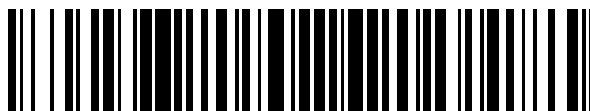


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 482**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2009 E 09703874 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2240200**

54 Título: **Péptido terapéutico de la proteína básica de la mielina PBM83-99 unido a manano**

30 Prioridad:

25.01.2008 GB 0801424

08.02.2008 GB 0802405

29.02.2008 GR 20080100151

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

06.10.2016

73 Titular/es:

VIANEX S.A. (100.0%)

Tatoiou Street 18th Kilometre Athens-Lamia

National Road

146 71 Nea Erythrea, GR

72 Inventor/es:

MATSOUKAS, JOHN;

TSELIOS, THEODORE;

APOSTOLOPOULOS, VASSO;

TSEVELEKI, VIVIAN;

KATSARA, MARIA y

PROBERT, LESLEY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 585 482 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

Péptido terapéutico de la proteína básica de la mielina PBM83-99 unido a manano

- 5 La presente invención se refiere a conjugados de antígenos de mielina que son candidatos útiles para la inmunoterapia de la esclerosis múltiple (EM).

Antecedentes de la invención

- 10 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica del sistema nervioso central (SNC) caracterizada por infiltrados de linfocitos T y macrófagos locales, desmielinización y pérdida de la función neurológica [Steinman, 1996; Martin, *et al.*, 1992; Mantzourani *et al.*, 2005]. La EM es una enfermedad autoinmunitaria provocada por linfocitos T CD4⁺ específicos del SNC. Los autoantígenos candidatos incluyen constituyentes de la vaina mielínica, tales como proteína básica de la mielina (PBM), proteína proteolipídica (PPL) y glicoproteína mielínica oligodendrocitaria (GMO).

- 15 Se ha observado una asociación entre los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II y la enfermedad en pacientes con esclerosis múltiple, en particular HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4. Aunque la patología de la EM permanece incierta, hay indicios de que los linfocitos T que reconocen los epítomos encefalitogénicos de la mielina, tales como PBM, desempeñan un papel patógeno en la inducción de la EM. Los estudios han demostrado que las respuestas de los linfocitos T en pacientes se asocian al reconocimiento de la región 81-105 de la PBM (QDENPWHFFKNIVTPRTPPPSQGK), y con mayor afinidad y unión a HLA-DR2 para el epítomo peptídico PBM₈₃₋₉₉ (ENPVVHFFKNIVTPRTP). El reconocimiento de linfocitos T de esta región de la PBM también se ha demostrado en individuos sanos, aunque en frecuencias precursoras relativamente bajas. La unión de PBM₈₃₋₉₉ a HLA-DR2 se produce a través de residuos V⁸⁷ y F⁹⁰ hidrófobos, mientras que H⁸⁸, H⁸⁹, y K⁹¹ son residuos de contacto TCR [Mantzourani *et al.*, 2005].

- 20 El papel patógeno de los linfocitos T autoinmunitarios que reconocen epítomos encefalitogénicos de la PBM se ha observado asimismo en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), uno de los modelos animales experimentales mejor estudiados de EM. La EAE representa un sistema *in vivo* invaluable para la evaluación de enfoques terapéuticos. La EAE se induce en animales susceptibles por epítomos inmunodominantes de la vaina mielínica. Pueden inducirse características clínicas e histopatológicas similares a la EM en cepas de ratones susceptibles mediante inmunización de los componentes de la mielina. La EAE se media por linfocitos T CD4⁺ del fenotipo Th1 (IFN-γ). Al igual que la EM, la susceptibilidad de la EAE depende del antecedente del CMH del ratón y diferentes péptidos son inmunogénicos e inducen la EAE en diferentes cepas. El residuo 35-55 de la glicoproteína mielínica oligodendrocitaria (GMO) induce EAE crónica (no recidivante) en ratones C57BL/6, el residuo 74-85 de la PBM de cobayas induce EAE aguda (recidivante-remitente) en ratas Lewis y el residuo 139-151 de la proteína proteolipídica (PPL) induce EAE aguda en ratones SJL/J [Zamvil *et al.*, 1990].

- 30 La cepa de ratón SJL/J (haplotipo H-2^S) se utiliza habitualmente para la EAE puesto que numerosas características histopatológicas, clínicas e inmunológicas se parecen a la EM humana en comparación con otras cepas de ratón o rata. En la cepa de ratón SJL/J, los residuos del epítomo PBM₈₁₋₁₀₀ encefalitogénico han demostrado unirse con alta afinidad. De hecho, el epítomo mínimo requerido para la unión es PBM₈₃₋₉₉. Es más, en ratones SJL/J, las respuestas de los linfocitos T CD4 a los residuos 139-151 de la PPL (PPL₁₃₉₋₁₅₁: secuencia HSLGKWLGHDPDKF) son cualitativamente diferentes de las respuestas al encefalitogénico de PBM₈₃₋₉₉, en la que los clones específicos para el péptido PPL son heterogéneos. Como primer paso hacia la comprensión de las bases celulares y moleculares y la relevancia biológica de esta heterogeneidad, los estudios han determinado si la superposición de múltiples epítomos en la PPL₁₃₉₋₁₅₁ es responsable de la diversidad. Los estudios iniciales demostraron que el panel de los clones de los linfocitos T sólo reaccionaba con la superposición de péptidos PPL cuando los péptidos contenían el residuo 144, lo que sugiere que este es un sitio importante para la activación de todos los clones [Kuchroo, *et al.*, 1992]. Además, W¹⁴⁴ es el residuo de contacto TCR dominante, como sustitución en la posición 144 con alanina (A), u otros residuos hidrófobos, tales como fenilalanina (F), suprime la actividad estimulante *in vitro* del péptido y dichos análogos no inducen EAE [Kuchroo, *et al.*, 1992]. El único análogo peptídico antagonista TCR (L¹⁴⁴/R¹⁴⁷), en el que se sustituyen ambos residuos de contacto TCR principales, mostró la actividad antagonista máxima (L¹⁴⁴/R¹⁴⁷), *in vitro* y además proporcionó la mejor inhibición de EAE [Kuchroo, *et al.*, 1994].

- 35 En la cepa de ratón C57BL/6, se ha hallado que los residuos 35-55 de la proteína GMO son encefalitogénicos [McFarlin, *et al.*, 1973]. La enfermedad se provoca por la inmunización con GMO₃₅₋₅₅, resultando en una respuesta de linfocitos T CD4⁺ auxiliares-1 (Th1) que ataca a las áreas mielinizadas del SNC [Zamvil y Steinman, 1990]. Los linfocitos T soportados por los monocitos y células microgliales activadas median la inflamación y la desmielinización. Los linfocitos B y los anticuerpos no son críticos para la inducción de EAE en ratones, aunque los anticuerpos que se unen a los epítomos GMO₃₅₋₅₅ potencian la desmielinización en algunos modelos [Linnington, *et al.*, 1988]. En ratas Lewis, el epítomo PBM₇₄₋₈₅ se ha identificado como inmunodominante para la inducción de EAE. Además, se ha hallado que los análogos peptídicos en base al epítomo PBM₈₃₋₉₉ humano suprimen los síntomas de la EAE inducidos a partir del epítomo PBM₇₄₋₈₅ encefalitogénico. [Mendel *et al.*, 1995; Tselios *et al.*, 1999; Tselios *et al.*, 2000a; Tselios *et al.*, 2000b].

Habida cuenta de lo anterior, los péptidos GMO₃₅₋₅₅, PPL₁₃₉₋₁₅₁, PBM₇₄₋₈₅ y PBM₈₃₋₉₉ y sus equivalentes cíclicos cabeza-cola representan claramente un punto de partida prometedor para el diseño de ligandos peptídicos alterados y análogos peptídicos, que podrían utilizarse para alterar las respuestas de los linfocitos T en estos modelos animales y en consecuencia dar lugar a nuevos enfoques terapéuticos contra la EM y otras enfermedades autoinmunitarias. Además, los epítomos de PBM, PPL y GMO de pacientes con esclerosis múltiple, PBM₈₂₋₁₀₀, [Ala⁸⁶]PBM₈₃₋₉₉, [Ala⁸⁸]PBM₈₃₋₉₉, [Tyr⁸⁹]PBM₈₃₋₉₉, PBM₁₁₀₋₁₁₈, GMO₉₇₋₁₀₈, PPL₉₇₋₁₁₇, PPL₁₈₅₋₂₀₆, PPL₄₀₋₆₀, PPL₁₉₀₋₂₀₉, PPL₁₈₄₋₁₉₉, PPL₈₀₋₈₈₉, PPL₃₀₋₄₉, PPL₁₈₀₋₁₉₉ y similares se reconocen/presentan por medio de los linfocitos T/linfocitos B de la sangre periférica de pacientes con EM o son capaces de inducir respuestas de linfocitos T específicas para el péptido en individuos [Greer, *et al.*, 1997, Singh, *et al.*, 2004, Greer, *et al.*, 2004, Tsuchida, *et al.*, 1994, Trotter, *et al.*, 1998].

Tselios *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 275-283 y el documento WO 2002/077025 describen péptidos PBM₈₇₋₉₉ alterados que proporcionan efectos antagonistas en la encefalomielite alérgica experimental.

Tselios *et al.*, *Analytical Biochemistry* 347 (2005) 121-128 describen la síntesis y el comportamiento electroforético de PBM₇₄₋₈₅ cíclica conjugada a manano a través de un enlazador (Lys-Gly)₅.

Bielekova *et al.*, *Nature Medicine*, vol. 6, n.º 10, octubre de 2000, describen un ensayo clínico con un péptido PBM₈₃₋₉₉ alterado.

Terapias actuales peptídicas para EM

Las terapias actuales peptídicas de EM incluyen el tratamiento con interferones (interferón beta-1 α e interferón beta-1 β) y acetato de glatiramer (copolímero-1) que es una proteína sintética compuesta de los principales aminoácidos Glu, Gln, Lys, Arg de PBM. Estos inmunomoduladores se han aprobado por la AAM en pacientes con EM recidivante-remite. Los interferones administrados por inyección subcutánea reducen la frecuencia, gravedad y duración de la exacerbación, pero su impacto en la prevención de la discapacidad a largo plazo aún no se ha establecido. Además, los efectos secundarios son comunes y consisten en reacciones en el sitio de inyección, fiebre, mialgia y síndrome gripal. Hasta ahora, los beneficios descritos a partir del empleo de interferones y copolímeros son mínimos y la necesidad de mejorar la terapéutica es imprescindible.

Otro enfoque en investigación clínica para la supresión autoinmunitaria es la administración oral de autoantígenos. Se ha demostrado que los antígenos administrados por vía oral suprimen la autoinmunidad en modelos animales, incluyendo EAE, artritis inducida por colágeno y adyuvante, uveítis y diabetes en ratón diabético no obeso. Las bajas dosis de antígeno oral inducen linfocitos T reguladores específicos para antígeno que actúan al liberar citoquinas inhibitorias, tales como FCT- β , IL-4 e IL-10 en el órgano diana. Por consiguiente, puede suprimirse la inflamación en un órgano diana administrando por vía oral un antígeno obtenido a partir del sitio de inflamación, aunque no sea la diana de la respuesta autoinmunitaria. Los ensayos iniciales en humanos de antígeno administrado por vía oral han mostrado resultados positivos en pacientes con EM y artritis reumatoide. Se está llevando a cabo un estudio multicéntrico en fase III, doble ciego, controlado con placebo de la mielina oral en pacientes con EM recidivante-remite, así como ensayos clínicos en fase II que investigan la administración oral de colágeno tipo II en la artritis reumatoide, antígeno S en uveítis e insulina en la diabetes tipo I. Este prometedor método permite la administración oral que resulta ventajosa con respecto a tratamientos previos con interferones y copolímero-1. No obstante, las cuestiones relativas a la naturaleza peptídica y el costo de la sustancia administrada hacen al enfoque mimético no peptídico, incluso en sus comienzos, una meta atractiva a perseguir. En este sentido, nuestros epítomos cíclicos, que son más estables que sus equivalentes epítomos lineales, ofrecen esta propiedad ventajosa.

La presente invención pretende proporcionar un nuevo enfoque a la gestión terapéutica de la EM. Más específicamente, la invención se centra en el diseño y empleo de análogos peptídicos de epítomos de la mielina asociados a la enfermedad que inducen tolerancia de los linfocitos T periféricos.

Declaración de la invención

Las reivindicaciones definen el objeto para el que se solicita la protección, cualquier declaración que va más allá de lo que se define en las reivindicaciones se proporciona a título indicativo.

La presente invención proporciona un enfoque inmunoterapéutico en el cual se conjugan análogos peptídicos inmunodominantes/antigénicos de la proteína básica de la mielina (PBM) (cada uno o como grupos) a manano oxidado o reducido a través de un puente [Lys-Gly]_n para el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM).

Un primer aspecto de la invención se refiere a un conjugado que comprende:

(i) manano; y

(ii) al menos un epítomo que comprende un péptido que es la PBM₈₃₋₉₉, en forma lineal; en el que dicho epítomo se une a manano a través de un puente [(Lys-Gly)_n], en el que n es un número entero de 1 a 10.

La glicosilación es una característica universal de la naturaleza de las proteínas, que determina sus propiedades físico-químicas y biológicas. El diseño y síntesis de glicopéptidos es un tema de intensa investigación en los últimos años, ya que la parte glico mejora las características farmacocinéticas, potencia o altera la actividad biológica y puede utilizarse como herramienta para estudiar las funciones biológicas.

5 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la conjugación de los epítomos inmunodominantes de PBM (lineal) a manano inhibe o previene activamente la enfermedad por la activación de los linfocitos T reguladores específicos para antígeno o mediante la inducción de tolerancia de linfocitos T a los propios antígenos.

10 Un segundo aspecto de la invención se refiere a una mezcla que comprende dos o más conjugados como se ha definido previamente.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una preparación farmacéutica que comprende un conjugado o mezcla como se ha definido previamente, y un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un conjugado o mezcla como se ha definido previamente para su uso en medicina.

20 Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de un conjugado o mezcla como se ha definido previamente en la preparación de un medicamento para tratar la EM o la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una vacuna que comprende un conjugado o mezcla como se ha definido previamente.

25 Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un conjugado o a una mezcla como se ha definido previamente para el tratamiento de un trastorno inmunitario.

Descripción detallada

30 Las reivindicaciones definen el objeto para el que se solicita la protección, cualquier declaración que va más allá de lo que se define en las reivindicaciones se proporciona a título indicativo.

35 La presente invención se refiere a péptidos potentes (lineales) de los epítomos inmunodominantes de PBM que se conjugan con manano oxidado o reducido a través de un espaciador (Lys-Gly)_n. Los conjugados resultan útiles en el tratamiento de la EAE y por consiguiente tienen implicaciones en el tratamiento de la EM. Por vez primera, se han sintetizado epítomos de proteínas de la mielina conjugados a manano oxidado/reducido a través de un espaciador (Lys-Gly)₅ y demuestran la prevención y protección por completo en los animales de los síntomas de EAE sin emplear un adyuvante. Preferentemente, los conjugados de la invención se administran a los animales diluidos en solución tampón (pH 6,0-9,0). La evidencia sugiere que la conjugación de estos epítomos asociados a la enfermedad a manano oxidado o reducido a través de un enlazador (Lys-Gly)_n induce los niveles reducidos de linfocitos T CD4⁺ y citoquinas proliferativos.

40 Los experimentos han demostrado que la inmunización activa de animales con péptidos conjugados a manano oxidado/reducido confiere protección contra EAE (el modelo animal utilizado más ampliamente para la EM humana). Esta protección resulta evidente en dos especies diferentes, utilizando tres modelos diferentes de EAE. Un modelo representa la forma recidivante-remitente de la enfermedad (GMO₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6) y los otros representan la enfermedad monofásica aguda seguida de una remisión completa (PBM₇₂₋₈₅ en ratas Lewis o PPL₁₃₉₋₁₅₁ en ratones SJL/J). Los resultados indican que los conjugados peptídicos a manano podrían ser potencialmente de valor terapéutico significativo en el tratamiento de la EM.

50 CONJUGADO

Un aspecto de la invención se refiere a un conjugado que comprende:

- 55 (i) manano; y
(ii) al menos un epítomo que comprende un péptido que es la PBM₈₃₋₉₉, en forma lineal;

en el que dicho epítomo se une a manano a través de un puente [(Lys-Gly)_n], en el que n es un número entero de 1 a 10.

60 Como se utiliza en el presente documento, el término "epítomo" se refiere a una región molecular en la superficie de un antígeno que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria y combinarse con el anticuerpo específico producido por dicha respuesta.

65 En el contexto de la presente invención, el término "fragmento peptídico" se refiere a una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de una proteína de longitud completa. Preferentemente, el fragmento peptídico posee uno o más

residuos aminoácidos suprimidos de la proteína de longitud completa.

En el contexto de la presente invención, estos epítomos se obtienen, o constituyen a partir de fragmentos de aminoácidos específicos de las secuencias proteicas de la proteína básica de la mielina (PBM). Los epítomos pueden ser lineales.

El epítomo corresponde a la secuencia peptídica SEQ ID NO. 1:

H-Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-Val-Thr-Pro-Arg-Thr-Pro-OH [SEQ ID NO. 1]

en forma lineal.

En un aspecto, K⁹¹ se sustituye con un aminoácido seleccionado entre A, R, E, F e Y.

En un aspecto, K⁹¹ se sustituye con un aminoácido seleccionado entre A, E, e Y.

En un aspecto, K⁹¹ se sustituye con el aminoácido Y.

En un aspecto, P⁹⁶ se sustituye con un aminoácido natural.

En un aspecto, P⁹⁶ se sustituye con el aminoácido A.

En un aspecto, K⁹¹ se sustituye con un aminoácido seleccionado entre A, R, E, F e Y y P⁹⁶ se sustituye con el aminoácido A.

En un aspecto, K⁹¹ se sustituye con el aminoácido R y P⁹⁶ se sustituye con el aminoácido A.

En otro aspecto, K⁹¹ se sustituye con el aminoácido A y P⁹⁶ se sustituye con el aminoácido A.

En un aspecto, el péptido de la invención se selecciona entre las siguientes secuencias:

[R⁹¹, A⁹¹]PBM₈₃₋₉₉ ENPWHFFRNIVTARTP
[A⁹¹, A⁹⁶]PBM₈₃₋₉₉ ENPWHFFANIVTARTP

[A⁹¹, A⁹¹]PBM₈₃₋₉₉ es un aspecto particularmente preferente.

En otro aspecto, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (Ib),

ENPVVHIFFK⁹¹NIVTP⁹⁶RTP (Ib)

en la que al menos uno de K⁹¹ y P⁹⁶ se sustituye con un aminoácido seleccionado entre R, E, F e Y.

En otro aspecto, el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de fórmula (Ib), en la que al menos uno de K⁹¹ y P⁹⁶ se sustituye con un aminoácido seleccionado entre R, E, F e Y.

En un aspecto, K⁹¹ se sustituye con un aminoácido seleccionado entre R, E, F e Y.

Más preferentemente, el péptido de fórmula (Ib) se selecciona entre los siguientes:

[E⁹¹]PBM₈₃₋₉₉ ENPWHFFENIVTPRTP

[F⁹¹]PBM₈₃₋₉₉ ENPWHFFFNIVTPRTP

[Y⁹¹]PBM₈₃₋₉₉ ENPVVHFFYNIVTPRTP

El péptido [Y⁹¹]PBM₈₃₋₉₉ es un aspecto particularmente preferente, lineal o cíclico.

Preferentemente, el péptido de fórmula (Ia) o (Ib) es un péptido lineal.

En otro aspecto de la divulgación, el péptido es un péptido cíclico que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (Ic),

ENPVVHIFFK⁹¹NIVTP⁹⁶RTP (Ic)

o una variante de la misma, en la que uno o dos aminoácidos se sustituyen con un aminoácido natural o no natural.

Preferentemente, el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de fórmula (Ic) ciclada cabeza-cola.

Preferentemente, al menos uno de K⁹¹ y P⁹⁶ se sustituye con un aminoácido natural o no natural.

5 En un aspecto, uno o dos aminoácidos se sustituyen con un aminoácido seleccionado entre A, R, E, F, S e Y.

En un aspecto, K⁹¹ se sustituye con un aminoácido seleccionado entre A, R, E, F e Y.

10 En un aspecto, P⁹⁶ se sustituye con un aminoácido natural.

Más preferentemente, P⁹⁶ se sustituye con el aminoácido A.

15 En un aspecto, K⁹¹ se sustituye con un aminoácido seleccionado entre A, R, F, S e Y y P⁹⁶ se sustituye con el aminoácido A.

Más preferentemente, el residuo K⁹¹ se sustituye con el aminoácido A. Por consiguiente, en un aspecto, el análogo cíclico es ciclo(83-99)[A⁹¹]PBM₈₃₋₉₉, con sustitución de alanina en la posición 91 y ciclación cabeza-cola entre los residuos 83-99.

20 En un aspecto, el péptido cíclico se selecciona entre los siguientes:

análogos péptidos	secuencia
ciclo(B3-99)PBM ₈₃₋₅₃	ciclo(83-99)ENP V V H F F K N I V T P R T P
ciclo(B3-99)[A ⁹¹]PBM ₈₃₋₉₉	ciclo(83-93)ENP V V H F F <u>A</u> N I V T P R T P
ciclo(B3-99)[R ⁹¹]PBM ₈₃₋₉₉	ciclo(83-99)ENP V V H F F <u>R</u> N I V T P R T P
ciclo(B3-99)[F ⁹¹]PBM ₈₃₋₉₉	ciclo(83-99)ENP V V H F F <u>F</u> N I V T P R T P
ciclo(B3-93)[Y ⁹³]PBM ₈₃₋₉₉	ciclo(93-99)ENP V V H F F <u>Y</u> N I V T P R T P
ciclo(B3-99)[E ⁹¹]PBM ₈₃₋₉₉	ciclo(83-99)ENP V V H F F <u>E</u> N I V T P R T P
ciclo[B3-99][A ⁹¹ ,A ⁹⁶]PBM ₈₃₋₉₉	ciclo(83-99)ENP V V H F F <u>A</u> N I V T <u>A</u> R T P
ciclo(B3-99)[R ⁹¹ ,A ⁹⁶]PBM ₈₃₋₉₉	ciclo(83-99)ENP V V H F F <u>R</u> N I V T <u>A</u> R T P
ciclo(B3-99)[F ⁹¹ ,A ⁹⁶]PBM ₈₃₋₉₉	ciclo(83-99)ENP V V H F F <u>F</u> N I V T <u>A</u> R T P
ciclo(B3-99)[Y ⁹¹ ,A ⁹⁶]PBM ₈₁₋₉₉	ciclo(83-99)ENP V V H F F <u>Y</u> N I V T <u>A</u> R T P
ciclo(B3-99)[S ⁵¹ ,A ⁹⁶]PBM ₈₃₋₉₉	ciclo(83-99)ENP V V H F F <u>S</u> N I V T <u>A</u> R T P

25 En la nomenclatura anterior, (83-99) denota el sitio de ciclación. Por ejemplo, el residuo del aminoácido 83 se une al residuo 99; es decir, el péptido se cicla "cabeza-cola". El ciclo (83-99)[Y⁹¹]PBM₈₃₋₉₉ resulta particularmente preferente.

En otro aspecto de la divulgación, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (IIa),



30 en forma lineal o cíclica.

En otro aspecto, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (IIa),



35 en la que K⁹¹ se sustituye con el aminoácido A y P⁹⁶ se sustituye con el aminoácido A, en el que dicho péptido está en forma lineal.

40 En un aspecto, el péptido de fórmula (IIa) consiste en la secuencia VHFFANIVTARTP.

En otro aspecto, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (IIb),



45 en la que K⁹¹ se sustituye con el aminoácido A y P⁹⁶ se sustituye con el aminoácido A, en el que dicho péptido está en forma cíclica.

50 En un aspecto, el péptido de fórmula (IIb) consiste en la secuencia VHFFANIVTARTP ciclada cabeza-cola, es decir, ciclación entre los residuos 87-99.

En otro aspecto, el epítipo comprende un fragmento peptídico de la glicoproteína mielínica oligodendrocitaria (GMO) en forma lineal o cíclica. Preferentemente, el epítipo comprende un péptido seleccionado entre GMO₃₅₋₅₅ y GMO₉₇₋₁₀₈, y variantes de los mismos, en forma lineal o cíclica.

Más preferentemente, el epítipo es un péptido seleccionado entre GMO₃₈₋₅₅ y GMO₉₇₋₁₀₈, y variantes de los mismos, en forma lineal o cíclica.

5 En un aspecto, el epítipo comprende el péptido GMO₃₅₋₅₅, o una variante del mismo. Más preferentemente, el epítipo es GMO₃₅₋₅₅, o una variante del mismo, en forma lineal o cíclica.

En un aspecto, el epítipo corresponde a la secuencia peptídica SEQ ID NO. 2, o una variante de la misma:

10 H-Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Pro-Pro-Phe-Ser-Arg-V al-Val-His-Leu-Tyr-Arg-Asn-Gly-Lys-OH [SEQ ID NO. 2]
en forma lineal o cíclica. Preferentemente, el péptido está en forma lineal.

15 En otro aspecto, el epítipo comprende un fragmento peptídico de la proteína proteolipídica (PPL) en forma lineal o cíclica.

Preferentemente, el epítipo comprende un péptido seleccionado entre PPL₉₇₋₁₁₇, PPL₁₈₅₋₂₀₆, PPL₄₀₋₆₀, PPL₁₃₉₋₁₅₁, PPL₁₉₀₋₂₀₉, PPL₁₈₄₋₁₉₉, PPL₈₀₋₈₈, PPL₃₀₋₄₉, PPL₁₈₀₋₁₉₉, y sus variantes, en forma lineal o cíclica.

20 Más preferentemente, el epítipo es un péptido seleccionado entre PPL₉₇₋₁₁₇, PPL₁₈₅₋₂₀₆, PPL₄₀₋₆₀, PPL₁₃₉₋₁₅₁, PPL₁₉₀₋₂₀₉, PPL₁₈₄₋₁₉₉, PPL₈₀₋₈₈, PPL₃₀₋₄₉, PPL₁₈₀₋₁₉₉, y sus variantes, en forma lineal o cíclica.

En un aspecto, el epítipo comprende el péptido PPL₁₃₉₋₁₅₁, o una variante del mismo. Incluso más preferentemente, el epítipo es PPL₁₃₉₋₁₅₁, o una variante del mismo, en forma lineal o cíclica.

25 En un aspecto, el epítipo corresponde a la secuencia peptídica SEQ ID NO. 3, o una variante de la misma:

30 H-His-Ser-Leu-Gly-Lys-Trp-Leu-Gly-His-Pro-Asp-Lys-Phe-OH [SEQ ID NO. 3]
en forma lineal o cíclica. Preferentemente, el péptido está en forma lineal.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "variante" incluye cualquier variación en la que; (a) uno o más residuos aminoácidos se sustituyen con un residuo aminoácido presente de forma natural o no natural, (b) se invierte el orden de dos o más residuos aminoácidos, (c) ambos (a) y (b) se presentan juntos, (d) un grupo espaciador está presente entre dos residuos aminoácidos, (e) uno o más residuos aminoácidos se encuentran en forma peptoide, (f) se ha modificado la estructura principal (N-C-C) de uno o más residuos aminoácidos del péptido, o cualquiera de (a)-(f) en combinación. Preferentemente, las variantes surgen de uno de (a), (b) o (c).

40 Más preferentemente, uno o dos residuos de aminoácidos se sustituyen con uno o varios residuos aminoácidos. Incluso más preferentemente, un residuo aminoácido se sustituye con otro residuo aminoácido. Preferentemente, la sustitución es homóloga.

45 Se puede producir la sustitución homóloga (tanto sustitución como reemplazo se utilizan en el presente documento con significado de intercambio de un residuo aminoácido existente, con un residuo alternativo) es decir, sustitución de semejante por semejante, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no homóloga puede producirse también, es decir, a partir de una clase de residuo a otro, o implica alternativamente la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (en lo sucesivo denominada Z), ácido diaminobutírico ornitina (en lo sucesivo denominado B), norleucina ornitina (en lo sucesivo denominada O), piridilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina, un listado más detallado de lo cual aparece a continuación. En cada resto del transportador peptídico puede modificarse a la vez más de un residuo aminoácido.

50 Como se utiliza en el presente documento, los aminoácidos se clasifican según las siguientes clases;

55 básica; H, K, R
ácida; D, E
no polar; A, F, G, I, L, M, P, V, W
polar; C, N, Q, S, T, Y,

60 (empleando la notación de una única letra de aminoácidos aceptada internacionalmente) y la sustitución homóloga y no homóloga se define utilizando estas clases. Por consiguiente, la sustitución homóloga se utiliza para referirse a la sustitución en la misma clase, mientras que la sustitución no homóloga se refiere a la sustitución de una clase diferente o por un aminoácido no natural.

65 Los grupos espaciadores apropiados que pueden insertarse entre cualesquiera de dos residuos aminoácidos del resto transportador incluyen grupos alquilo, tales como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores aminoácidos, tales como residuos de glicina o β-alanina. Una forma adicional de variante, tipo (e), implica la presencia de uno o más residuos aminoácidos en forma peptoide, se entenderá adecuadamente por los expertos en la materia. Para que no quede lugar a dudas, "la forma peptoide" se utiliza para referirse a una variante de residuos

aminoácidos en la que el grupo sustituyente α -carbono es un átomo de nitrógeno del residuo en lugar de α -carbono. Los procesos para preparar péptidos en forma peptoides se conocen en la materia, por ejemplo Simon RJ *et al.*, *PNAS* (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (1995) 13(4), 132-134. La modificación tipo (f) puede producirse por métodos, tales como los descritos en la solicitud internacional PCT/GB99/01855.

En la definición de fórmula (I) se ha demostrado que resulta preferente que la variación de aminoácidos, preferentemente de tipo (a) o (b), se produzca de forma independiente en cualquier posición. Como se ha mencionado previamente puede ocurrir simultáneamente más de una sustitución homóloga o no homóloga. Además la variante puede ocurrir en virtud de la inversión de la secuencia de un número de residuos aminoácidos en una secuencia.

En un aspecto, el reemplazo de un residuo aminoácido se selecciona entre los residuos de alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

El péptido de la presente invención puede comprender aminoácidos en forma L o D, es decir, uno o más residuos, preferentemente todos los residuos pueden estar en forma L o D.

El conjugado de la invención se une a manano a través de un puente $[(\text{Lys-Gly})_n]$, en el que n es un número entero de 1 a 10. Preferentemente, n es un número entero de 1 a 5, y aún más preferentemente, n es 5. En una realización preferente, n es de 6 a 10, más preferentemente de 7 a 10. En otra realización preferente, n es de 1 a 4, más preferentemente 1 a 3.

La conjugación se produce a través de la formación de base de Schiff entre los grupos amino libres de la lisina y manano oxidado. Los conjugados a manano reducido pueden prepararse mediante la adición de un agente reductor (p. ej., borohidruro de sodio) a los conjugados a manano oxidado.

El manano (poli-manosa) conjugado a MUC1 FP o péptidos (MUC1, un antígeno encontrado en las células de adenocarcinoma) en la forma oxidada (que comprende aldehídos) o reducida (aldehídos reducidos a alcoholes) genera respuestas inmunitarias diferenciales. El manano se ha utilizado como un transportador capaz de orientar selectivamente péptidos al receptor de manosa, que se encuentra predominantemente en macrófagos y en las células dendríticas (CDs). Tras la unión, se genera la presentación del CMH clase I o CMH clase II de péptidos, ya sea estimulando respuestas inmunitarias LTC/Ac o Th1/Th2. Las citoquinas Th1 liberadas tras la administración terapéutica se asocian con la exacerbación de la EM. No obstante, las citoquinas Th2 (tales como IL-4 e IL-10) poseen propiedades antiinflamatorias y reducen las respuestas Th1. El antígeno de manosa da lugar a una potencia 100-10.000 veces mejorada para estimular la presentación del CMH clase II a los linfocitos T [Apostolopoulos, *et al.*, 2000a; Apostolopoulos, *et al.*, 2000b]. El manano se ha investigado ampliamente por su capacidad para generar respuestas en varios sistemas modelo. Se ha demostrado que su función adyuvante surge de su capacidad para orientar selectivamente el receptor de manosa en las células presentadoras de antígenos. Los ratones (consanguíneos o MUC1 transgénicos) inmunizados con la proteína MUC1 a manano se protegen contra una estimulación tumoral que expresa MUC1, así como la inversión de tumores establecidos en ratones [Apostolopoulos, *et al.*, 1996; Acres, *et al.*, 2000]. Se observaron resultados similares en ratones transgénicos MUC1. Cualquiera de una respuesta Th1 (IL-2, IFN- γ , IL-12, FNT- α y anticuerpos IgG2a) o respuesta Th2 (sin IFN- γ o IL-12, aunque cantidades significativas de IL-4, IL-10 y FCT- β y anticuerpos IgG1) se genera en función del modo de conjugación, y si el manano se encuentra en un estado oxidado o reducido [Lees, *et al.*, 1999; Lees, *et al.*, 2000a; Lees, *et al.*, 2000b]. Otras citoquinas, IL-5, IL-6, IL-13, IL-15 e IL-18 también se han medido con inmunógenos con manano oxidado o reducido. Además de las respuestas tipo Th1/Th2 a MUC1 en ratones, se han demostrado respuestas similares en seres humanos y monos [Vaughan, *et al.*, 1999; Vaughan, *et al.*, 2000] con la proteína MUC1 y en un péptido MSP-1 *Anaplasma marginale* en vacas [Davis, *et al.*, 2002]. El empleo de manano oxidado o reducido conjugado con epítomos PBM₈₃₋₉₉, PPL₁₃₉₋₁₅₁ o GMO₃₅₋₅₅ y en particular, el empleo de manano reducido para desviar aún más las respuestas inmunitarias a Th2 cuando se conjuga con péptidos PBM, constituye una prometedora estrategia para la inmunoterapia de EM.

En una realización preferente de la invención, el manano es manano reducido.

En otra realización preferente de la invención, el manano es manano oxidado.

En una realización especialmente preferente, más de un epítomo se une a manano, es decir, múltiples epítomos se unen a un único residuo de manano. Para la presente realización, los epítomos pueden ser iguales o diferentes.

Por consiguiente, en una realización particularmente preferente, el conjugado comprende una mezcla (o "cóctel") de más de uno de dichos epítomos conjugados a un único residuo de manano a través de un puente $[(\text{Lys-Gly})_n]$, en el que n es un número entero de 1 a 10, es decir, el manano puede conjugarse a una pluralidad de epítomos. Como se ha indicado previamente, el manano puede estar oxidado o reducido.

En una realización muy preferente, la invención se refiere a un conjugado que comprende:

(i) manano; y

(ii) (a) un epítipo que comprende un péptido que es la PBM₈₃₋₉₉ en forma lineal; y

5 (ii) (b) un epítipo que comprende un fragmento peptídico de la glicoproteína mielínica oligodendrocitaria (GMO) en forma lineal o cíclica; y

(ii) (c) un epítipo que comprende un fragmento peptídico de la proteína proteolipídica (PPL) en forma lineal o cíclica;

10 en el que cada epítipo se une a manano a través de un puente [(Lys-Gly)_n], en el que n es un número entero de 1 a 10.

Otra realización de la invención se refiere a una mezcla que comprende dos o más conjugados definida previamente. Para la presente realización, los dos o más conjugados pueden ser iguales o diferentes. Además, cada conjugado puede comprender uno o más epítipos, que pueden ser iguales o diferentes.

15 APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Otro aspecto de la invención se refiere a un conjugado descrito previamente para su uso en medicina.

20 Otro aspecto se refiere al uso de un conjugado de la invención en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno inmunitario.

En una realización preferente, el trastorno inmunitario es una enfermedad autoinmunitaria.

25 En una realización particularmente preferente, el trastorno es esclerosis múltiple (EM).

La EM es una enfermedad autoinmunitaria grave en la que se produce la destrucción de la vaina mielínica y la pérdida de la función neurológica [Steinman, 1996]. Se halló que los péptidos lineales PBM₈₃₋₉₉: H-Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-Val-Thr-Pro-Arg-Thr-Pro-OH, PPL₁₃₉₋₁₅₁: H-His-Ser-Leu-Gly-Lys-Leu-Trp-Gly-His-Pro-Asp-Lys-Phe-OH y GMO₃₅₋₅₅: H-Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Pro[Ser]-Pro-Phe-Ser-Arg-Val-Val-His-Leu-Tyr-Arg-Asn-Gly-Lys-OH inducen EAE en modelos animales. No obstante, su conjugación a manano reducido u oxidado previno completamente la inducción de EAE.

35 En otra realización preferente, el trastorno es encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

En una realización preferente, la EAE es EAE inducida por PBM₇₄₋₉₅.

En una realización preferente, la EAE es EAE inducida por PBM₈₃₋₈₉.

40 En otra realización preferente, la EAE es EAE inducida por GMO₃₅₋₅₅.

En otra realización preferente, la EAE es EAE inducida por PPL₁₃₁₋₁₃₉.

45 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para tratar un trastorno inmunitario, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto un conjugado como se ha definido previamente.

Preferentemente, el trastorno inmunitario es una enfermedad autoinmunitaria. Más preferentemente, el trastorno es esclerosis múltiple (EM) y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

50 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de inmunización de un sujeto contra un trastorno inmunitario, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto un conjugado como se ha definido previamente.

Preferentemente, el péptido o conjugado se administra en una cantidad suficiente para causar la supresión de la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica (EAE).

55 Otro aspecto de la invención se refiere a un conjugado o mezcla según la invención para el tratamiento de un trastorno inmunitario.

60 COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido o un conjugado según la invención, mezclado con un diluyente, excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable.

65 A pesar de que los conjugados de la presente invención (incluyendo sus sales, ésteres farmacéuticamente aceptables y solvatos farmacéuticamente aceptables) puedan administrarse solos, generalmente se administrarán

mezclados con un transportador, excipiente o diluyente, en particular para la terapia humana. Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria.

5 Ejemplos de dichos excipientes adecuados para las diversas formas diferentes de composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden hallarse en "*Handbook of Pharmaceutical Excipients*", 2ª edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller.

10 Transportadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico se conocen adecuadamente en la materia farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

Ejemplos de transportadores adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

15 La selección del transportador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, o además, el transportador, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) solubilizante(s).

20 Ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

25 Ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares.

30 Conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso agentes aromatizantes pueden proporcionarse en la composición farmacéutica. Ejemplos de conservantes incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Pueden utilizarse asimismo antioxidantes y agentes de suspensión.

VACUNAS

35 Otro aspecto de la invención se refiere a una vacuna o composición inmunogénica que comprende un conjugado como se ha definido previamente.

40 Las composiciones inmunogénicas de la invención están preferentemente adyuvantadas. Los adyuvantes empleados en la presente invención son aquellos fisiológicamente aceptables para seres humanos, estos incluyen, entre otros, una sal de aluminio, tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también pueden ser una sal de calcio, hierro o cinc, adyuvantes de emulsión en base a aceite/tensioactivo, tales como Montanide (TM) en el que diferentes tensioactivos (especialmente oleato de manitol) se combinan con un aceite mineral, emulsiones que contienen escualeno, tales como MF59(TM), monofosforil lípido A, o lipopolisacárido mutante *Neisseriae*, una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente, o polifosfacenos.

45 Preferentemente, el adyuvante se administra al mismo tiempo que el de la invención y en realizaciones preferentes se formulan juntos.

50 La composición de vacuna de la presente invención es preferentemente estéril. Además, la composición puede contener componentes que preservan contra la infestación y el crecimiento de microorganismos.

Resulta preferente que la composición de vacuna se fabrique en forma de un líquido acuoso estéril que se prepara para la administración inmediata.

55 En una realización preferente de la invención, la composición de vacuna de la invención puede formularse en forma de dosificación unitaria como se ha descrito hasta la fecha para facilitar la administración y garantizar la uniformidad de la dosificación. La formulación puede efectuarse empleando técnicas disponibles, tales como las aplicables a las preparaciones de emulsiones.

SALES/ÉSTERES

60 Los péptidos/conjugados de la invención pueden estar presentes como sales o ésteres, en particular, sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

65 Las sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos/conjugados de la invención incluyen sales de adición de ácido o de base adecuadas de las mismas. Una revisión de las sales farmacéuticas adecuadas puede hallarse en Berge *et al*, *J Pharm Sci*, 66, 1-19 (1977). Las sales se forman, por ejemplo, con ácidos inorgánicos fuertes, tales

como ácidos minerales, p. ej., ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácidos hidroalcoólicos; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que son insustituídos o sustituidos (p. ej., por halógeno), tales como ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo ácido oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos alquil (C₁-C₄) o aril sulfónico que son insustituídos o sustituidos (por ejemplo, por un halógeno), tales como ácido metano o p-toluensulfónico.

Los ésteres se forman utilizando ácidos orgánicos o alcoholes/hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que se esterifica. Los ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 12 átomos de carbono que son insustituídos o sustituidos (p. ej., por halógeno), tales como ácido acético; con ácido dicarboxílico saturado o insaturado, por ejemplo ácido oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos alquil (C₁-C₄) o aril sulfónico, que son insustituídos o sustituidos (por ejemplo, por un halógeno), tales como ácido metano o p-toluensulfónico. Hidróxidos adecuados incluyen hidróxidos inorgánicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio. Alcoholes incluyen alcoholes de 1-12 átomos de carbono que pueden ser insustituídos o sustituidos, (p. ej., por un halógeno).

ENANTIÓMEROS/TAUTÓMEROS

En todos los aspectos de la presente invención discutidos previamente, la invención incluye, cuando sea apropiado, todos los enantiómeros y tautómeros de los péptidos/conjugados. El experto en la materia reconocerá compuestos que poseen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quirales) o características tautoméricas. Los enantiómeros y/o tautómeros correspondientes pueden aislarse/prepararse por métodos conocidos en la materia.

ESTEREOISÓMEROS E ISÓMEROS GEOMÉTRICOS

Algunos de los péptidos/conjugados de la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, p. ej., pueden poseer uno o más centros asimétricos y/o geométricos y así pueden existir en dos o más formas estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros individuales e isómeros geométricos, y mezclas de los mismos. Los términos empleados en las reivindicaciones abarcan estas formas, siempre que dichas formas retengan la actividad funcional apropiada (aunque no necesariamente en el mismo grado).

La presente invención también incluye todas las variantes isotópicas adecuadas de los péptidos/conjugados o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Una variante isotópica se define como aquella en la que al menos un átomo se sustituye con un átomo que posee el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica normalmente hallada en naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los péptidos/conjugados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro, tales como ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁷O, ¹⁸O, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ¹⁸F y ³⁶Cl, respectivamente. Ciertas variantes isotópicas de los péptidos/conjugados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, por ejemplo, aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo, tal como ³H o ¹⁴C, son útiles en estudios de distribución tisular en fármacos y/o sustrato. Los isótopos tritados, es decir, ³H, y carbono 14, es decir, ¹⁴C, resultan particularmente preferentes por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos, tales como deuterio, es decir, ²H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, aumento de la semivida *in vivo* o reducción de requerimientos de dosificación y por tanto pueden preferirse en algunas circunstancias. Las variantes isotópicas de los péptidos/conjugados de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de la presente invención pueden prepararse generalmente por medio de procedimientos convencionales empleando variantes isotópicas apropiadas de reactivos aptos.

SOLVATOS

La presente invención también incluye el uso de formas de solvato de los péptidos/conjugados de la presente invención. Los términos empleados en las reivindicaciones abarcan estas formas.

POLIMORFOS

La invención se refiere además a los péptidos/conjugados de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas (an)hidras. Se establece de forma adecuada en la industria farmacéutica que los compuestos químicos pueden aislarse en cualquiera de dichas formas variando ligeramente el método de purificación y o forma de aislamiento de los disolventes utilizados en la preparación sintética de dichos compuestos.

PROFÁRMACOS

La divulgación incluye además los péptidos/conjugados de la presente invención en forma de profármaco. Dichos profármacos son generalmente péptidos/conjugados en los que uno o más grupos apropiados se han modificado de manera tal que la modificación puede invertirse tras la administración a un sujeto humano o mamífero. Dicha inversión se realiza generalmente por una enzima natural presente en dicho sujeto, aunque es posible administrar un segundo agente junto con dicho profármaco para llevar a cabo la inversión *in vivo*. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen éster (por ejemplo, cualquiera de las descritas previamente), en las que la inversión que puede llevarse a cabo es una esterasa etc. Los expertos en la materia conocerán adecuadamente otros sistemas.

ADMINISTRACIÓN

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden adaptarse para vías oral, rectal, vaginal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intratecal, intrabronquial, subcutánea, intradérmica, intravenosa, nasal, bucal o sublingual de administración.

Para administración oral, se hace uso particular de pastillas comprimidas, píldoras, comprimidos, grageas, gotas, y cápsulas.

Otras formas de administración comprenden soluciones o emulsiones que pueden inyectarse por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal o intramuscular, y que se preparan a partir de soluciones estériles o esterilizables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden estar en forma de supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, ungüentos, cremas, geles, pulverizaciones, soluciones o polvos para espolvorear.

Un medio alternativo de administración transdérmica es por medio del uso de un parche cutáneo. Por ejemplo, el principio activo puede incorporarse en una crema que consiste en una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. El principio activo también puede incorporarse a una concentración comprendida entre 1 y 10 % en peso, en un ungüento que consiste en una cera blanca o base de parafina blanda blanca junto con dichos estabilizadores y conservantes que pueden requerirse.

Las composiciones pueden formularse en forma de dosificación unitaria, es decir, en forma de porciones discretas que contienen una dosis unitaria, o un múltiplo o subunidad de una dosis unitaria.

DOSIFICACIÓN

Una persona experta en la materia puede determinar fácilmente una dosis apropiada de una de las composiciones instantáneas para administrar a un sujeto sin experimentación excesiva. Generalmente, un médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un paciente individual y dependerá de una variedad de factores incluyendo actividad del compuesto específico empleado, estabilidad metabólica y duración de acción de ese compuesto, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, gravedad de la afección particular, y terapia individual a la que se somete. Las dosificaciones divulgadas en el presente documento son ejemplos de caso ordinario. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se requieran intervalos de dosificación mayor o menor, y estos están dentro del alcance de la presente invención.

COMBINACIONES

En una realización particularmente preferente, uno o más péptidos/conjugados de la invención se administran en combinación con uno o varios agentes terapéuticamente activos, por ejemplo, fármacos existentes disponibles en el mercado. En tales casos, los compuestos de la invención pueden administrarse de forma consecutiva, simultánea o secuencialmente con uno o varios agentes.

La terapia de combinación es deseable con el fin de evitar un solapamiento de toxicidades mayores, mecanismo de acción y mecanismo(s) de resistencia. Además, también es deseable administrar la mayoría de los fármacos en sus dosis máximas toleradas con intervalos de tiempo mínimos entre dichas dosis. Las principales ventajas de combinar fármacos quimioterapéuticos son aquellas que pueden favorecer efectos sinérgicos aditivos o posibles mediante interacciones bioquímicas y también pueden disminuir la aparición de resistencia en las células tumorales precoces que habrían sido de otra manera sensibles a la quimioterapia inicial con un único agente.

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitativos, y con referencia a las figuras siguientes (figuras y ejemplos marcados con un asterisco (*) se incluyen como referencia), en los que:

*La Figura 1 muestra la puntuación media clínica de los grupos de ratones que recibieron la vacunación profiláctica con conjugados peptídicos GMO₃₅₋₅₅ a manano oxidado/reducido antes de la inducción de EAE por GMO₃₅₋₅₅ (n=6 para todos los grupos).

*La Figura 2 muestra los cambios medios de peso corporal en los grupos de ratones que habían recibido la vacunación profiláctica con conjugados peptídicos GMO₃₅₋₅₅ a manano oxidado/reducido antes de la inducción de EAE por GMO₃₅₋₅₅.

5 *La Figura 3 muestra las puntuaciones medias clínicas de los ratones que recibieron vacunación con péptido GMO₃₅₋₅₅ (cuadrados negros, n=6) antes de la inducción de EAE por GMO₃₅₋₅₅. Los animales no vacunados se utilizaron como controles (n=3, cuadrados blancos).

10 *La Figura 4 muestra los cambios medios de peso corporal en los ratones que recibieron la vacunación con péptido GMO₃₅₋₅₅ (cuadrados negros, n=6) antes de la inducción de EAE por GMO₃₅₋₅₅. Los animales no vacunados se utilizaron como controles (n=3, cuadrados blancos).

15 *La Figura 5 muestra la tinción hematoxilina-eosina y azul luxol rápido de las secciones de la médula espinal de los grupos indicados de ratones para observar la infiltración celular inflamatoria y la desmielinización, respectivamente.

20 *La Figura 6 muestra los resultados de los ratones individuales de cada uno de los grupos experimentales para los que se realizó el análisis histológico tras la inducción de EAE por GMO₃₅₋₅₅. Se muestran la infiltración de la médula espinal y la desmielinización, además de la infiltración cerebral y la desmielinización. (Abreviaturas: ubi = ubicua, cer = cerebelo, men = meninges, vac = vacuolación). La inflamación en la médula espinal se determinó por cuantificación absoluta verdadera; los números significan infiltrados inflamatorios/mm² de tejido. En el cerebro se utilizó una puntuación semicuantitativa según la cual 0,5 = infiltrados perivasculariales únicos; 1 = infiltrados inflamatorios múltiples. La desmielinización se puntuó de la siguiente manera: 0,5: manguitos perivasculariales únicos de desmielinización, 1: desmielinización perivascularial ubicua o subpial, 2: placas desmielinizadas confluentes, 3: desmielinización focal profunda, que implica aproximadamente 1/2 de la sustancia blanca de la médula espinal, al menos en un segmento de la médula espinal, 4: desmielinización extensa, por ejemplo desmielinización completa de la sustancia blanca de la médula espinal, al menos en un segmento de la médula espinal. Los controles 1, 2, 3 son iguales que el control TFS, ya que el experimento se llevó a cabo dos veces.

30 *La Figura 7 muestra la proliferación de esplenocitos aislados 25 días postinducción de EAE por GMO₃₅₋₅₅ a partir de ratones inmunizados con GMO₃₅₋₅₅ a manano oxidado/reducido, sólo manano oxidado/reducido, o TFS como control. Los esplenocitos se estimularon *ex vivo* con concentraciones crecientes de péptido GMO₃₅₋₅₅. (Control TFS, círculos cerrados, n=4; GMO₃₅₋₅₅ a manano oxidado, cuadrados cerrados, n=6; GMO₃₅₋₅₅ a manano reducido, cuadrados abiertos, n=6; manano oxidado, triángulos cerrados, n=5, manano reducido, triángulos abiertos, n=4).

35 *La Figura 8 muestra la proliferación de esplenocitos aislados 25 días postinducción de EAE por GMO₃₅₋₅₅ a partir de ratones que se inmunizaron con sólo el péptido GMO₃₅₋₅₅, y se estimularon *ex vivo* con concentraciones crecientes de péptido GMO₃₅₋₅₅. (Control TFS, círculos abiertos, n=3; péptido GMO₃₅₋₅₅, círculos cerrados, n=6).

40 *La Figura 9 muestra la producción de citoquinas medida en sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos que se estimularon durante 48 horas con 10 µg/ml de péptido GMO₃₅₋₅₅. Los esplenocitos se aislaron 25 días postinducción de EAE por GMO₃₅₋₅₅. Se muestra la significación estadística tras la comparación por pares (empleando el ensayo de T y el ensayo de suma de rangos de Mann-Whitney) de cada grupo experimental con el grupo de control no vacunado (TFS). TFS1, TFS2 son controles.

45 *La Figura 10 muestra la puntuación media clínica de los grupos de ratones que recibieron la vacunación profiláctica con conjugados peptídicos PPL₁₃₉₋₁₅₁ a manano oxidado/reducido antes de la inducción de EAE por PPL₁₃₉₋₁₅₁; los ratones de control eran no inmunizados (n=5 para todos los grupos). Los ratones inmunizados con sólo manano oxidado, sólo manano reducido, o los ratones de control se sacrificaron en el día 14 por razones éticas. El grupo vacunado con PPL₁₃₉₋₁₅₁ a manano oxidado posee la misma puntuación clínica que el control. Está completamente protegido.

50 La Figura 11 muestra la puntuación media clínica de las ratas Lewis que habían recibido inyecciones de PBM₈₃₋₉₉ a manano oxidado/reducido o sólo manano oxidado/reducido, antes de la inducción de EAE por PBM₇₄₋₈₅. Los ratones que no han recibido un tratamiento determinado (no inmunizados) se utilizaron como controles (n=5 para todos los grupos).

55 La Figura 12 muestra los cambios medios de peso corporal en ratas Lewis que se inmunizaron con PBM₈₃₋₉₉ a manano oxidado/reducido o sólo manano oxidado/reducido, o no inmunizados (controles), tras la inducción de EAE por PBM₇₄₋₈₅ (n=5 para todos los grupos).

60 Ejemplos

Síntesis y purificación de los epítomos lineales de la mielina: PBM₈₃₋₉₉, *PPL₁₃₉₋₁₅₁ y *GMO₃₅₋₅₅ con un puente [(Lys-Gly)₅]

65

Procedimiento general

En general, los péptidos se sintetizaron mediante metodología Fmoc/tBu empleando resina de cloruro de 2-clorotritilo (CLTR-Cl) (0,7 mmol Cl/g) y aminoácidos protegidos por N^o-Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarboxil) [Tselios *et al.*, 1999; Tselios *et al.*, 2000a; Tselios *et al.*, 2000b; Tselios *et al.*, 2002; Matsoukas *et al.*, 2005; Mantzourani *et al.*, 2006a; Mantzourani *et al.*, 2006b; Mantzourani *et al.*, 2007]. En particular, los péptidos protegidos lineales: PBM₈₃₋₉₉: H-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Glu(tBu)-Asn(Trt)-Pro-Val-Val-His(Trt)-Phe-Phe-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Ile-Val-Thr(tBu)-Pro-Arg(Pdf)-Thr(tBu)-Pro-OH, PPL₁₃₉₋₁₅₁: H-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-His(Trt)-Ser(tBu)-Leu-Gly-Lys(Boc)-Trp-Leu-Gly-His(Trt)-Pro-Asp-Lys(Boc)-Phe-OH y GMO₃₅₋₅₅: H-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Met-Glu(tBu)-Val-Gly-Trp-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro(Ser)-Pro-Phe-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Val-Val-His(Trt)-Leu-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Asn(Trt)-Gly-Lys(Boc)-OH se sintetizaron paso a paso en el polímero sólido (CLTR-Cl) utilizando N,N'-diisopropilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol como reactivo de acoplamiento en DMF. El ensayo de Kaiser y cromatografía en capa fina (CCF) en n-butanol/ácido acético/agua (4:1:1) (BAA) como eluyente verificaron la integridad de cada acoplamiento. Los péptidos protegidos, en la resina, se trataron con la mezcla de división DCM/HFIP (7/3) durante 6 horas a temperatura ambiente para eliminar el péptido de la resina. La mezcla se filtró y la resina se lavó dos veces con la mezcla de división y con DCM. El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio y el producto oleoso obtenido se precipitó en éter dietílico frío y seco como un sólido blanco. Los péptidos lineales protegidos se trataron con la mezcla de desprotección DCM/TFA/etanodiol/anisol (32/65/2/1) durante 6 horas a temperatura ambiente. La solución resultante se concentró al vacío en un pequeño volumen (0,5 ml). Los productos crudos finales se purificaron adicionalmente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa semipreparativa (RP-HPLC). La pureza de los péptidos se determinó utilizando RP-HPLC, y la identificación se logró mediante ESI-MS y análisis de aminoácidos.

25 Síntesis peptídica en fase sólida de los análogos lineales y cíclicos

Los péptidos (Tabla 1) se prepararon en resina de cloruro de 2-clorotritilo (CLTR-Cl) empleando la metodología Fmoc/tBu. La ciclación se logró con TBTU/HOAt y 2,4,6-colidina como base, como se ha descrito previamente. La HPLC preparativa para los análogos peptídicos se realizó utilizando una columna semipreparativa en fase inversa Lichrosorb RP-18 con material de embalaje de 7 µm. Los péptidos eran >95 % puros según el análisis por espectrometría de masas.

Tabla 1: análogos peptídicos PBM₈₃₋₉₉ utilizados en este estudio

	Secuencia	Análogos peptídicos
P1	ENPVVHFFKNIVTPRTP	PBM ₈₃₋₉₉
P2	ciclo(83-99)ENPVVHFFKNIVTPRTP	ciclo(83-99)PBM ₈₃₋₉₉
P3	ENPVVHFFANIVTPRTP	[A ⁹¹]PBM ₈₃₋₉₉
P4	ciclo(83-99)ENPVVHFFANIVTPRTP	ciclo(83-99)[A ⁹¹]PBM ₈₃₋₉₉
P5	ENPVVHFFENIVTPRTP	
P6	ENPVVHFFFNIVTPRTP	[E ⁹¹]PBM ₈₃₋₉₉
P7	ENPVVHFFRNIVTARTP	[F ⁹¹]PBM ₈₃₋₉₉
P8	ENPVVHFFYNIVTPRTP	[R ⁹¹ , A ⁹⁶]PBM ₈₃₋₉₉
P9	ENPVVHFFANIVTARTP	[Y ⁹¹]PBM ₈₃₋₉₉ [A ⁹¹ , A ⁹⁶]PBM ₈₃₋₉₉

35 Ejemplos de ciclación

La ciclación del análogo protegido PBM₈₃₋₉₉ lineal se consiguió empleando O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol, 2,4,6 colidina en solución DMF, permitiendo reacciones rápidas y productos de ciclación de alto rendimiento. Los resultados recientes indican que HOAt, una variante que contiene 4-nitrógeno, es un aditivo de acoplamiento muy eficaz, más eficiente que HOBt para la síntesis en solución o en fase sólida que produce productos de alto rendimiento.

Síntesis de péptidos cíclicos PBM humanos

45 Ciclo(83-99)[Arg⁹¹, Ala⁹⁶] PBM₈₃₋₉₉ (Glu-Asn-Pro-Val-Val⁸⁷-His-Phe-Phe-Lys⁹¹-Asn-Ile-Val-Thr-Ala⁹⁶-Arg-Thr-Pro⁹⁹).
Ciclo(91-99)[Ala⁹⁶] PBM₈₃₋₉₉ (Glu-Asn-Pro-Val-Val⁸⁷-His-Phe-Phe-Lys⁹¹-Asn-Ile-Val-Thr-Ala⁹⁶-Arg-Thr-Pro⁹⁹).

Los análogos cíclicos PBM humanos se prepararon en resina de cloruro de 2-clorotritilo empleando la metodología Fmoc/tBu. La síntesis peptídica se consiguió utilizando DIC/HOBt en DMF y N^o-NH₂ de los aminoácidos se protegió con el grupo Fmoc. La cadena lateral de los péptidos se protegió de la siguiente manera: Trt para His, Pbf para Arg, tBu para Ser, Thr, Asp, Glu, Boc para Lys, se utilizó grupo protegido MTT con respecto al análogo cíclico ciclo(91-99) [Ala⁹⁶] PBM₈₃₋₉₉ (por Nε-NH₂ de Lys y C-terminal), ya que se puede eliminar fácilmente empleando la mezcla HFIP (1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol)/DCM (2/8), que escinde los péptidos de la resina. De otro modo, la cadena lateral de Lys del ciclo(87-99)[Arg⁹¹, Ala⁹¹]PBM₈₇₋₉₉ se protegió con el grupo Boc. Los péptidos lineales protegidos

5 finales en resina se secaron al vacío y se trataron a continuación con la mezcla de división DCM/HFIP (8/2) durante 7 h a temperatura ambiente para liberar el péptido de la resina y desproteger Lys de MTT del ciclo(91-99)[Ala⁹⁶] PBM₈₃₋₉₉. Cada péptido protegido lineal se disolvió en DMF y se añadió colidina/HOAt. Esta mezcla se añadió gota a gota en una solución de TBTU en DMF durante 8 horas. La ciclación se determinó mediante CCF y HPLC en fase inversa analítica (RP-HPLC). El disolvente se eliminó a presión reducida, produciendo un residuo oleoso de color amarillo claro. El péptido protegido cíclico (pureza ≥90 %) se precipitó en H₂O y se secó al vacío durante 16 h. El péptido protegido cíclico se trató con TFA al 65 % en DCM y etanodiol al 3 % como depurador durante 4 horas a temperatura ambiente. La solución resultante se concentró en un pequeño volumen y el péptido libre final se precipitó como un sólido éter amorfo de color amarillo claro añadido a dietiléter (pureza ≥80 %). La pureza del péptido se evaluó mediante repeticiones de análisis por HPLC, cromatografía en capa fina (CCF) y espectrometría de masas (ESIMS).

Síntesis peptídica en fase sólida de análogos lineales

15 Los péptidos PBM₈₇₋₉₉ (VHFFKNIVTPRTP), [R⁹¹, A⁹⁶] PBM₈₇₋₉₉ (VHFFRNVITARTP) y [A⁹¹, A⁹⁶]PBM₈₇₋₉₉ (VHFFANIVTARTP) se prepararon en resina de cloruro de 2-clorotritil (CLTR-Cl) empleando la metodología Fmoc/tBu^{22, 48-51}. La HPLC preparativa para los análogos peptídicos PBM₈₇₋₉₉, [R⁹¹, A⁹⁶]PBM₈₇₋₉₉ y [A⁹¹, A⁹⁶]PBM₈₇₋₉₉ se realizó utilizando una columna en fase inversa semipreparativa Lichrosorb RP-18 con material de embalaje de 7 μm. Los péptidos eran > 95 % puros según el análisis por RP-HPLC analítica y ESI-MS.

Referencias para la síntesis peptídica en fase sólida de análogos lineales

22. Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V.; Kalbacher, H.; Papini, A. M.; Tselios, T.; Chatzantoni, K.; Biagioli, T.; Lolli, F.; Deraos, S.; Papathanassopoulos, P.; Troganis, A.; Mantzourani, E.; Mavromoustakos, T.; Mouzaki, A. *Design and synthesis of a novel potent myelin basic protein epitope 87-99 cyclic analogue: enhanced stability and biological properties of mimics render them a potentially new class of immunomodulators. J Med Chem* 2005, 48, 1470-80.

48. Tselios, T.; Apostolopoulos, V.; Daliani, I.; Deraos, S.; Grdadolnik, S.; Mavromoustakos, T.; Melachrinou, M.; Thymianou, S.; Probert, L.; Mouzaki, A.; Matsoukas, J. *Antagonistic effects of human cyclic PBM(87-99) altered peptide ligands in experimental allergic encephalomyelitis and human T-cell proliferation. J Med Chem* 2002, 45, 275-83.

49. Tselios, T.; Daliani, I.; Deraos, S.; Thymianou, S.; Matsoukas, E.; Troganis, A.; Gerothanassis, I.; Mouzaki, A.; Mavromoustakos, T.; Probert, L.; Matsoukas, J. *Treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by a rationally designed cyclic analogue of myelin basic protein (PBM) epitope 72-85. Bioorg Med Chem Lett* 2000, 10, 2713-7.

50. Tselios, T.; Daliani, I.; Probert, L.; Deraos, S.; Matsoukas, E.; Roy, S.; Pires, J.; Moore, G.; Matsoukas, J. *Treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) induced by guinea pig myelin basic protein epitope 72-85 with a human PBM(87-99) analogue and effects of cyclic peptides. Bioorg Med Chem* 2000, 8, 1903-9.

51. Tselios, T.; Probert, L.; Daliani, I.; Matsoukas, E.; Troganis, A.; Gerothanassis, I. P.; Mavromoustakos, T.; Moore, G. J.; Matsoukas, J. M. *Design and synthesis of a potent cyclic analogue of the myelin basic protein epitope PBM72-85: importance of the Ala81 carboxyl group and of a cyclic conformation for induction of experimental allergic encephalomyelitis. J Med Chem* 1999, 42, 1170-7.

Síntesis peptídica en fase sólida de análogos cíclicos

45 Los péptidos PBM₈₇₋₉₉ (VHFFKNIVTPRTP) y el péptido mutante doble cíclico con mutaciones Ala en las posiciones 91 y 96, ciclo(87-99) [A⁹¹, A⁹⁶]PBM₈₇₋₉₉ (ciclo, cabeza-cola, VHFFANIVTARTP) se prepararon en resina de cloruro de 2-clorotritilo (CLTR-Cl) empleando la metodología Fmoc/tBu. La ciclación cabeza-cola del péptido PBM₈₇₋₉₉[A⁹¹, A⁹⁶] se consiguió empleando O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) y 1-hidroxí-7-azabenzotriazol, 2,4,6 colidina en solución DMF, permitiendo reacciones rápidas y productos de ciclación de alto rendimiento. Los resultados indican que HOAt, una variante que contiene 4-nitrógeno, es un aditivo de acoplamiento muy eficaz, más eficiente que HOBt para la síntesis en solución o en fase sólida¹⁴⁻¹⁷. La HPLC preparativa para análogos peptídicos se realizó empleando una columna en fase inversa semipreparativa Lichrosorb RP-18 con material de embalaje de 7 μm. Los péptidos eran > 95 % puros según el análisis por espectrometría de masas (ESI-MS).

Referencias para la síntesis peptídica en fase sólida de análogos cíclicos

14. Tselios, T.; Apostolopoulos, V.; Daliani, I.; Deraos, S.; Grdadolnik, S.; Mavromoustakos, T.; Melachrinou, M.; Thymianou, S.; Probert, L.; Mouzaki, A.; Matsoukas, J. *Antagonistic effects of human cyclic PBM(87-99) altered peptide ligands in experimental allergic encephalomyelitis and human T-cell proliferation. J Med Chem* 2002, 45, 275-83.

15. Tselios, T.; Daliani, I.; Deraos, S.; Thymianou, S.; Matsoukas, E.; Troganis, A.; Gerothanassis, I.; Mouzaki, A.; Mavromoustakos, T.; Probert, L.; Matsoukas, J. *Treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by a rationally designed cyclic analogue of myelin basic protein (PBM) epitope 72-85. Bioorg Med Chem Lett* 2000, 10, 2713-7.

16. Tselios, T.; Daliani, I.; Probert, L.; Deraos, S.; Matsoukas, E.; Roy, S.; Pires, J.; Moore, G.; Matsoukas, J.

Treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) induced by guinea pig myelin basic protein epitope 72-85 with a human PBM(87-99) analogue and effects of cyclic peptides. Bioorg Med Chem 2000, 8, 1903-9.

17. Tselios, T.; Probert, L.; Daliani, I.; Matsoukas, E.; Troganis, A.; Gerothanassis, I. P.; Mavromoustakos, T.; Moore, G. J.; Matsoukas, J. M. *Design and synthesis of a potent cyclic analogue of the myelin basic protein epitope PBM72-85: importance of the Ala81 carboxyl group and of a cyclic conformation for induction of experimental allergic encephalomyelitis. J Med Chem 1999, 42, 1170-7.*

Conjugación de péptidos a manano

- 10 La unión a manano del péptido se logró siguiendo un protocolo descrito previamente [Apostolopoulos *et al.*, 1996; Tselios *et al.*, 2005]. Brevemente, se disolvieron 14 mg de manano (poli-manosa de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich Ltd, Atenas, Grecia) en 1 ml de tampón fosfato, pH 6,0, y se oxidó a polialdehído por tratamiento con periodato de sodio. La mezcla se pasó a través de una columna PD-10 (columna Sephadex G-25 M, Pharmacia Biotech. Suecia) equilibrada con 0,1 M de tampón bicarbonato pH 9,0 y se recogió la fracción de manano. El manano oxidado (7,0 mg/ml) se eluyó con 2 ml de tampón fosfato pH 9,0, al cual se añadió 1 mg de péptidos que contienen el puente [(Lys-Gly)₅] y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. La conjugación se produce a través de la formación de base de Schiff entre los grupos amino libres de Lys y manano oxidado. Los complejos de péptido a manano reducido se prepararon mediante la adición de 1 mg de borohidruro de sodio a cada mezcla durante 6-8 h a temperatura ambiente en la oscuridad. La unión a manano del péptido cíclico se logró a través de un residuo Lys siguiendo el mismo protocolo indicado.

Vacunaciones peptídicas conjugadas a manano

- 25 Los grupos de animales hembras (ratones C57BL/6 o SJL/J con un intervalo de edad de 6-10 semanas de vida y ratas Lewis con 12-15 semanas de vida) se inmunizaron por vía intradérmica con una solución de 100 µl que contiene 30 µg de péptido (GMO₃₅₋₅₅) o 50 µg de péptido PPL₁₃₉₋₁₅₁ para ratones y 30 µg de PBM₈₃₋₉₉ para ratas Lewis) conjugado con 70 µg de manano oxidado o reducido diluido en tampón bicarbonato, pH 9,0. Como controles, los grupos con edad similar de animales se vacunaron con sólo manano oxidado o reducido, solución salina o 30-50 µg de sólo péptido. Tres vacunas consecutivas se realizaron espaciadas con un intervalo de 15 días. Quince días tras la última vacunación se indujo la EAE.

Inducción-inhibición y evaluación de EAE por GMO₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6

- 35 EAE se indujo en ratones C57BL/6 mediante inyección subcutánea (sc) en la base de la cola de 50 µg de GMO₃₅₋₅₅ emulsionado en adyuvante completo de Freund (ACF) suplementado con 400 µg de H37Ra de *M. tuberculosis* (Difco). Los ratones también recibieron una inyección intraperitoneal (ip) de 200 ng de toxina pertussis (Sigma-Aldrich, Grecia) en los días 0 y 2. Los ratones se evaluaron diariamente para detectar signos clínicos según la siguiente escala: 0, normal; 1, cola flácida; 2, debilidad de las extremidades posteriores; 3, parálisis de las extremidades posteriores; 4, parálisis de la extremidad anterior; y 5, moribundos o muerte (gradaciones de 0,5 representan puntuaciones intermedias). Los pesos de los ratones también se controlaron diariamente. A los ratones se les permitió el acceso libre a comida y agua durante todo el experimento.

Inducción-inhibición y evaluación de EAE por PPL₁₃₉₋₁₅₁ en ratones SJL/J

- 45 EAE se indujo en ratones SJL/J empleando un protocolo convencional. 150 µg de PPL₁₃₉₋₁₅₁ se disolvieron en TFS y se emulsionó en un volumen igual de ACF (conteniendo 1 mg/ml de calor que destruye HR37a de *Mycobacterium Tuberculosis*, Sigma). En el día 0 (día de la inducción de la enfermedad), se administró una inyección sc al inyectar 150 µg de PPL₁₃₉₋₁₅₁/200 µl por ratón en ambos flancos. Cada ratón recibió 400 ng de toxina pertussis (Sigma, P2980) (ip) disuelta en 200 µl de TFS. En el día 2, los ratones recibieron una dosis de refuerzo de la toxina pertussis (200 ng de toxina pertussis disuelta en 200 µl de TFS por ratón). Los animales se evaluaron diariamente para detectar signos clínicos de la enfermedad, a partir del día 1 postinmunización, utilizando una escala clínica de 6 grados: 0, animal normal; 0,5, pérdida de peso; 1, incapacidad para levantar la cola por encima del nivel horizontal, debilidad de la cola; 2, parálisis de la cola; 3, parálisis de la cola/paresia de las extremidades posteriores; 4, parálisis de las extremidades posteriores/debilidad de la extremidad anterior; 5, tetraplejía/moribundo; 6, muerte por EAE. Además, los animales se pesaron diariamente durante todo el periodo experimental.

Inducción y evaluación de EAE por PBM₇₄₋₈₅ en ratas Lewis

- 60 Se indujo EAE en ratas Lewis hembra mediante inyección sc en las almohadillas de las patas traseras de 30 µg del péptido PBM₇₄₋₈₅ emulsionado en ACF suplementado con 400 µg de H37Ra de *M. tuberculosis* (Difco). Las ratas se evaluaron diariamente para detectar signos clínicos según la siguiente escala: 0, normal; 1, parálisis de la cola; 2, debilidad de las extremidades posteriores; 3, parálisis de las extremidades posteriores; 4, parálisis de la extremidad anterior; y 5, moribundo o muerte (gradaciones de 0,5 representan puntuaciones intermedias). Los pesos de los animales también se controlaron diariamente. A las ratas se les permitió acceso libre a comida y agua durante todo el experimento.

Cebado de linfocitos T y ensayos de proliferación

Los esplenocitos aislados se cultivaron durante 72 h en placas de 96 pocillos en medio RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD) que contiene STF inactivado por calor al 10 %, 50 μM de 2-ME, y concentraciones crecientes del péptido GMO_{35-55} . Las células se estimularon por triplicado a 2×10^6 células/ml en placas de fondo redondo de 96 pocillos, (Costar). Las células se pulsaron con 1 $\mu\text{Ci}/5 \times 10^5$ células de [^3H]-timidina por triplicado (Amersham Radiochemicals) en las últimas 16 h de cultivo. La incorporación de [^3H]-timidina se midió por recuento por centelleo líquido (Wallac, Turku, Finlandia). Los resultados se expresan como el índice de estimulación (relación entre los recuentos de radiactividad de las células cultivadas en presencia del péptido y células cultivadas con sólo medio).

Medición de citoquinas

El kit de determinación de citoquinas de ratón tipo Th1/Th2 con matriz citométrica de microesferas (BD Biosciences) se utilizó para medir los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivo según las instrucciones del fabricante. Las citoquinas medidas con este kit eran: IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ y FNT- α . Además, se utilizó un conjunto ELISA de IL-17 para ratón (R&D Systems, Alemania) para medir la secreción de citoquinas a partir de sobrenadantes de cultivo de células de esplenocitos según las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo para diferentes citoquinas era de la siguiente manera: IL-2, IL-4 y IL-5 = 5,0 pg/ml; IFN- γ = 2,5 pg/ml; FNT- α = 6,3 pg/ml.

Análisis histopatológico

Los ratones se perfundieron transcardialmente con paraformaldehído al 4 % helado en TFS con anestesia profunda. Los tejidos del SNC se postfijaron en el mismo fijador durante 3 horas a 4 °C y se procesaron para análisis histopatológico convencional. La inflamación se visualizó mediante tinción con H y E, mientras que la desmielinización se demostró por una tinción azul luxol rápido/ácido periódico de Schiff. La cuantificación de la inflamación y desmielinización se hizo de forma ciega. La inflamación en la médula espinal se determinó por cuantificación absoluta verdadera; los números significan infiltrados inflamatorios/ mm^2 de tejido. En el cerebro se utilizó una puntuación semicuantitativa según la cual 0,5 significa infiltrados perivascuales únicos; 1 significa múltiples infiltrados inflamatorios. La desmielinización se puntuó de la siguiente manera: 0,5: manguitos únicos perivascuales de desmielinización, 1: desmielinización perivascular ubicua o subpial, 2: placas desmielinizadas confluentes, 3: desmielinización focal profunda, que implica aproximadamente 1/2 de la sustancia blanca de la médula espinal, al menos en un segmento de la médula espinal, 4: desmielinización extensa, por ejemplo desmielinización completa de la sustancia blanca de la médula espinal, al menos en un segmento de la médula espinal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

* La vacunación con conjugados peptídicos GMO_{35-55} a manano oxidado/reducido protege a ratones C57BL/6 de EAE por GMO_{35-55}

La vacunación por triplicado de ratones C57BL/6 con conjugados peptídicos GMO_{35-55} a manano oxidado/reducido permitió su protección significativa del desarrollo de EAE por GMO_{35-55} que se indujo 15 días después de la última vacunación (Figura 1). El péptido GMO_{35-55} conjugado a manano oxidado mostró el mayor grado de protección a juzgar por el descenso de la puntuación clínica (Figura 1) y la ausencia de síntomas de emaciación que acompañan generalmente el inicio de la enfermedad y la progresión según la medición de peso diaria de los animales experimentales mostrados (Figura 2). El péptido GMO_{35-55} conjugado a manano reducido también mostró una inhibición significativa de la manifestación de la enfermedad. Con el fin de excluir la posibilidad de que hubiera una inducción de tolerancia con respecto al péptido debido a la estimulación repetida con ello, se realizó un experimento equivalente en el que los ratones recibieron vacunaciones por triplicado con péptido GMO_{35-55} no conjugado espaciado en un intervalo de 15 días antes de la inducción de EAE por GMO_{35-55} . Los resultados mostraron que los ratones que recibieron tres exposiciones anteriores con sólo péptido aún eran susceptibles a EAE por GMO y mostraron signos clínicos de la enfermedad pero característicamente: 1) el inicio de EAE se retrasó en animales vacunados con GMO_{35-55} durante 3 días, 2) EAE era significativamente menor en animales vacunados con GMO_{35-55} en comparación con los controles no vacunados en las etapas iniciales de la enfermedad experimental y 3) la enfermedad se exacerbó en animales vacunados con GMO_{35-55} después del día 20 de progresión de la enfermedad (Figuras 3 y 4).

*Ausencia de infiltrados inflamatorios y lesiones desmielinizantes en ratones inmunizados con conjugados GMO_{35-55} a manano oxidado/reducido antes de la inducción de EAE

Los animales se sacrificaron 24 días después de la inducción de EAE. Las médulas espinales y los cerebros se examinaron para detectar la presencia de inflamación y desmielinización. La evaluación del grado de infiltración de linfocitos y la desmielinización (Figura 5) muestra ratones que no habían recibido ninguna vacunación con cantidad sustancial de infiltración de células mononucleares en la médula espinal acompañada por extensa desmielinización. Por el contrario, ratones vacunados con GMO_{35-55} a manano oxidado mostraron poca infiltración inflamatoria y sin

lesiones desmielinizantes en la médula espinal. Se observaron efectos protectores intermedios en ratones vacunados con GMO_{35-55} a manano reducido, el péptido GMO_{35-55} y sólo manano se utilizaron como controles. En un examen detallado de las puntuaciones de desmielinización e inflamación para cada ratón individual (Figura 6), la marcada reducción en el índice inflamatorio y desmielinización para ratones tratados con GMO_{35-55} a manano oxidado se observa tanto para el cerebro como la médula espinal. Este análisis proporciona una fuerte evidencia patofisiológica en apoyo de la naturaleza terapéutica de la vacunación con los conjugados GMO_{35-55} a manano.

*Disminución de respuestas proliferativas de linfocitos T en ratones inmunizados con conjugados peptídicos GMO_{35-55} a manano oxidado/reducido siguiendo la inducción de EAE por GMO_{35-55}

Se aislaron esplenocitos de los animales en el día 25 postinducción de EAE por GMO_{35-55} . Las suspensiones de células únicas eran estimuladas *ex vivo* por triplicado con concentraciones crecientes de péptido GMO_{35-55} . La proliferación se evaluó por [^3H]-timidina. La reducción de la proliferación significativa se observó en los bazos de los ratones que se preinmunizaron con conjugados peptídicos GMO_{35-55} a manano oxidado/reducido (Figura 7), en comparación con ratones que habían recibido sólo manano oxidado, sólo manano reducido o control (TFS), antes de la inducción de EAE por GMO_{35-55} (Figura 7). En 100 $\mu\text{g/ml}$ de péptido recordatorio GMO_{35-55} , la proliferación de linfocitos T alcanzó su punto máximo con un índice de estimulación de 7 en comparación a un índice de estimulación de 3 (en el grupo inmunizado péptido a manano) (Figura 7). Del mismo modo, la inmunización con sólo péptido GMO_{35-55} o ratones de control (TFS) no mostró una reducción en las respuestas proliferativas de linfocitos T (Figura 8). Los resultados indican que la presencia de manano oxidado o reducido en los conjugados peptídicos es capaz de inducir tolerancia (reducir) respuestas de los linfocitos T a péptidos propios.

* Liberación de citoquinas a partir de bazos de ratones vacunados

Se aislaron esplenocitos de ratones C57BL/6 en el día 25 postinducción de EAE por GMO_{35-55} . Las suspensiones de células únicas se estimularon *ex vivo* por triplicado en pocillos con 10 $\mu\text{g/ml}$ de péptido GMO_{35-55} . Se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a un ensayo de citometría de flujo basado en microesferas para la medición de las citoquinas Th1/Th2. Los resultados mostrados son para IFN- γ , TNF- α e IL-2. Puesto que la producción de IL-17 también se ha implicado en la fase efectora de EAE y recientemente se ha demostrado que desempeña un papel importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad [Sutton, *et al.*, 2006; Komiyama, *et al.*, 2006], también se mide la producción de IL-17 empleando un kit de ELISA disponible en el mercado. La vacunación protectora general con conjugados peptídicos GMO_{35-55} a manano reducido u oxidado indujo una reducción en los niveles de citoquinas Th1 y en la cantidad de IL-17 secretada por los linfocitos T específicos para GMO_{35-55} . Los resultados que alcanzaron un nivel de significación con valores de $p < 0,05$ se resaltan en la Figura 9.

* La vacunación con conjugados peptídicos $\text{PPL}_{139-151}$ a manano oxidado/reducido protege los ratones SJL/J contra EAE por $\text{PPL}_{139-151}$

Los ratones hembra se inyectaron con sólo manano oxidado/reducido o conjugados $\text{PPL}_{139-151}$ a manano oxidado/reducido, con tres inmunizaciones consecutivas. En el día 24 los ratones se expusieron a EAE, con el fin de ensayar la eficacia protectora de péptidos conjugados a manano oxidado/reducido. Los ratones vacunados con sólo manano reducido o ratones de control (no inmunizados) indujeron signos clínicos de EAE severa con una puntuación clínica de hasta 4, los ratones inmunizados con manano oxidado indujeron EAE menos severa con el pico de puntuación clínica de 2,5 (Figura 10). De manera interesante, tanto los grupos de ratones inmunizados con conjugados $\text{PPL}_{139-151}$ a manano oxidado como reducido no indujeron EAE (puntuación clínica 0,5, pérdida de peso), lo que indica que el uso de conjugados a manano con el péptido $\text{PPL}_{139-151}$ encefalitogénico podría proteger a los ratones de la inducción de EAE (Figura 10).

La vacunación con conjugados peptídicos PBM_{83-99} a manano oxidado/reducido inhibe EAE por PBM_{74-85} en ratas Lewis

Las ratas Lewis se utilizaron como una especie alternativa para ensayar la eficacia terapéutica de los conjugados péptídicos a manano oxidado/reducido en el tratamiento de EAE. Para esta serie de experimentos, las ratas Lewis recibieron tres vacunaciones consecutivas con manano en forma reducida u oxidada conjugado con péptido MPB_{83-99} espaciado en un intervalo de 15 días, incluyendo los grupos de control necesarios que recibieron sólo manano en la forma reducida u oxidada. La inducción de EAE en ratas Lewis se realizó utilizando el péptido PBM_{74-85} . La puntuación clínica (Figura 11) de los animales experimentales y el control del peso (Figura 12) mostraron resultados protectores similares en los que la vacunación con conjugados PBM_{83-99} a manano oxidado/reducido protegió las ratas Lewis de EAE, lo que retrasa la aparición de enfermedades durante 5 días y reduce la gravedad clínica media de la enfermedad.

Referencias

Acres, B.; Apostolopoulos, V.; Balloul, J.M.; Wreschner, D.; Xing, P.X.; Ali-Hadjj, D.; Bizouarne, N.; Kieny, M.P.; McKenzie, I.F. *Cancer Immunol Immunother*, 2000, 48, 588;

- Apostolopoulos, V.; Pietersz, A.; McKenzie, I. *Vaccine*, 1996,14, 930;
- Apostolopoulos, V.; McKenzie, I.F.; Pietersz, G.A. *Immunology and cell biology*, 1996, 74, 457;
- 5 Apostolopoulos, V.; Barnes, N.; Pietersz, G.A.; McKenzie, I.F. *Vaccine*, 2000a, 18, 3174;
- Apostolopoulos, V.; Pietersz, G.A.; Gordon, S.; Martinez-Pomares, L.; McKenzie, I.F. *European journal of immunology*, 2000b, 30, 1714-1723;
- 10 Davis, W.C.; Konzek, R.L.; Haas, K.; Estes, D.M.; Hamilton, M.J.; Call, D.R.; Apostolopoulos, V.; McKenzie, I.F. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002,969,119;
- Komiyama Y.; Nakae S.; Matsuki T.; Nambu A.; Ishigame H.; Kakuta S.; Sudo K.; Iwakura Y. *J Immunol*, 2006, 177(1):566;
- 15 Kuchroo, V. K.; R. A. Sobel, J. C.; Laning, C. A.; Martin, E.; Greenfield, M. E.; Dorf, y M. B. Lees. *J Immunol*, 1992, 148:3776;
- Kuchroo, V. K.; J. M. Greer, D.; Kaul, G. ; Ishioka, A.; Franco, A.; Sette, R. A. Sobel, y M. B. Lees. *J Immunol*, 1994, 20 153:3326;
- Linington, C.; Bradl, M.; Lassmann, H.; Brunner, C.; Vass, K. *The American journal of pathology*, 1988, 130, 443;
- 25 Lees, C.J.; Apostolopoulos, V.; Acres, B.; Ong, C.S.; Popovski, V.; McKenzie, I.F. *Cancer Immunol Immunother*, 2000a, 48, 644;
- Lees, C.J.; Apostolopoulos, V.; Acres, B.; Ramshaw, I.; Ramsay, A.; Ong, C.S.; McKenzie, I.F. *Vaccine*, 2000b, 19, 158;
- 30 Lees, C.J., Apostolopoulos, V., y McKenzie, I.F. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, 19, 1373;
- Martin, R.; McFarland, H.; McFarlin, D. *Ann. Rev. Immunol.* 1992, 10, 153;
- 35 Greer, J.M; Scurses, P.A; Cameron, K.D.; McCombe, P.A; Good, M.F.; Pender, M.P. *Brain* 1997, 120(8): 1447;
- Singh, R.A.K.; Zhang, J.Z. *The Journal of Immunology*, 2004, 173:7299;
- Greer J.M.; Csurhes P.A; Pender, M.P.; McCombe, P.A. *Journal of Autoimmunity* 2004 22 (4) 345;
- 40 Tsuchida, T.; Parker, K.C.; Turner, R.V.; McFarland, H.F.; Coligan, J.E.; Biddison, W.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, 91:10859;
- Trotter, J.L.; Perfrey, CC.M.; Trotter, A.L.; Selvidge, J.A.; Gushleff, K.C.; Mohanakumar, T.; McFarland, H.F. *Journal of Neuroimmunology* 1998, 84, 172;
- 45 Mantzourani E.D.; Platts J.A.; Brancale A.; Mavromoustakos T.M.; Tselios T.V. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2007, 26(2), 471;
- 50 McFarlin, D.E.; Blank, S.E.; Kibler, R.F.; McKneally, S.; Shapira, R. *Science*, 1973, 179, 478;
- Mendel, I.; Kerlero de Rosbo, N.; Ben-Nun, A. *European journal of immunology*, 1995, 25, 1951;
- Steinman, L. *Cell* 1996, 85, 299;
- 55 Sutton, C.; Brereton, C.; Keogh, B.; Mills, K. H.; Lavelle, EC. *J Exp Med.* 2006, 203(7):1685;
- Tselios, T.; Probert, L.; Daliani, I.; Matsoukas, E.; Troganis, A.; Gerothanasis, I.; Mavromoustakos T.; Moore G.; Matsoukas J. *J. Med Chem.*, 1999, 42, 7:1170;
- 60 Tselios, T.; Daliani, I.; Probert, L.; Deraos, S.; Matsoukas, E.; Roy, S.; Pires, J.; Moore, G.; Matsoukas, *J. Bioorg. Med. Chem.*, 2000a, 8: 1903;
- Tselios, T.; Daliani, I.; Deraos, S.; Thymianou, S.; Matsoukas, E.; Troganis, A.; Gerothanassis, I.; Mouzaki, A.; Mavromoustakos, T.; Probert, L.; Matsoukas, *J. Bioorg. Med Chem. Lett.*, 2000b, 10: 2713;
- 65

- Tselios, T.; Apostolopoulos, V.; Daliani, I.; Deraos, S.; Grdadolnik, S.; Mavromoustakos, T.; Melachrinou, M.; Thymianou, S.; Probert, L.; Mouzaki, A.; Matsoukas, J. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 275;
- 5 Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V.; Kalbacher, H.; Papini, A.M.; Tselios, T.; Chatzantoni, K.; Biagioli, T.; Lolli, F.; Deraos, S.; Papatthanassopoulos, P.; Troganis, A.; Mantzourani, E.; Mavromoustakos, T.; Mouzaki, A. *J Med Chem.* 2005 Mar 10, 48(5):1470;
- 10 Mantzourani, E. D.; Mavromoustakos, T. M.; Platts, J. A.; Matsoukas, J. M.; Tselios, T. V. *Cur. Med Chem.* 2005, 12, 13, 1569;
- Tselios, T. V.; Lamari, F. N.; Karathanasopoulou, I.; Katsara, M.; Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. A.; Matsoukas, J. M.; Karamanos, N. K. *Anal Biochem.* 2005, 1;347(1):121;
- 15 Mantzourani, E.; Tselios T.; Grdadolnik, S.G.; Brancale, A.; Matsoukas, J.; Mavromoustakos T. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2006a, 25/1, 17;
- Mantzourani, E.D.; Tselios, T.V.; Golič Grdadolnik, S.; Platts, J.A.; Brancale, A.; Deraos, G.; Matsoukas, J. M.; Mavromoustakos, T. M. *J. Med. Chem.* 2006b, 49, 6683;
- 20 Vaughan, H.A.; Ho, D.W.; Karanikas, V.; Sandrin, M.S.; McKenzie, I.F.; Pietersz, G.A. *Vaccine*, 2000, 18, 3297;
- Vaughan, H.A.; Ho, D.W.; Karanikas, V.A.; Ong, C.S.; Hwang, L.A.; Pearson, J.M.; McKenzie, I.F.; Pietersz, G.A. *Vaccine*, 1999, 17, 2740;
- 25 Zamvil, SS. y Steinman, L. *Annu Rev Immunol.* 1990, 8, 579.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende:

- 5 (i) manano; y
- (ii) al menos un epítopo que comprende un péptido que es la PBM₈₃₋₉₉, en forma lineal;

en el que dicho epítopo se une a manano a través de un puente [(Lys-Gly)_n], en el que n es un número entero de 1 a 10.

10 2. Un conjugado según la reivindicación 1, en el que el epítopo corresponde al péptido de SEQ ID NO. 1:

H-Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-Val-Thr-Pro-Arg-Thr-Pro-OH [SEQ ID NO. 1]

15 en forma lineal.

3. Un conjugado según cualquier reivindicación precedente, en el que n es un número entero de 1 a 5.

20 4. Un conjugado según cualquier reivindicación precedente, en el que el manano es manano reducido o manano oxidado.

5. Un conjugado según cualquier reivindicación precedente, en el que dos o más epítopos se unen a manano.

25 6. Un conjugado según la reivindicación 5, en el que los epítopos son diferentes.

7. Una mezcla que comprende dos o más conjugados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

30 8. Una preparación farmacéutica que comprende un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una mezcla según la reivindicación 7, y un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

9. Un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una mezcla según la reivindicación 7, para su uso en medicina.

35 10. Utilización de un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una mezcla según la reivindicación 7, en la preparación de un medicamento para tratar la esclerosis múltiple (EM) y la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE).

40 11. Una vacuna que comprende un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una mezcla según la reivindicación 7.

12. Un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una mezcla según la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de un trastorno inmunitario.

45 13. Un conjugado que comprende:

- (i) manano; y
- (ii) (a) un epítopo que comprende un péptido que es la PBM₈₃₋₉₉ en forma lineal; y
- (ii) (b) un epítopo que comprende un fragmento peptídico de la glicoproteína mielínica oligodendrocitaria (GMO) en forma lineal o cíclica; y
- 50 (ii) (c) un epítopo que comprende un fragmento peptídico de la proteína proteolipídica (PPL) en forma lineal o cíclica;

en el que cada epítopo se une a un manano a través de un puente [(Lys-Gly)_n], en el que n es un número entero de 1 a 10.

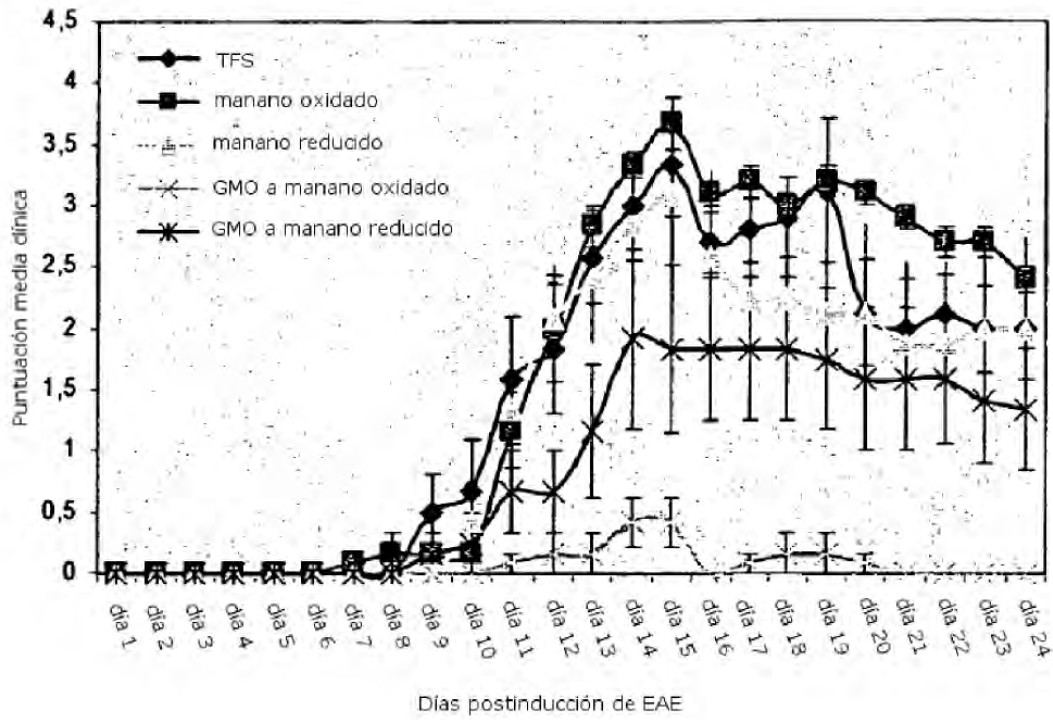


FIGURA 1

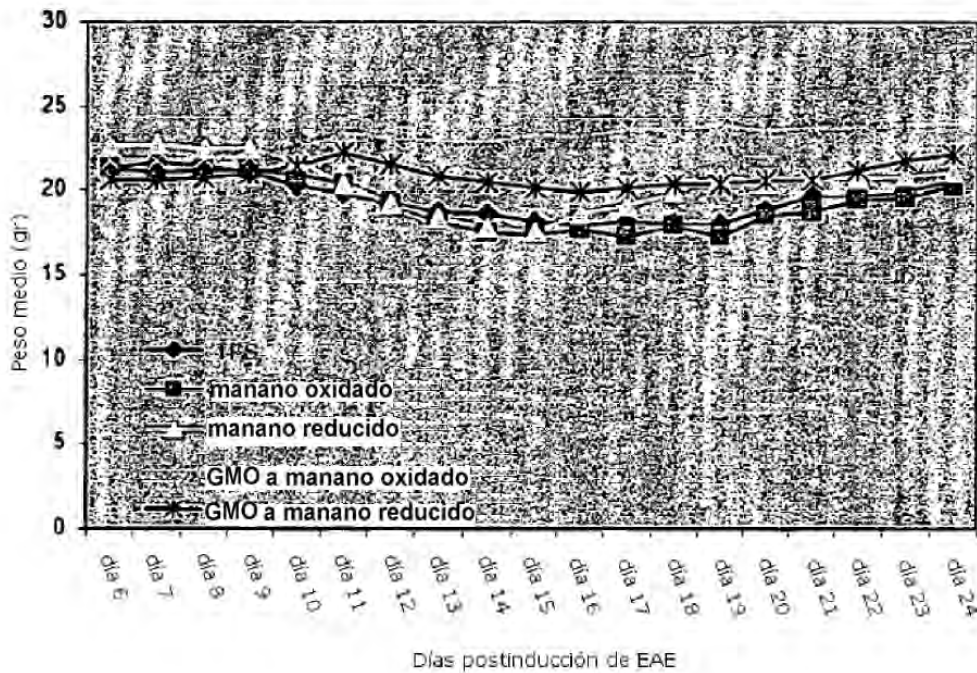


FIGURA 2

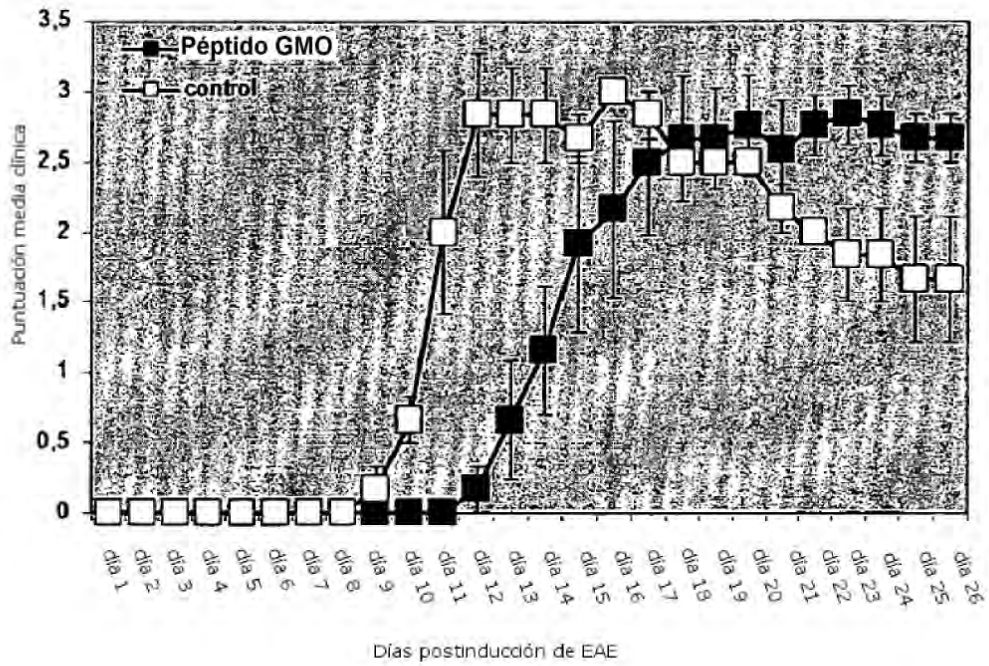


FIGURA 3

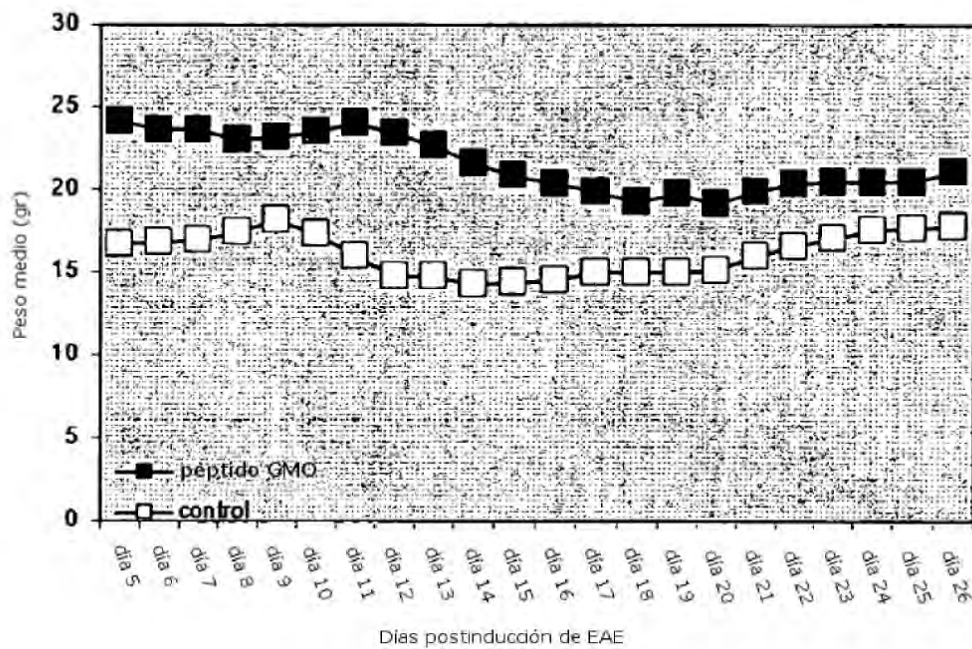


FIGURA 4

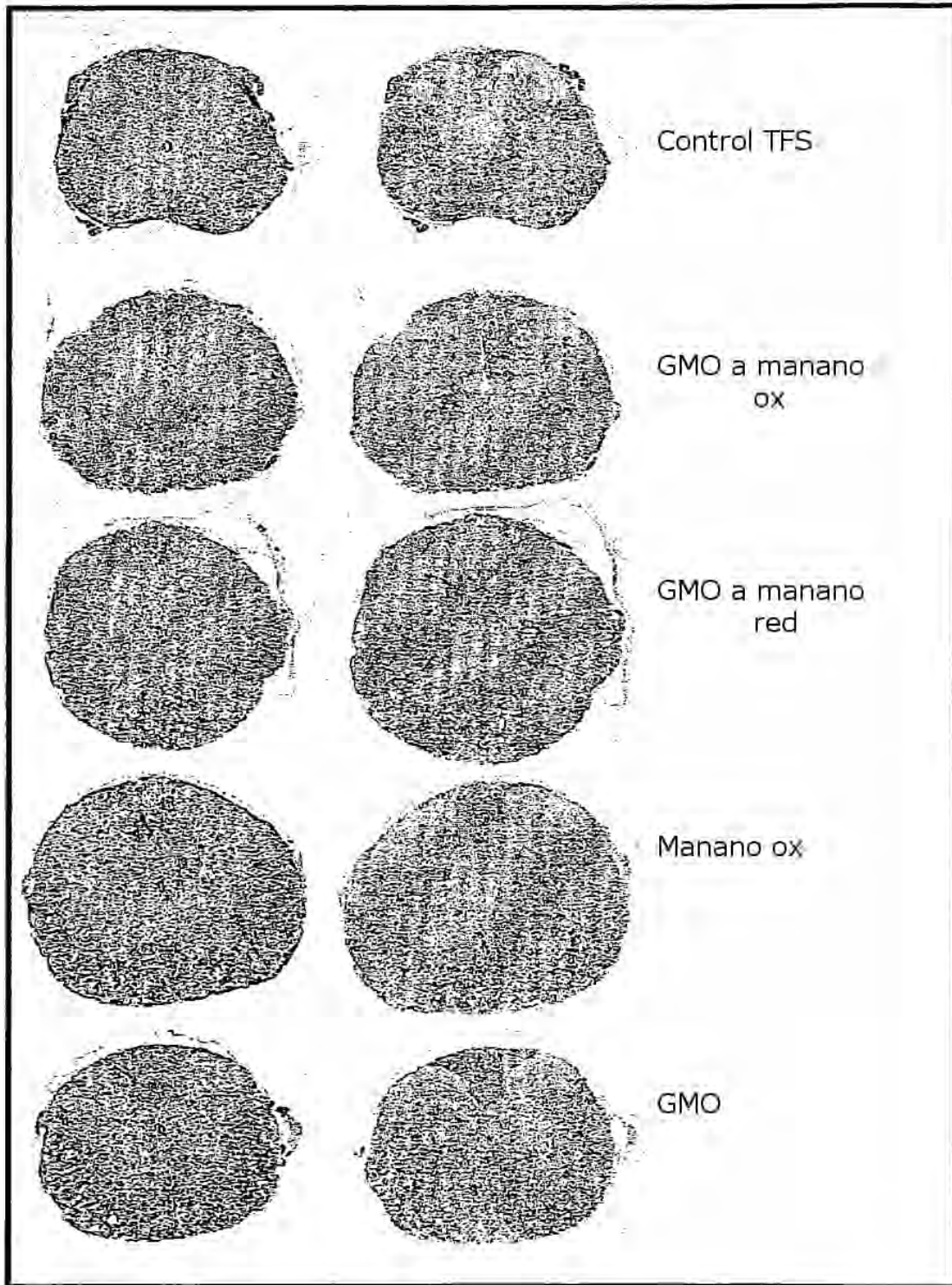


FIGURA 5

Tipo de muestra	Inflamación médula espinal	Desmielinización médula esp.	Inflamación cerebro	Desmielinización cerebro
Control TFS	3,5	1 + Vac	ubi +	0
Control TFS	1,5	1	ubi +	1
Control TFS	3,6	3	Cer +	1
Control TFS	2,8	2	Cer +	0
GMO man ox	0,2	0	0	0
GMO man ox	0,1	0	0	0
GMO man ox	0,2	0	0	0
GMO man ox	0	0	0	0
GMO man ox	0,3	0	Cer +	0
GMO man ox	0,2	1	Cer +	0
GMO man red	0,1	0	0	0
GMO man red	1,1	1	Cer +	1
GMO man red	1,8	1 + Vac	Men	0
GMO man red	hipoxia global	hipoxia global	hipoxia global	hipoxia global
GMO man red	1,8	1 + Vac	Cer +	0
GMO man red	1,7	0,5 + Vac	Cer +	0,5
solo man ox	1,6	1	ubi +	0,5
solo man ox	1,8	0,5	Cer +	0
solo man ox	1,5	0,5	Men	0
solo man ox	2,6	2	Cer +	0,5
solo man ox	2,2	1	ubi +	0
solo man red	0,2	0	0	0
solo man red	1,8	0,5	ubi +	0
solo man red	2	1	Men	0
solo man red	4,4	2	ubi +	1
Solo GMO	1,6	2	ubi +	0,5
Solo GMO	2,1	2	ubi +	0,5
Solo GMO	2	0,5	Cer +	0,5
Solo GMO	1,7	1	Cer +	0,5
Solo GMO	1	2	ubi +	1
Solo GMO	2,7	2	ubi +	1
Control 1	0,8	1	ubi +	0,5
Control 2	3,2	2	ubi +	1
Control 3	2,3	2	ubi +	1

FIGURA 6

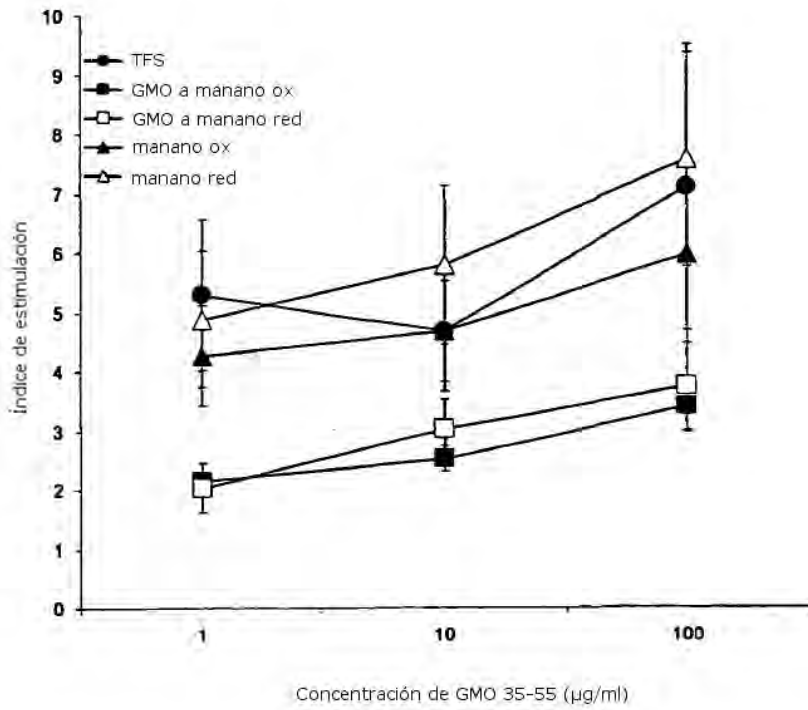


FIGURA 7

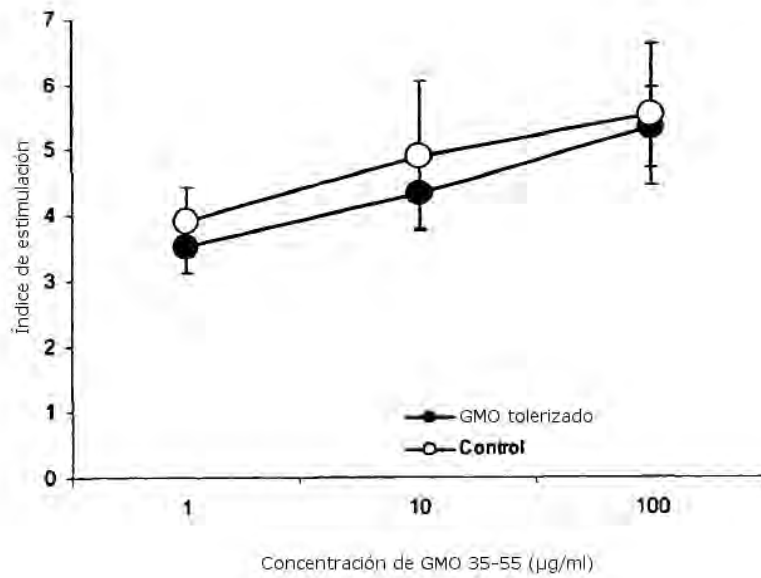


FIGURA 8

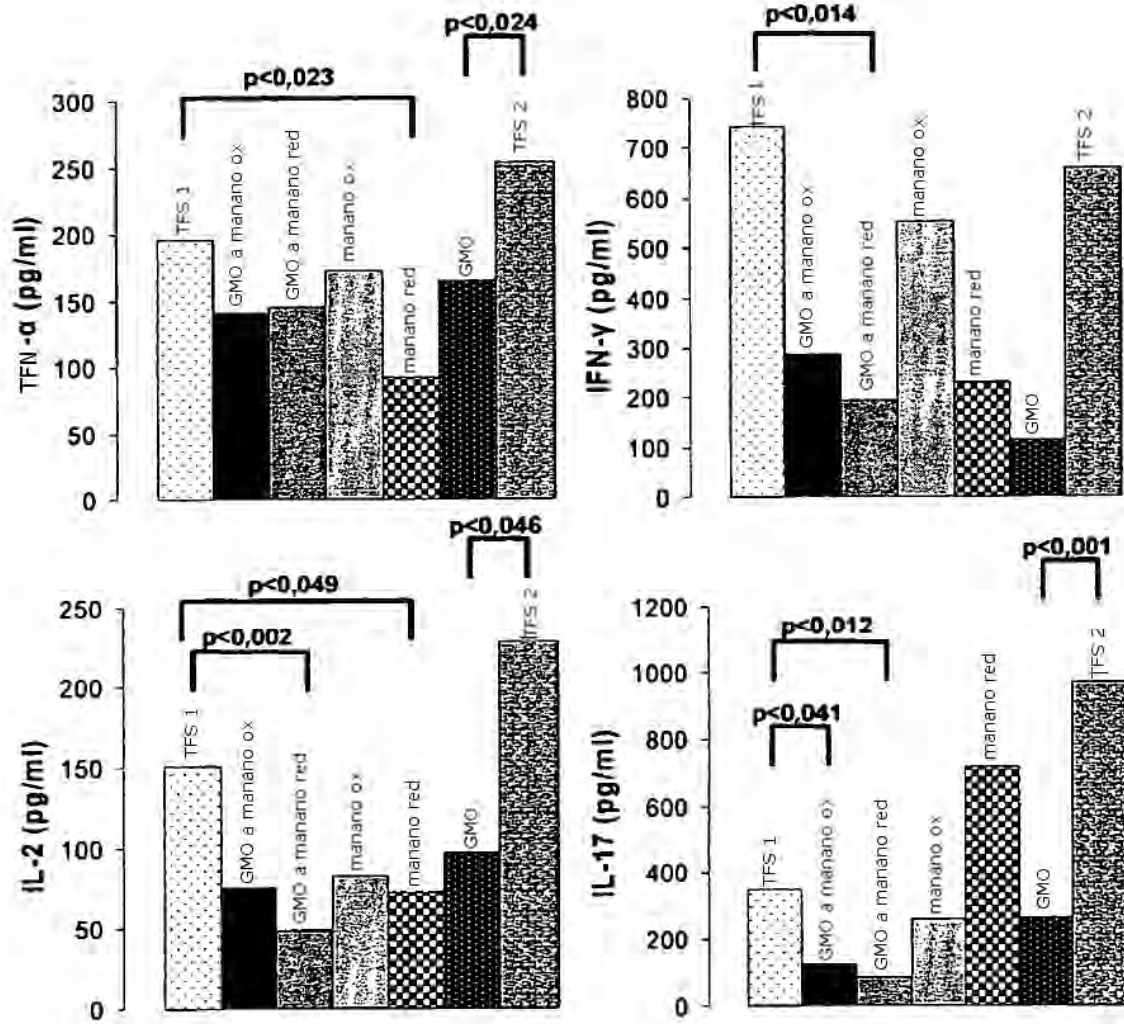


FIGURA 9

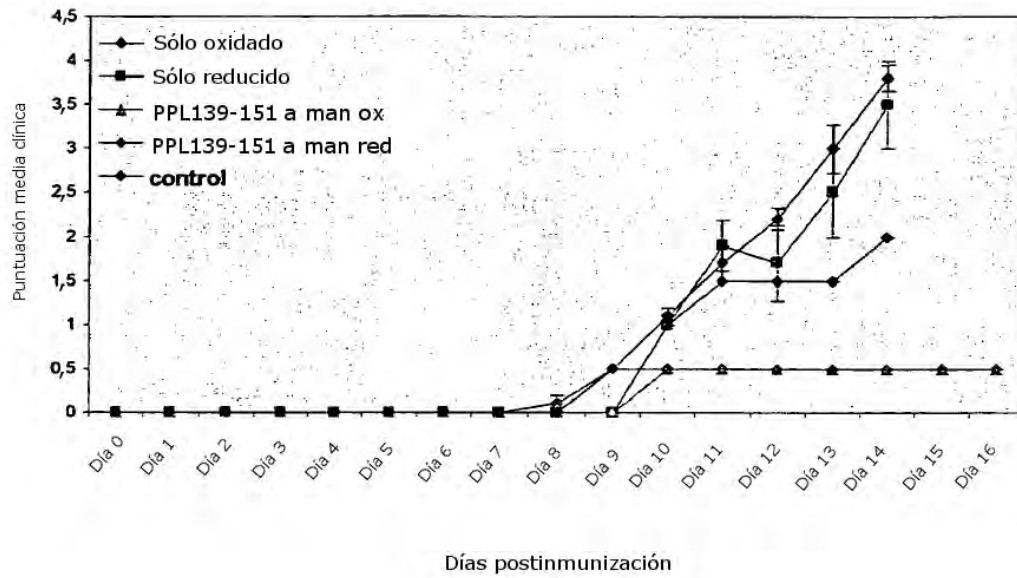


FIGURA 10

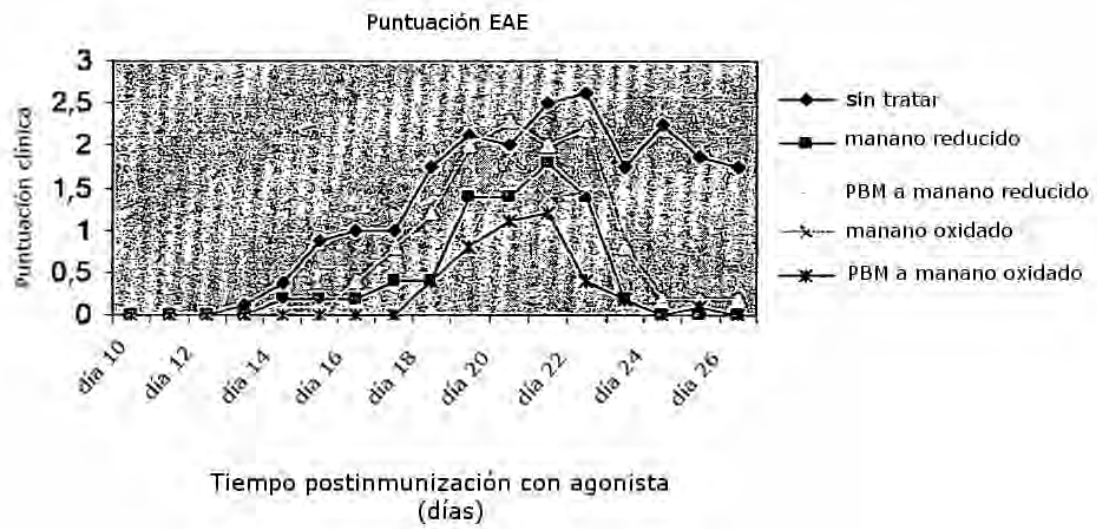


FIGURA 11

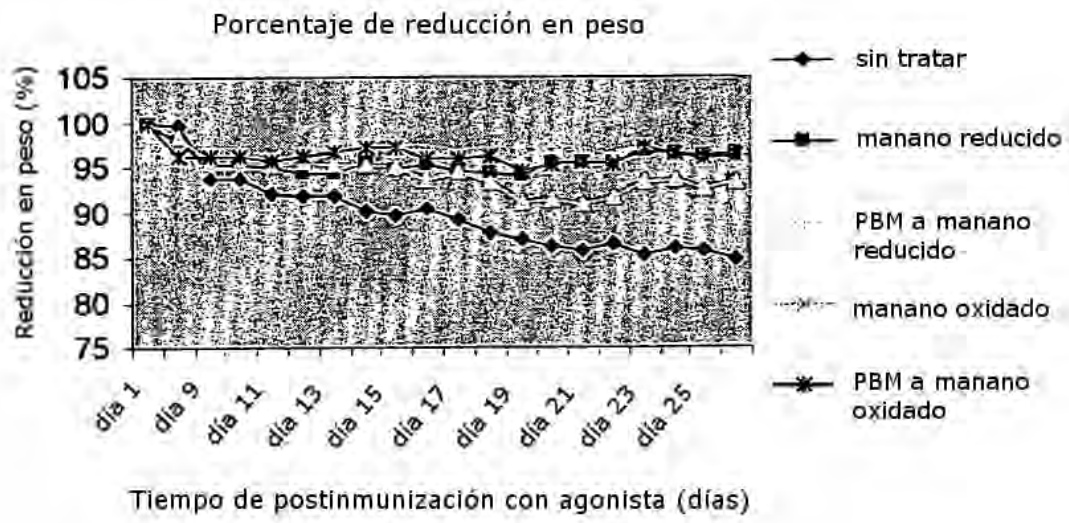


FIGURA 12