100 gramos de mezcla de polipéptidos):

10
$$\text{DTP} = (\text{DEA/PP}) \times 100$$

DEA= moles de dietilamina en 100 gramos de mezcla de polipéptidos calculados en la base seca

PP= moles de polipéptido en 100 gramos de mezcla de polipéptidos

- 15 Por ejemplo, se determinó que el peso molecular promedio de un lote representativo de una mezcla de polipéptidos era de 16.192 Da. Se encontró que una muestra de 100 gramos contenía 112,4 mg de dietilamina tras hidrólisis (calculada sobre la base seca), por tanto el DTP es 24,9.

3.5.5 Estudios de dicroísmo circular (DC) (véase la figura 26)

Se disolvió la mezcla de polipéptidos de la invención en tampón fosfato, pH 6,8, que contenía cloruro de potasio. Se determinaron los espectros iniciales en este tampón (línea con triángulos). Mínimos a aproximadamente 208 y 220 nm que son característicos de la presencia de conformación de alfa-hélice.

- 20 Se añadió trifluoroetanol (TFE), un inductor de conformación de alfa-hélice, y se registraron los espectros. La adición de TFE no produjo ningún efecto significativo en la mezcla de polipéptidos de la invención.

La razón de señal mínima es de desde 0,91 (disolución en tampón) hasta 0,93 (disolución en tampón + TFE). Estos resultados representan la mezcla de polipéptidos de la invención con el 97,0% de la conformación de α -hélice inicial.

- 25 Partiendo de la base de estos resultados de prueba, puede concluirse que el grado de conformación de alfa-hélice en la mezcla de polipéptidos de la invención está aparentemente casi en su máximo y no resulta afectado por la adición de TFE. Al contrario de la mezcla de polipéptidos de la invención, se induce a que las moléculas de acetato de glatirámico, que tienen un grado más pequeño de conformación de alfa-hélice, aumenten esta característica mediante la adición de TFE.

DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE PESO MOLECULAR

- 30 Se determinó inicialmente que el peso molecular promedio de los polipéptidos en la mezcla de la invención era de aproximadamente 15.000 ± 2.000 Dalton (mediante dispersión de luz láser de múltiples ángulos (MALLS)). El peso molecular se determina ahora mediante cromatografía SEC. Tal como se determina mediante cromatografía SEC, se mostró que la misma mezcla de polipéptidos tenía un peso molecular promedio de 16.000 ± 2.500 Dalton.

- 35 La determinación de distribución de pesos moleculares (PM) en la mezcla de polipéptidos de la invención mediante cromatografía SEC requiere un conjunto adecuado de marcadores de PM. Como la mezcla de polipéptidos de la invención difiere de la proteína nativa, no pueden usarse marcadores de PM de proteína comerciales para este fin y tenían que producirse marcadores relacionados con la mezcla de polipéptidos de la invención ("marcadores de polipéptido"). Con el fin de obtener un conjunto de marcadores para la curva de calibración de PM, se designaron cinco marcadores con un intervalo de PM de desde aproximadamente 16.000 Da hasta 27.000 Da (tabla 6). Los marcadores de polipéptido se produjeron mediante métodos recombinantes. Se subclonaron los ADNc de marcadores en un vector pET-21a. (Merck, n.º de catálogo 69740) y se clonaron en la cepa de *E. coli* HMS174(DE3) (Merck, n.º de catálogo 69453). Tras la expresión, dos precipitaciones y dos etapas de cromatografía dieron los marcadores con al menos una pureza del 80%.

- 45 Se realizó la determinación del peso molecular de los marcadores usando un espectrómetro de masas Q-TOF Ultima Global (Micromass). Los datos se sometieron a deconvolución usando el software MaxEnt 1. Los resultados de la determinación de masas moleculares se resumen en la tabla 6.

Tabla 6: Resultados del análisis de EM frente a cálculo de PM teórico

N.º de marcador	PM teórico *	PM medido
1	15972	15971,6 $\pm$ 0,2

2	18093	18093,5 ± 0,2
3	20402	20402,0 ± 0,3
4	23627	23627,9 ± 0,3
5	26662	26662,4 ± 0,3

* El PM teórico se determinó según la secuencia de marcadores

El análisis de EM demuestra que los marcadores para la masa principal son comparables a la masa prevista y que todos los marcadores carecen de residuo de Met en los extremos N-terminales.

- 5 Se realizó análisis de SDS-PAGE para estimar las características de los marcadores. Se cargaron aproximadamente 45 µg de la mezcla de polipéptidos de la invención y el kit de marcadores LMW-SDS (Amersham n.º de catálogo 17-0446-01) y 1 µg de cada marcador de polipéptido en un gel al 14%. Tal como se muestra en las figuras 28a y 28b, los marcadores se alinean correctamente según su masa comparativa. Sin embargo, el cálculo del peso molecular de los marcadores basándose en marcadores de proteína de SDS-PAGE disponibles comercialmente da como resultado una masa medida aproximadamente un 30% más alta que su masa esperada (figura 28c). Previamente se han experimentado resultados similares, acentuando así la necesidad de marcadores específicos.

- 10 Las condiciones cromatográficas principales a las que se obtuvo una correlación lineal entre los marcadores fue una velocidad de flujo de 0,4 ml/min a una concentración de HCl de guanidina ("GuaHCl") de 4,5 M. La linealidad se mantuvo tras liofilizar y reconstituir con agua los marcadores. Las condiciones presentaron picos de forma bastante simétrica con asimetría mínima, valor de R^2 de 0,999 e intervalo de tiempo de elución entre los marcadores de polipéptido 1 y 5 de 3,5 min. Figura 29.

Secuencia de aminoácidos de marcadores de polipéptido 1-5 y el ADN codificante

Marcador de polipéptido 1:

PM teórico = 15974

Contenido en aminoácidos

L-Alanina (A)	64
L-Glutamato (E)	21
L-Tirosina (Y)	14
L-Lisina (K)	50

- 20 Secuencia de aminoácidos (149 aa):

AEKYKAKKAKEKAYKKKAKEAKKAKYKAKEAKAYKAEKKAKYAKAKEKAYAKAKEAKA
YAKAKAKAEKAKAKAKYAEKAKAAKYAEKAAKYAEAKAKAAEAKYAAEAKAEAKAAEA
KYAAKAEAAKYAAEAKAAEKYAKAEAAEAEAKEAA (SEQ ID NO: 1)

Secuencia de ADN:

ATGGCCGAGAAATACAAGGCTAAGAAAGCGAAGGAAAAAGCATACAAGAAAAAGGCCA
AAGAAGCAAAAAAGGCCAAATATAAGGCTAAAGAAGCGAAAGCGTATAAAGCAGAAAA
AAAGGCGAAATATGCAAAAGCAAAAGAAAGGCTTATGCTAAAGCCAAGGAGGCCAAA
GCATACGCGAAAGCCAAAGCAAAAGCCGAAAAGGCTAAAGCTAAAGCGAAATATGCTG
AGAAAGCTAAAGCCGCGAAGTATGCCGAAAAAGCGGCCAAATATGCGGAAGCCAAAGC
AAAGGCCGCTGAGGCAAAATATGCCGCAGAAGCTAAAGAAGCTGCGAAAGCCGCGGAA
GCAAAATACGCGGCAAGGCAGAAGCGGCCAAATATGCCGCGGAGAAGGCCGCGGAAA
AGTATGCGAAAGCTGAAGCCGCGGCCGAGGCGAAAGAGGCGGCGTAA (SEQ ID
NO: 6)

Marcador de polipéptido 2:

- 25 PM teórico = 18095

Contenido en aminoácidos

L-Alanina (A)	73
L-Glutamato (E)	23
L-Tirosina (Y)	16
L-Lisina (K)	57

Secuencia de aminoácidos (169 aa):

AKKKYKAKEKKAKKKAKEKKYKAKKAKYKEKA AKYKAKKAKAKYKAKAEKAKAKAEKA
KAYAEKAKAKYAKEAKKYAEKAKKA EYKAKEAAEKAKAYAKEAAKAEKAAKAAEKAAK
AYAKAEAAAKEAAAYAAKAEKAAAYAAEAAKAEYAAEAAKEAAAYAAAEYAAEAA (SEQ
ID NO: 2)

Secuencia de ADN:

ATGGCAAAGAAGAAATATAAGGCGAAAGAAAAGAAGGCTAAGAAGAAAGCAAAGAGA
AGAAGTACAAAGCCAAGAAGGCGAAATACAAAGAAAAGGCGGCAAAGTATAAGGCTAA
AAAGGCGAAAGCTAAATACAAAGCCAAAGCCGAGAAAGCGAAAGCTAAAGCAGAAAAA
GCGAAAGCTTATGCGGAAAAAGCGAAAGCAAATATGCGAAAGAAGCCAAAAAGTATG
CGGAGAAAGCAAAAAAGCTGAGTATAAGCTAAAGAAGCCGCAGAAAAAGCTAAAGC
TTATGCCAAAGAGGCTGCAAAAGCAGAAAAAGCTGCGAAAGCAGCGGAAAAAGCCGCT
AAGGCTTATGCGAAAGCGGAAGCCGCAGCCAAAGAAGCTGCCTACGCCGCGAAAGCAG
AAGCTAAAGCGGCCTATGCCGCAGAGGCAGCCAAAGCGGAATACGCCGGCTGAAGCGGC
AAAAGAGGCGGCTTACGCAGCCGCGGAATACGCCGGCCGAGGCGGCCTAA (SEQ ID
NO: 7)

Marcador de polipéptido 3:

PM teórico = 20404

Contenido en aminoácidos

L-Alanina (A)	81
L-Glutamato (E)	27
L-Tirosina (Y)	18
L-Lisina (K)	64

Secuencia de aminoácidos (190 aa):

AKKKYKAKEKKAKKKAKEKKKYKAKEKKAKKYKEKA AKYKAKKAKKEAAKYKKAKAEK
AKYAKEKA EKAKAYAEKAKAKYAKEAKKYAEKAKKA EYKAKEAAEKAKAYAKEAAKAE
AKAAKYAAEKAAEAAKAAAYAKAEAAKAAKEAAAYAAKAEAAKAAAYAAEAAKAEYAAEAA
KEAAAYAAAEYAAAEAA (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de ADN:

ATGGCAAAGAAGAAATATAAGGCGAAAGAAAAGAAGGCTAAGAAGAAAGCAAAAGAGA
AGAAGAAATACAAAGCCAAGGAAAAGAAAGCCAAAAAGTACAAAGAAAAGGCGGCAAA
GTATAAGGCTAAAAAGGCGAAAAAGGAAGCGGCTAAATACAAAAAGGCCAAAGCCGAG
AAAGCGAAATATGCGAAGGAAAAAGCAGAAAAAGCGAAAGCTTATGCGGAAAAAGCGA
AAGCAAAATATGCGAAAGAAGCCAAAAAGTATGCGGAGAAAGCAAAAAAAGCTGAGTA
TAAAGCTAAAGAAGCCGCAGAAAAAGCTAAAGCTTATGCCAAAGAGGCTGCAAAAGCA
GAAGCCAAAGCTGCGAAATATGCAGCGGAAAAAGCCGCTGAGGCTGCCAAAGCAGCCT
ATGCGAAAGCGGAAGCCGCAGAAAGCAGCCAAAGAAGCTGCCTACGCCGCGAAAGCAGA
AGCTGCCAAAGCGGCCTATGCCGCAGAGGCAGCCAAAGCGGAATACGCGGCTGAAGCG
GCAAAAGAGGCGGCTTACGCAGCCGCGGAATACGCGGCCGCGGAGGCCGCGTAA
(SEQ ID NO: 8)

Marcador de polipéptido 4:

PM teórico = 23630

Contenido en aminoácidos

L-Alanina (A)	96
L-Glutamato (E)	30
L-Tirosina (Y)	21
L-Lisina (K)	74

5 Secuencia de aminoácidos (221 aa):

AKKKYKAKEKKAKAKKKAKEKKKYKAKKEKKAKKYKEKA AKYKAKKEKAKKEAAKYKK
AKKYKAEKAKYAKEKAKEKAKAYAEKAEKAAKYAAKEAKKYAEKAAEKKA EYKAKEAA
EKYAAKAYAAKEAAKAYKEAKAAKYAKAAEKAAAKEAAKAAYAAKAEAAKEAAKEAAY
AAAKAEAAAAKAAAYAAEAAAKAEYAAEAAAKEAAAYAAAEYAAAEAA (SEQ ID
NO: 4)

Secuencia de ADN:

ATGGCAAAGAAGAAATATAAGGCGAAAGAAAAGAAGGCTAAGGCTAAGAAGAAAGCAA
AAGAGAAGAAGAAATACAAAGCCAAGAAAGAAAAGAAAGCCAAAAAGTACAAAGAAAA
GGCGGCAAAGTATAAGGCTAAAAAGGAGAAAGCGAAAAAGGAAGCGGCTAAATACAAA
AAGGCCAAAAAGTACAAAGCCGAGAAAGCGAAATATGCGAAGGAAAAAGCAAAAGAAA
AAGCGAAAGCTTATGCGGAAAAAGCGGAGAAAGCTGCAAAATATGCGGCCAAAGAAGC
CAAAAAGTATGCGGAGAAAGCAGCTGAGAAAAAAGCTGAGTATAAAGCTAAAGAAGCC
GCAGAAAAATACGCGGCTAAAGCTTATGCCGCTAAAGAGGCTGCAAAAGCATATAAGG
AAGCCAAAGCTGCGAAATATGCGAAAGCTGCGGAAAAAGCCGCTGCGAAAGAGGCTGC
CAAAGCAGCCTATGCGGCCAAAGCGGAAGCCGCAGAAAGAGGCAGCCAAAGAAGCTGCC
TACGCCGCGGCAAAAGCAGAAAGCTGCCGCTGCGAAAGCGGCTGCCTATGCCGCAGAGG
CAGCCGCTAAAGCGGAATACGCGGCTGAAGCGGCAGCGAAAGAGGCGGCTTACGCAGC
CGCGGAATACGCGGCCGCGGAGGCCGCGTAA (SEQ ID NO: 9)

Mezcla de polipéptidos 5:

10 PM teórico = 26665

Contenido en aminoácidos

L-Alanina (A)	107
L-Glutamato (E)	35
L-Tirosina (Y)	23
L-Lisina (K)	84

Secuencia de aminoácidos (248 aa):

AKKKYKAKEKKAKYKAKKEKKAKEKKAKKKYKAKKKAAEKKYAKEKKAKEKAACKKYKA
KKEKAKKEAAKYKKAKKYKAEKKAKYAAKEKAKEKAKAYAEKKAKEKAAKYAAKEAKKY
AEKAAEKKAEYKAKEAAEKYAAKKAEEYAAEKEAAKAYKEAKAAKYAKAAEKAKAAKEA
AKAAYAAKAEAAKEAAKEAAYAAAKAEAAAYAAAKAAAAYAAEAAAKAEYAAAEAAAK
EAAAYAAEYAAAAEAAA (SEQ ID NO: 5)

Secuencia de ADN:

ATGGCGAAAAAAGTACAAAGCTAAGGAGAAAAAGGCGAAATATAAGGCAAAGAAGG
AGAAAAAGGCGAAAGAAAGAAAGGCTAAGAAGAAATATAAGCGAAGAAGAAAGCCGC
TGAGAAGAAATACGCCAAAGAGAAAAAGGCGAAAGAAAGGCGGCAAAGAAATATAAG
GCTAAAAAGGAGAAAGCGAAAAAGGAAGCGGCTAAATACAAAAAGGCCAAAAAGTACA
AAGCCGAGAAAAAGGCGAAATATGCGGCCAAGGAAAAAGCAAAAGAAAAAGCGAAAGC
TTATGCGGAAAAAAGGCGGAGAAAGCTGCAAAATATGCGGCCAAAGAAGCCAAAAAG
TATGCGGAGAAAGCAGCTGAGAAAAAAGCTGAGTATAAAGCTAAAGAAGCCGCAGAAA
AATACGCGGCTAAAAAGGCCGAGTATGCCGCTGAGAAAGAGGCTGCAAAAGCATATAA
GGAAGCCAAAGCTGCGAAATATGCGAAAGCTGCGGAAAAAGCCAAAGCTGCGAAAGAG
GCTGCCAAAGCAGCCTATGCGGCCAAAGCGGAAGCCGCAAAAGAGGCAGCCAAAGAAG
CTGCCTACGCCGCGGCAAAAGCAGAAGCTGCCGCTTATGCAGCGGCCAAAGCGGCGGC
TGCCTATGCCGCAGAGGCAGCCGCTAAAGCGGAATACGCGGCTGCAGAAGCGGCAGCG
AAAGAGGCGGCTTACGCAGCCGCGGAATACGCGGCCGCGGCCGAGGCGGCTGCATAA
(SEQ ID NO: 10)

5 Expresión y purificación de marcadores de polipéptido

Se subclonó ADN sintético que codificaba para cada uno de los marcadores de polipéptido de la invención en los sitios *NdeI* y *Sall* del vector Pet21-a y se transformó en la cepa HMS174 (DE3) de *E. coli*.

10 Se hizo crecer un cultivo de 10-30 litros y se indujo la expresión de los polipéptidos con IPTG. Tras 25-50 horas de fermentación, se recogieron las células y se centrifugaron. Se resuspendió el sedimento con tampón fosfato 50 mM, pH 2,5 y urea 6 M y se lisó en un homogeneizador Microfluidics con serpentín de enfriamiento en línea. Entonces se centrifugó el homogeneizado y se resuspendió el sedimento con tampón fosfato 50 mM pH 12. Se centrifugó la suspensión resultante y se ajustó el pH del sobrenadante a 8,0 con HCl. Se añadieron MgCl 1 mM y ADNasa y se incubó la suspensión durante 2 horas a temperatura ambiente.

15 Etapa cromatográfica 1: Se ajustó la concentración del sulfato de amonio de la suspensión al 50% y se cargaron los marcadores en una columna de fenil-Sepharose (Amersham). Se eluyeron los marcadores de la columna usando un gradiente de tampón fosfato 50 mM, pH 8 y se recogieron las fracciones de pico.

Etapa cromatográfica 2: Se diluyó el pico principal de la columna de fenil-Sepharose con tampón fosfato 50 mM, pH 8,5 y se cargó en una columna SP-650C (Tosoh). Se eluyeron los marcadores de la columna usando un gradiente de tampón fosfato 50 mM, pH 8,5/NaCl 2 M y luego se recogieron, se desalinizaron y se liofilizaron.

20 Comparación de diferentes marcadores de peso molecular

25 Para comparar los caracteres cromatográficos de diferentes marcadores de PM se sometieron a prueba cuatro conjuntos de marcadores: los marcadores de polipéptido 1-5 tal como se da a conocer, marcadores de acetato de glatirámico dados a conocer en la patente estadounidense n.º 6.800.287 y marcadores de proteína disponibles comercialmente de dos vendedores (Sigma, n.º de catálogo PM-GF-70 y Amersham, n.º de catálogo 17-0442-01). Todos los marcadores se prepararon de la misma manera según el método que se desarrolló durante este estudio

incluyendo la preparación de las muestras con clorhidrato de guanidina 4,5 M.

Los experimentos muestran (figura 31) que estos marcadores de polipéptido están casi en línea con marcadores de GA dados a conocer en la patente estadounidense n.º 6.800.287 B2 y aparentemente tienen caracteres de corrida idénticos. Los dos marcadores de GA más grandes, de 9200 Da y 11700 Da, forman junto con los marcadores de polipéptido 1-5 una excelente correlación lineal ($R^2 = 0,996$). Los marcadores de GA más pequeños parecen desviarse ligeramente de la línea recta; sin embargo, las diferencias se deben lo más probablemente al intervalo de columna que no se diseñó para incluir muestras con PM tan pequeñas como los marcadores de polipéptido. Inesperadamente, los dos conjuntos de marcadores de proteína presentan dos líneas de tendencia no relacionadas. Las dos curvas de calibración formadas por el conjunto de marcadores de proteína no son comparables entre sí e indudablemente no son comparables con los marcadores de GA dados a conocer en la patente estadounidense n.º 6.800.287 B2 y los marcadores de polipéptido 1-5.

La prueba muestra que las calibraciones con marcadores de PM comerciales no son comparables con los marcadores de polipéptido 1-5. Aun cuando las líneas de tendencia de los marcadores comerciales muestran valores de pendiente próximos a los de los otros dos conjuntos, sus valores de RRT son significativamente mayores en comparación con su PM como si mantuvieran algo de nivel de forma globular (parecen más pequeños que sus PM marcados en comparación con los marcadores de polipéptido 1-5). Además, en las condiciones desarrolladas para la corrida, la mezcla de polipéptidos de la invención: se agregó un marcador comercial durante la preparación (ovoalbúmina, marcador de Amersham de 43000 Da), y los otros muestra escasa correlación lineal.

Determinación de la distribución de peso molecular de la mezcla de polipéptidos de la invención

Tras establecer las condiciones cromatográficas principales a las que se obtuvo la correlación lineal entre los marcadores de peso molecular, se realizó un experimento preliminar para determinar el PM de la mezcla de polipéptidos de la invención. El experimento se llevó a cabo con las condiciones usando tampón fosfato, pH 3 con GuaHCl 4,5 M como fase móvil y velocidad de flujo de 0,4 ml/min. Se determinaron los resultados de distribución de PM de un lote de una mezcla de polipéptidos de la invención mediante el programa de cálculo de PM "Millennium" basado en valores de PM teóricos para los marcadores.

Tal como se muestra en el cromatograma de solapamiento de la mezcla de polipéptidos de la invención y los marcadores de polipéptido (figura 30), los marcadores cubrían la región de peso molecular más alto de la mezcla de polipéptidos de la invención. El RT del marcador de polipéptido 1 (el marcador de PM más bajo) y de la mezcla de polipéptidos de la invención en su máximo fueron aproximadamente iguales. La extensión del intervalo de PM cubierta por los marcadores hacia la región de PM más bajo de la mezcla de polipéptidos de la invención puede lograrse con marcadores de 11700 Da y 9200 Da, respectivamente, descritos en la patente estadounidense n.º 6.800.287 B2 para Alexander Gad *et al.*

Finalmente, se contempla que los propios marcadores que tienen los cuatro constituyentes de aminoácido del polipéptido de la invención son útiles para los mismos usos y métodos que la mezcla de polipéptidos de la invención.

FABRICACIÓN DE LA MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Fase 1: Mezclas de polipéptidos protegidos

La copolimerización de derivados de N-carboxianhídrido de los cuatro aminoácidos (L-Ala, L-Glu, L-Tyr y L-Lys) en 1,4-dioxano, agitados a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en presencia de un iniciador (dietilamina) 24 horas $\pm$ 1/4 horas para producir una mezcla de polipéptidos protegidos. Los cuatro derivados de los aminoácidos usados son L-tirosina-N-carboxianhídrido, L-alanina-N-carboxianhídrido, 5-bencil-L-glutamato-N-carboxianhídrido y 6N-trifluoroacetil-L-lisina-N-carboxianhídrido.

Tras la copolimerización, se añade agua de proceso y los polipéptidos protegidos se someten a precipitación, troceado y dispersión durante 1,25 horas. Los polipéptidos protegidos se someten entonces a filtración y lavado. Se seca la torta de filtración a vacío a $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ a una presión de menos del 20 mmHg durante 12 horas, y entonces se somete a molienda. Esto produce una mezcla de polipéptidos protegidos, en la que se protegen los grupos funcionales de cadena lateral de dos aminoácidos (ácido glutámico y lisina) para evitar reticulación.

La mezcla de polipéptidos protegidos es el primer producto intermedio en la producción de las mezclas de polipéptidos de la invención.

En esta fase, se fija la secuencia de residuos de aminoácido en los polipéptidos.

Fase 2: Trifluoroacetil-polipéptidos

El tratamiento de las mezclas de polipéptidos protegidos con una disolución de bromuro de hidrógeno al 33% en ácido acético glacial a 20°C durante un tiempo determinado por una reacción de prueba implica dos reacciones

químicas: escisión del grupo protector bencilo de la cadena lateral de 5-carboxilato de los residuos de glutamato (desprotección); y escisión del enlace peptídico acidolítico, que reduce el tamaño molecular promedio de la mezcla de péptidos. Entonces se añade el agua de proceso, seguido por lavado con agitación, decantación, filtración y secado a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a menos de 40 mmHg, formando así las segundas mezclas intermedias de trifluoroacetil-polipéptidos de tamaño y peso molecular promedio reducidos.

El tiempo de reacción necesario se determina mediante una reacción de prueba antes de la ejecución real de la fase de producción 2, que dirige la reacción a un valor objetivo de un peso molecular promedio de 16.000 Dalton. El tiempo de reacción normalmente es de 7 a 18 horas a $17-21^{\circ}\text{C}$. Por tanto, el tiempo de reacción es de 7-15 horas a $18-20^{\circ}\text{C}$ y es de ~15 horas a $\sim 20^{\circ}\text{C}$.

Fase 3: Disolución de una mezcla de polipéptidos de la invención

El tratamiento de mezclas de trifluoroacetil-polipéptidos con piperidina acuosa a $20^{\circ}\text{C}-26^{\circ}\text{C}$ elimina los grupos protectores trifluoroacetilo de los residuos de lisina que forman una mezcla de polipéptidos de la invención (base). El producto resultante se somete entonces a filtración (menos de $1,2 \mu\text{m} + 0,2 \mu\text{m}$) a una temperatura de menos de 15°C . Durante las etapas de ultrafiltración/dilución, de las que puede haber dos, se eliminan polipéptidos de bajo peso formados durante las dos primeras fases de producción, sales y piperidina alternando los ciclos de ultrafiltración/dilución. Tras la acidificación con ácido acético glacial (pH 4,0-4,5) se reanudan los ciclos de ultrafiltración/dilución, alcanzando un pH mayor de 5,5, por ejemplo 5,5-6, y reduciendo la concentración de impurezas hasta el nivel requerido. Esto produce la tercera mezcla intermedia, una mezcla acidificada de los polipéptidos de la invención en disolución.

Fase 4: Principio activo

La tercera mezcla intermedia se somete a filtración adicional ($0,2 \mu\text{m}$) y luego se liofiliza. Tras la congelación inicial (-50°C), se continúa gradualmente el procedimiento de liofilización en la disolución filtrada de la mezcla acidificada de polipéptidos de la invención contenida en bandejas individuales en el liofilizador manteniendo una presión controlada de $<0,3 \text{ mbar}$.

Tras la liofilización, se obtiene un material de blanco a ligeramente amarillento, caracterizado por su fórmula como la sal de acetato de la mezcla de polipéptidos de la invención que tiene un intervalo de peso molecular promedio en el máximo de pico de HPLC de 16.000 ± 2.500 Dalton, tal como se caracteriza por GC-HPLC calibrada mediante los marcadores de polipéptido.

EL REACTIVO DE HBr

En el procedimiento de fabricación para las mezclas de polipéptidos de la invención, puede usarse el 10%-36% de ácido bromhídrico en ácido acético para desproteger los polipéptidos protegidos. Durante el desarrollo del procedimiento de producción se encontró que algunos de los residuos de tirosina en los trifluoroacetil-polipéptidos estaban bromados. Se aisló e identificó esta impureza. Se encontró que el residuo de tirosina reaccionaba con bromo para formar un resto de mono-bromotirosina que comprende o bien 2-bromotirosina o bien 3-bromotirosina.

Tras mucha investigación, los inventores descubrieron que la impureza de tirosina bromada se introducía en los polipéptidos a través del bromo libre en HBr/ácido acético. El bromo libre estaba presente en el 33% de HBr/ácido acético que se adquirió a un proveedor y se había usado en el procedimiento de producción. Por tanto, se contempla que la disolución de bromuro de hidrógeno y ácido acético tiene menos de 500 ppm, en una realización menos de 100 ppm, o menos de 10 ppm de impurezas de iones metálicos. En una realización, la disolución de bromuro de hidrógeno y ácido acético está libre de impurezas de iones metálicos. Además, en la disolución de bromuro de hidrógeno y ácido acético debe haber menos del 0,5%, del 0,1%, del 0,05%, del 0,01% o del 0,001% de bromo libre (o estar libre de él) y tal como se indica debe haber menos de 1000 ppm de impurezas de iones metálicos.

Por tanto, deben tomarse medidas con el fin de disminuir el nivel de bromo libre en la disolución. Por ejemplo, el pretratamiento del 33% de HBr/ácido acético con un eliminador de bromo fue eficaz para eliminar algo del bromo libre de la disolución de HBr/ácido acético. Además, la disolución de bromuro de hidrógeno y ácido acético se manipuló en un reactor no metálico, tal como un reactor revestido con vidrio o revestido con Teflon®.

Uno de los eliminadores de bromo usados en el procedimiento de purificación de HBr fue el fenol. Además del fenol, pueden usarse otros agentes reductores, tales como bisulfito de sodio. Se eligió fenol como eliminador de bromo porque él y su producto de reacción con bromo (bromofenoles) son ambos sustancialmente no reactivos con los polipéptidos protegidos, la mezcla de polipéptidos de la invención y la mezcla de TFA-polipéptidos de la invención, y son fáciles de eliminar de la disolución durante el procedimiento de purificación. De manera similar, puede usarse cualquier agente de eliminación de bromo siempre que él y su producto de reacción con bromo, no sean reactivos con los polipéptidos protegidos, la mezcla de polipéptidos de la invención y la mezcla de TFA-polipéptidos de la invención, y pueda eliminarse fácilmente durante el procedimiento de purificación final.

CONCENTRACIÓN Y FORMA FARMACÉUTICA

Se han desarrollado varias concentraciones diferentes de la mezcla de polipéptidos de la invención. Pruebas de inmunorreconocimiento *in vitro* mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando anticuerpos monoclonales y policlonales específicos anti-GA (acetato de glatirámico) que muestran alta reactividad cruzada con la mezcla de polipéptidos de la invención, sirven para la identificación específica de la mezcla de polipéptidos de la invención. La actividad biológica del material se demuestra mediante la prueba de potencia *ex vivo* y la prueba de bloqueo de EAE *in vivo*, llevadas a cabo ambas en ratones.

Se eligió uno de tres lotes de producción regulares de la mezcla de polipéptidos de la invención que muestra un efecto aceptable en la toxicidad por glutamato, la presión intraocular y los modelos de TNBS descritos en el presente documento para que sirviera como el material de referencia.

El material no se sometió a un procedimiento de purificación adicional para su uso como patrón de referencia.

Biorreconocimiento específico mediante ELISA de tipo sándwich

Se evaluaron las propiedades biológicas de la mezcla de polipéptidos de la invención mediante pruebas de inmunorreconocimiento usando anticuerpos específicos con respecto a GA. Se examinó mediante ELISA el inmunorreconocimiento de la mezcla de polipéptidos de la invención mediante anticuerpos monoclonales y policlonales específicos con respecto a GA. Se examinaron varias preparaciones a escala de laboratorio de la mezcla de polipéptidos de la invención y se calculó el % de unión de anticuerpos a epítopos relevantes en relación con RS de GA (1000). Se encontró un inmunorreconocimiento por encima del 100% de unión, de hasta el 122% y de hasta 113% de unión para anticuerpos policlonales y monoclonales, respectivamente.

Se identificaron lotes de prueba de la mezcla de polipéptidos de la invención mediante anticuerpos específicos de GA, indicando que GA y la mezcla de polipéptidos de la invención comparten epítopos de células B similares y que hay reacción cruzada entre GA y la mezcla de polipéptidos de la invención. Sin embargo, estas pruebas de ELISA de identificación no fueron cuantitativas y no pudieron evaluar la cantidad relativa de epítopos, por lo que los lotes de la mezcla de polipéptidos de la invención no muestran unión significativamente más alta en comparación con RS de GA. Por consiguiente, se ha desarrollado un método de ELISA de tipo sándwich más sensible, que permite una evaluación más cuantitativa. En la figura 3 se presentan los resultados de los lotes de la mezcla de polipéptidos de la invención sometidos a prueba mediante ELISA de tipo sándwich.

Los resultados mostraron que la cantidad de anticuerpos que se unen a la mezcla de polipéptidos de la invención fue más alta que la que se une a GA, lo que indica un mayor inmunorreconocimiento, que corresponde a su mayor inmunogenicidad, tal como se muestra en los modelos de EAE y las pruebas de potencia *ex vivo*.

Se recubre una placa de microtitulación con anticuerpo monoclonal (AcM) de ratón anti-acetato de glatirámico (anti-GA) (n.º 4B5/44 o n.º 10F6/32). Tras lavar los AcM no unidos en exceso y bloquear la superficie expuesta de los pocillos, se permitió que lotes del patrón de referencia (RS) de la mezcla de polipéptidos de la invención o el principio activo (DS) de la mezcla de polipéptidos de la invención sometido a prueba se unieran a los AcM anti-GA unidos. Puesto que la mezcla de polipéptidos de la invención contiene los mismos residuos de aminoácido que GA, están presentes determinantes antigénicos similares en ambos polipéptidos. Por tanto, los péptidos de la mezcla de polipéptidos de la invención se reconocen por anticuerpos anti-GA de manera específica. Posteriormente se detecta la unión de la mezcla de polipéptidos de la invención a los anticuerpos mediante anticuerpos policlonales (AcP) de cabra anti-GA conjugados con biotina y peroxidasa del rábano (HRP) conjugada con estreptavidina. Los resultados se expresan como el promedio del % de desviación de unión de los lotes sometidos a prueba de DS de la mezcla de polipéptidos de la invención y DS de GA a los anticuerpos, en relación con la unión del lote de RS de la mezcla de polipéptidos de la invención. El grado de unión se correlaciona con la cantidad de material "biorreconocible" en el lote sometido a prueba en relación con el lote de RS.

Tabla 7. La mezcla de polipéptidos de la invención: ELISA de tipo sándwich, resultados de la prueba de biorreconocimiento específico.

Principio activo (DS)		Datos de GP-HPLC	Resultados* % de desviación de unión	
N.º de lote		PM en el máx. de pico de HPLC	AcM 10F6/32	AcM 4B5/44
Mezcla de polipéptidos de la invención	1	(16.000 ± 2.500 Dalton) promedio para los tres lotes	4% (Pasa)	9% (Pasa)
	2		2% (Pasa)	4% (Pasa)
	3		3% (Pasa)	3% (Pasa)
GA	4	8050 Dalton	37% (No pasa)**	47% (No pasa)
	5	8000 Dalton	35% (No pasa)**	45% (No pasa)
	6	7100 Dalton	41% (No pasa)**	46% (No pasa)
El promedio de los valores de % de desviación de unión no debe ser de más del 25%				
* % de desviación de unión en relación con RS de la mezcla de polipéptidos de la invención				
** significativamente peor que la mezcla de polipéptidos de la invención				

La mezcla de polipéptidos de la invención se identifica mediante la prueba de inmunorreconocimiento y, tal como se muestra en la tabla 7, este método mostró alta selectividad para distinguir entre los lotes de mezcla de polipéptidos de la invención y de GA. De los dos lotes de mezcla de polipéptidos de la invención sometidos a prueba, pasaron ambos lotes (dieron resultados de prueba del 2-9% de desviación de unión), mientras que los tres lotes de GA no pasaron (dieron resultados de prueba del 35-47% de desviación de unión).

Los resultados se expresan como el promedio del % de desviación de unión de los lotes de mezcla de polipéptidos de la invención sometidos a prueba o DS de GA a los anticuerpos, en relación con la unión del lote de RS de la mezcla de polipéptidos de la invención (que se considera como el 100% de unión). Se considera aceptable un lote de DS de mezcla de polipéptidos de la invención si su % de desviación de unión absoluto promedio es de no más del 25%.

Ensayo de potencia relativa

Se determina *ex vivo* la potencia relativa de un lote de la mezcla de polipéptidos de la invención usando células T específicas de RS de la mezcla de polipéptidos de la invención. Se inmunizan ratones con 250 µg de RS de la mezcla de polipéptidos de la invención en adyuvante completo de Freund (CFA). De nueve a 11 días tras la inmunización, se sacrifican los animales y se prepara un cultivo primario de células de ganglios linfáticos (LN). Se incuban las células con diversas concentraciones de RS de la mezcla de polipéptidos de la invención y con muestras de la mezcla de polipéptidos de la invención. Tras 19-21 horas de incubación a 37°C en un incubador de CO₂ humidificado, se recogen los medios de cultivo y se miden los niveles de IL-2 mediante ELISA. Se somete a prueba la respuesta de las células T a cada lote de polipéptidos de la invención a cinco concentraciones (dentro del intervalo lineal) y para cada lote se calcula el % de potencia en relación con la del lote de RS de la mezcla de polipéptidos de la invención.

Tabla 8. La mezcla de polipéptidos de la invención: Resultados de la prueba de actividad inmunológica.

Principio activo (DS) N.º de lote		PM en el máx. de pico de HPLC	Prueba de potencia*	
			% de respuesta relativa	Pasa/No pasa
La mezcla de polipéptidos de la invención	(RS)	(16.000 ± 2.500 Dalton) promedio para los tres lotes	100%	Pasa
	1		95,3%	Pasa
	2		97,4%	Pasa
GA	(RS)	7200 Dalton	61,5%	No pasa
Valores de % de respuesta relativa de no menos del 80%				
* Actividad inmunológica en relación con RS de la mezcla de polipéptidos de la invención				

Tal como se muestra en la tabla 8, la prueba de potencia *ex vivo* mostró alta selectividad para distinguir entre los lotes de mezcla de polipéptidos de la invención y GA. Pasaron tres lotes de la mezcla de polipéptidos de la invención (resultados de prueba del 95,3% y el 97,4%) mientras que no pasó el lote de GA (resultado de prueba del 61,6%).

Prueba de bloqueo de EAE (modelo agudo en ratones)

La encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es una enfermedad autoinmunitaria del sistema nervioso central inducida en animales mediante inmunización con material del sistema nervioso central. El antígeno encefalitogénico usado para la inducción de EAE es el homogeneizado de médula espinal de ratón (MSCH). El bloqueo de EAE se define como la reducción de la incidencia (reducción en el número de ratones enfermos), así como la reducción en la intensidad de signos clínicos típicos de la enfermedad experimental (puntuación máxima media).

Se sumó la puntuación máxima de cada ratón en el grupo. La puntuación máxima media de un grupo es la puntuación promedio de los animales en el grupo. Se calculó la puntuación máxima del grupo:

(Σ puntuación máxima de cada ratón) / número de ratones en el grupo.

La razón de MMS es la razón de MMS de o bien el grupo de control de RS o bien la MMS del grupo en el que se somete a prueba el lote con respecto a la MMS del grupo de control de EAE. Se calculó la razón de MMS tal como sigue:

Razón de MMS = MMS del grupo / MMS del grupo de control de EAE

Se emulsiona el lote sometido a prueba de la mezcla de polipéptidos de la invención junto con el MSCH en CFA, y se inyecta a ratones que se sabe que son sensibles a EAE, es decir ratones híbridos F1 de la variedad SJL/J x BALB/C. Cada experimento incluye un grupo de control negativo (inducción de EAE sólo) y un grupo de control positivo al que se le inyecta el RS de la mezcla de polipéptidos de la invención en emulsión de MSCH. Se observan la incidencia y los signos clínicos en todos los grupos y se puntúan diariamente durante 20 días desde el 10º día tras

la inducción de EAE.

Se determina la actividad biológica de diferentes lotes de la mezcla de polipéptidos de la invención mediante su capacidad para bloquear la inducción de EAE en ratones, es decir, en la reducción del número de animales enfermos y la disminución de la gravedad de la enfermedad (puntuación clínica).

5 Tabla 9. La mezcla de polipéptidos de la invención: resultados de la prueba de bloqueo de EAE

N.º de lote	Porcentaje de actividad	Razón de puntuación máxima media	Conclusión
1	100	0,0	Pasa
2	100	0,0	Pasa
3	100	0,0	Pasa

Además, estudios inmunológicos y biológicos comparativos llevados a cabo recientemente con la mezcla de polipéptidos de la invención y GA demostraron que la mezcla de polipéptidos de la invención induce una respuesta inmunitaria y actividad biológica más intensas en EAE de ratón, que es un modelo experimental para MS (véase la comparación de la respuesta a la dosis entre GA y la mezcla de polipéptidos de la invención).

10 Comparación entre la mezcla de polipéptidos de la invención y GA con respecto a la dosis-respuesta en la prueba de bloqueo de EAE

Se llevaron a cabo estudios de dosis-respuesta con cuatro lotes de mezcla de polipéptidos de la invención que se compararon con la dosis-respuesta de GA [RS].

15 La especificación para la liberación para la prueba de bloqueo de EAE define una actividad de bloqueo de no menos del 80%.

Una comparación entre GA y la mezcla de polipéptidos de la invención presenta los siguientes valores aproximados y redondeados:

<u>Dosis</u>	<u>% de actividad de bloqueo</u>	
	<u>GA</u>	<u>La mezcla de polipéptidos de la invención</u>
25	50	57
50	45	74
75	43	89
100	68	88
150	80	100
250	100	100

20 Los datos indican que la mezcla de polipéptidos de la invención alcanza la actividad de bloqueo mínima del 80% ya a una dosis de aproximadamente 70 µg/ratón, mientras que es necesaria una dosis de al menos 150 µg/ratón de GA para alcanzar este nivel de actividad (Véase la figura 27).

4.4 Resumen de propiedades

La siguiente tabla resume los atributos fisicoquímicos y biológicos de la mezcla de polipéptidos de la invención.

Tabla 10. Propiedades de la mezcla de polipéptidos de la invención ejemplificada.

La mezcla de polipéptidos de la invención	
PRUEBA	RESULTADOS DE PRUEBA
Aspecto:	Material liofilizado blanco a ligeramente amarillento
Identificación: (mediante IR)	El IR de la mezcla de polipéptidos de la invención muestra los siguientes modos de vibración característicos - amida I a 1640 -1660 cm ⁻¹ - amida II a 1530 -1570 cm ⁻¹ cumple - COO ⁻ a 1380 -1420 cm ⁻¹ - amida III a 1240 -1300 cm ⁻¹
(mediante UV)	El espectro de UV de la mezcla de polipéptidos de la invención muestra un espectro característico a: Máx. I: aproximadamente 275 nm para el anillo aromático (tirosina) Máx. II: 195-210 nm para amida Hombro: 220 nm - 230 nm para tirosina y hélice α Las diferencias en las longitudes de onda de máx. I y máx. II entre disoluciones de muestra y patrón no debe superar ± 3 nm

Solubilidad:	Fácilmente soluble en agua en forma de sal de acetato
pH:	6,0*
Agua:	5,3% *

* promedio de 3 lotes

La mezcla de polipéptidos de la invención			
PRUEBA	RESULTADOS DE PRUEBA		
Peso molecular promedio: (al máximo de pico de HPLC)	16.000 ± 2.500 Dalton		
• a -1 D.E. (al menos el 84% de material)	No más de 41.000 Dalton		
• a +1 D.E. (al menos el 84% de material)	No menos de 7.000 Dalton		
Contenido en aminoácidos	Aminoácido	Fracción molar	Residuos de aminoácido totales(en una base sin agua)
	L-Glu	0,143	88,5% *
	L-Ala	0,435	
	L-Tyr	0,09 *	
L-Lys	0,332		
Contenido en acetato (en una base sin agua)	9,9% *		
Valoración (en una base sin agua)	96,6% *		
Metales pesados	LT 20 ppm*		
Grupo bencilo residual (expresado como bromuro de bencilo)	LT 0,10%*		
Residuos de tirosina bromados: (expresado como bromotirosina)	LT 0,2%*		
Impurezas/degradación	No más del 0,20% cada uno LT 0,03% *		
Productos mediante cromatografía RP	Totales: NMT 0,50% LT 0,03% *		
Derivados de dietilamida: (expresado como dietilamina)	864 ppm *		
Impurezas orgánicas volátiles - dioxano residual	LT 10ppm*		
Piperidina residual	LT 0,2% *		
Rotación óptica específica:	-70°*		
Dicroísmo circular n = 1	Medido en: Tampón Tampón + trifluoroetanol 0,91 0,93 (TFE) Sin cambio significativo. La conformación de hélice α está ya inicialmente en su máximo, es decir (~97,0%)		
Inmunorreconocimiento	*		
Unión por anticuerpos policlonales	NLT 85%		
Unión por dos anticuerpos monoclonales	NLT 85%		
Potencia relativa ex vivo	NLT 80%		

* promedio de 3 lotes

DESARROLLO FARMACÉUTICO

Jeringas precargadas Hypak®

- 5 En este ejemplo, la mezcla de polipéptidos de la invención es una disolución estéril envasada en jeringas precargadas Hypak® destinadas para inyección subcutánea. La composición del producto terminado se expone en la siguiente tabla:

Tabla 11. Composición cuantitativa de la inyección de la mezcla de polipéptidos de la invención

Nombre del componente	Dosis unitaria mg/ml	Dosis unitaria mg/ml	Dosis unitaria mg/ml	Dosis unitaria mg/ml
La mezcla de	5 mg	15 mg	30 mg	50 mg

polipéptidos de la invención				
Manitol	50 mg	45 mg	40 mg	35 mg
Agua para inyección	c.s. 1,0 ml	c.s. 1,0 ml	c.s. 1,0 ml	c.s. 1,0 ml

Se han preparado los cuatro tamaños de dosis diferentes enumerados anteriormente del producto terminado de la mezcla de polipéptidos de la invención para que puedan aplicarse en diferentes estudios clínicos, por ejemplo para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas.

Formulación iso-osmótica

- 5 El objetivo era desarrollar una formulación iso-osmótica de la mezcla de polipéptidos de la invención a concentraciones de 15 y 30 mg/ml en disolución de manitol, con un pH en el intervalo de 5,5 a 8,5, que es adecuado para una aplicación parenteral.

La siguiente tabla resume los datos de lotes experimentales del producto terminado de la mezcla de polipéptidos de la invención.

- 10 Tabla 12. Composición experimental de la inyección de la mezcla de polipéptidos de la invención

Excipiente	Cantidad de la mezcla de polipéptidos de la invención disuelta	pH de la disolución	Solubilidad	Valoración, %	Osmol/kg
Manitol 45 mg/ml	15 mg/ml	7,2	Disolución transparente	No realizada	0,300
Manitol 40 mg/ml	30 mg/ml	7,4	Disolución transparente	antes de la filtración 98,9% después de la filtración 102,0%	0,296

Debido a la similitud química entre la mezcla de polipéptidos de la invención y el acetato de glatirámico, se eligió el manitol como el excipiente adecuado ya que se usa para la producción de los productos terminados Copaxone®.

- 15 Se fabricaron tres conjuntos de las dosis de 15 mg y 30 mg del producto terminado, es decir un total de seis lotes, a partir de tres lotes diferentes de sustancia farmacológica activa para el desarrollo inicial con el fin de estudiar la estabilidad de la formulación mantenida en condiciones de almacenamiento a largo plazo y en condiciones aceleradas.

Ampollas

- 20 La siguiente tabla enumera los lotes de desarrollo de inyección de la mezcla de polipéptidos de la invención fabricados, llenados y sellados por fusión en ampollas de vidrio transparente de tipo I de la USP, de 1 ml, en condiciones totalmente asépticas en la sala de llenado de ampollas de la instalación de fabricación estéril, Teva Pharmaceutical Industries Ltd. Kfar-Sava, Israel. Los procedimientos usados para la combinación y la esterilización por filtración fueron similares a los usados para Copaxone®. Se almacenaron estos lotes de la disolución de mezcla de polipéptidos de la invención en ampollas de vidrio transparente de tipo I de la USP, de 1 ml selladas por fusión para eliminar un posible efecto de la jeringa y su tapón de goma sobre la estabilidad de la disolución. Se sometieron a prueba las ampollas a tiempo cero y se pusieron en espera en condiciones a largo plazo (2°C - 8°C) durante hasta 24 meses. Estas muestras servirán como controles, siempre que sea necesario.

PRUEBAS DE ESTABILIDAD DE PRODUCTO TERMINADO

Las condiciones de almacenamiento fueron las siguientes:

Condiciones de almacenamiento	Intervalos de prueba
Pruebas a largo plazo 2°C - 8°C	0, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses
Pruebas en condiciones aceleradas 25±2°C / HR del 60±5%	0, 1, 2, 3 y 6 meses

- 30 Se evaluó la estabilidad mediante pruebas físicas (color, transparencia y materia particulada), fisicoquímicas (pH, valoración e impurezas/productos de degradación), microbiológicas (esterilidad, endotoxinas bacterianas), biológicas (EAE), prueba de toxicidad anómala (seguridad) y pruebas funcionales.

Todos los parámetros fisicoquímicos, biológicos y microbiológicos del producto terminado estudiado para los sistemas de envasado propuestos permanecieron dentro de las especificaciones para cada condición de

almacenamiento durante el periodo de prueba citado.

Pruebas biológicas

EJEMPLO 1 - EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO

Prueba de EAE con preparación de diferente peso molecular promedio

- 5 Se produjeron varias preparaciones a escala de laboratorio (7 g cada una) de peso molecular promedio creciente (~12.000 Dalton – 20.000 Dalton) y se sometió a prueba su actividad biológica en modelos de EAE (aguda y crónica), y la prueba de potencia *ex vivo*. En esta prueba sólo se indica el peso molecular promedio mediante MALLS.

- 10 En modelos de EAE, se expresó la puntuación clínica usando parámetros de puntuación media diaria o puntuación máxima media. Estos parámetros mostraron la intensidad de signos clínicos típicos de la enfermedad experimental. Se observaron la incidencia y los signos clínicos en todos los grupos y se puntuaron diariamente durante 20 días desde el 10º día tras la inducción de EAE, oscilando los valores entre 0 para un comportamiento normal y 5 para la muerte. La puntuación media diaria era la media de las puntuaciones de todos los ratones en un grupo de prueba en un día dado. La puntuación máxima media era la suma de las puntuaciones máximas de todos los ratones en un grupo de prueba dividido entre el número de ratones en el grupo.

Se determinó la actividad biológica de las diferentes preparaciones mediante su capacidad para bloquear la inducción de EAE en ratones reduciendo el número de animales enfermos y disminuyendo la gravedad de la enfermedad (puntuación clínica).

- 20 Se sometieron a prueba las preparaciones de PM creciente en el modelo de bloqueo de EAE (aguda). Se trataron los ratones con 25 µg/ratón de o bien GA o bien las preparaciones. Se observaron los animales a lo largo de los siguientes 20 días y se registró su puntuación clínica diaria. El experimento comparó la actividad de bloqueo de EAE de las cinco preparaciones experimentales que diferían en su peso molecular, y RS de GA (figura 10).

- 25 Los resultados demostraron el efecto del aumento en el PM sobre la actividad biológica. A la dosis de 25 µg/ratón, la actividad de bloqueo de GA era subóptima mientras que las preparaciones con PM que oscilaba entre 15 y 20 KDa (tal como se determina mediante MALLS) fueron más eficaces en la inhibición de EAE aguda. Véase la figura 11.

EAE inducida por MOG (modelo crónico)

- 30 En este modelo, el antígeno encefalitogénico usado para la inducción de EAE fue glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG). Se inyectó la emulsión encefalitogénica (MOG + CFA enriquecido con MT 5 mg/ml) por vía s.c en el costado derecho de ratones C57BL/6J. De manera concomitante, se les inyectó la toxina Pertussis por vía intraperitoneal a una dosis volumétrica de 0,1 ml/ratón. Se repitió la inyección de toxina Pertussis después de 48 horas. Se inyectó un refuerzo de la emulsión encefalitogénica (MOG + CFA enriquecido con MT 5 mg/ml) por vía s.c. en el costado izquierdo una semana más tarde. Se administró la mezcla de polipéptidos de la invención diariamente, comenzando el primer día de aparición de signos clínicos, hasta el día 30 tras la inmunización.

- 35 Se comparó el efecto de las preparaciones sobre la EAE inducida por MOG crónica (un modelo crónico de EAE en el que se indujo EAE usando glicoproteína oligodendrocítica de mielina) con el de GA. Los resultados presentados en la figura 9 muestran que a la dosis de 50 µg/ratón, GA (7,5 Dalton) no es eficaz, mientras que la mezcla de polipéptidos de la invención (~16,0 kDalton) tuvo un efecto inhibitor significativo.

Evaluación del efecto biológico en función de la dosis usada

- 40 Se llevaron a cabo estudios de dosis-respuesta con RS de GA y la mezcla de polipéptidos de la invención (~16.000 Dalton) en la prueba de bloqueo de EAE en ratones. Los resultados se presentan en la figura 12.

- 45 Los resultados muestran que, a una dosis tan sólo 75 µg/ratón, la mezcla de polipéptidos de la invención mostró una actividad del 89%, y a una dosis de 150 µg/ratón, la actividad de supresión de EAE de la mezcla de polipéptidos de la invención era igual a la inducida por RS de GA a 250 µg/ratón (100%), de acuerdo con la mayor actividad inmunológica de la mezcla de polipéptidos de la invención. (En experimentos de dosis-respuesta con RS de GA, los lotes de GA ejercieron una actividad de bloqueo del 100% en el intervalo de dosis de 150 µg/ratón.)

EJEMPLO 2A - ÚNICA INYECCIÓN DE GA Y LA MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION

Toxicidad inducida por glutamato intravítreo en Ratones

- 50 Usando el modelo de citotoxicidad inducida en nervio óptico de ratón, se llevaron a cabo estudios para someter a prueba las posibles propiedades neuroprotectoras de la mezcla de polipéptidos de la invención. Se indujo una agresión en ratones mediante inyección intravítrea de glutamato a una concentración mostrada previamente para conducir a muerte de RGC que puede medirse después de una semana. El día de la inyección de glutamato (día 0) se anestesiaron ratones C57BL/6J macho con una edad de 1,5-2 meses y se perforó el ojo derecho de cada animal

con una aguja de calibre 27 en la parte superior de la esclerótica. A continuación, se insertó una jeringa Hamilton con una aguja de calibre 30 hasta el cuerpo vítreo y se inyectó un volumen total de 1 µl (200 nmol) de L-glutamato disuelto en solución salina. Cuatro días después de la inyección de glutamato, se anestesiaron los ratones y se inyectó un colorante neurotrazador retrógrado (FluoroGold) de manera estereotáctica en el colículo superior de cada hemisferio. Desde el colículo superior, se transporta el colorante de manera retrógrada a las RGC. Tres días más tarde, se sacrificaron los animales, se enuclearon sus ojos, y se desprendieron las retinas, se fijaron en paraformaldehído y se montaron de manera completa sobre filtros. Se contaron las células marcadas de cuatro campos seleccionados de idéntico tamaño. Los campos seleccionados estaban ubicados aproximadamente a la misma distancia del disco óptico para superar la variación en la densidad de RGC en función de la distancia del disco óptico. Se contaron las RGC bajo un microscopio de fluorescencia y se calculó el número promedio de RGC por campo en cada retina. Se usó el recuento de RGC en varias retinas contralaterales sin lesión como “control sano” con el fin de calcular el % de toxicidad. Para cada ratón, el grado de toxicidad neuronal inducida por la agresión con glutamato se calculó tal como sigue:

$$\% \text{ de toxicidad} = 100 - \left(\frac{\text{Recuento de RGC}_{\text{agresión con glutamato}}}{\text{Recuento de RGC}_{\text{control sano}}} \right) \times 100$$

- Se usó el siguiente cálculo para determinar el porcentaje medio de protección neuronal observado en cada grupo de tratamiento de ratones inmunizados:

$$\% \text{ de protección} = \left(\frac{\% \text{ de toxicidad}_{\text{grupo control}} - \% \text{ de toxicidad}_{\text{grupo tratado}}}{\% \text{ de toxicidad}_{\text{grupo control}}} \right) \times 100$$

Se determinó la significación estadística entre grupos usando la prueba de la t de Student.

Se llevó a cabo un conjunto de estudios en ratón con el fin de investigar si un tratamiento (inmunización) con una única inyección con GA y la mezcla de polipéptidos de la invención protegerían las RGC frente a la toxicidad inducida por glutamato. A continuación hay una lista de los grupos de tratamiento antes de la agresión a los que se asignaron los ratones a lo largo del conjunto de investigaciones. El número combinado de animales incluidos en cada grupo a lo largo del conjunto de investigaciones se indica entre paréntesis:

- 1) 25 µg/ratón de la mezcla de polipéptidos de la invención administrada en el día -7 antes de la agresión con glutamato. (n=15)
- 2) 75 µg/ratón de la mezcla de polipéptidos de la invención administrada en el día -7 antes de la agresión con glutamato. (n=22)
- 3) 75 µg/ratón de GA administrados en el día -7 antes de la agresión con glutamato. (n=91)
- 4) Sin pretratamiento administrado (“control de toxicidad”). (n=84)

Se disolvieron la mezcla de polipéptidos de la invención y GA en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se inyectó por vía subcutánea en el costado

Resultados

Los resultados presentados en la figura 2 muestran que tanto GA como la mezcla de polipéptidos de la invención protegieron las RGC frente a los efectos tóxicos de una agresión con glutamato intravítreo en ratones. El tratamiento con GA proporcionó una protección del 23%, mientras que el tratamiento con la mezcla de polipéptidos de la invención proporcionó una protección del 26% y el 22% en los grupos de dosis baja (25 µg/ratón) y alta (75 µg/ratón), respectivamente. Estos efectos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) con relación al recuento de RGC medido en el grupo de control negativo.

EJEMPLO 2B - EFECTO DE UNA ÚNICA INYECCIÓN SOBRE LA RESPUESTA INMUNITARIA A GA Y LA MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION

Se llevó a cabo una investigación para evaluar la respuesta inmunológica al tratamiento con GA y la mezcla de polipéptidos de la invención en ratones tras una única inyección. Se llevó a cabo el estudio a lo largo de un periodo de 7 días. Ratones C57BL/6J macho con una edad de 1,5-2 meses recibieron una única inyección de la mezcla de polipéptidos de la invención (75 µg/ratón) o GA (75 µg/ratón). Durante el periodo de estudio tras la inyección, se sacrificaron subconjuntos de animales en cada grupo de tratamiento en los días 1, 3 y 7 tras la inyección. Se extirparon los bazo y se preparó un cultivo primario de esplenocitos. Se activaron las células *in vitro* con la mezcla de polipéptidos de la invención o GA y se midió la secreción de citocinas usando kits de ELISA comerciales. En la figura 1, se representan gráficamente las concentraciones de IL-2, IL-10 y IFN-γ determinadas en los cultivos de

bazo en cada punto de tiempo en tres gráficos. No se detectó IL-4. Tomados en conjunto, los resultados muestran que una única inyección tanto de GA como de la mezcla de polipéptidos de la invención evocó una respuesta inmunológica, en la que se observó el efecto pico en el día 3 tras la inyección. Se encontró que la mezcla de polipéptidos de la invención era más inmunogénica que GA.

5 Resultados

La presencia de una respuesta inmunológica potenciada tras la administración de la mezcla de polipéptidos de la invención muestra que la mezcla de polipéptidos de la invención evoca una respuesta de células T beneficiosa que, por ejemplo media en la protección neuronal frente a la pérdida de RGC. Además, la respuesta de células T provocada por la mezcla de polipéptidos de la invención es superior a la respuesta de células T provocada por GA.

10 EJEMPLO 2C INYECCIONES SEMANALES

Se demostró que la inmunización con la mezcla de polipéptidos de la invención atenuaba la muerte de células neuronales inducida mediante exposición a niveles elevados del neurotransmisor excitotóxico, glutamato. El efecto neuroprotector depende de la activación y proliferación de la mezcla de polipéptidos de la invención de células T específicas. Usando el modelo de citotoxicidad inducida en nervio óptico de ratón, los inventores llevaron a cabo

15 estudios para someter a prueba las posibles propiedades neuroprotectoras de la mezcla de polipéptidos de la invención.

Se inmunizaron los ratones mediante inyecciones s.c. de 75 µg/ratón de la mezcla de polipéptidos de la invención, o 75 µg/ratón de GA, o control de solución salina tamponada con fosfato (PBS), administradas una vez a la semana, nueve inyecciones consecutivas desde el día -63 hasta el día -7 antes de la inducción de toxicidad por glutamato.

20 La figura 15 muestra que 9 inyecciones repetidas, administradas una vez a la semana, de 75 µg/ratón de o bien RS de GA o bien la TS de la mezcla de polipéptidos de la invención, proporcionan un efecto neuroprotector significativo sobre la supervivencia de células ganglionares de la retina (RGC) en el modelo de toxicidad por glutamato.

Inyecciones semanales repetidas de 75 µg de la mezcla de polipéptidos de la invención mostraron un efecto neuroprotector alto y significativo ($p < 0,01$). De manera similar, la administración semanal de GA al mismo nivel de

25 dosis dio como resultado un buen efecto neuroprotector ($p = 0,05$), aunque fue menor en comparación con el efecto de la mezcla de polipéptidos de la invención. Hubo un efecto placebo muy pequeño.

Estos datos demuestran que además de ser eficaz la mezcla de polipéptidos de la invención cuando se administra una vez a la semana, en este programa de administración la mezcla de polipéptidos de la invención es más eficaz que GA, respaldando por tanto un programa de administración semanal para la mezcla de polipéptidos de la

30 invención.

EJEMPLO 3 - ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS *IN VIVO*

Efecto de una única inyección sobre la respuesta inmunitaria a GA y la mezcla de polipéptidos de la invención

Se llevó a cabo una investigación para evaluar la respuesta inmunológica al tratamiento con GA y la mezcla de polipéptidos de la invención en ratones tras una única inyección. Se llevó a cabo el estudio a lo largo de un periodo de 7 días. Ratones C57BL/6J macho con una edad de 1,5-2 meses recibieron una única inyección de la mezcla de polipéptidos de la invención (75 µg/ratón) o GA (75 µg/ratón). Durante el periodo de estudio tras la inyección, se sacrificaron subconjuntos de animales en cada grupo de tratamiento en los días 1, 3 y 7 tras la inyección. Se extirparon los bazo y se preparó un cultivo primario de esplenocitos. Se activaron las células *in vitro* con la mezcla de polipéptidos de la invención o GA y se midió la secreción de citocinas usando kits de ELISA comerciales. En la

40 figura 1, se representan gráficamente las concentraciones de IL-2, IL-10 y IFN-γ determinadas en los cultivos de bazo en cada punto de tiempo en tres gráficos. No se detectó IL-4.

Tomados en conjunto, los resultados mostraron que una única inyección tanto de GA como de la mezcla de polipéptidos de la invención evocó una respuesta inmunológica, en la que se observó el efecto pico en el día 3 tras la inyección. En la mayor parte de los casos, se encontró que la mezcla de polipéptidos de la invención era más

45 inmunogénica que GA.

Respuesta inmunológica a inyecciones semanales frente a diarias en ratones (estudio de 3 semanas)

Basándose en el hecho de que se encontró que la mezcla de polipéptidos de la invención era más inmunogénica que GA *in vivo*, se evaluó el efecto de la mezcla de polipéptidos de la invención en un programa de administración menos frecuente que el de GA. Se llevó a cabo una investigación para evaluar el perfil inmunológico de una administración semanal de la mezcla de polipéptidos de la invención en ratones frente a una administración diaria de GA. Se llevó a cabo el estudio a lo largo de un periodo de 21 días (día 0 - día 21). Se les inyectó a los ratones una vez a la semana (total de 3 inyecciones) la mezcla de polipéptidos de la invención (75 µg/ratón) o diariamente GA (75 µg/ratón). Durante el periodo de estudio que siguió a cada una de las inyecciones, se sacrificaron subconjuntos de animales en cada grupo de tratamiento en los días 4 y 7 de cada semana, se extirparon los bazo y se

50

prepararon cultivos celulares primarios. Se sometió a prueba el efecto del tratamiento mediante activación *in vitro* de esplenocitos, y se monitorizó la respuesta de células T específicas mediante la detección de citocinas secretadas desde células activadas. En la figura 14, se muestran los resultados de las mediciones de IL-2.

Las inyecciones diarias de GA o inyecciones una vez a la semana de la mezcla de polipéptidos de la invención proporcionaron una respuesta inmunitaria similar de células T específicas de GA, tal como resulta evidente por la secreción de IL-2. Las inyecciones una vez a la semana de la mezcla de polipéptidos de la invención indujeron una fuerte secreción de IL-2 después de la primera inyección. Esta secreción disminuyó ("tolerancia") con inyecciones repetidas, en paralelo con 7-10 inyecciones diarias de GA. No se observaron diferencias significativas entre GA y la mezcla de polipéptidos de la invención administrados una vez al día o una vez a la semana, respectivamente. Se examinaron los niveles de citocinas adicionales, es decir IFN- γ , IL-10 e IL-4, en la totalidad de las tres semanas sometidas a prueba. Todas las citocinas determinadas en los cultivos de bazo mostraron un patrón similar de pico inicial, y una disminución posterior hasta niveles estacionarios bajos. Un experimento adicional que sometía a prueba el efecto de nueve inyecciones semanales consecutivas de la mezcla de polipéptidos de la invención mostró una respuesta inmunológica similar: una disminución en la secreción de todas las citocinas después de la tercera inyección.

EJEMPLO 4 - EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION

Respuesta neuroprotectora en el modelo de toxicidad por glutamato a inyecciones semanales en ratones (estudio de 9 semanas)

Habiéndose mostrado la respuesta inmunológica a la administración semanal de la mezcla de polipéptidos de la invención, se sometió a prueba el efecto de inyecciones semanales repetidas de la mezcla de polipéptidos de la invención sobre protección de RGC frente a la toxicidad por glutamato. Se inmunizaron los ratones mediante una inyección s.c. de 75 μ g/ratón de la mezcla de polipéptidos de la invención, o 75 μ g/ratón de GA, o control de PBS administrados una vez a la semana, nueve inyecciones consecutivas desde el día -63 hasta el día -7 antes de la inducción de toxicidad por glutamato. La figura 15 muestra que 9 inyecciones repetidas, administradas una vez a la semana, de 75 μ g/ratón de o bien RS de GA o bien el patrón de referencia de la mezcla de polipéptidos de la invención, proporcionan un efecto neuroprotector significativo sobre la supervivencia de RGC en el modelo de toxicidad por glutamato. Inyecciones semanales repetidas de 75 μ g de la mezcla de polipéptidos de la invención (~16.000 Dalton) mostraron un efecto neuroprotector alto y significativo ($p < 0,01$). De manera similar, la administración semanal de GA al mismo nivel de dosis dio como resultado un buen efecto neuroprotector ($p = 0,05$), aunque fue menor en comparación con el efecto de la mezcla de polipéptidos de la invención. Hubo un efecto placebo muy pequeño.

Estos datos demuestran que no sólo es eficaz la mezcla de polipéptidos de la invención cuando se administra una vez a la semana, en este programa de administración la mezcla de polipéptidos de la invención fue más eficaz que GA, respaldando por tanto un programa de administración semanal para la mezcla de polipéptidos de la invención.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Estudios de fraccionamiento de GA mostraron que péptidos caracterizados por un tamaño molecular y una hidrofobicidad aumentados muestran un efecto progresivamente mayor en pruebas tanto *in vivo* como *ex vivo*, es decir cuanto mayor es el peso molecular promedio, mayor es la actividad biológica y la inmunogenicidad. Estos estudios establecieron el fundamento básico para el desarrollo de la mezcla de polipéptidos de la invención como un producto mejorado para MS.

En efecto, la mezcla de polipéptidos de la invención mostró una potencia relativa aumentada *ex vivo*, anticuerpos específicos frente a GA reconocen la mezcla de polipéptidos de la invención y la interacción de los anticuerpos con la mezcla de polipéptidos de la invención produce una señal más intensa en ELISA en comparación con la de GA, en correlación con un aumento en PM de sus péptidos: cuanto mayor es el peso molecular promedio, mayor es la inmunogenicidad y la potencia.

Estos resultados estuvieron de acuerdo con el efecto de un aumento en el peso molecular promedio sobre la actividad *in vivo* en modelos de EAE tanto agudos como crónicos. Todos los lotes de la mezcla de polipéptidos de la invención mostraron mayor actividad en la prueba de bloqueo de EAE, en comparación con GA. A una dosis de tan sólo 100 μ g/ratón, lotes de la mezcla de polipéptidos de la invención redujeron la incidencia de ratones enfermos (% de actividad aumentado) y redujeron la gravedad de la enfermedad a un nivel similar al conferido por RS de GA a 250 μ g/ratón.

La mezcla de polipéptidos de la invención mostró una inmunogenicidad aumentada *in vivo*. Una única inyección tanto de GA como de la mezcla de polipéptidos de la invención evocó respuesta inmunológica, en la que se encontró que la mezcla de polipéptidos de la invención era más inmunogénica que GA. La presencia de una respuesta inmunológica potenciada tras la administración de la mezcla de polipéptidos de la invención proporcionó respaldo a la hipótesis de que la mezcla de polipéptidos de la invención evoca una respuesta de células T beneficiosa que media en la protección neuronal.

De acuerdo con la inmunogenicidad potenciada *in vivo* de la mezcla de polipéptidos de la invención, en estudios inmunológicos en ratones no se observaron diferencias significativas entre GA y la mezcla de polipéptidos de la invención administrados una vez al día o una vez a la semana, respectivamente. Las inyecciones diarias de GA o inyecciones una vez a la semana de la mezcla de polipéptidos de la invención proporcionaron una respuesta inmunitaria similar de células T específicas de GA.

Los estudios del efecto neuroprotector de la mezcla de polipéptidos de la invención mostraron que la inmunización activa con la mezcla de polipéptidos de la invención proporciona neuroprotección eficaz frente a la toxicidad por glutamato, lo que sugiere que la mezcla de polipéptidos de la invención es un agente neuroprotector que tendría beneficios clínicos en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos en los que el glutamato es un participante destacado tales como MS, ELA, enfermedad de Huntington y glaucoma.

Tomados en conjunto, estos hallazgos sugirieron que la mezcla de polipéptidos de la invención era eficaz cuando se administraba una vez a la semana, era más eficaz que GA, y por tanto puede conferir potencialmente un efecto terapéutico en MS cuando se administra a una menor frecuencia que GA, respaldando el programa de administración semanal para la mezcla de polipéptidos de la invención, y la administración semanal, mensual o bimensual en otros trastornos neurológicos.

EJEMPLO 5 - INYECCIONES MENSUALES DE LA MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION

Con el fin de investigar si un régimen de tratamiento mensual (inmunización) con la mezcla de polipéptidos de la invención protegería RGC frente a la toxicidad inducida por glutamato, se asignaron ratones a los siguientes grupos de tratamiento antes de la agresión:

- 1) 25 µg/ratón la mezcla de polipéptidos de la invención administrada una vez al mes (3 veces) antes de la agresión con glutamato, en los días -63, -35 y -7. (n=29)
- 2) 75 µg/ratón de la mezcla de polipéptidos de la invención administrada una vez al mes (3 veces) antes de la agresión con glutamato, en los días -63, -35 y -7. (n=38)
- 3) Sin pretratamiento administrado ("control negativo"). (n=38)

Se disolvió la mezcla de polipéptidos de la invención en PBS y se inyectó por vía subcutánea en el costado.

Resultados

Se presentan los resultados del estudio en la figura 3 que muestra los efectos protectores de la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC en los grupos de tratamiento inmunizados. Los resultados presentados en la figura 3 muestran que el tratamiento con la mezcla de polipéptidos de la invención protegió las RGC. El efecto observado fue mayor en el grupo tratado con administraciones repetidas mensuales de la mezcla de polipéptidos de la invención a una dosis de 75 µg/ratón (protección del 35%) ($p < 0,01$). Los resultados del estudio anterior muestran que la inmunización con la mezcla de polipéptidos de la invención proporciona neuroprotección eficaz frente a la toxicidad por glutamato, sugiriendo que la mezcla de polipéptidos de la invención puede tener beneficios clínicos en el tratamiento de trastornos degenerativos en los que el glutamato es un participante destacado, por ejemplo glaucoma, esclerosis múltiple y otras enfermedades neurodegenerativas. Farkas RH, Grosskreutz CL, Apoptosis, neuroprotection and retinal ganglion cell death: an overview, *Int Ophthalmol Clin* 2001, 41:111-130; Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB, Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells, *Vision Res* 1997, 37:3483-3493; Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Childlow G, Bae JH, Wood JPM, Nash MS, Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma, *Survey of Ophthalmology* 1999, 43(Sup. 1):S102-S128; y Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA, Elevated glutamate levels in the vitreous of humans and monkeys with glaucoma, *Arch Ophthalmol* 1996; 114:299-305.

EJEMPLO 6 - EFECTO DE INYECCIONES MENSUALES SOBRE LA RESPUESTA INMUNITARIA A LA MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION

Se llevó a cabo una investigación para evaluar el perfil inmunológico de la mezcla de polipéptidos de la invención en ratones durante el régimen de tratamiento mensual usado en el estudio anterior. El experimento duplicó el programa de administración mensual que se usó para someter a prueba las propiedades neuroprotectoras de la mezcla de polipéptidos de la invención tras una agresión con glutamato intravítreo.

Se llevó a cabo el estudio a lo largo de un periodo de 70 días (día 0 - día 70). Usando el mismo régimen de tratamiento mensual descrito anteriormente, se les inyectó a los ratones una vez al mes (total de 3 inyecciones) la mezcla de polipéptidos de la invención (75 µg/ratón) en tres ocasiones: los días 0, 28 y 56. Durante el periodo de estudio que siguió a cada una de estas inyecciones, se sacrificaron subconjuntos de animales en cada grupo de tratamiento en los días 3, 7, 14 y 28 tras la inyección. Para el tercer tratamiento, sólo se llevó a cabo el procedimiento 3, 7 y 14 días tras la inyección. Se determinó la secreción de citocinas desde cultivos primarios de bazo tal como se describió anteriormente.

En la figura 4, se representan gráficamente las concentraciones de IL-2, IFN- γ , IL-10 e IL-4 determinadas en los cultivos de bazo en cada punto de tiempo. Tomados en conjunto, los gráficos muestran que cada una de las tres administraciones de la mezcla de polipéptidos de la invención evocó una respuesta inmunológica.

EJEMPLO 7 - ESTUDIO DE SEIS MESES

- 5 Se trataron los ratones de manera mensual con 75 μ g/ratón de la mezcla de polipéptidos de la invención o GA, o de manera bimensual con la mezcla de polipéptidos de la invención. Se cultivaron esplenocitos y se midieron los niveles de citocinas en varios puntos de tiempo.

Resultados

- 10 En la figura 5, se muestran los resultados de toxicidad por glutamato. La protección del grupo de control positivo (GA en el día -7) es relativamente baja (el resultado esperado que hace que un experimento sea válido para la liberación de lotes es mayor del 20-25%), lo que puede atribuirse a la edad "avanzada" de los ratones. Todos los datos recopilados en este modelo hasta la fecha son en ratones de 8-12 semanas de edad. Sin embargo, con relación al grupo de control positivo del experimento, todos los grupos de tratamiento mostraron un % de protección similar o mayor. Además, el efecto de la administración bimensual de la mezcla de polipéptidos de la invención mostró ser
15 próxima a la significación estadística ($p=0,058$).

Es importante observar que los programas de administración tanto mensual (total de 6 inyecciones) como bimensual (total de 3 inyecciones) proporcionan una protección igual o mayor que una única inyección en el día -7, es decir inyecciones repetidas a estas frecuencias son neuroprotectoras.

- 20 En las figuras 6, 7 y 18, se muestran los resultados de inmunología. Se midieron los niveles de IL-2 tras cada inyección. Los resultados en la figura 6 muestran un rápido aumento y disminución en el primer ciclo, tal como se observa en experimentos previos, seguido por picos menores en cada uno de los cinco ciclos sucesivos. Los resultados actuales confirman la capacidad de la mezcla de polipéptidos de la invención para provocar una mayor respuesta de células T que GA. Los resultados también confirman la capacidad del tratamiento mensual para reforzar la respuesta inmunitaria, aunque a un nivel aproximadamente la mitad de la respuesta inicial. Esta
25 respuesta parece ser suficiente para mantener un efecto neuroprotector. Las inyecciones bimensuales de la mezcla de polipéptidos de la invención muestran la capacidad para reforzar la respuesta inmunitaria tras cada inyección, aunque a niveles progresivamente menores (figura 7). La figura 18 muestra el cambio TH1-TH-2 después de varias inyecciones, mostrando una disminución en la respuesta de IFN- γ y una respuesta de IL-10 estable si no creciente.

- 30 Los resultados también muestran que la respuesta inmunitaria se mantiene después de cada nueva inyección, tal como se indica por la presencia de un pico después de cada refuerzo.

EJEMPLO 8 - HIPERTENSIÓN OCULAR EN RATAS

Se sometió a prueba el efecto de la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC en un modelo de rata de PIO elevada de forma crónica, un factor de riesgo principal en el glaucoma.

Materiales y métodos

- 35 Se indujo un aumento unilateral en la PIO en ratas Lewis macho anestesiadas (con una edad de 8 semanas) mediante fotocoagulación láser de las venas limbares y episclerales. Las ratas recibieron dos tratamientos de cauterización con láser, separados una semana. Se midió la PIO una semana tras el segundo tratamiento con láser. El segundo tratamiento con láser estuvo seguido dos semanas más tarde por la aplicación de un neurotrazador retrógrado fluorescente de manera distal a la papila del nervio óptico. Un día después de la aplicación de colorante
40 (3 semanas después del tratamiento con láser inicial) se sacrificaron las ratas, se extirparon sus retinas, se fijaron en paraformaldehído y se montaron de manera completa sobre filtros. Se determinó la supervivencia de RGC mediante recuento de las células marcadas usando un microscopio de fluorescencia (de manera similar al procedimiento descrito anteriormente).

- 45 Para examinar el efecto de inmunización con la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC, las ratas recibieron una única inyección subcutánea de la mezcla de polipéptidos de la invención (0, 100, 250, 500 ó 1000 μ g/rata) antes del segundo tratamiento con láser. El número de animales sometidos a prueba en los grupos de 100, 250, 500, 1000 μ g/rata y en el grupo de control de vehículo (con inyección de PBS) fue de $n=11$, $n=13$, $n=12$, $n=7$ y $n=16$, respectivamente. (Véase la figura 8) Un grupo adicional de animales no tratados previamente no recibieron tratamiento con láser ($n=3$). Se calcularon "el % de protección" del tratamiento con la
50 mezcla de polipéptidos de la invención en relación con el tratamiento control (PBS), y la significación estadística del efecto, de la manera descrita en el ejemplo 2.

Resultados

En torno a una semana después de la última cauterización con láser, la PIO en ratas tratadas había aumentado hasta un promedio de aproximadamente 39 mm Hg (en comparación con una PIO de aproximadamente 17 mm Hg

en ratas Lewis normales) y permaneció aproximadamente a ese nivel después de eso. Además, el número de RGC supervivientes en las ratas tratadas con PBS se redujo en aproximadamente el 50% en relación al recuento de RGC obtenido de los animales no tratados previamente (no cauterizados). Estos datos indican que la hipertensión ocular, inducida en estos animales mediante cauterización con láser, dio como resultado una pérdida significativa de RGC, tal como predijo el modelo.

La figura 8 ilustra el efecto protector (“% de protección”) de la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC en los tres grupos de tratamiento inmunizados. El efecto beneficioso de la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC en condiciones de PIO elevada pareció depender de la dosis, proporcionando dosis crecientes de la mezcla de polipéptidos de la invención una protección de hasta aproximadamente el 43%. La dosis más eficaz es 500 µg/rata.

Inyecciones repetidas - protocolo de tratamiento.

Basándose en el estudio de dosis-respuesta descrito anteriormente, se eligió la dosis de 500 µg/rata de la mezcla de polipéptidos de la invención para someter a prueba el régimen de tratamiento de inyecciones repetidas. Para examinar el efecto del tratamiento semanal y mensual con la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC, las ratas recibieron inyección subcutánea repetida de 500 µg/rata de la mezcla de polipéptidos de la invención durante 12 semanas (tratamiento semanal: 11 inyecciones, tratamiento mensual: 3 inyecciones), empezando en el día del segundo tratamiento con láser. Un grupo de control recibió PBS semanal, un grupo de control positivo (PC) adicional recibió una única inyección de 500 µg/rata de la mezcla de polipéptidos de la invención en el día del segundo tratamiento con láser (día +7). El número de animales sometidos a prueba en todos los grupos fue de n=11.

La figura 19 ilustra el efecto protector (“% de protección”) de la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC en los grupos de tratamiento. Ambos tratamientos mensual y semanal fueron significativamente beneficiosos en comparación con control sin tratar, $p=0,029$ y $p=0,002$ respectivamente. El efecto del tratamiento semanal es mayor que el del tratamiento mensual pero no es estadísticamente significativo.

Inyecciones repetidas - protocolo de prevención.

Para examinar el efecto del tratamiento semanal y mensual con la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC, las ratas recibieron inyección subcutánea repetida de 500 µg/rata de mezcla de polipéptidos de la invención durante 12 semanas (tratamiento semanal: 11 inyecciones, tratamiento mensual: 3 inyecciones), empezando 63 días antes del segundo tratamiento con láser, siendo la última inyección para todos los grupos en el día del segundo tratamiento con láser. Un grupo de control recibió PBS semanal, un grupo de control positivo (PC) adicional recibió una única inyección de 500 µg/rata de mezcla de polipéptidos de la invención en el día del segundo tratamiento con láser (día +7). El número de animales sometidos a prueba en los grupos semanal, mensual, de PBS y control positivo fue de n=10, n=10, n=12 y n=7, respectivamente.

La figura 20 ilustra el efecto protector (“% de protección”) de mezcla de polipéptidos de la invención sobre la supervivencia de RGC en los grupos de tratamiento. Ambos tratamientos mensual y semanal fueron significativamente beneficiosos en comparación con control sin tratar, $p<0,001$. El efecto de tratamiento semanal es significativamente mayor que el del tratamiento mensual ($p<0,001$), aunque ambos regímenes son muy eficaces.

EJEMPLO 9 - LA MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION EN UN MODELO DE COLITIS INDUCIDA POR ÁCIDO TRINITROBENCENOSULFÓNICO (TNBS)

Las enfermedades inflamatorias del intestino son enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Ambas se caracterizan por inflamación crónica de diversos lugares en el tracto gastrointestinal (GI). La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria transmural crónica inespecífica que afecta de la manera más común a la parte distal del íleo y el colon pero puede aparecer en cualquier parte del tracto GI (Merck Manual of Diagnosis and Therapy (1999), Merck Research Laboratories, (Whitehouse Station, NJ), 302-312). La colitis ulcerosa es una enfermedad ulcerosa e inflamatoria crónica que surge en la mucosa colónica (Merck Manual of Diagnosis and Therapy (1999), Merck Research Laboratories, (Whitehouse Station, NJ), 302-312).

Se trataron ratones CSJL con o bien dos administraciones de la mezcla de polipéptidos de la invención en los días -10 y -4 o bien dos administraciones de GA (días -10 y -4) o administraciones diarias de GA. Se administró budenosida por vía intrarrectal en los días -1, 0 y 1. Se indujo enfermedad mediante sensibilización de la piel con TNBS en el día -7 y sensibilización rectal con TNBS en el día 0. Se sacrificaron los animales en el día 2. Los parámetros de lectura fueron pérdida de peso, diarrea, acortamiento del colon y análisis histológico. Se presentan los resultados en la figura 16.

En el día -7, se aplicó una disolución de 3,75 mg de TNBS en 150 µl de etanol al 48% sobre la piel afeitada de ratones CSJL. En el día 0, se anestesiaron los animales con isoflurano, después de que se administrara 1,0 mg de TNBS en 100 µl de etanol al 40% por vía rectal.

Se sacrificaron los ratones en el día 2, se disecaron los colonos de los animales y después de la retirada de las

heces, se determinaron el peso y la longitud de los colones.

Se fijó el colon en formalina tamponada al 4% y se incrustó en parafina. Se tiñeron secciones de tejido (5 µm) del tejido de colon fijado con formalina, con hematoxilina/eosina/azafrán y se evaluaron con respecto a la extensión de inflamación y daño tisular. Se realizó una clasificación histológica de un modo ciego. La puntuación de cada campo de aumento osciló entre 0 y 4 (cuanto mayor es la puntuación, más grave es la enfermedad) (véase la figura 17).

Los ratones tratados por vía rectal con budesonida desarrollaron colitis significativamente menos grave que los ratones tratados con vehículo, evidente a partir de una pérdida de peso significativamente menor, una menor puntuación clínica, menos enrojecimiento del colon y una menor puntuación histológica.

Este estudio mostró que la mezcla de polipéptidos de la invención inhibe el desarrollo de colitis inducida por TNBS. La mezcla de polipéptidos de la invención tuvo un efecto significativo y beneficioso sobre el peso corporal, la puntuación clínica, el enrojecimiento del colon y la puntuación histológica. (Véase las figuras 20 y 21).

Independientemente de la dosificación, la mezcla de polipéptidos de la invención inhibió la extensión y gravedad de la inflamación y el daño tisular presente tanto en la mitad rectal como en la mitad proximal del colon.

La mezcla de polipéptidos de la invención fue más eficaz a una dosificación de 75 µg, 500 µg y 2 mg por ratón. La respuesta a la dosis para la mezcla de polipéptidos de la invención tuvo forma de campana, lo que es característico de la actividad de inmunomoduladores.

EJEMPLO 10 - ACTIVIDAD DE LA MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION EN EL MODELO DE DSS DE RATÓN BALB/C

Se sometieron ratones Balb/c a inducción de colitis experimental proporcionando DSS al 3,5% en el H₂O de bebida, suministrada de manera continua a voluntad durante un periodo de 7 días, seguido posteriormente por 3 días de H₂O de bebida regular hasta la finalización del estudio en el día de estudio 10. Se midió la actividad de la enfermedad con los siguientes parámetros: mortalidad; peso corporal; puntuación clínica y longitud del colon.

Puntuación	% de pérdida de peso	Signos clínicos (consistencia de las deposiciones y hemorragia rectal)
0	< 0	Normales / formadas
1	0-4,9	Pasadas / formadas
2	5-9,9	Pastosas / no formadas a blandas
3	10-20	Diarrea o restos de sangre en las deposiciones
4	> 20	Hemorragia rectal macroscópica
5	Muerte	Muerte

Fue evidente la colitis inducida por DSS en el grupo de control (PBS), tal como se observa por la mortalidad (30%), pérdida de peso, gravedad clínica y acortamiento del colon. El tratamiento con tanto GA como con la mezcla de polipéptidos de la invención mejoró la gravedad clínica. El régimen de tratamiento de 100 mg/kg (2 mg/ratón) de la mezcla de polipéptidos de la invención administrada en los días 0, 4 y 8, demostró ser más eficaz que el tratamiento diario. Hubo una mejora dependiente de la dosis en el desenlace clínico usando la mezcla de polipéptidos administrada en 3 ocasiones (días 0, 4 y 8).

EJEMPLO 11 - PRUEBAS CLÍNICAS

Glaucoma

El glaucoma es un grupo de enfermedades oculares caracterizadas por un daño progresivo de los ojos debido al menos parcialmente a elevada presión intraocular (PIO) ("Glaucoma", Merck Manual of Diagnosis and Therapy (1999), Merck Research Laboratories, (Whitehouse Station, NJ), 733-738). Adicionalmente, el glaucoma se caracteriza por muerte de células ganglionares de la retina (RGC), pérdida axónica y un aspecto excavado de la papila del nervio óptico (Alward, "Medical Management of Glaucoma", N Eng J Med, 1998; 339:1298-1307). El glaucoma puede diagnosticarse antes de que se produzca pérdida de visión mediante pruebas del campo visual y mediante examen oftalmoscópico del nervio óptico para detectar "excavación". El tratamiento del glaucoma se basa en disminuir la PIO para prevenir el daño adicional del nervio óptico. La PIO media en adultos normales es de 15 a 16 mm Hg; el intervalo normal es de 10 a 21 mm Hg. La primera etapa en el tratamiento del glaucoma se basa en disminuir la PIO usando medicamentos aplicados de manera tópica (Coleman, "Glaucoma", Lancet, 1999; 354:1803-1810). Actualmente, existen cinco clases principales de medicamentos que se usan para reducir la PIO: antagonistas β-adrenérgicos, agonistas adrenérgicos, parasimpaticomiméticos, análogos similares a prostaglandina e inhibidores de anhidrasa carbónica (Medeiros, *et al.*, "Medical Backgrounders: Glaucoma", Drugs of Today 2002; 38:563-570). Aunque la mayor parte de los medicamentos se aplican de manera tópica al ojo, pueden provocar graves efectos secundarios sistémicos y afectar adversamente a la calidad de vida del paciente. Si está indicada una

- reducción adicional de la PIO o si el medicamento no puede reducir suficientemente la PIO, la trabeculoplastia láser es habitualmente la siguiente etapa. Si todavía no se controla de manera adecuada la PIO, está indicada cirugía incisional para glaucoma (*id.*). La reducción de la PIO, aunque reduce significativamente la extensión de la pérdida neuronal, no garantiza el cese del proceso patológico, porque puede continuar la pérdida de células ganglionares de la retina (RGC). Estudios recientes de la asociación entre regulación de PIO y pérdida de campo visual después de intervención médica o quirúrgica mostraron que puede disminuirse la pérdida neuronal en curso reflejada en pruebas del campo visual si la PIO es baja. Sin embargo, puede seguir produciéndose pérdida neuronal después de la reducción de la PIO (Bakalash, *et al.*, "Resistance of Retinal Ganglion Cells to an Increase in Intraocular Pressure is Immune-dependent", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:2648-2653).
- 5 Parece resultar neuropatía óptica glaucomatosa de cambios fisiopatológicos específicos y la muerte posterior de RGC y sus axones. Se cree que el procedimiento de muerte de RGC es bifásico: una lesión primaria responsable del inicio del daño seguido por una degeneración secundaria, menor atribuible al entorno hostil que rodea a las células con degeneración (Kipnis, *et al.*, "T Cell Immunity To Copolymer 1 Confers Neuroprotection On The Damaged Optic Nerve: Possible Therapy For Optic Neuropathies", *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:7446-7451).
- 10 Se ha mostrado que los mecanismos de muerte de RGC en modelos con animales experimentales de glaucoma y glaucoma humano implican apoptosis. Aunque no se ha identificado el mecanismo molecular que desencadena la apoptosis, se sospecha que la privación de factores neurotróficos, isquemia, elevación crónica del glutamato y metabolismo desorganizado del óxido nítrico son posibles mecanismos (Farkas, *et al.*, "Apoptosis, Neuroprotection and Retinal Ganglion Cell Death: An Overview", *Int Ophthalmol Clin* 2001; 41:111-130). Además, no sería sorprendente si los mecanismos que conducen a muerte de RGC compartiesen características comunes con otros tipos de lesión neuronal, tales como señalización por especies de oxígeno reactivas, despolarización de mitocondrias o inducción de muerte celular regulada de manera transcripcional (Weinreb, *et al.*, "Is Neuroprotection a Viable Therapy for Glaucoma?" *Arch Ophthalmol* 1999; 117:1540-1544).
- 15 Se ha planteado la hipótesis de que una liberación excesiva del aminoácido excitador, glutamato en la retina puede contribuir a la muerte celular. El glutamato es un importante neurotransmisor en la retina, pero cuando se libera en exceso puede ser tóxico para las RGC. Por tanto, es esencial que los niveles de glutamato se regulen estrechamente dentro de la retina. La toxicidad por glutamato parece estar mediada, al menos en parte, a través de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) que pueden permitir la entrada de cantidades excesivas de calcio. El aumento en el calcio intracelular parece activar la enzima óxido nítrico sintasa, que genera especies de oxígeno reactivas. Estos radicales libres destruyen en última instancia la célula. Se ha propuesto que isquemia neuronal como el mecanismo subyacente a la elevación de glutamato observada en glaucoma (Sucher, *et al.*, "Molecular Basis of Glutamate Toxicity in Retinal Ganglion Cells", *Vision Res* 1997; 37:3483-3493; Osborne, *et al.*, "Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma", *Survey of Ophthalmology* 1999; 43(Sup. 1):S102-S128).
- 20 En el cerebro, se han visto implicadas anomalías en el glutamato en varias enfermedades neurológicas, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y epilepsia (Sucher, *et al.*, "Molecular Basis of Glutamate Toxicity in Retinal Ganglion Cells", *Vision Res* 1997; 37:3483-3493). Se han encontrado concentraciones elevadas de glutamato en el cuerpo vítreo de pacientes con glaucoma y también en monos con glaucoma experimental (Dreyer, *et al.*, "Elevated glutamate levels in the vitreous of humans and monkeys with glaucoma", *Arch Ophthalmol* 1996; 114:299-305). Sin embargo, aún sigue siendo incierto si las anomalías del metabolismo del glutamato desempeñan un papel causal o bien en la muerte glaucomatosa primaria de RGC o bien en la degeneración secundaria de RGC.
- 25 En los últimos años, ha habido un interés creciente en la prevención de la progresión de la neuropatía óptica glaucomatosa usando enfoques basados en la premisa de que el glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa (Fisher, *et al.*, "Vaccination for Neuroprotection in the Mouse Optic Nerve: Implications for Optic Neuropathies", *J Neurosci* 2001; 21:136-142). La neuroprotección del nervio óptico glaucomatoso sería por tanto un paradigma terapéutico complementario para su uso con tratamientos de reducción de PIO convencionales (Schwartz, *et al.*, "Potential Treatment Modalities for Glaucomatous Neuropathy: Neuroprotection and Neurodegeneration", *J. Glaucoma* 1996; 5:427-432). La investigación condujo al desarrollo del concepto de "autoinmunidad protectora", es decir una respuesta fisiológica en la que células T autorreactivas confieren protección frente a la neurodegeneración (Schwartz, *et al.*, "Protective Autoimmunity Against the Enemy Within: Fighting Glutamate Toxicity", *Trends in Neurosciences*, 2003; 26:297-302; Moalem, *et al.*, "Autoimmune T Cells Protect Neurons from Secondary Degeneration after Central Nervous System Axotomy", *Nat Med* 1999; 5:49-55).
- 30 La neuroprotección es un paradigma terapéutico novedoso para ralentizar o prevenir la degeneración y muerte de neuronas para mantener su función fisiológica. Una ventaja importante de la estrategia neuroprotectora es que permite el tratamiento de una enfermedad para la que la etiología específica o bien se desconoce o bien difiere entre los pacientes. Esto es particularmente relevante para el tratamiento de glaucoma cuando la neuroprotección debe ser eficaz independientemente de si el glaucoma de un paciente particular se debe a mecanismos patológicos primarios o secundarios (Weinreb, *et al.*, "Is Neuroprotection a Viable Therapy for Glaucoma?", *Arch Ophthalmol* 1999; 117:1540-1544). Aunque disminuyen significativamente la pérdida neuronal, los medicamentos reductores de la PIO actuales no detienen la naturaleza progresiva del glaucoma, y la pérdida de RGC puede continuar incluso

después de que se haya reducido la PIO. Por tanto, la mayor necesidad médica no satisfecha en el glaucoma es un agente terapéutico que pueda proteger el tejido ocular frente a la degeneración continuada.

Se han propuesto varios enfoques para la neuroprotección en el glaucoma. Se ha sugerido un enfoque neuroprotector que se basa en suministrar neurotrofinas a la retina para compensar la privación de neurotrofinas derivadas de diana que resultan del bloqueo del transporte axoplásmico retrógrado (Weinreb, *et al.*, "Is Neuroprotection a Viable Therapy for Glaucoma?", *Arch Ophthalmol* 1999; 117:1540-1544). La memantina, un antagonista de N-metil-D-aspartato (NMDA), redujo la pérdida de células ganglionares en un modelo de rata de isquemia retiniana inducida por PIO (Lagreze, *et al.*, "Memantine is Neuroprotective in a Rat Model of Pressure-induced Retinal Ischemia", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:1063-1066) y está sometiéndose a prueba actualmente en ensayos clínicos con pacientes con glaucoma (Vision Newsletter, otoño de 2002, <http://www.ucsfeye.net/visionfal02p2.shtml>). En un modelo de rata de alta PIO, la vacunación con Cop-1 reduce significativamente la muerte inducida por presión de RGC (Schwartz, "Neurodegeneration and Neuroprotection in Glaucoma: Development of a Therapeutic Neuroprotective Vaccine: the Friedenwald Lecture", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:1407-1411; Bakalash, *et al.*, "Antigenic Specificity of Immunoprotective Therapeutic Vaccination for Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:3374-3381; Schwartz M., "Neuroprotection as a Treatment for Glaucoma: Pharmacological and Immunological Approaches", *Eur J Ophthalmol* 2003; 13:S27-31).

Investigaciones recientes mostraron que puede obtenerse la neuroprotección de nervios ópticos de rata con lesión por aplastamiento mediante inmunización activa con GA en el día de la lesión y mediante transferencia adoptiva de células T reactivas con GA (Kipnis, *et al.*, "T Cell Immunity To Copolymer 1 Confers Neuroprotection On The Damaged Optic Nerve: Possible Therapy For Optic Neuropathies", *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:7446-7451). GA demostró propiedades neuroprotectoras en un modelo de toxicidad inducida por glutamato en ratones y en un modelo de rata de presión intraocular elevada (PIO) protegiendo a los animales frente a la pérdida de RGC infligida mediante inyección intravítrea de glutamato (Schori *et al.*, "Vaccination for Protection of Retinal Ganglion Cells Against Death From Glutamate Cytotoxicity and Ocular Hypertension: Implications for Glaucoma", *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:3398-3403). Además, en el modelo de hipertensión ocular de rata, que simula el glaucoma, la inmunización con GA redujo significativamente la pérdida de RGC desde el 27,8% hasta el 4,3%, sin afectar a la PIO (*id.*). La vacunación con GA dio como resultado neuroprotección significativa en modelos de rata de glaucoma crónico y por aplastamiento del nervio óptico (Schwartz, "Vaccination for Glaucoma: Dream or Reality?", *Brain Res Bull.* 2004; 62(6):481-4). Se usan células T activadas específicas de GA para promover la regeneración nerviosa o para prevenir o inhibir los efectos degenerativos secundarios que pueden seguir a una lesión primaria del sistema nervioso o los efectos de procesos neurodegenerativos provocados por una enfermedad o un estado incluyendo glaucoma (publicación de solicitud de patente estadounidense 2002-0037848 A1, publicada el 28 de marzo de 2002 (Eisenbach-Schwartz *et al.*); publicación de solicitud de patente estadounidense 2003-0004099 A1, publicada el 2 de enero de 2003 (Eisenbach-Schwartz *et al.*)).

Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad autoinmunitaria debilitante caracterizada por la destrucción de mielina (desmielinización) en el sistema nervioso central. La esclerosis múltiple con recaídas-remisiones (RR MS) es la forma más común de la enfermedad en el momento del diagnóstico inicial (Noseworthy, *et al.*, "Multiple Sclerosis", *N Engl J Med* 2000; 343:938-952). Aunque los pacientes con RR MS tienen normalmente manifestaciones leves entre recaídas inicialmente, casi el 60% experimentan una evolución progresiva secundaria 15 años después del diagnóstico. Esta proporción aumenta al 90% a los 25 años después del inicio de la enfermedad, que deja a la mayoría de los pacientes incapacitados a una edad relativamente joven (Bjartmar, *et al.*, "Pathological Mechanisms and Disease Progression of Multiple Sclerosis: Therapeutic Implications", *Drugs of Today* 2002; 38:17-29).

La prevalencia de MS varía considerablemente por todo el mundo. (National Multiple Sclerosis Society, disponible en <http://www.nationalmssociety.org>) La mayor prevalencia se encuentra en el norte de Europa, el sur de Australia y la parte central de Norteamérica. A nivel mundial, MS puede afectar a 2,5 millones de individuos. Los motivos de la variación en la prevalencia e incidencia de MS en todo el mundo no se entienden. Se han ofrecido explicaciones ambientales y genéticas, y probablemente ambos factores desempeñan un papel. Normalmente, los pacientes se diagnostican entre los 20 y 50 años de edad. Se encuentra MS de dos a tres veces más en mujeres que en hombres. Se desconoce la base de esta diferencia (National Multiple Sclerosis Society, <http://www.nationalmssociety.org>).

Ha resultado un avance en el tratamiento de MS sustancialmente por la disponibilidad de cuatro agentes modificadores de enfermedad inyectables: interferón beta-1b (Betaseron®), interferón beta-1a intramuscular (Avonex®) e interferón beta-1a subcutáneo (Rebif®) y acetato de glatirámico (Copaxone®). Después de varios años de experiencia con estos fármacos, se ha llegado al consenso de que estos agentes reducen una futura incapacidad y mejoran la calidad de vida para muchos individuos con R-R MS. Por tanto, se recomienda que la terapia inmunomoduladora debe comenzar poco después del diagnóstico de R-R MS y continuar durante muchos años. (Freedman MS, Blumhardt LD, Brochet B, Comi G, Noseworthy JH, Sandberg-Wollheim M, Soelberg Sørensen P y the Paris Workshop Group. International consensus statement on the use of disease-modifying agents in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2002; 8:19-23.)

La elección del agente específico sigue dependiendo enormemente de la opinión del médico de su potencia relativa y la tolerancia prevista del paciente a los efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Copaxone® generalmente se tolera bien y puede ser el más eficaz para pacientes con incapacidad leve con un diagnóstico reciente de MS que desean iniciar el tratamiento pronto en la evolución de la dolencia (Noseworthy, *et al.*, "Multiple Sclerosis", N Engl J Med 2000; 343:938-952).

Evidencias experimentales recientes implican al glutamato, el principal neurotransmisor en el cerebro de mamíferos, como importante factor contribuyente en la patogenia de MS. Se había encontrado que los niveles de glutamato estaban elevados en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con MS, y su concentración se asocia con la gravedad y la evolución de la enfermedad. Esta excitotoxicidad, secundaria a autoinmunidad, podría en efecto subyacer en una parte sustancial de las lesiones observadas en MS (Matute, *et al.*, "The Link Between Excitotoxic Oligodendroglial Death and Demyelinating Diseases", Trends Neurosci. 2001; 24:224-30; Gilgun-Sherki, *et al.*, "Riluzole Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Implications for the Treatment of Multiple Sclerosis", Brain Res. 2003; 989:196-204).

Basándose en lo anterior, están emprendiéndose dos ensayos clínicos.

Ensayo clínico de glaucoma

Un estudio multicéntrico, doble ciego aleatorizado, controlado por placebo, de múltiples dosis y de tres ramas para evaluar la tolerabilidad, seguridad y la eficacia de inyecciones subcutáneas de la mezcla de polipéptidos de la invención en pacientes con neuropatía óptica glaucomatosa que corre un alto riesgo de progresar. El estudio está diseñado para evaluar la tolerabilidad, seguridad y la eficacia de múltiples inyecciones subcutáneas de la especialidad farmacéutica en investigación en esta población de pacientes. El objetivo secundario del estudio es evaluar la respuesta inmunológica en pacientes tras múltiples inyecciones subcutáneas de la mezcla de polipéptidos de la invención. El estudio dura un año o más e incluye sujetos de sexo masculino y femenino que padecen glaucoma de ángulo abierto que cumplen con los criterios de alto riesgo de progresar. El sujeto recibe placebo o la mezcla de polipéptidos de la invención (5, 15, 30 ó 50 mg) en inyecciones subcutáneas o bien semanales o bien mensuales. Los sujetos acuden a los centros del estudio de manera periódica para evaluaciones de seguridad, inmunológicas y de eficacia (funcional y estructural) a lo largo de todo el periodo de estudio.

Resultados

Los pacientes tratados con la mezcla de polipéptidos de la invención muestran un aumento en la respuesta inmunológica a la mezcla de polipéptidos de la invención en comparación con el grupo que recibe el placebo. Adicionalmente, el grupo que recibe la mezcla de polipéptidos de la invención demuestra una protección aumentada frente a la pérdida de RGC y una consiguiente intensidad reducida de los síntomas de glaucoma, por ejemplo atrofia reducida del nervio óptico, en comparación con el grupo que recibe el placebo. Los pacientes que reciben la mezcla de polipéptidos de la invención también demuestran una pérdida reducida del campo visual y una conservación aumentada de la retina y de la integridad estructural del nervio óptico.

Ensayo clínico de esclerosis múltiple

Los ensayos clínicos de la mezcla de polipéptidos de la invención para MS son estudios piloto abiertos diseñados para evaluar la eficacia, tolerabilidad y seguridad de una inyecciones subcutáneas vez a la semana de la mezcla de polipéptidos de la invención (15 mg o 30 mg) en pacientes con MS con recaídas-remisiones (n = 25 pacientes por estudio). Los estudios de obtención de imágenes mediante resonancia magnética (IRM) proporcionan las evidencias más firmes de un efecto neuroprotector en pacientes con MS. Se evalúa el efecto de la mezcla de polipéptidos de la invención mediante el cambio desde el nivel inicial en el número total de lesiones con potenciación por gadolinio en T₁. Se evalúa la respuesta inmunológica a la mezcla de polipéptidos de la invención.

Se han desarrollado varias concentraciones diferentes de la mezcla de polipéptidos de la invención. En la tabla 13, se presenta la composición completa de una única jeringa precargada de 15 mg o 30 mg de la mezcla de polipéptidos de la invención.

Tabla 13. Composición de dos concentraciones de la mezcla de polipéptidos de la invención en una jeringa precargada

Componente	Concentración de la mezcla de polipéptidos de la invención		Función
	15 mg	30 mg	
La mezcla de polipéptidos de la invención (mg)	15	30	Principio activo
Manitol (mg)	45,0	40,0	Excipiente (agente de carga)
Agua para inyección	c.s. hasta 1,0 ml	c.s. hasta 1,0 ml	Disolvente

Las condiciones de almacenamiento para las jeringas precargadas de la mezcla de polipéptidos de la invención fueron refrigeración (de 2° a 8°C/de 36° a 46°F). Sin embargo, se mostró que desviaciones de las condiciones de almacenamiento recomendadas a condiciones de temperatura ambiente (de 15° a 30°C/de 59° a 86°F) durante hasta una semana no tuvieron ningún impacto sobre el producto.

- 5 Actualmente están en marcha dos estudios de fase II, piloto abiertos en pacientes con RR-MS. Estos estudios están diseñados para evaluar la eficacia, tolerabilidad, seguridad y la inmunogenicidad de inyecciones s.c. una vez a la semana de la mezcla de polipéptidos de la invención (15 mg o 30 mg) en pacientes con MS. Específicamente, los estudios evalúan inyecciones una vez a la semana de la mezcla de polipéptidos de la invención sobre la actividad de la enfermedad en IRM tal como se refleja por el número total de lesiones con potenciación por gadolinio [Gd] en T1 y nuevas lesiones en T2; y para evaluar la tolerabilidad y seguridad de la mezcla de polipéptidos de la invención en sujetos con R-RMS.

Diseño	Se evalúan los sujetos en centros de estudio en diez visitas programadas: semanas -10 (selección), -6, 0 (nivel inicial); una semana tras el nivel inicial (visita 1); y en las semanas 4, 12, 24, 28, 32 y 36 (finalización). Tras las evaluaciones antes del tratamiento en las semanas -10 (selección), -6 y 0 (nivel inicial), se incluyen los sujetos elegibles y reciben inyecciones una vez a la semana de la mezcla de polipéptidos de la invención durante un periodo de 36 semanas. Los sujetos se someten a 3 exploraciones mediante IRM antes del tratamiento tal como sigue: semana -10 (selección), semana -6 y 14-18 días antes de la visita de la semana 0 (nivel inicial); y 4 exploraciones mediante IRM durante el tratamiento en las semanas 12, 28, 32 y 36 (finalización).
Medidas de desenlace	<u>Criterio de valoración primario de eficacia</u> Cambio en la suma de lesiones de potenciación por Gd en T1 medida antes del tratamiento (semanas -10 [selección]; -6; y 14-18 días antes de la semana 0 [nivel inicial]) con respecto a la suma de lesiones de potenciación por Gd en T1 medida en el último trimestre del estudio (semanas 28, 32 y 36 [finalización]). <u>Criterio de valoración secundario de eficacia</u> Cambio en la suma de nuevas lesiones en T2 desde antes del tratamiento (semanas -6 y 0 [nivel inicial]) con respecto a la suma de nuevas lesiones en T2 en las últimas 2 visitas de tratamiento (semanas 32 y 36 [finalización]). <u>Medidas de desenlace de seguridad</u> Incidencia, frecuencia y gravedad de acontecimientos adversos (AA); cambios en los signos vitales, ECG y parámetros de laboratorio clínico de rutina
Análisis exploratorio	Se realizan las siguientes pruebas con linfocitos de sangre periférica (PBL): ▪ Respuesta de proliferación. ▪ Elispot para la detección de células secretoras de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN-γ. ▪ Secreción de citocinas tal como se determina mediante ELISA: IL-4, IL-5, IL-10 e IFN-γ. Se recogen muestras de suero para someter a prueba anticuerpos anti-GA (Ig total, IgG1, IgG2, IgM e IgE).

MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION (15 MG)

- 15 Se incluyeron treinta y ocho (38) sujetos [29 (76,3%) mujeres] en este estudio. La edad media es de 33,8 años (intervalo de 20-48); todos los sujetos, excepto uno, son de raza blanca. El índice de masa corporal (BMI) medio es de 23 (intervalo de 17-24), la duración de MS media es de 4,7 años (intervalo de 0,2-20,6). Según la base de datos de CRF, 37 sujetos están todavía en el estudio; un sujeto abandonó prematuramente debido a acontecimientos adversos. La duración media del tratamiento desde la primera inyección de fármaco del estudio es de 71,7 días (intervalo de 29-108).

MEZCLA DE POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION (30 MG)

- 20 Se incluyeron veintisiete (27) sujetos [18 (66,7%) mujeres] en este estudio. La edad media es de 33,6 años (intervalo de 18-51); todos los sujetos, excepto uno, son de raza blanca. El BMI medio es de 23,3 (intervalo de 17-34), la duración de MS media es de 2,4 años (intervalo de 0,2-13,6). Según la base de datos de CRF, 25 están todavía en el estudio; dos sujetos abandonaron prematuramente debido a acontecimientos adversos. La duración media del tratamiento desde la primera inyección de fármaco del estudio es de 52,1 días (intervalo de 1-90).

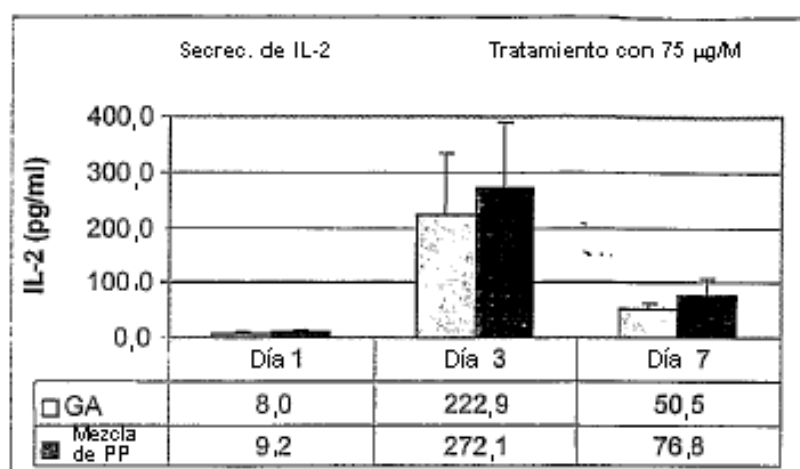
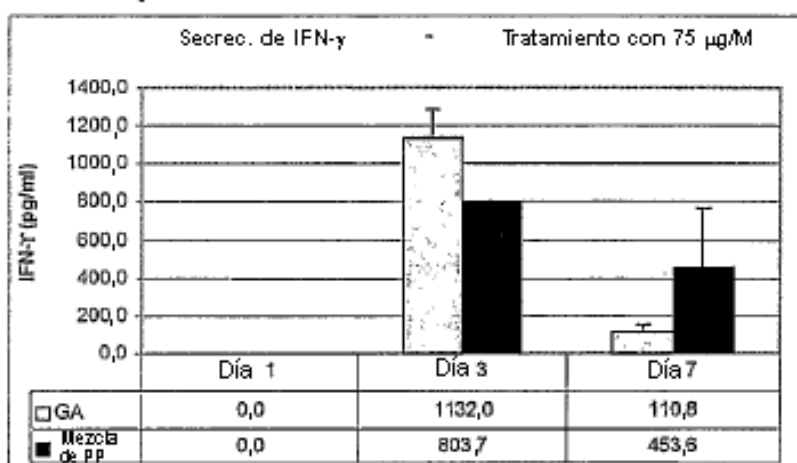
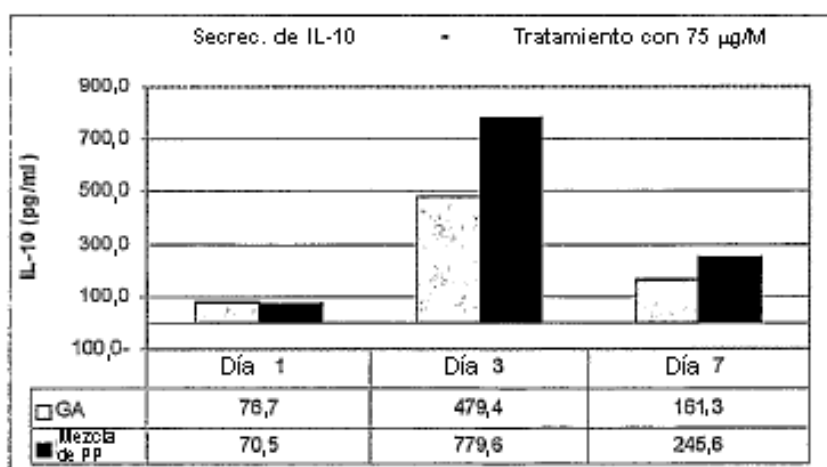
Resultados

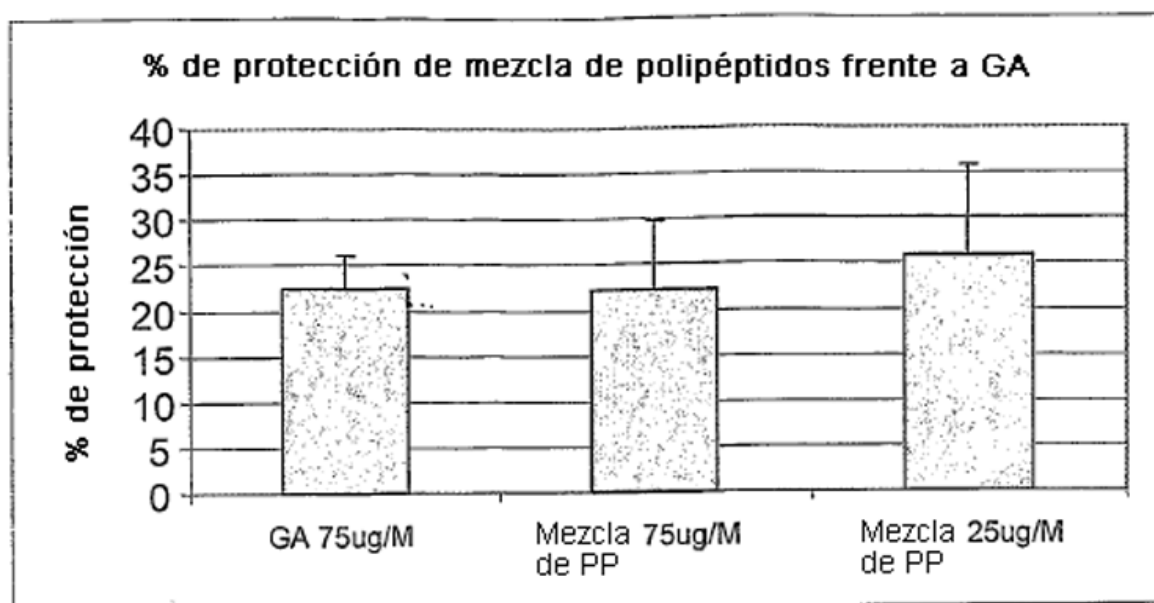
- 5 Los pacientes tratados con la mezcla de polipéptidos de la invención muestran un cambio en la respuesta inmunológica a acetato de glatirámico/o acetato de glatirámico de alto peso molecular en comparación con el grupo que recibe el placebo. Los pacientes tratados con la mezcla de polipéptidos de la invención tienen una proporción reducida de nuevas lesiones por potenciación y nuevas lesiones de MS que evolucionan a "agujeros negros" en comparación con el grupo que recibe el placebo, sugiriendo un mecanismo de acción central global y un posible efecto neuroprotector. Por tanto, la mezcla de polipéptidos de la invención tiene un efecto clínico beneficioso a largo plazo, puesto que se cree que la degeneración axonal provoca un daño crónico irreversible en MS.

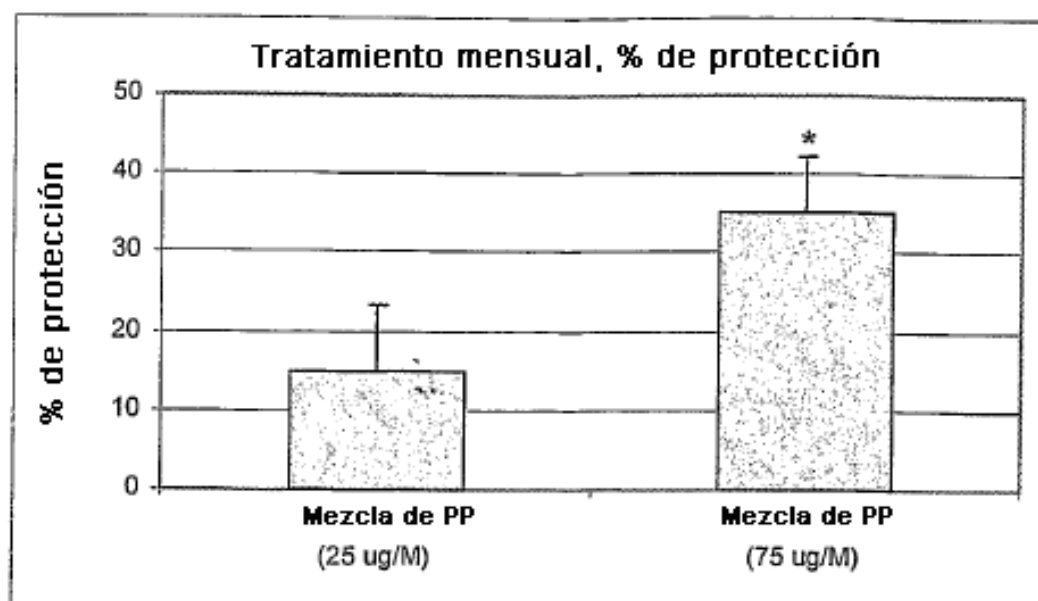
REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una mezcla de polipéptidos, en la que cada polipéptido (a) es un copolímero de los aminoácidos ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina, y (b) puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable; y en la que en la mezcla (i) los polipéptidos tienen un peso molecular promedio en el intervalo de 13.500 a 18.500 Dalton, (ii) del 13% al 38% de los polipéptidos tienen un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en un extremo de los mismos, y (iii) el 68% de los polipéptidos tienen un peso molecular de entre 7.000 y 41.000 Dalton.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el peso molecular promedio es de 16.000 Dalton.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que los aminoácidos están presentes en la mezcla en una cantidad de manera que la fracción molar promedio de los aminoácidos es: ácido L-glutámico 0,129-0,153; L-alanina 0,392-0,462; L-tirosina 0,086-0,100; y L-lisina 0,300-0,374.
4. Composición según la reivindicación 3, en la que los aminoácidos están presentes en la mezcla en una cantidad de manera que la fracción molar promedio de los aminoácidos es: ácido L-glutámico 0,141; L-alanina 0,427; L-tirosina 0,095; y L-lisina 0,338.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que del 19% al 28% de los polipéptidos en la mezcla tienen dietilamida en un extremo de los mismos.
6. Composición según la reivindicación 5, en la que el resto de polipéptidos en la mezcla tienen un grupo carboxilo en el extremo C-terminal.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el 35-45% de los polipéptidos en la mezcla tienen una L-alanina en el extremo N-terminal.
8. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un portador farmacéuticamente aceptable.
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, que comprende además al menos uno de riluzol, acetato de glatirámico, baclofeno, fenitoína, quinina, amitriptilina, fenotiazina, clorpromazina, neurolepticos de butirofenona, geldamicina, ARN de interferencia, trehalosa, cistamina, rapamicina, glucocorticoide, fármaco antiinflamatorio no esteroideo, minociclina, ácido fólico, creatina, dicloroacetato, nicotinamida, riboflavina, carnitina, ácido tauroursodesoxicólico, ginkgo biloba, coenzima Q10, vitamina A, vitamina C, vitamina E, selenio, ácido lipoico, arginina, mitramicina, remacemida, filuzol, lamotrigina, memantina, gabamentina, inhibidores de HDAC, ácido retinoico, reserpina, anticolinérgicos, difenoxilato, loperamida, tintura de opio desodorizada, codeína, metronidazol, sulfasalazina, corticosteroide, azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina, aféresis de linfocitos T, 4-aminoquinolinas, ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), balsalazida, olsalazina, ACTH 75, ACTH 120, antibiótico, pilocarpina, isoptocarpina-timolol hemihidratado, maleato de timolol, betaxolol, levobunolol, carteolol, metipranolol, epinefrina, dipivefrina, carbacol, apraclonidina, brimonidina, dorzolamida, latanoprost, travaprost, brimatoprost, brinzolamida, inhibidor de colinesterasa, demecario, isoblufofato, inhibidor de anhidrasa carbónica, manitol, glicerina oral y midriáticos, atropina, meclizina, dienhidrinato, proclorperazina, escopolamina, difenhidramina, gabapentina, primidona, toxina botulínica, actazolamida y cabidopa-levodopa, isoniazida, diazepam, clonazepam, dantroleno sódico, tizanidina, clonidina, sildenafil, alprostadil, papaverina, bisacodilo, hidróxido de magnesio, glicerina, muciloide hidrófilo de psilio, fosfato de sodio, factor de necrosis antitumoral (TNF), docusato, oxibutinina, desmopresina, vasopresina, tolterodina, carbamazepina, imipramina, betanecol, fenoxibenzamina, terazosina, propantelina, oxibutinina, hiosciamina, metenamina, nitrofurantoína, fenazopiridina, ciprofloxacino, amantadina, pemolina, derivado de vitamina D, modafinilo, fluoxetina, sertralina, venlafaxina, citalopram, paroxetina, trazodona, nortriptilina, imipramina, dotiepin, lofepramina, doxepina, protriptilina, tranilcipromina, moclobemida, bupropión, nefazodona, mirtazapina, zolpidem, alprazolam, temazepam, buspirona, gabapentina, topiramato, zonisamida, desipramina, imipramina, doxepina, protriptilina, pentozifilina, hidroxizina, natalizumab, esteroides, relajantes musculares, prednisolona, dexametasona, corticotropina, inmunosupresores, aciclovir, azatioprina, ciclofosfamida, mitoxantrona, ciclosporina, metotrexato, cladribina, interferones, laquinimod, alemtuzumab, 4-aminopiridina, 3,4-diaminopiridina, eliprodil, inmunoglobulina IV, pregabalina o ziconotida.
10. Procedimiento para obtener una composición que comprende una mezcla de polipéptidos, que comprende:
 - a) polimerizar N-carboxianhídridos de L-tirosina, L-alanina, glutamato de γ -bencilo y trifluoroacetil-lisina con dietilamina para formar una mezcla de polipéptidos protegidos;
 - b) retirar el grupo protector bencilo de los polipéptidos protegidos poniendo en contacto los polipéptidos con una disolución de bromuro de hidrógeno y ácido acético a una temperatura en el intervalo de 17°C a 23°C durante un periodo de 7 a 18 horas para producir una mezcla de polipéptidos protegidos con trifluoroacetilo;

- c) retirar el grupo protector trifluoroacetilo de los polipéptidos protegidos con trifluoroacetilo poniendo en contacto los polipéptidos protegidos con una disolución de base orgánica para obtener el polipéptido desprotegido; y
 - d) someter los polipéptidos desprotegidos de la etapa c) a ultrafiltración, formando así la composición,
- 5 en la que en la mezcla de polipéptidos (i) los polipéptidos tienen un peso molecular promedio en el intervalo 13.500 a 18.500 Dalton, (ii) del 13% al 38% de los polipéptidos tienen un grupo dietilamida en lugar de un grupo carboxilo presente en un extremo de los mismos, y (iii) el 68% de los polipéptidos tienen un peso molecular de entre 7.000 y 41.000 Dalton.
- 10 11. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.
12. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria no autoinmunitaria, una enfermedad inmunitaria o una enfermedad asociada con desmielinización.
- 15 13. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.
- 20 14. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple.
- 25 16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9, para su uso como medicamento.
17. Producto que contiene la composición según la reivindicación 16 y un segundo agente farmacéutico, como preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial como medicamento.

IL-2**IFN-γ****IL-10****Figura 1.**

**Figura 2.**

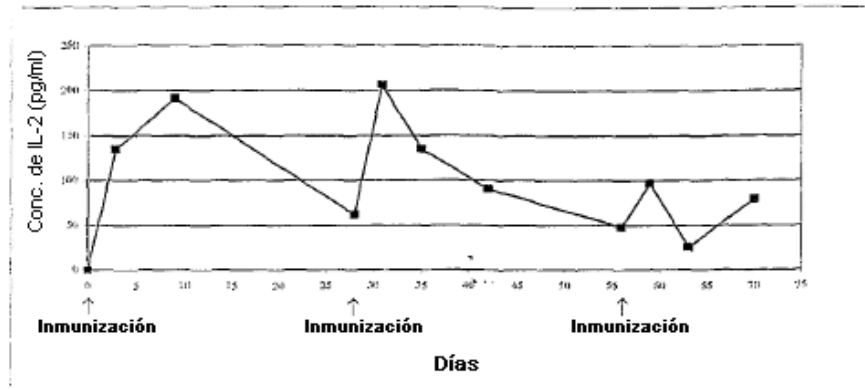


* $p < 0,01$ (recuento de RGC en el grupo de prueba frente al grupo de control negativo)

Figura 3.

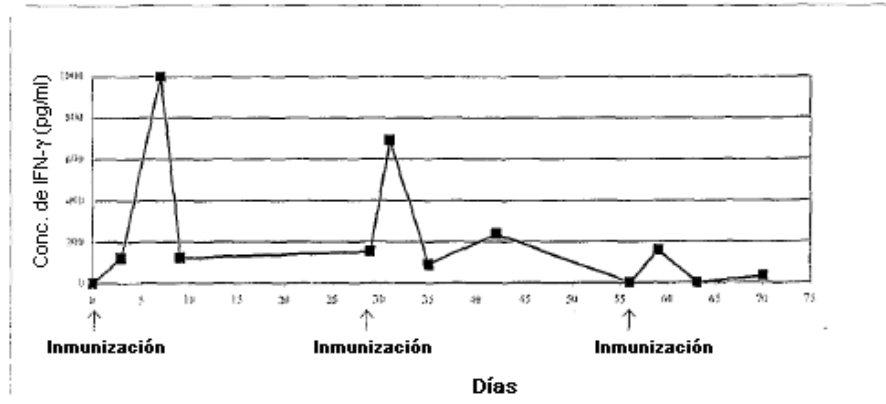
IL-2

Secreción de IL-2 tras inyecciones mensuales



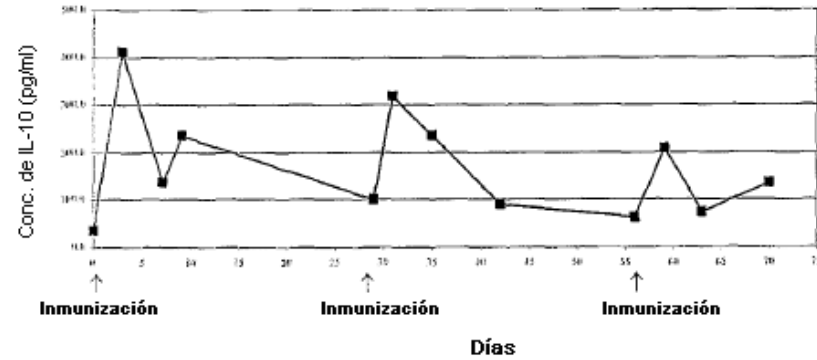
IFN- γ

Secreción de IFN- γ tras inyecciones mensuales



IL-10

Secreción de IL-10 tras inyecciones mensuales



IL-4

Secreción de IL-4 tras inyecciones mensuales

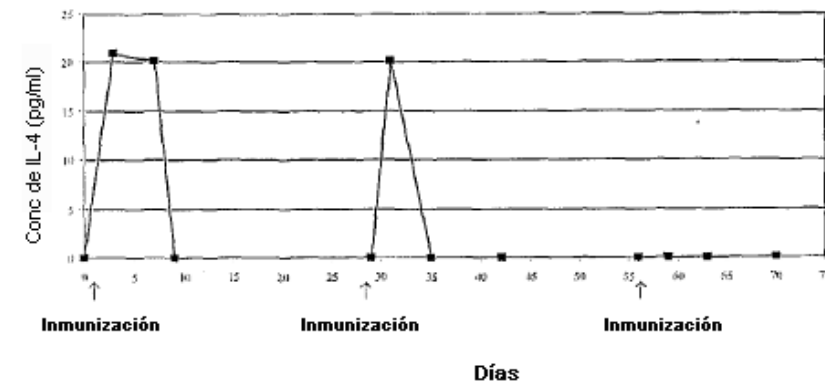
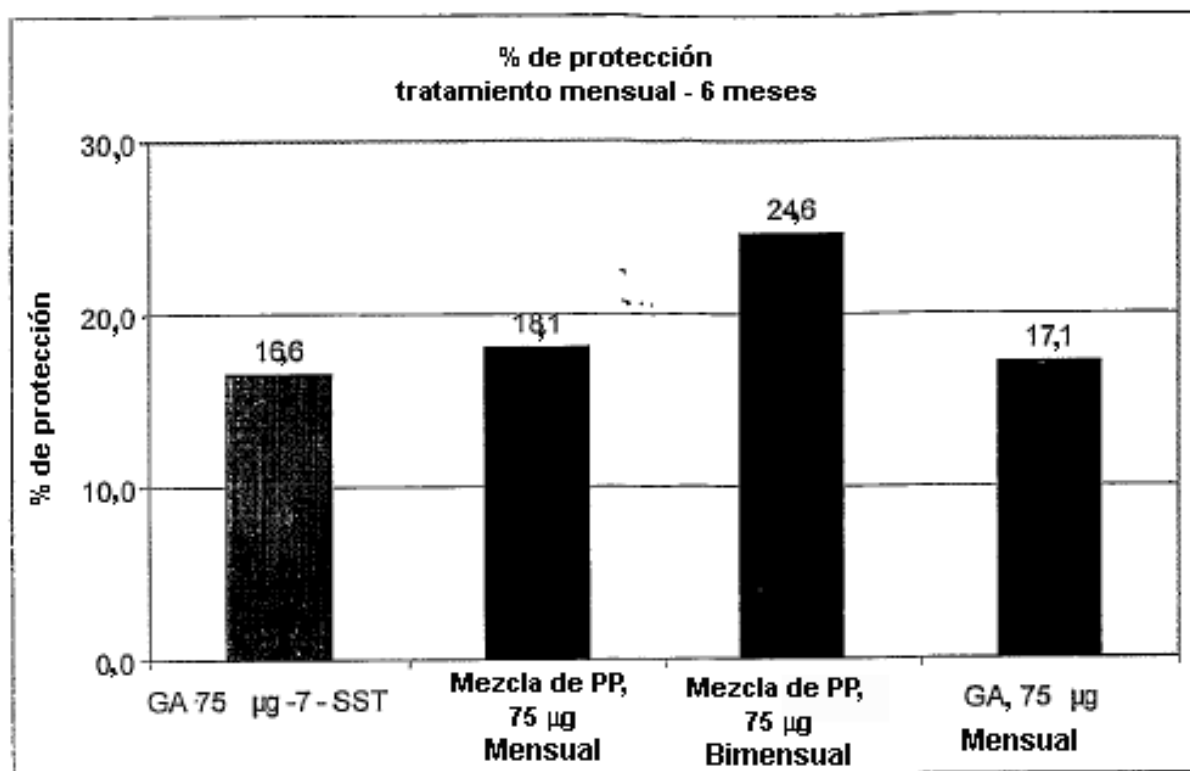


Figura 4.

**Figura 5.**

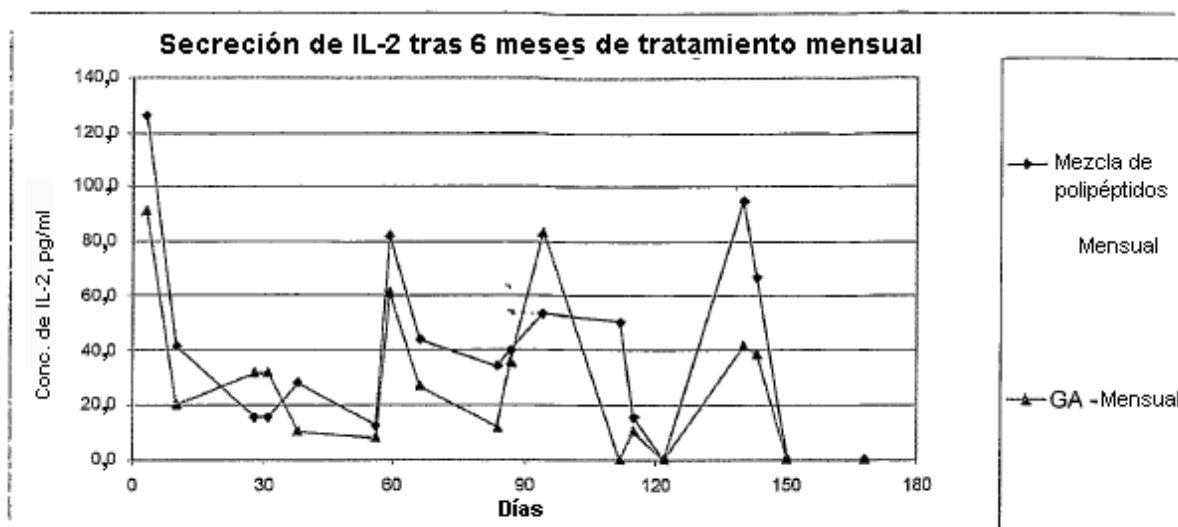
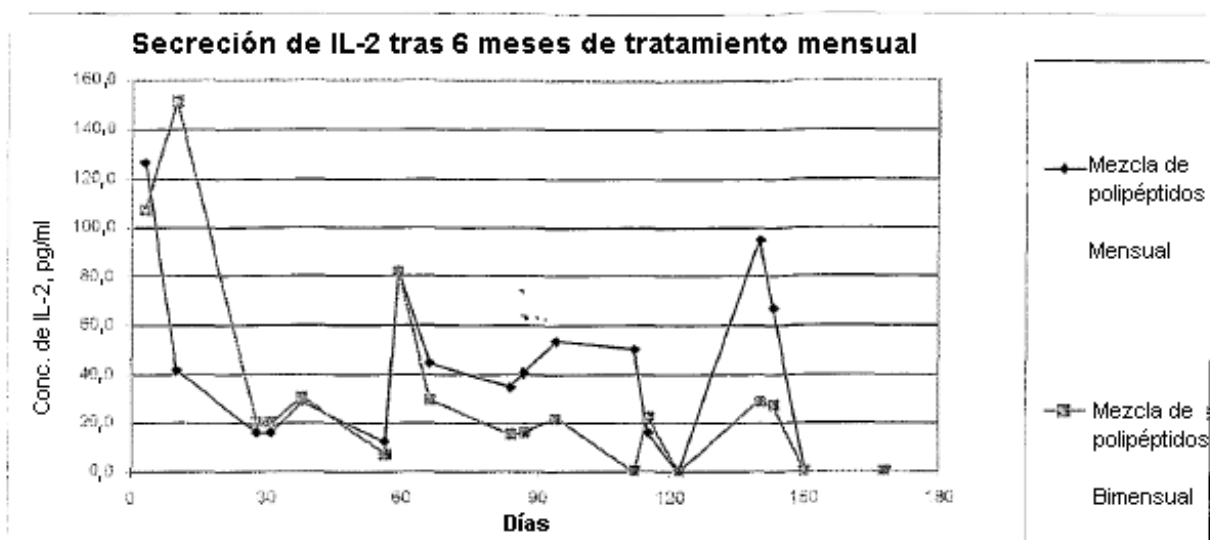


Figura 6.

**Figura 7.**

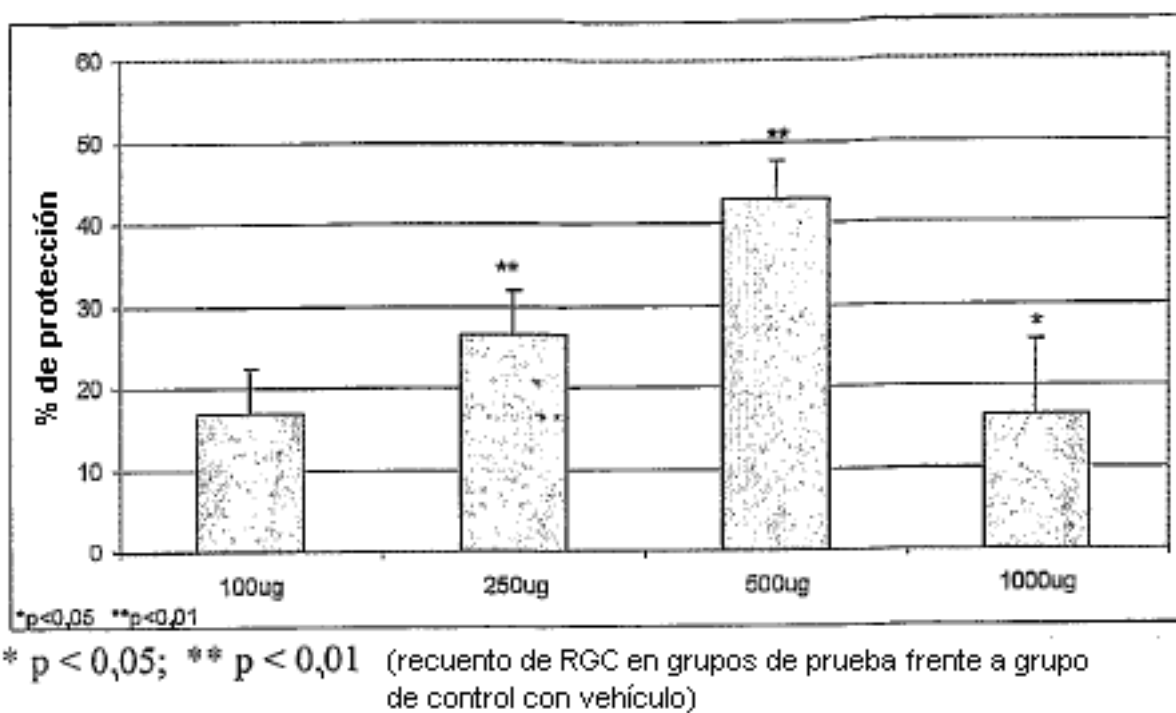


Figura 8.

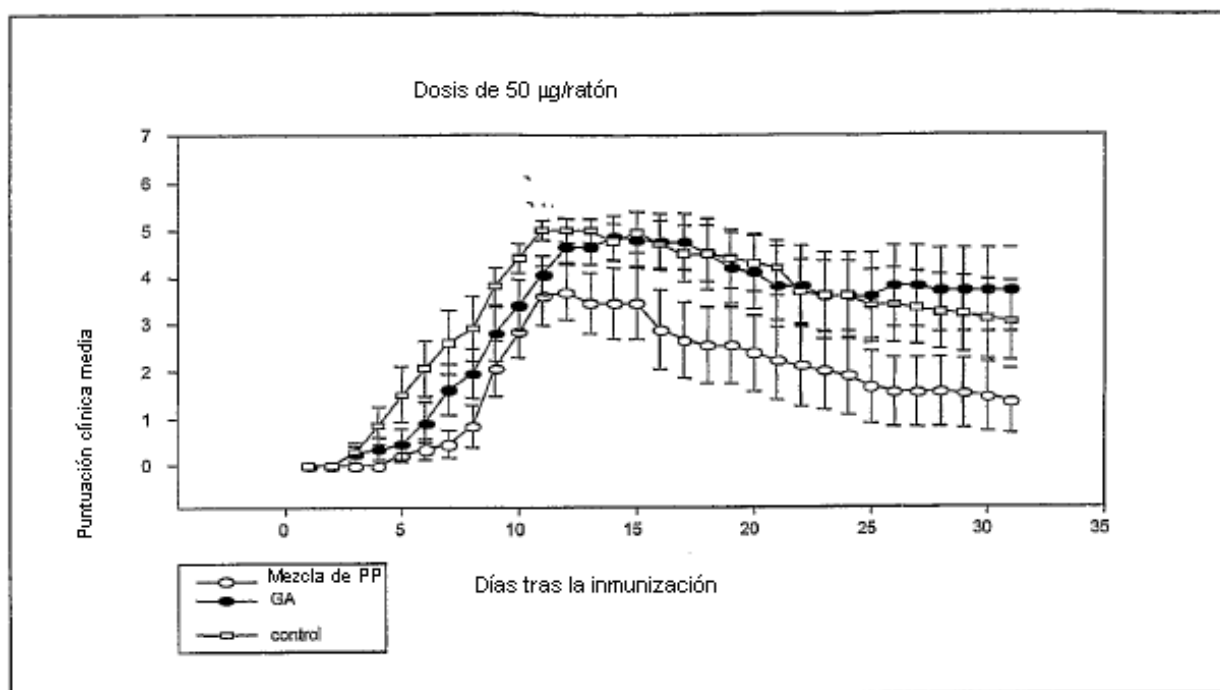


Figura 9.

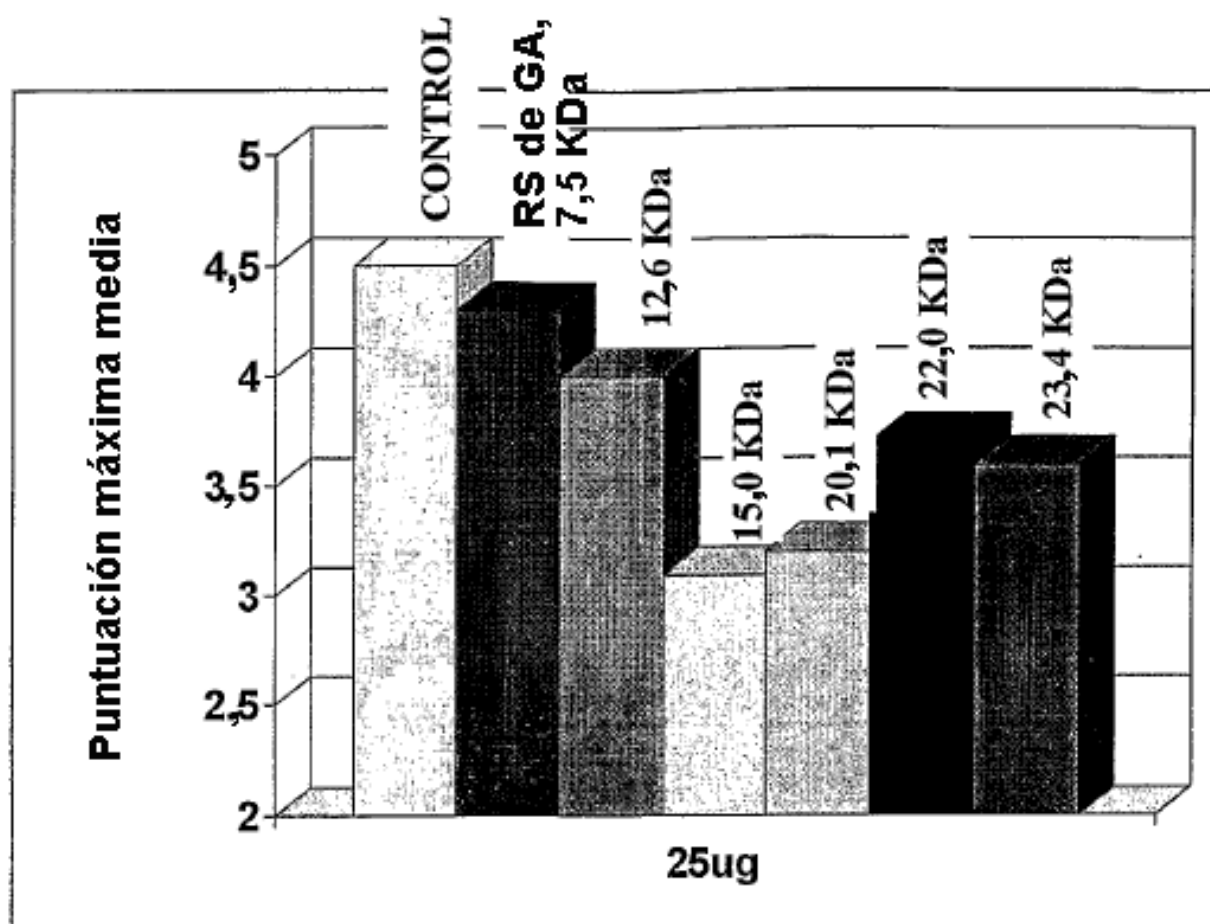


Figura 10.

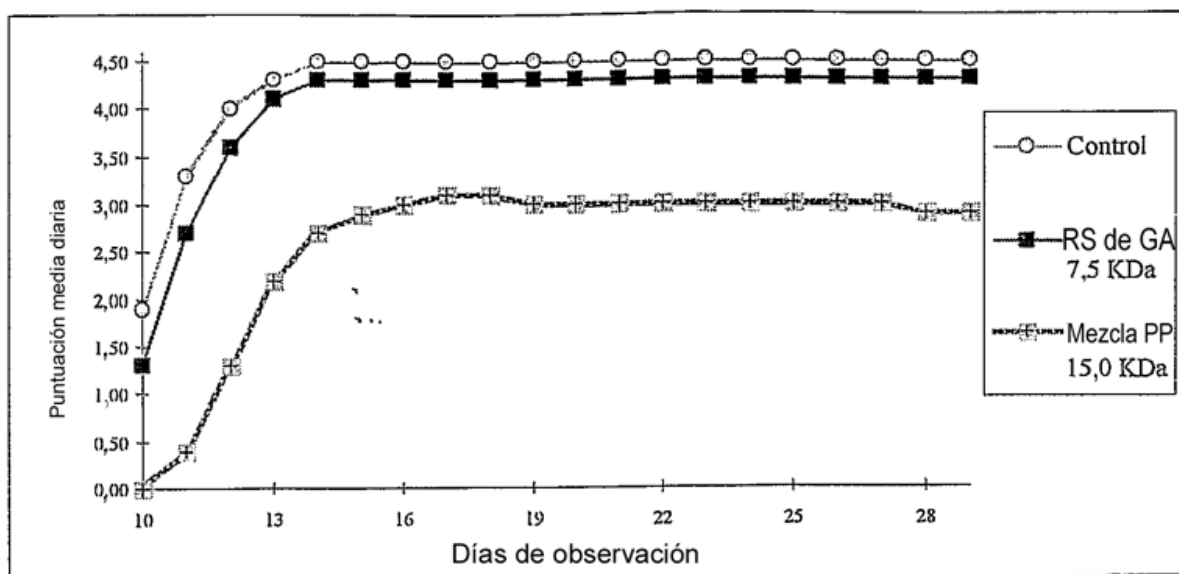


Figura 11.

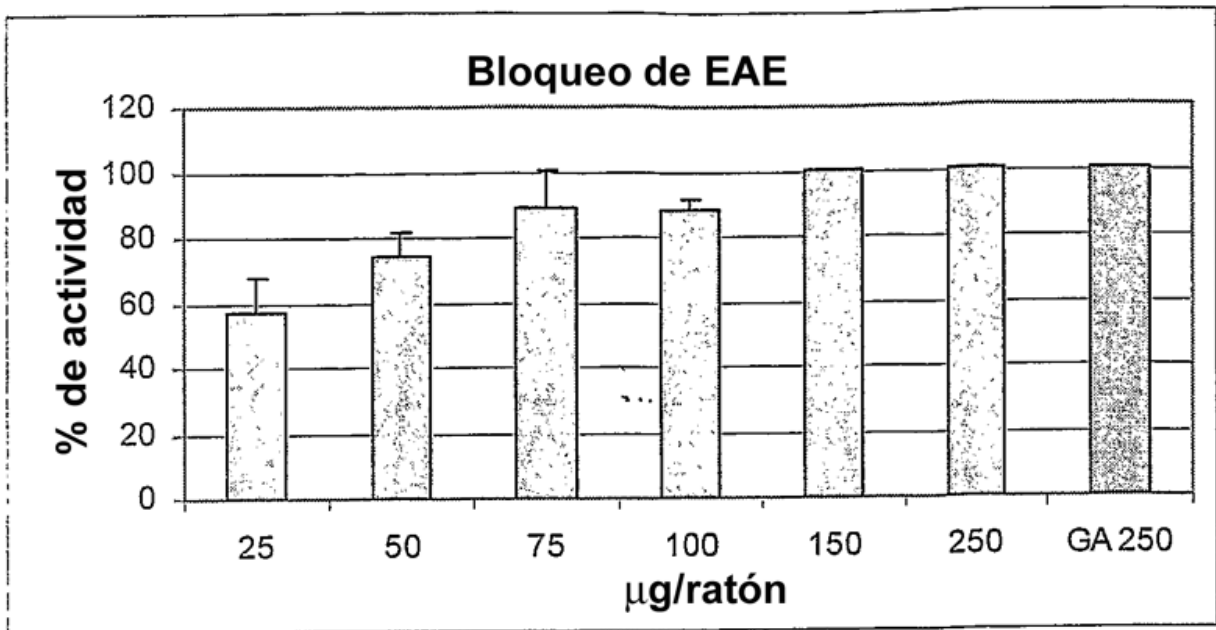
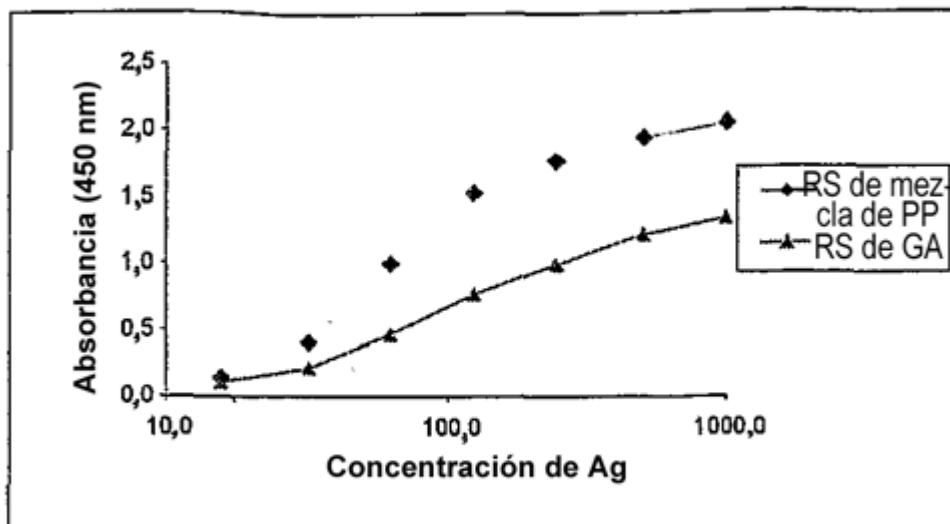


Figura 12.

AcM 10F6/32



AcM 4B5/44

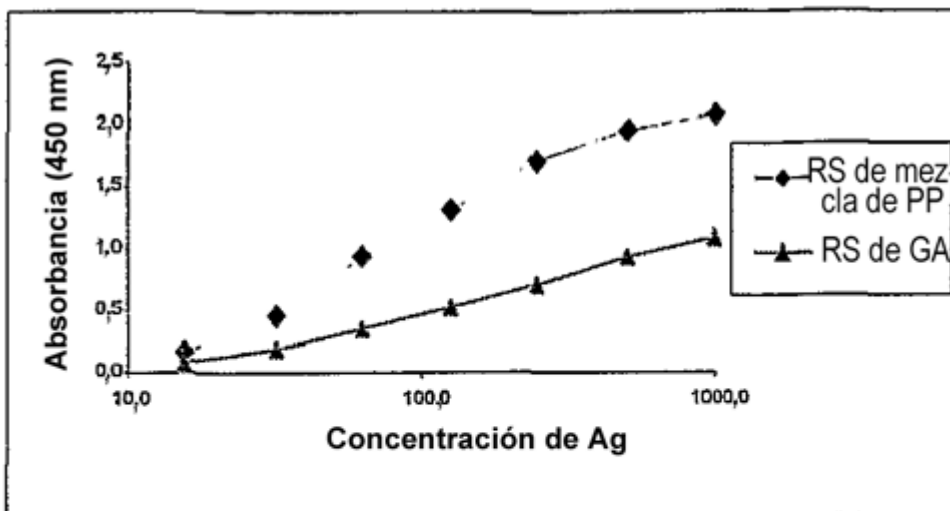


Figura 13.

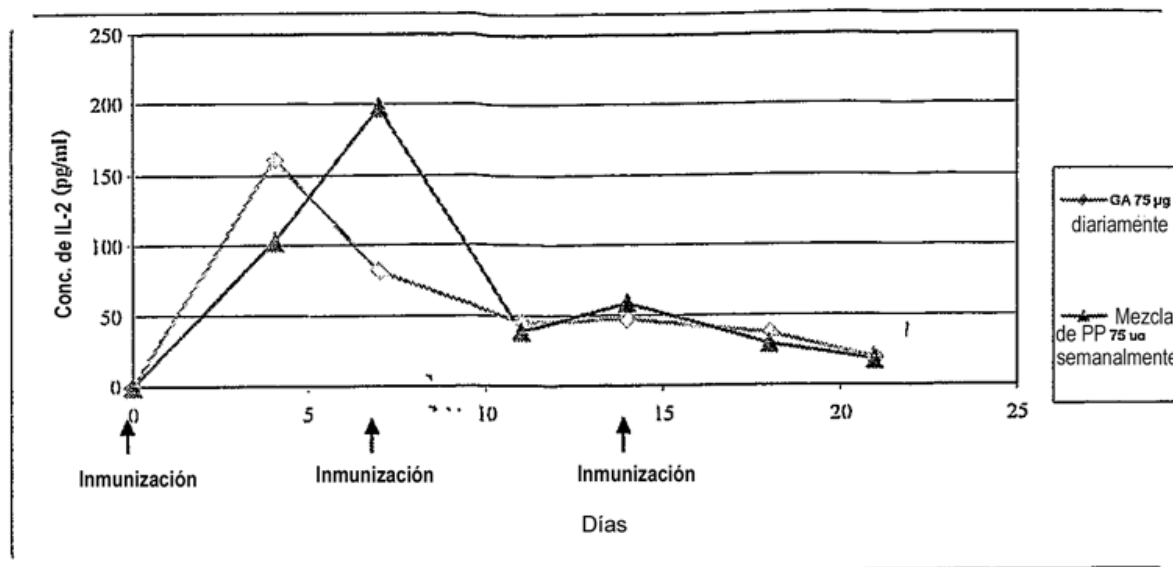


Figura 14.

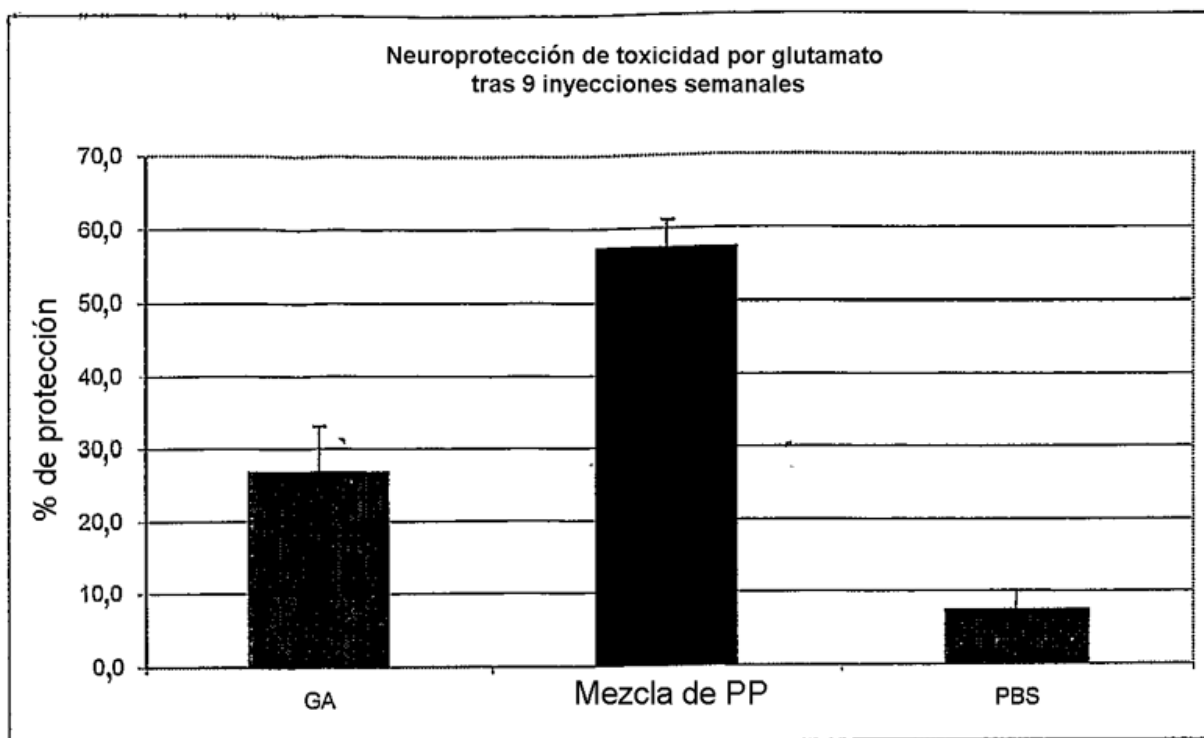
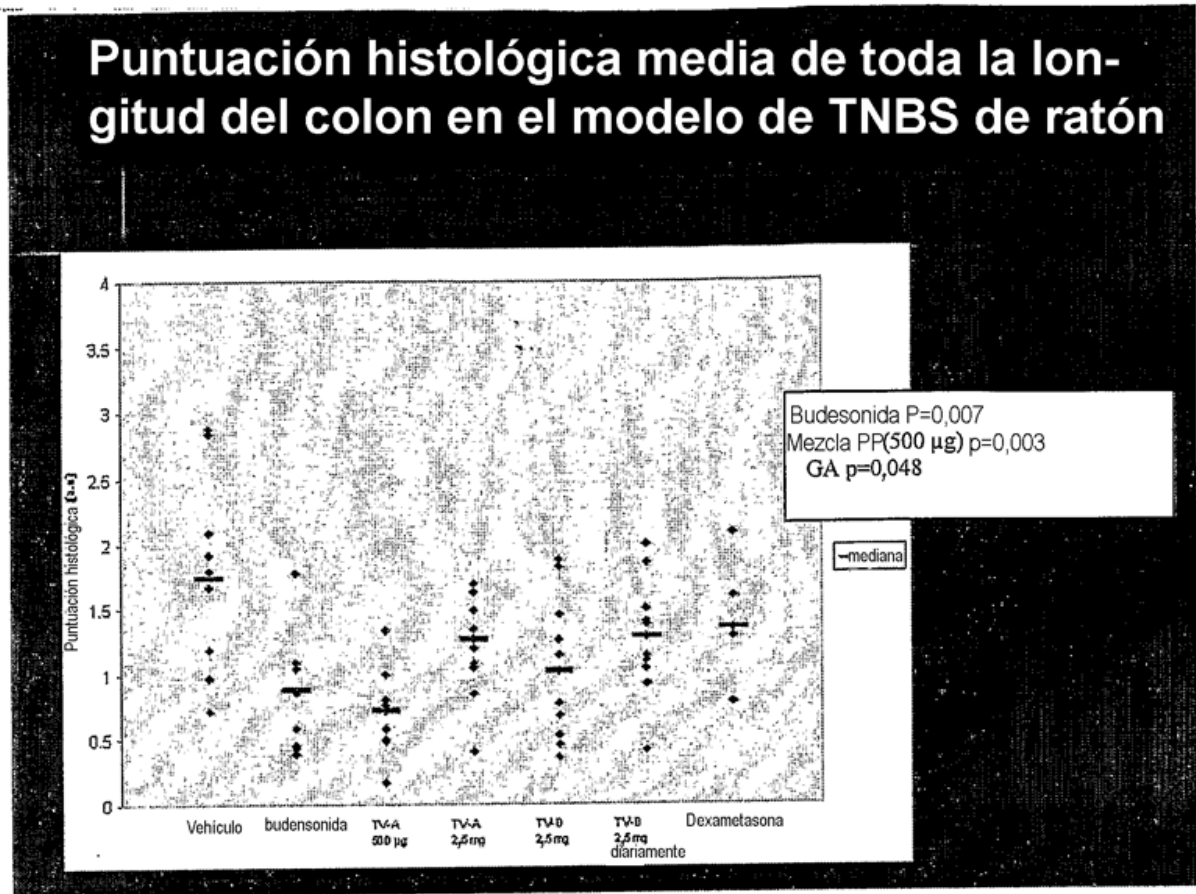


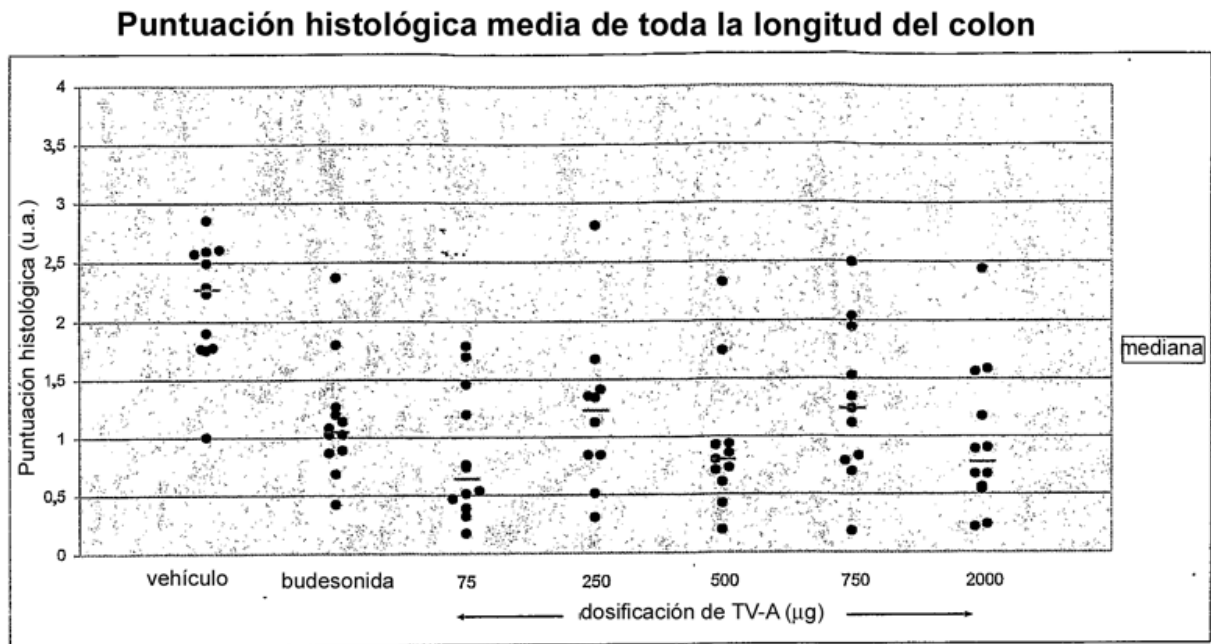
Figura 15.



TV-A = la mezcla de polipéptidos de la invención

TV-B = acetato de glatirámico

Figura 16.



TV-A = la mezcla de polipéptidos de la invención

Figura 17

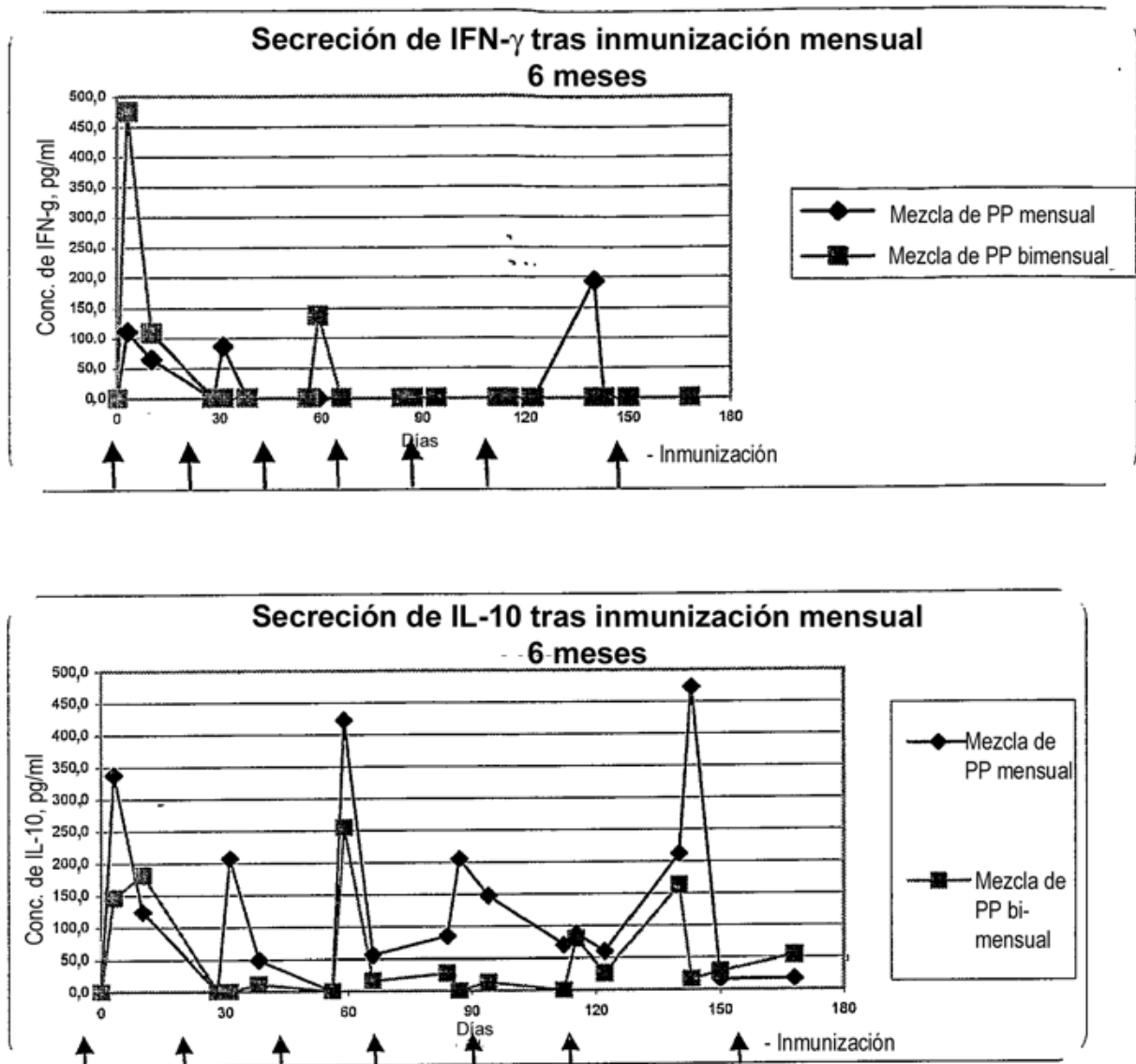
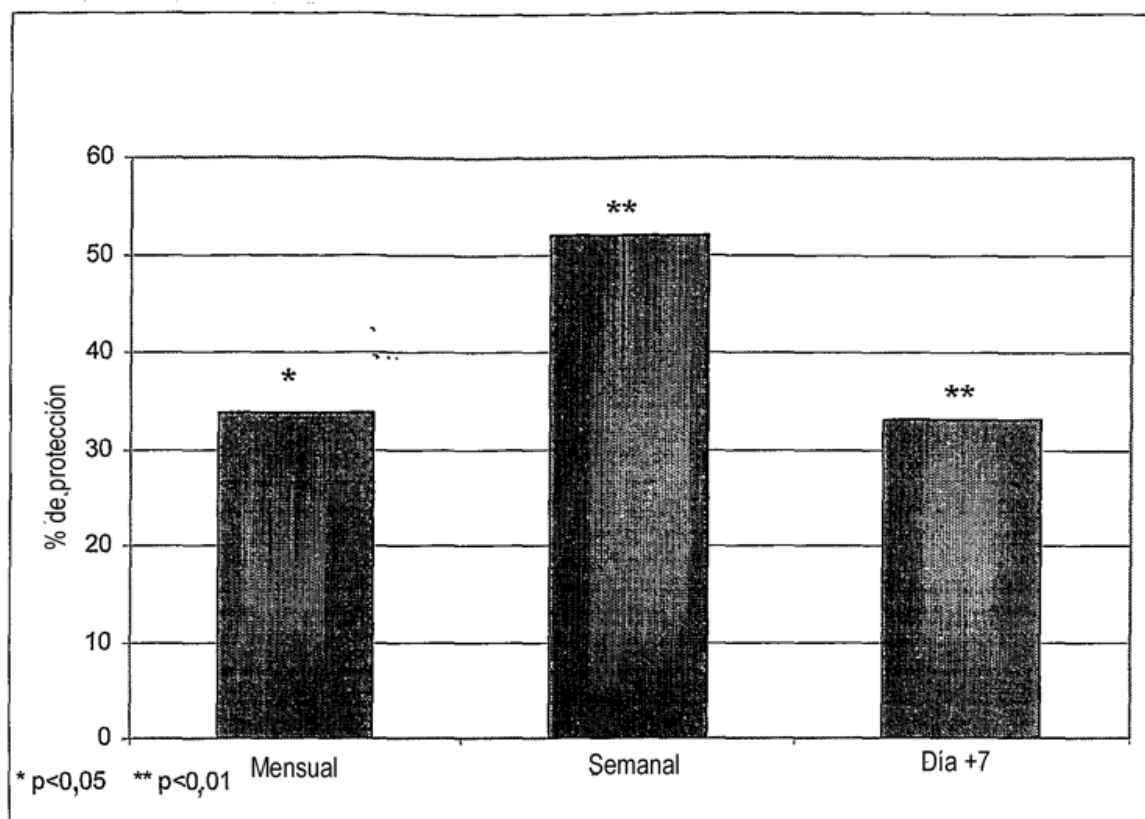
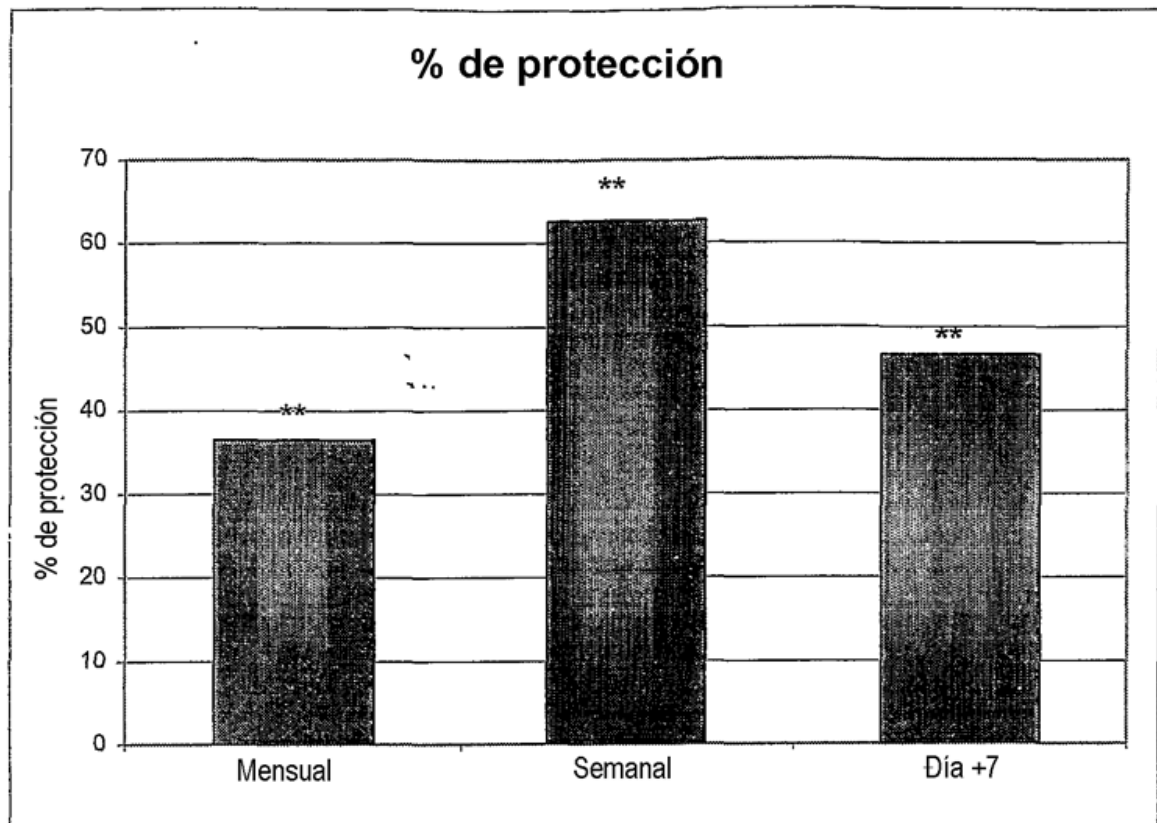


Figura 18



* p < 0,05; ** p < 0,01 (Recuento de RGC en el grupo de prueba frente al grupo de control de vehículo)

Figura 19



** mensual $p = 1,64 \times 10^{-9}$; **semanal $p = 1,29 \times 10^{-15}$ (Recuento de RGC en el grupo de prueba frente al grupo de control de vehículo)

Figura 20

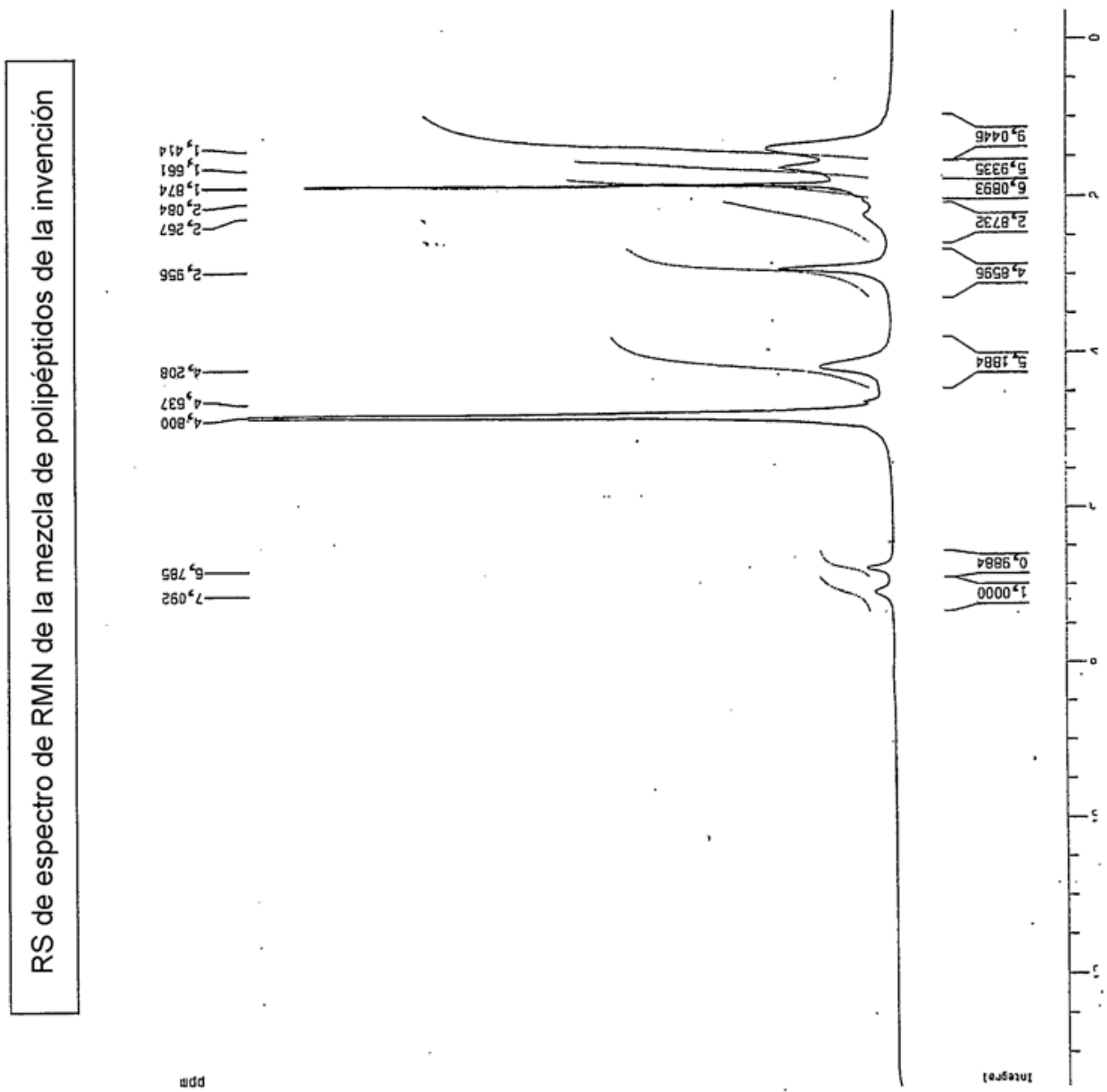


Figura 21

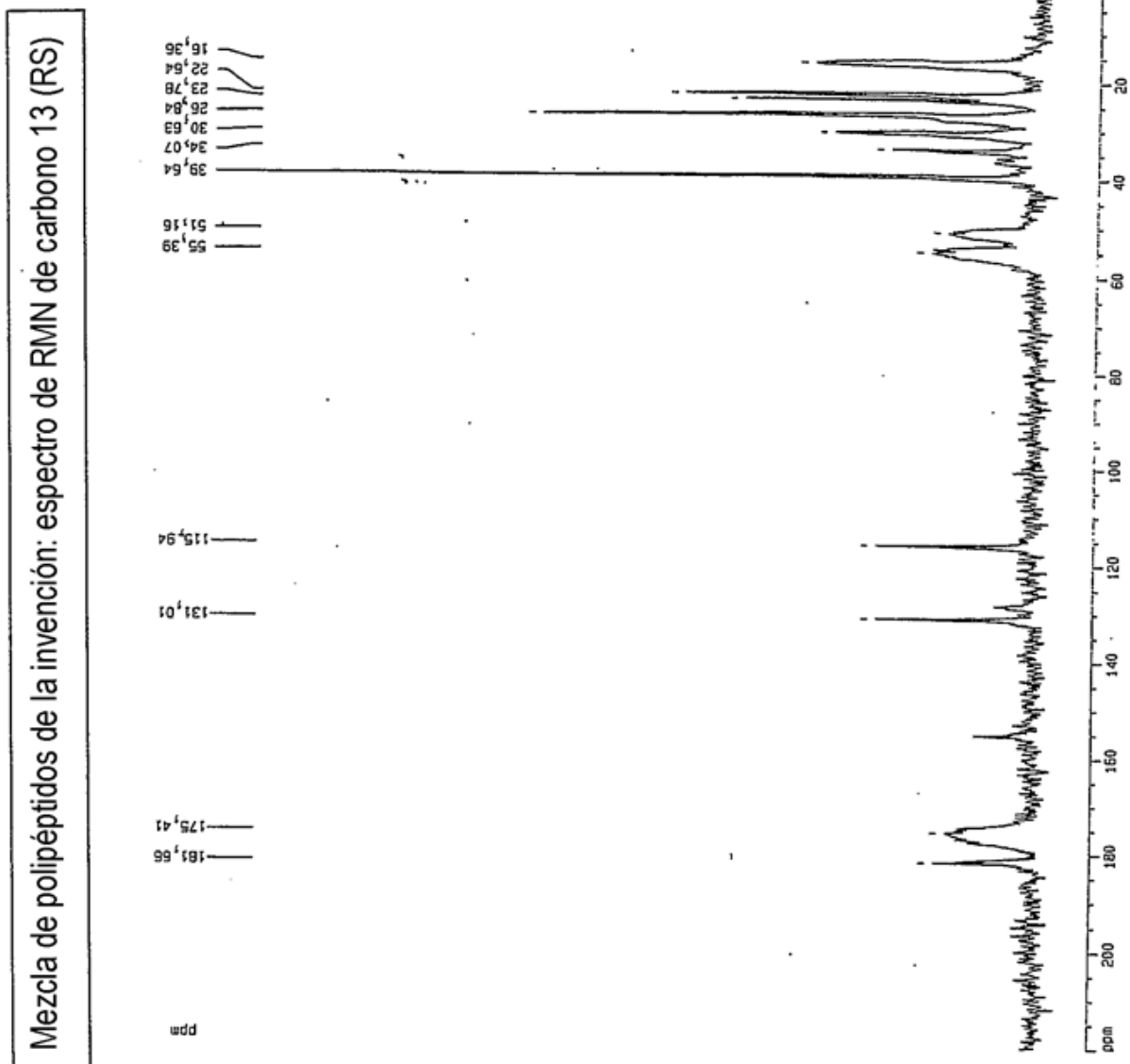


Figura 22

Mezcla de polipéptidos de la invención: espectro ultravioleta

Espectro de solapamiento:

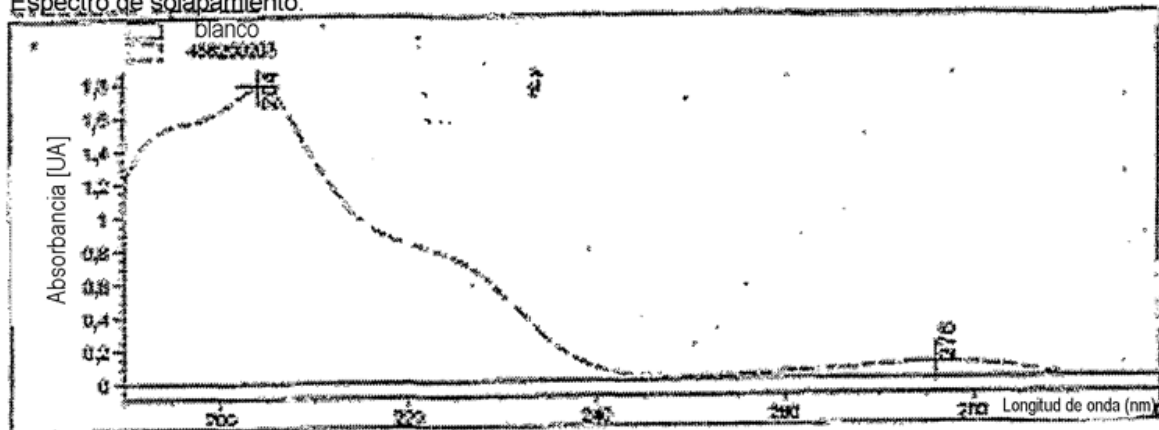


Figura 23

Mezcla de polipéptidos de la invención: espectro de infrarrojo con transformada de Fourier

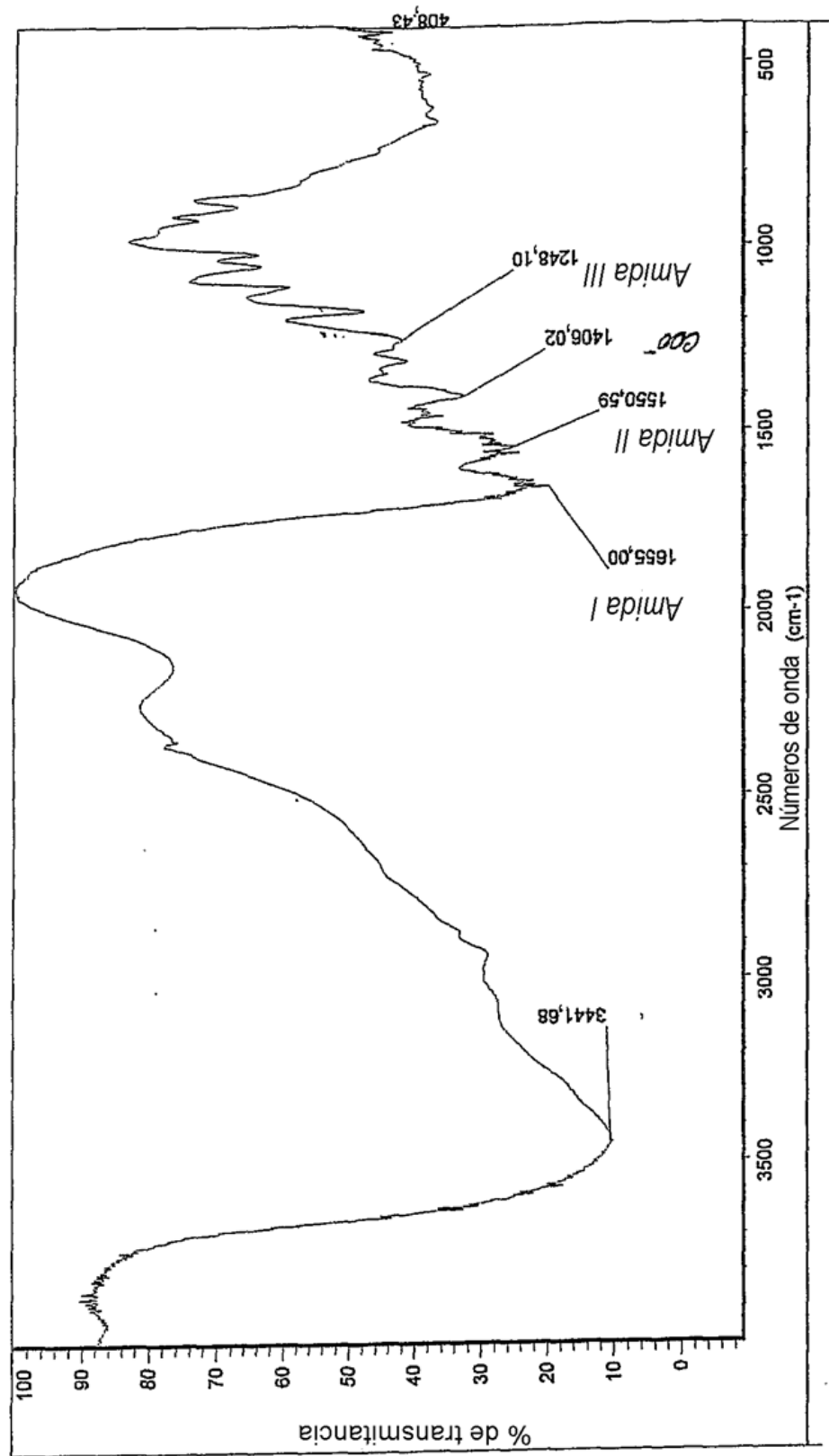


Figura 24

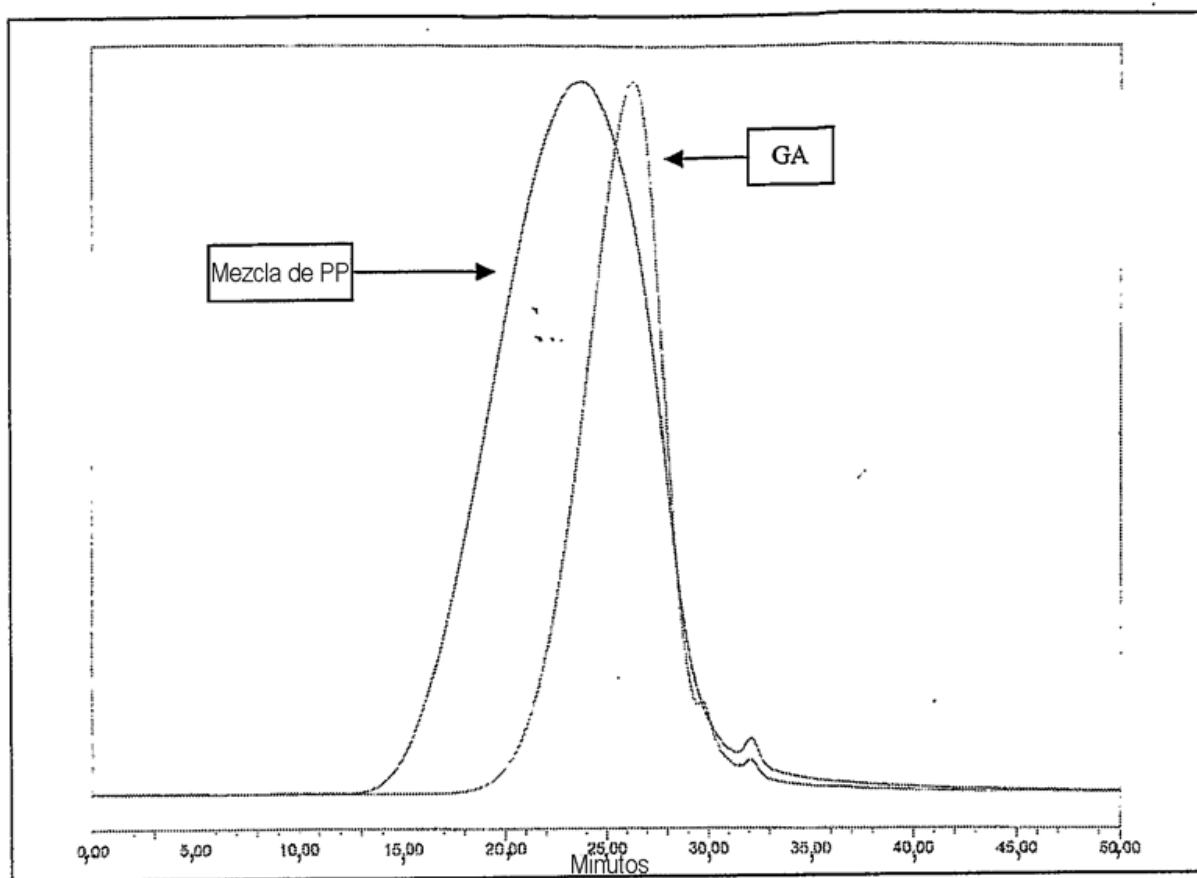


Figura 25

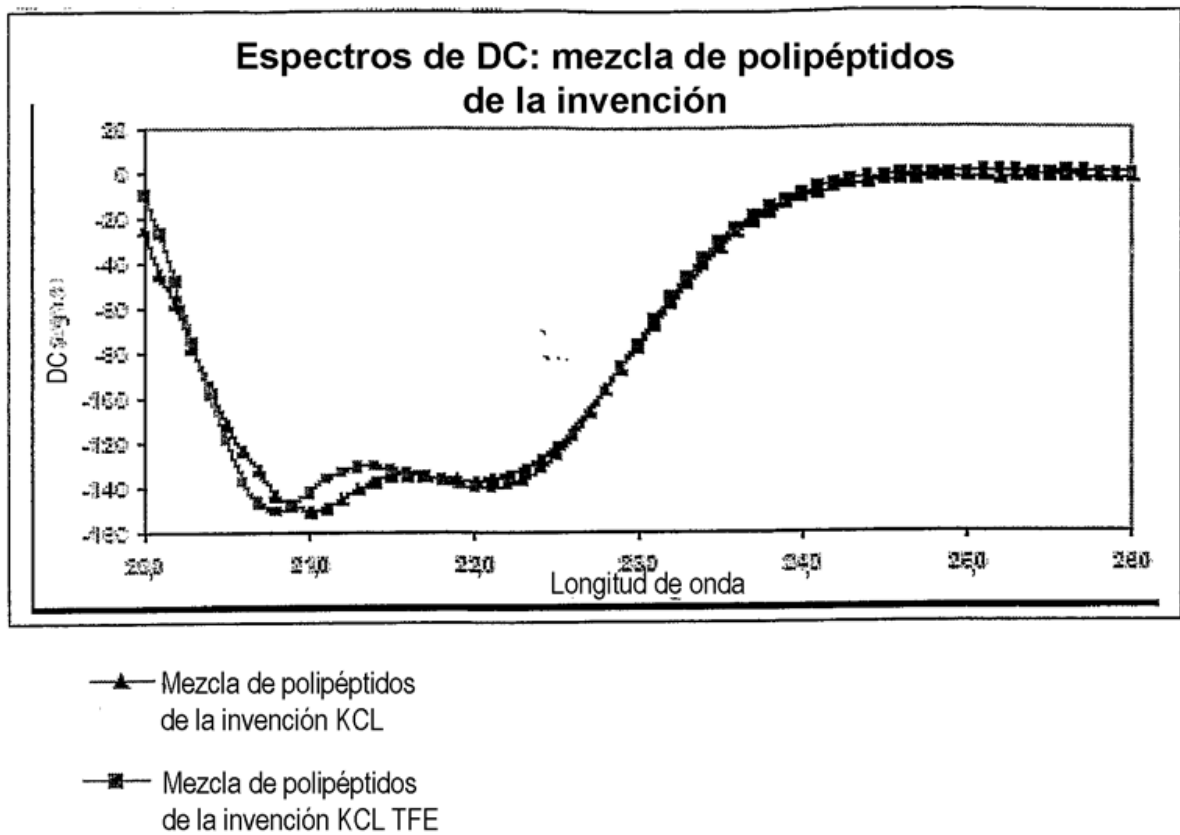


Figura 26

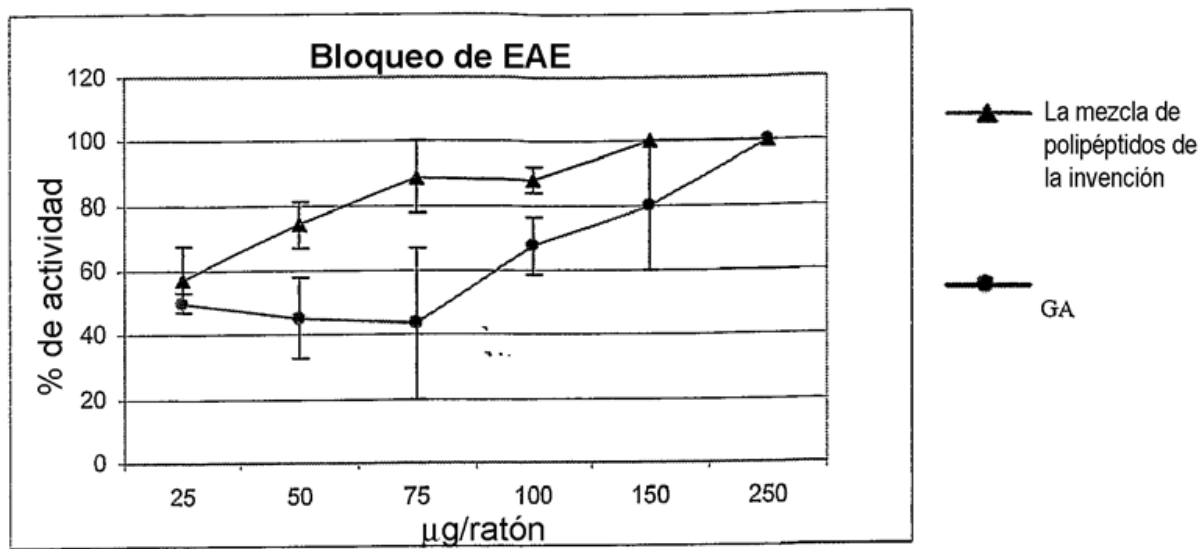


Figura 27

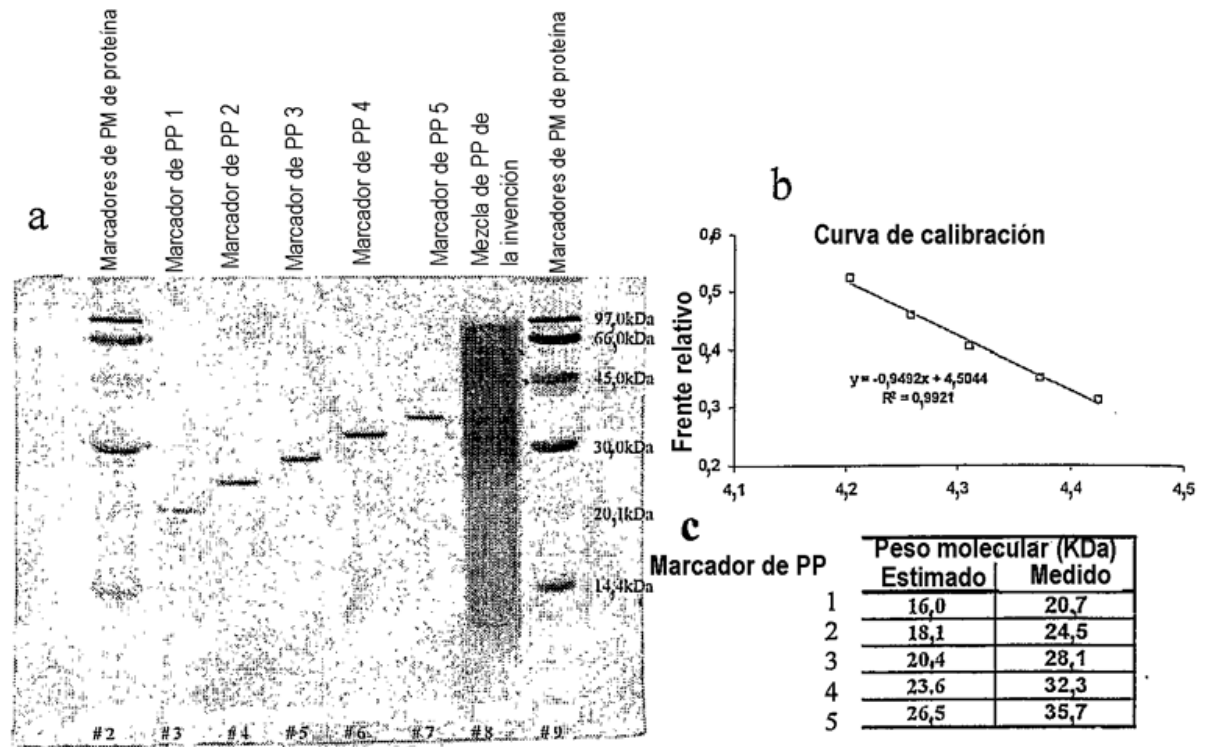


Figura 28

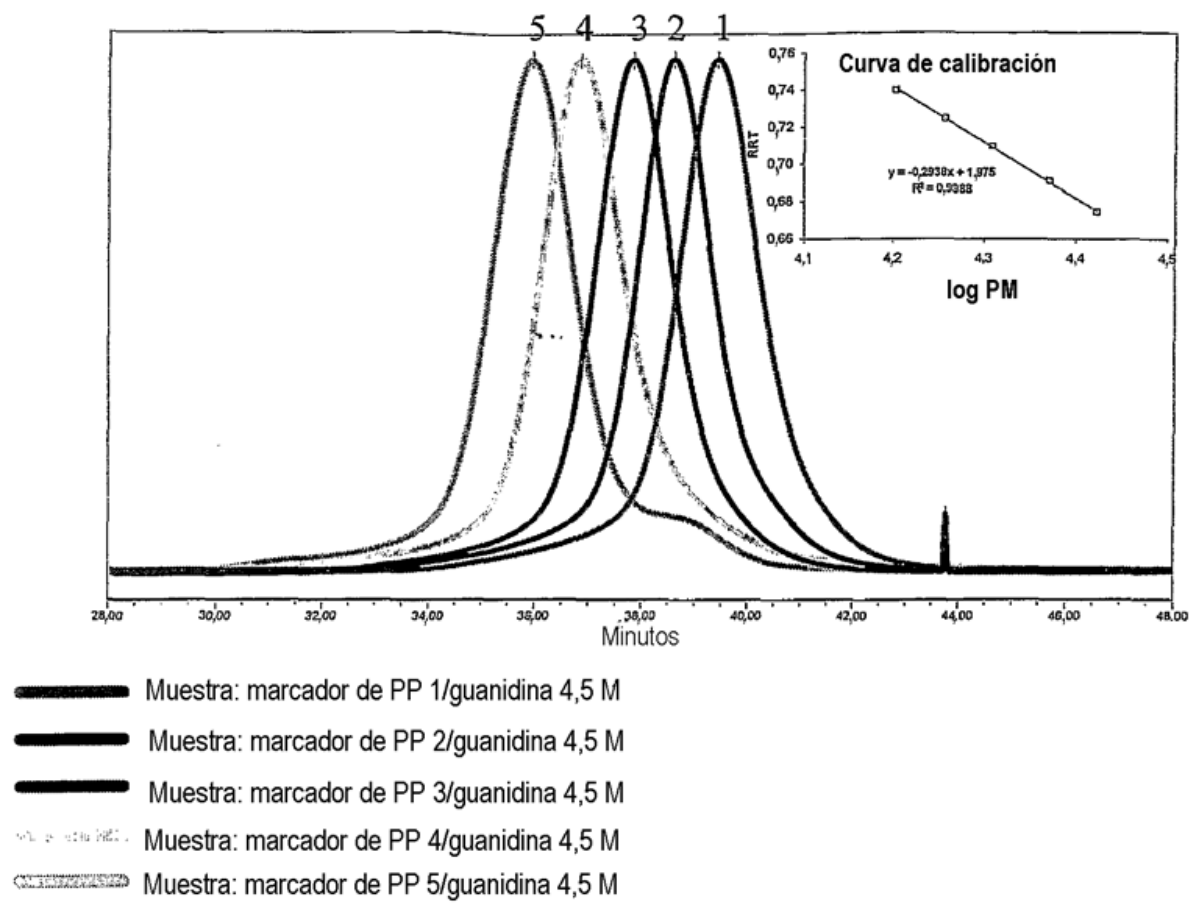


Figura 29

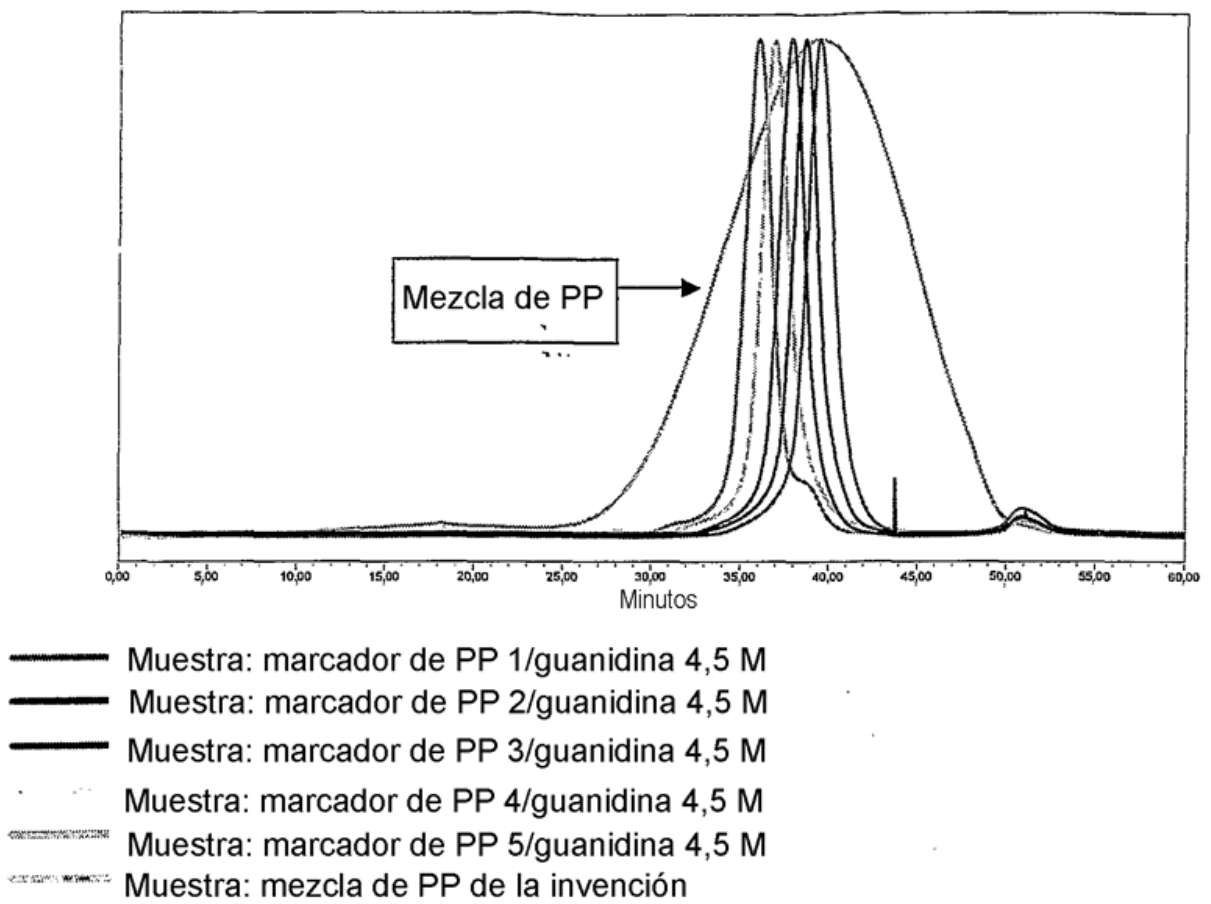
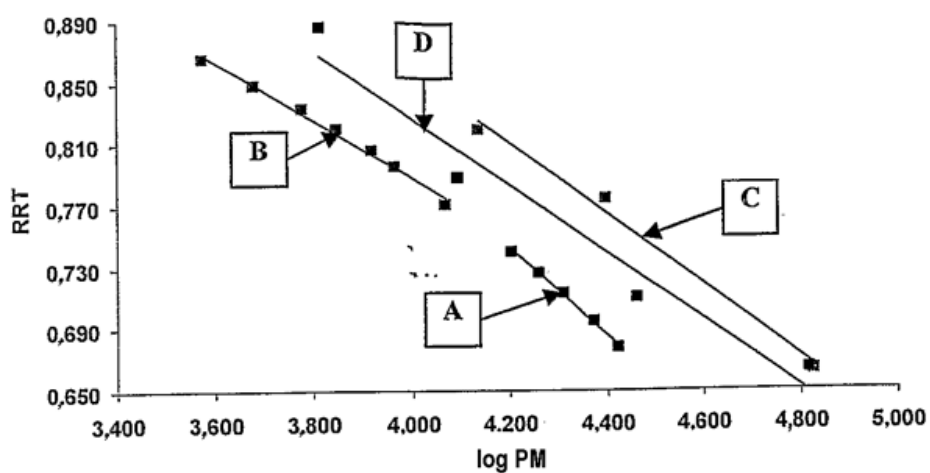


Figura 30



Parámetros lineales

Conjunto de marcadores	Pendiente	Ordenada en el origen	R2
Marcadores de polipéptido 1-5 (A)	-0,188	1,542	0,992
Marcadores de acetato de glatirámero (B)	-0,284	1,935	0,997
Marcadores de proteína (Sigma) (C)	-0,218	1,698	0,960
Marcadores de proteína (Amersham) (D)	-0,232	1,785	0,990

Figura 31