

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 306**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 7/64** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2008 PCT/IB2008/003493**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2009 WO09066175**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2008 E 08851987 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2227486**

54 Título: **Análogos de péptido y conjugados de los mismos**

30 Prioridad:

**20.11.2007 GR 20070100697**

**20.12.2007 GB 0724878**

**09.06.2008 GB 0810553**

**12.09.2008 AU 2008904757**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.07.2017**

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;**

**APOSTOLOPOULOS, VASSO;**

**TSELIOS, THEODOROS;**

**KATSARA, MARIA;**

**DERAOS, GEORGE;**

**GRIGORIADIS, NIKOS y**

**LOURBOPOULOS, ATHANASIOS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 627 306 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

Análogos de péptido y conjugados de los mismos

5 La presente invención se refiere a análogos de péptido lineales y cíclicos de antígenos de mielina y conjugados de los mismos. Los péptidos y conjugados de la invención son candidatos útiles para la inmunoterapia de la esclerosis múltiple (EM).

Antecedentes a la invención

10 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) y se caracteriza por una respuesta desregulada de linfocitos T. Se ha observado una asociación entre alelos de clase II del MHC y enfermedad en pacientes con EM, en particular HLA-DR1, HLA-DR2 y HLA-DR4 (Valli et al., J Clin. Invest. 1993).

15 Las actuales terapias de péptidos de la esclerosis múltiple incluyen tratamiento con interferones (interferón beta-1 $\alpha$  e interferón beta-1 $\beta$ ) y acetato de glatiramer (copolímero-1) que es una mezcla de polipéptidos sintéticos que comprende los principales aminoácidos Glu, Gln, Lys, Arg de MBP. Estos inmunomoduladores han sido autorizados por la FDA para pacientes con EM recurrente-remite. Los interferones administrados por inyección subcutánea o intramuscular reducen la frecuencia, gravedad y duración de la exacerbación, pero todavía no se ha establecido su  
20 impacto sobre la prevención de la incapacidad a largo plazo. También son comunes efectos secundarios e incluyen reacciones en el sitio de inyección, fiebre, mialgia y síndrome similar a la gripe. Hasta la fecha, los beneficios informados del uso de interferones y copolímero son marginales y, por tanto, existe la necesidad de terapéuticos mejorados. Otro enfoque en la investigación clínica para la supresión autoinmune es la administración por vía oral de autoantígenos. Los antígenos administrados por vía oral suprimen la autoinmunidad en modelos animales, que  
25 incluyen EAE, artritis inducida por colágeno y adyuvante, uveítis y diabetes en el ratón diabético no obeso. Bajas dosis de antígeno oral inducen linfocitos T reguladores específicos de antígeno que actúan liberando citocinas inhibitoras tales como el factor de crecimiento transformante-beta, IL-4 e IL-10 en el órgano diana. Así, puede suprimirse la inflamación en un órgano diana mediante la administración por vía oral de un antígeno derivado del sitio de inflamación, aunque no sea la diana de la respuesta auto-inmunitaria. Ensayos humanos iniciales de antígeno administrado por vía oral han mostrado hallazgos positivos en pacientes con EM y artritis reumatoide. Está  
30 en progreso un ensayo de doble ciego, controlado por placebo, de fase III multicéntrico de mielina oral en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remite, ya que son ensayos clínicos de fase II que investigan la administración por vía oral de colágeno de tipo II en artritis reumatoide, antígeno S en uveítis e insulina en diabetes de tipo I. El prometedor método es ventajoso debido a que permite la administración por vía oral, a diferencia de métodos previos usando interferones y copolímero-1. Sin embargo, cuestiones relacionadas con la naturaleza del péptido y el  
35 coste de sustancia administrada convierten el enfoque de mimético no peptídico, incluso en sus comienzos, en un objetivo atractivo a perseguir.

Estrategias en la inmunoterapia de EM y perspectivas clínicas

40 En el enfoque inmunoterapéutico hacia el desarrollo de vacunas terapéuticas para EM, la suposición es que epítopes de MBP o sus análogos pueden inhibir o prevenir activamente la enfermedad mediante la activación de linfocitos T reguladores específicos de antígeno, o anticuerpos relacionados con la destrucción de la vaina de mielina. La vaina de mielina está constituida de las proteínas: MBP, proteína proteolipídica (PLP), glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y la proteína de choque térmico que participan en EM. Así, los epítopes de estas  
45 proteínas de la vaina de mielina son dianas para técnicas inmunoterapéuticas. En áreas de inflamación en EM, se han demostrado anticuerpos contra la proteína menor MOG. Los anticuerpos contra MOG están relacionados con rotura significativa de mielina, probablemente recubriendo la mielina de manera que los macrófagos puedan engullir y destruir secciones recubiertas de mielina, bloqueando los impulsos nerviosos temporalmente o permanentemente.  
50 Así, se sabe que los anticuerpos desempeñan una función en EM, y cooperan con células presentadoras de antígenos en la destrucción de mielina. El bloqueo de los efectos de estos anticuerpos para MOG con anticuerpos secundarios o miméticos no peptídicos puede ser una vía importante para la futura terapia.

Otra dirección en la inmunoterapia de enfermedades autoinmunitarias es el uso de sistemas de péptidos de múltiples antígenos (MAP) introducido por Tam [Tam *et al.*, 1990]. Este sistema representa un novedoso enfoque para la  
55 producción de anticuerpos anti-péptido. Está construido sobre una resina que posee un núcleo de dendritas de lisina de ramificación radial sobre la que pueden sintetizarse varias copias de un antígeno de péptido dado. Se han usado derivados de lisina para la síntesis en fase sólida de núcleos de lisina adecuados para el ensamblaje de péptidos antigénicos. Estos péptidos han encontrado aplicaciones en la producción de anticuerpos y en la preparación de vacunas sintéticas. En un núcleo de lisina pueden ensamblarse varios epítopes diferentes de una proteína o de  
60 diferentes proteínas para crear la proteína sintética antigénica requerida. Tras el ensamblaje del péptido sobre el núcleo de MAP, el péptido se desprotege y se escinde del soporte usando técnicas convencionales, dando una estructura macromolecular altamente inmunogénica sin la necesidad de conjugación con una proteína transportadora. Se ha mostrado que el enfoque de MAP da títulos de anticuerpos más altos que usando conjugados de péptido monoméricos. Alternativamente, los dos epítopes pueden sintetizarse sobre ramas alternativas del núcleo  
65

de lisina, usando química de Boc y de Fmoc. También pueden combinarse epítopes de linfocitos T y de linfocitos B secuencialmente dentro de una única secuencia lineal.

5 Otra estrategia prometedora en la inmunoterapia de EM u otras enfermedades autoinmunitarias es el uso de análogos de poli-lisina de péptido conjugados con manano reducido mediante el conector de KLH en su forma oxidada o reducida para desarrollar respuestas Th1/Th2, seguido de liberación de citocinas apropiadas [Apostolopoulos, *et al.*, 1995, Apostolopoulos, *et al.*, 1996, Apostolopoulos, *et al.*, 1998, Lofthouse, *et al.*, 1997]. El objetivo de este enfoque es el desarrollo de un enfoque inmunoterapéutico para la prevención o control de enfermedad. Actualmente, están en investigación los péptidos de antígeno de proteínas MBP, PLP y MOG  
10 conjugadas con manano en su forma oxidada o reducida. Con el fin de estudiar su efecto sobre la proliferación celular, se determinaron la producción de anticuerpos y los ensayos de secreción de citocinas en ratas Lewis, modelos de ratón y en linfocitos T de sangre periférica humana. Estos estudios incluyen el desarrollo de análogos de péptido de antagonista cíclico limitado racionalmente diseñado basados en el epítipo de MBP 87-99 que suprime el desarrollo de EAE clínica, inflamación del SNC y desmielinización. El uso de manano oxidado o reducido para  
15 desarrollar una respuesta Th1 o Th2 (y las citocinas apropiadas) para los péptidos de mielina expresados en EM constituye una novedosa estrategia para el tratamiento de enfermedad.

#### Función de la proteína básica de mielina (MBP)

20 Aunque la patología de EM sigue sin estar clara, hay evidencia de que los linfocitos T que reconocen epítopes encefalitogénicos de mielina, tales como la proteína básica de mielina (MBP), desempeñan una función patógena en la inducción de EM. Estudios han mostrado que las respuestas de linfocitos T en pacientes están asociadas al reconocimiento de la región 81-105 de MBP (QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGK) (Valli *et al.*, J Clin. Invest. 1993), y con afinidad y unión más alta a HLA-DR2 para el epítipo de péptido MBP<sub>83-99</sub> (ENPVVHFFKNIVTPRTP). También  
25 se ha mostrado el reconocimiento de linfocitos T de esta región de MBP en individuos sanos, pero a frecuencias de precursor relativamente bajas. La unión de MBP<sub>83-99</sub> a HLA-DR2 es mediante los restos V87 y F90 hidrófobos, mientras, H88, F89 y K91 son restos de contacto de TCR.

La función patógena de los linfocitos T autoinmunes que reconocen epítopes encefalitogénicos de MBP también se  
30 ha observado en encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE), un modelo animal para EM. Características clínicas e histopatológicas similares a EM pueden inducirse en cepas de ratón susceptibles por inmunización de componentes de mielina. La EAE está mediada por linfocitos T CD4+ del fenotipo Th1 (IFN $\gamma$ ). Similar a EM, la susceptibilidad a EAE depende de los antecedentes de MHC de ratón y diferentes péptidos son inmunogénicos e inducen EAE en diferentes cepas de ratón. Los restos 35-55 de la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) inducen EAE crónica en ratones C57BL/6, los restos 74-85 de MBP inducen EAE aguda en ratas Lewis y los  
35 restos 139-153 de la proteína proteolipídica (PLP) inducen EAE aguda en ratones SJL/J (Zamvil *et al.*, Annu Rev Immunol. 1990). La cepa de ratón SJL/J (haplotipo H-2<sup>s</sup>) se usa comúnmente para EAE, ya que numerosas características histopatológicas, clínicas e inmunológicas se parecen a la de EM humana, más similarmente en comparación con otras cepas de ratón o rata (Sommer *et al.*, J Neuroimmunol, 1997). El ratón SJL/J no expresa la  
40 cadena H2-E- $\alpha$ , así, H2-A<sup>s</sup> (I-A<sup>s</sup>) es la única molécula de clase II de MHC funcional en el ratón SJL/J. En la cepa de ratón SJL/J se ha mostrado que los restos del epítipo encefalitogénico NMP<sub>81-100</sub> se unen con alta afinidad. De hecho, el epítipo mínimo requerido para la unión es MBP<sub>83-99</sub> (Kalbus *et al.*, Eur J Immunol. 2001). Así, el péptido MBP<sub>83-99</sub> puede actuar de péptido conductor para el diseño de ligandos de péptido y análogos de péptido alterados, que podrían usarse para alterar respuestas de linfocitos T en el modelo de ratón SJL/J y pueden ayudar en nuevos  
45 enfoques terapéuticos en enfermedades autoinmunitarias.

La presente invención busca proporcionar ligandos de péptido alterados y conjugados de los mismos que tienen posibles aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, y en particular esclerosis múltiple.

50 Establecimiento de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (I),

55 ENPVVHFFK<sup>91</sup>NIVTP<sup>96</sup>RTP (I)

en la que K<sup>91</sup> está sustituido con un aminoácido seleccionado de A, R, E, F e Y y P<sup>96</sup> está sustituido con el aminoácido A, en el que dicho péptido está en forma lineal o cíclica.

60 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (Ib),

ENPVVHFFK<sup>91</sup>NIVTP<sup>96</sup>RTP (Ib)

en la que al menos un de K<sup>91</sup> y P<sup>96</sup> está sustituido con un aminoácido seleccionado de R, E, F e Y.

65

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de fórmula (IIb),



5 en la que K<sup>91</sup> está sustituido con el aminoácido A y P<sup>96</sup> está sustituido con el aminoácido A, en la que dicho péptido está ciclado cabeza a cola.

10 En comparación con los péptidos lineales, los péptidos cíclicos han sido considerados por tener mayor potencial que los agentes terapéuticos debido a su elevada estabilidad química y enzimática, selectividad por receptor y propiedades farmacodinámicas mejoradas.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un conjugado que comprende un péptido como se ha definido anteriormente y manano.

15 Ventajosamente, los ensayos biológicos han demostrado ligandos de péptidos alterados específicos del epítotope MBP<sub>83-99</sub> (E<sup>83</sup>NPVVHFFK<sup>91</sup>NIVTP<sup>96</sup>RTP) con modificaciones en las posiciones 91 y 96, y que están conjugados con manano reducido:

- 20 • Desvían respuestas inmunitarias de Th1 a Th2 terapéutica en ratones SJL/J, es decir, generan citocinas útiles tales como IL4, IL10 y en absoluto interferón gamma (IFN $\gamma$ ) destructivo;
- Generan IgG y en particular anticuerpos IgG1 que no reaccionan de forma cruzada con la proteína nativa MBP completa;
- 25 • Suprimen la EAE inducida por MBP 74-85 de cobaya en ratas Lewis después de vacunación de tres veces con manano reducido-KLH-MBP<sub>83-99</sub>;
- Suprimen la EAE crónica inducida por MOG<sub>35-55</sub> en ratones C57BL/6;
- 30 • El péptido ciclo (83-99)MBP<sub>83-99</sub> solo (o conjugado con manano) aumenta la estabilidad a la proteólisis en comparación con homólogos lineales.

35 Un quinto aspecto de la invención se refiere a un péptido o conjugado como se ha descrito anteriormente para su uso en medicina.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido o un conjugado como se ha descrito anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno inmunitario.

40 Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido o un conjugado como se ha definido anteriormente, mezclado con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido o un conjugado como se ha descrito anteriormente en un ensayo para dilucidar agentes capaces de regular la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) o regular la esclerosis múltiple.

Un noveno aspecto de la invención se refiere a un proceso de preparación de un conjugado como se ha descrito anteriormente, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- 50 (i) hacer reaccionar un péptido como se ha definido anteriormente con una hemocianina de lapa californiana (KLH);
- (ii) hacer reaccionar el producto formado en la etapa (i) con manano oxidado; y
- (iii) reducir el producto formado en la etapa (ii) para formar un conjugado de manano reducido.

55 Un décimo aspecto de la invención se refiere a un péptido o conjugado como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

60 Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido o un conjugado como se ha descrito anteriormente para su uso en desviar la respuesta inmunitaria en un sujeto de una respuesta Th1 a una respuesta Th2, o inducir una respuesta inmunitaria específica de Th2 en un sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende un péptido o un conjugado como se ha descrito anteriormente y un adyuvante adecuado.

Similarmente, un aspecto adicional se refiere al uso de un péptido o un conjugado como se ha descrito anteriormente en la preparación de una composición de vacuna.

Descripción detallada

5 La presente invención se refiere a variantes del péptido MBP, y más específicamente a variantes de fragmentos particulares del péptido MBP, concretamente el péptido MBP<sub>83-99</sub> y el péptido MBP<sub>87-99</sub>.  
 10 polar etc. También puede producirse sustitución no homóloga, es decir, de una clase de resto a otro o que implica alternativamente la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (denominado en lo sucesivo Z), ácido diaminobutírico ornitina (denominado en lo sucesivo B), norleucina ornitina (denominado en lo sucesivo O), pirdilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina, apareciendo una lista más detallada a continuación. Dentro de cada péptido puede modificarse más de un resto de aminoácido cada vez.

15 Como se usa en el presente documento, los aminoácidos se clasifican según las siguientes clases;  
 básicos; H, K, R  
 ácidos; D, E  
 no polares; A, F, G, I, L, M, P, V, W  
 polares; C, N, Q, S, T, Y,  
 (usando la notación de aminoácidos de una sola letra internacionalmente aceptada)  
 20 y se define sustitución homóloga y no homóloga usando estas clases. Así, se usa sustitución homóloga para referirse a la sustitución de dentro de la misma clase, mientras que sustitución no homóloga se refiere a la sustitución de una clase diferente o con un aminoácido no natural.

25 Grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre dos restos de aminoácidos cualquiera del péptido incluyen grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos tales como restos de glicina o β-alanina. Otra forma de variación, tipo (e), que implica la presencia de uno o más restos de aminoácidos en forma peptoide será bien entendida por aquellos expertos en la materia. Para evitar dudas, "la forma peptoide" se usa para referirse a restos de aminoácidos de variante en los que el grupo sustituyente de α-carbono está sobre el átomo de nitrógeno del resto en vez del α-carbono. Se conocen en la técnica procesos de preparación de péptidos en la forma peptoide, por ejemplo Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134. La modificación de tipo (f) puede producirse por métodos tales como aquellos descritos en la solicitud internacional PCT/GB99/01855.

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

Un aspecto de la invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (I)



40 en la que K<sup>91</sup> está sustituido con un aminoácido seleccionado de A, R, E, F e Y y P<sup>96</sup> está sustituido con el aminoácido A, en la que dicho péptido está en forma lineal o cíclica.

45 En una realización más preferida, K<sup>91</sup> está sustituido con un aminoácido seleccionado de A, E e Y.

En una realización altamente preferida, K<sup>91</sup> está sustituido con el aminoácido Y.

En una realización preferida, K<sup>91</sup> está sustituido con el aminoácido R y P<sup>96</sup> está sustituido con el aminoácido A.

50 En otra realización preferida, K<sup>91</sup> está sustituido con el aminoácido A y P<sup>96</sup> está sustituido con el aminoácido A.

En una realización particularmente preferida, el péptido de la invención está seleccionado de las siguientes secuencias:



55 [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> es particularmente preferido.

En otra realización, el péptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (Ib)



60

en la que al menos un de K<sup>91</sup> y P<sup>96</sup> está sustituido con un aminoácido seleccionado de R, E, F e Y.

En una realización preferida, el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de fórmula (Ib), en la que al menos uno de K<sup>91</sup> y P<sup>96</sup> está sustituido con un aminoácido seleccionado de R, E, F e Y.

En una realización altamente preferida, K<sup>91</sup> está sustituido con un aminoácido seleccionado de R, E, F e Y.

5

Más preferentemente todavía, el péptido de fórmula (Ib) está seleccionado de los siguientes:

[E <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ENPVVHFFENIVTPRTP
[F <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ENPVVHFFFNIVTPRTP
[Y <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ENPVVHFFYNIVTPRTP

El péptido [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> es particularmente preferido, lineal o cíclico.

10

En una realización preferida el péptido de fórmula (I) o (Ib) es un péptido lineal.

Preferentemente, el péptido de fórmula (I) o (Ib) está seleccionado de las secuencias anteriormente mencionadas, cada uno de los cuales está unido a manano, preferentemente manano reducido.

15

Basándose en el péptido de unión mínimo MBP<sub>83-91</sub> a I-A<sup>S</sup>, los solicitantes han diseñado y sintetizado análogos mutando el resto en la posición K<sup>91</sup> con alanina (A), ácido glutámico (E), arginina (R), fenilalanina (F) y tirosina (Y), con el fin de determinar si las respuestas inmunitarias pueden alterarse de Th1 a Th2. Se mutó K<sup>91</sup>, ya que éste es uno de los restos de contacto de TCR principales cuando se une a HLA-DR2 y se ha predicho que también es un resto de contacto de TCR cuando se une a H2 I-A<sup>S</sup> (Kalbus et al, Eur J Immunol. 2001).

20

### PÉPTIDOS CÍCLICOS

En una realización preferida, el péptido de la invención está en forma cíclica. En comparación con los péptidos lineales, los péptidos cíclicos han sido considerados por tener mayor potencial que los agentes terapéuticos debido a su elevada estabilidad química y enzimática, selectividad por receptor y propiedades farmacodinámicas mejoradas.

25

Preferentemente, el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la invención ciclada cabeza a cola.

30

En una realización particularmente preferida, el péptido cíclico está seleccionado de los siguientes:

análogos de péptido	secuencia
	ciclo(83-99)ENPVVHFFFKNIIVTFRTP
	ciclo(83-99)ENPVVHFFKANIVTFRTP
	ciclo(83-99)ENPVVHFFRNIIVTFRTP
ciclo(83-99)[R <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ciclo(83-99)ENPVVHFFRNIIVTFRTP
ciclo(83-99)[F <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ciclo(83-99)ENPVVHFFENIIVTFRTP
ciclo(83-99)[Y <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ciclo(83-99)ENPVVHFFENIIVTFRTP
ciclo(83-99)[E <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ciclo(83-99)ENPVVHFFKANIVTFRTP
ciclo(83-99)[A <sup>91</sup> , A <sup>96</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ciclo(83-99)ENPVVHFFRNIIVTFRTP
ciclo(83-99)[R <sup>91</sup> , A <sup>96</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ciclo(83-99)ENPVVHFFENIIVTFRTP
ciclo(83-99)[F <sup>91</sup> , A <sup>96</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ciclo(83-99)ENPVVHFFENIIVTFRTP
ciclo(83-99)[Y <sup>91</sup> , A <sup>96</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	ciclo(83-99)ENPVVHFFENIIVTFRTP

En la nomenclatura anterior, (83-99) indica el sitio de ciclación. Por ejemplo, el resto de aminoácido 83 está unido al resto 99; es decir, el péptido está ciclado "cabeza a cola".

35

Ciclo(83-99)[Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> es particularmente preferido.

Se buscó la ciclación del péptido MBP<sub>83-99</sub> y análogos como resultado de estudios de conformación en MBP<sub>87-99</sub> lineal que indica una estructura cíclica. En particular, el diseño de los análogos cíclicos del epítipo de MBP humano 83-99 se basó en resonancia magnética nuclear y dinámica molecular. Estos estudios revelaron una proximidad intramolecular de cabeza a cola (conectividad ROE entre ζNHLys<sup>91</sup>-nNHArg<sup>97</sup>) que indica una conformación pseudocíclica para el péptido inmunogénico MBP<sub>87-99</sub>. Similarmente, estudios de RMN de [Arg<sup>91</sup>, Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (ligando de péptido alterado por antagonista) revelaron una interacción intramolecular de cabeza a cola (conectividad ROE entre αVal<sup>87</sup>-βThr<sup>98</sup>, αVal<sup>87</sup>-γThr<sup>98</sup>).

40

45

La ciclación de secuencias de aminoácidos produce elevada estabilidad metabólica, potencia, selectividad por receptor y biodisponibilidad, todos los cuales reflejan un mejor perfil farmacológico [Scott, et al., 1999, Oligino, et al., 1997]. En particular, se han usado péptidos cíclicos en varios casos como inmunógenos [sintéticos Bruggle, et al., 1999], vacuna potente para diabetes [Berezhkovskiy, et al., 1999], antígenos para el virus del herpes simple [Mezo, et al., 1999], canales de iones transmembranarios [Chaloin et al., 1999], inhibidores de las interacciones Tat-TAR del

50

VIH-1 en células humanas [Tamilarasu *et al.*, 2000], de  $\alpha$ -amilasa, tripsina pancreática y como estabilizador de proteínas [Iwai, *et al.*, 1999].

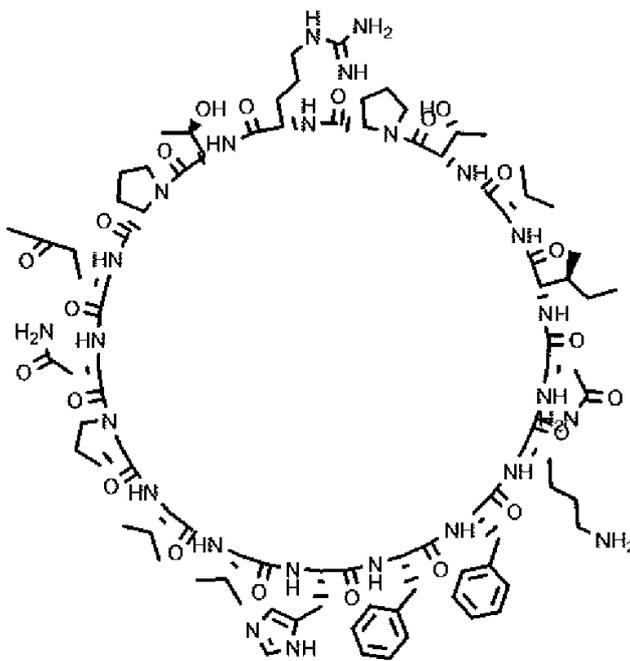
Además, ventajas de los análogos cíclicos con respecto a sus homólogos lineales incluyen:

- 5 (i) los análogos cíclicos son moléculas más estables y así más resistentes a la degradación enzimática, una calidad que los hace candidatos atractivos como cabezas de serie de fármacos;
- (ii) es una etapa intermedia hacia el diseño racional y desarrollo de un fármaco no peptídico para administración por vía oral, que es el objetivo definitivo de este trabajo y tecnología; y
- 10 (iii) la conformación de los análogos cíclicos se fija en comparación con la flexibilidad conformacional que caracteriza a los homólogos lineales. La conformación activa de los potentes péptidos lineales, que son muy importantes para el desarrollo de fármacos adicionales, se ha identificado mediante SAR, RMN y estudios dinámicos combinados.

15 Hasta la fecha, esta es la primera vez que los análogos cíclicos de epítopes de MBP han sido sintetizados y se mostró que prevenían el desarrollo de EAE.

En una realización particularmente preferida de la invención, el péptido es de fórmula A, en la que los análogos de ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> de extremo N a C (o cabeza a cola) están sustituidos en las posiciones 91 y/o 96 según la fórmula (I) o (Ib), como se ha descrito anteriormente, que son los sitios de contacto de TCR.

20



Fórmula A

25 Análogos cíclicos de epítope de MBP<sub>83-99</sub> humano que inducen y suprimen el desarrollo de EAE por MBP en ratas Lewis

El péptido MBP<sub>72-85</sub> (25  $\mu$ g) indujo una enfermedad monofásica aguda con una puntuación clínica pico en el día 13 después de la inyección inicial, seguido de recuperación completa en todos los animales en el día 18. La co-

30 inyección de [Arg<sup>91</sup>, Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (500  $\mu$ g) con el potente péptido agonista MBP<sub>72-85</sub> (25  $\mu$ g) previno completamente el desarrollo de EAE. La modificación y ciclación adicionales produjeron dos péptidos cíclicos antagonistas. La cadena lateral de Lys y el análogo cíclico unido a la amida del extremo C, ciclo(91-99)[Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (Val-His-Phe-Phe-Lys<sup>91</sup>-Asn-Ile-Val-Thr-Ala<sup>96</sup>-Arg-Thr-Pro<sup>99</sup>) tuvieron baja actividad inhibitoria en el sistema de EAE, mientras que el análogo cíclico unido a la amida, ciclo(87-99)[Arg<sup>91</sup>, Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> fue un fuerte inhibidor de EAE cuando se co-

35 administró con MBP<sub>72-85</sub>. La co-inyección de cualquier análogo cíclico (500  $\mu$ g) con MBP<sub>72-85</sub> (25  $\mu$ g) no inhibió la actividad de EAE. Sin embargo, todos los análogos cíclicos, excepto ciclo(1-5)Phe<sup>1</sup>-Ala-Arg-Gln-Acp<sup>5</sup>, produjeron el retraso de la aparición de EAE (del día 13 al día 15), pero no su gravedad.

40 Análogos cíclicos del epítope de MBP<sub>83-99</sub> humano como tratamiento preventivo experimental en EAE por MOG en ratones C57BL/6.

La inyección de MOG<sub>35-55</sub> lineal en ratones C57BL/6 produce una enfermedad crónica con una única recaída al principio de la enfermedad (fase aguda), seguida de una remisión incompleta que conduce a fase crónica con una enfermedad residual. Esta EAE crónica se produce mediante la inyección de 600 µg de MOG<sub>35-55</sub>, administrada en 2 dosis de 300 µg cada una y separada 2 días. La co-inyección del péptido MBP<sub>83-99</sub> cíclico en la inducción de enfermedad a la relación 1:1 parece ofrecer un leve beneficio preventivo, que no siempre es constante y depende del tamaño de muestra estadístico y la varianza. Por otra parte, la histopatología revela que MBP<sub>83-99</sub> cíclico está reduciendo algunos de los efectos histopatológicos básicos que son responsables del cuadro clínico de los animales.

Análogos de MBP<sub>87-99</sub>

Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de fórmula (IIb)



en la que K<sup>91</sup> está sustituido con el aminoácido A y P<sup>96</sup> está sustituido con el aminoácido A, en la que dicho péptido está ciclado cabeza a cola.

En una realización altamente preferida, el péptido de fórmula (IIa) consiste en la secuencia VHFFANIVTARTP ciclada cabeza a cola, es decir, ciclación entre los restos 87-99.

CONJUGADOS

Otro aspecto de la invención se refiere a un conjugado que comprende un péptido como se ha descrito anteriormente y manano. El manano (oxidado o reducido) puede unirse en cualquier sitio adecuado sobre el péptido. El conjugado puede contener más de un resto de manano y más de un péptido según la invención (cada uno de los cuales puede ser igual o diferente).

Preferentemente, el manano es manano reducido.

Así, en una realización preferida, la invención se refiere a un péptido como se ha descrito anteriormente conjugado con manano reducido.

Se ha usado manano como un vehículo satisfactorio para dirigir péptidos al receptor de manosa de macrófagos/células dendríticas. Tras la unión, se genera la presentación de clase I de MHC o de clase II de MHC de péptidos, estimulando tanto respuestas inmunitarias CTL/Ab como Th1/Th2. Resultados preliminares sugieren que las conjugaciones de manano reducido con péptidos antagonistas/agonistas cíclicos son más potentes que los análogos cíclicos solos. Están haciéndose investigaciones adicionales para medir citocinas y linfocitos T después de la inmunización de conjugados de manano oxidado/reducido con análogos de MBP cíclicos.

Las citocinas Th1 liberadas después de la administración terapéutica están asociadas a exacerbación de EM. Sin embargo, las citocinas Th2 (tales como IL-4 e IL-10) tienen propiedades antiinflamatorias y regulan por disminución respuestas Th1. Se ha investigado ampliamente el manano para su capacidad para generar respuestas en varios sistemas modelo. Se ha mostrado que su función de adyuvante procede de su capacidad para dirigir el receptor de manosa sobre células presentadoras de antígenos. Ratones inmunizados con la proteína MUC1 de manano se protegen contra una exposición a tumor que expresa MUC1, además de revertir tumores establecidos en ratones. Se observaron resultados similares en ratones transgénicos MUC1. Tanto una respuesta Th1 (IL-2, IFN-γ, IL-12, TNF-α y anticuerpos IgG2a) como respuesta Th2 (no IFN-γ o IL-12, pero cantidades significativas de IL-4, IL-10 y TGF-β y anticuerpos IgG1), dependiendo del modo de conjugación, y el manano oxidado/reducido respectivamente. Otras citocinas, IL-5, IL-6, IL-13, IL-15 e IL-18 también han sido medidas con tanto inmunógenos de manano oxidado como reducido. Además de respuestas de tipo Th1/Th2 a MUC1 en ratones, se han demostrado respuestas similares en seres humanos y monos con proteína MUC1 y a un péptido MSP-1 de *Anaplasma marginale* en vacas. El uso de manano reducido para desviar además respuestas inmunitarias a Th2 cuando se conjuga con péptidos MBP constituye una estrategia novedosa para la inmunoterapia de la enfermedad.

Los presentes solicitantes han demostrado que los análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> mutados conjugados con manano reducido desvían las respuestas inmunitarias de Th1 a Th2 en ratones SJL/J y generan anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con la proteína MBP nativa. Los péptidos [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> dieron el mejor perfil de reactividad de citocinas y anticuerpos, siendo [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> el más prometedor como péptido terapéutico contra EM.

Como se usa en el presente documento, "desviar respuestas inmunitarias de Th1 a Th2" significa un aumento de la producción de al menos una de las citocinas de tipo Th2, que incluyen, sin limitación, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 y/o una disminución de la producción de al menos una de las citocinas de tipo Th1, que incluyen, sin limitación, IL-2, TNFα e IFNγ, en comparación con los niveles de estas citocinas antes de la administración de péptido/conjugado, es decir, en ausencia del tratamiento.

En otra realización altamente preferida, la invención se refiere al péptido [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> o [A<sup>91</sup>,A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> conjugado con manano reducido.

En una realización preferida, el péptido se une al manano reducido mediante un grupo conector.

5

Preferentemente, el grupo conector es una hemocianina de lapa californiana (KLH).

La hemocianina de lapa californiana (KLH) es una proteína que contiene cobre aislada del molusco *Megathura crenulata*. Es un potente inmunoactivador comúnmente usado como vehículo en la conjugación de péptidos para la producción de anticuerpos, y respuestas de colaboradores CD4<sup>+</sup>. Está compuesta de formas monoméricas de alto y bajo peso molecular. KLH se usa como conector entre manano y péptido. El péptido de KLH se conjuga con KLH mediante glutaraldehído. La conjugación se produce mediante la formación de bases de Schiff entre grupos amino libres de KLH y manano oxidado. El complejo de manano oxidado-KLH-péptido se reduce entonces con borohidruro de sodio para formar el complejo de manano reducido-KLH-péptido. Además, la KLH proporciona colaboradores CD4<sup>+</sup> para iniciar además respuestas inmunitarias. El manano reducido es capaz de desviar respuestas inmunitarias de Th1 a Th2.

10

15

Preferentemente, el manano se oxida a un polialdehído tratando con peryodato de sodio. Entonces se añade etanoditiol para detener la oxidación. La mezcla se pasa a través de una columna de PD-10 pre-calibrada con tampón carbonato y se recoge la fracción de manano oxidado. Para la conjugación de análogos de péptido con manano oxidado, se dejó reaccionar cada péptido pre-conjugado con KLH usando glutaraldehído con manano oxidado durante la noche a temperatura ambiente. El manano oxidado contiene aldehídos y bases de Schiff (Figura 2). Para la conjugación de análogos de péptido a manano reducido (que reduce los aldehídos a alcoholes y las bases de Schiff a aminas): se hacen reaccionar complejos de manano oxidado-análogo de péptido (de antes) con borohidruro de sodio durante 3 horas a temperatura ambiente. La conjugación (manano reducido-péptido-KLH) se usa sin más purificación (Figura 2).

20

25

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un proceso de preparación de un conjugado, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

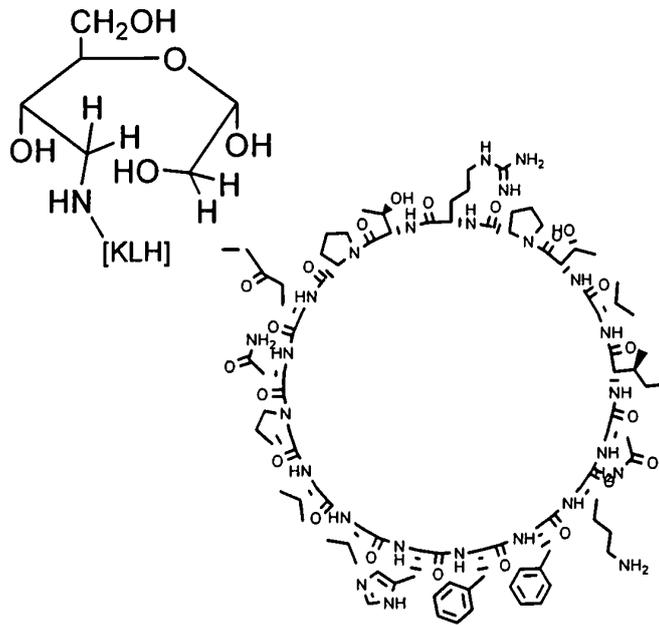
30

- (i) hacer reaccionar un péptido como se ha definido anteriormente con una hemocianina de lapa californiana (KLH);
- (ii) hacer reaccionar el producto formado en la etapa (i) con manano oxidado; y
- (iii) reducir el producto formado en la etapa (ii) para formar un conjugado de manano reducido.

35

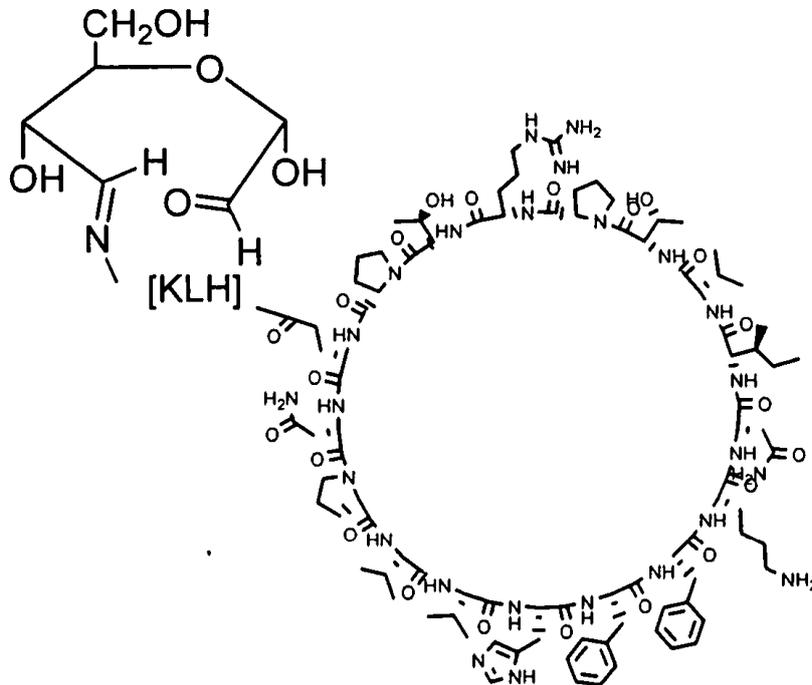
Hay evidencia recopilada de que los análogos de epítopes asociados a enfermedad pueden conjugarse con manano oxidado o reducido mediante el conector de KLH y generar activamente linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> reguladores específicos de antígeno y citocinas Th1/Th2. La capacidad para alterar la secreción de citocinas de líneas de linfocitos T auto-reactivos usando péptidos o tratamiento con miméticos peptídicos incluso en enfermedad autoinmunitaria de larga duración indica que la terapia con citocinas podría tener beneficios terapéuticos cambiando la función de linfocitos T auto-reactivos de mielina que son no patógenos. Conjugados de manano oxidado o reducido de antígenos de mielina son prometedores para inducir secreción de citocinas apropiada.

40



Fórmula C

- 5 En una realización particularmente preferida de la invención, el conjugado es de fórmula D, en la que un péptido ciclo(83-99)N4BP<sub>83-99</sub> está opcionalmente sustituido en las posiciones 91 y/o 96 y se conjuga con manano en su forma oxidada.



Fórmula D

10

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

- 15 Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido o conjugado como se ha descrito anteriormente para su uso en medicina.

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

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

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

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante autoinmunitaria mediada principalmente por linfocitos T CD4<sup>+</sup> del subconjunto Th1. Autoantígenos candidatos incluyen constituyentes de la vaina de mielina - proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolípida (PLP) y glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG). Modernos enfoques hacia el tratamiento terapéutico de EM implican el diseño y uso de análogos de péptido de epítopes de mielina asociados a enfermedad para inducir la tolerancia de linfocitos T periféricos. La presente invención proporciona varios ligandos de péptido alterados mutando los restos de contacto de TCR principales basados en el epítipo de MBP<sub>83-99</sub>. Experimentos por el solicitante han demostrado que los análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> mutados conjugados con manano reducido desvían inesperadamente las respuestas inmunitarias de Th1 a Th2 en ratones SJL/J y generan anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con la proteína MBP nativa. Los péptidos [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> dieron el mejor perfil de reactividad de citocinas y anticuerpos, siendo [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> el más prometedor como péptido terapéutico contra EM.

Además, análogos de MBP<sub>83-99</sub> cíclicos suprimieron EAE crónica inducida por el MOG<sub>35-55</sub> lineal y también la inmunización con conjugados de MBP<sub>83-99</sub> lineal-KLH-manano reducido previno la inducción de EAE.

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

Los estudios de estructura-actividad basados en el epítipo MBP<sub>83-99</sub> humano [Vergeli, *et al* 1996, Brocke, *et al.* 1996] (Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-Val-Thr-Pro-Arg-Thr-Pro) produjeron análogos lineales y cíclicos, concretamente [Arg<sup>91</sup>,Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (Val-His-Phe-Phe-Arg<sup>91</sup>-Asn-Ile-Val-Thr-Ala<sup>96</sup>-Arg-Thr-Pro) y ciclo(87-99)[Arg<sup>91</sup>,Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (Val<sup>87</sup>-His-Phe-Phe-Arg<sup>91</sup>-Asn-Ile-Val-Thr-Ala<sup>96</sup>-Arg-Thr-Pro<sup>99</sup>) que previnieron completamente la inducción de EAE cuando se co-inyectaron a ratas Lewis junto con el agonista encefalitogénico MBP<sub>72-85</sub>. El bloqueo de EAE inducida por MBP<sub>72-85</sub> por los péptidos no relacionados previos podría indicar que el mecanismo de inhibición no es debido a la competición por unión, sino debido a la administración de una señal negativa por el antagonista que vence la respuesta del agonista posiblemente mediante la activación de linfocitos T reguladores específicos de antígeno.

Preferentemente, el péptido o conjugado va a administrarse en una cantidad suficiente para producir la supresión de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) crónica inducida por MOG<sub>35-55</sub>.

Preferentemente, el péptido o conjugado va a administrarse en una cantidad suficiente para modular inversamente las respuestas Th1 y Th2 de linfocitos en un sujeto para aumentar la respuesta Th2 y disminuir la respuesta Th1, respectivamente, por encima y por debajo de los niveles que prevalecen sin dicho tratamiento.

Ensayos inmunológicos para medir respuestas de linfocitos T específicas a antígenos pueden llevarse a cabo por análisis ELISpot para detectar la secreción de citocinas específicas tales como IFN-γ, IL-4 o IL-10. Más detalles de estos ensayos pueden encontrarse en la sección de Ejemplos adjunta.

Preferentemente, el péptido o conjugado va a administrarse en una cantidad suficiente para potenciar/inducir la respuesta de tipo Th2 en un sujeto, en comparación con la respuesta de tipo Th2 antes de la administración de péptido/conjugado (es decir, en ausencia de tratamiento) y reducir la respuesta de tipo Th1 en comparación con la respuesta de tipo Th1 antes de la administración de péptido/conjugado.

Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido o conjugado como se ha descrito anteriormente para su uso en desviar la respuesta inmunitaria en un sujeto de una respuesta Th1 a una respuesta Th2.

En una realización, el péptido o conjugado inhibe selectivamente la respuesta inmunitaria Th1 con respecto a la respuesta inmunitaria Th2 en un sujeto.

En una realización, el péptido o conjugado aumenta selectivamente la respuesta inmunitaria Th2 en un sujeto con respecto a la respuesta inmunitaria Th1.

En una realización, el péptido o conjugado reduce selectivamente la respuesta Th1 de linfocitos en un sujeto con respecto a la respuesta Th2 de linfocitos.

Otro aspecto más se refiere a un péptido o conjugado como se ha descrito anteriormente para su uso en inducir una respuesta inmunitaria específica de Th2 en un sujeto.

En una realización, el péptido o conjugado reduce el nivel de IFNγ en un sujeto.

Otro aspecto se refiere al uso de un péptido o un conjugado como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a un desequilibrio en la expresión de linfocinas.

5 Las linfocinas son un grupo de polipéptidos que pertenecen a la familia de las citocinas, es decir, moléculas de tipo  
 10 hormona que pueden afectar diversas funciones celulares y permitir la comunicación entre diferentes células. Desarrollos recientes han ayudado a aclarar la función de las linfocinas en la respuesta inmunitaria. La producción  
 15 de linfocinas por linfocitos T CD4 colaboradores (y también en CD8+) frecuentemente se clasifica en uno de dos fenotipos, Th1 y Th2, en tanto sistemas murinos como humanos (Romagnani. 1991, Immunol Today 12: 256-257, Mosmann. 1989, Annu Rev Immunol, 7: 145-173). Las células Th1 producen interleucina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) e interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y son responsables principalmente de la inmunidad celular tal como hipersensibilidad de tipo retardado. Las células Th2 producen interleucinas, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 y están principalmente implicadas en proporcionar ayuda óptima para respuestas inmunitarias humorales tales como el cambio de isotipo de anticuerpos IgE e IgG4 (Mosmann, 1989, Annu Rev Immunol, 7: 145-173). Respuestas Th1 y Th2 fuertemente polarizadas no solo desempeñan diferentes funciones en la protección, pueden promover diferentes reacciones inmunopatológicas.

Otro aspecto se refiere al uso de un péptido o un conjugado como se ha descrito anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno asociado a un desequilibrio en la expresión de linfocinas.

20 Preferentemente, el péptido o conjugado va a administrarse en una cantidad suficiente para modular inversamente las respuestas Th1 y Th2 de linfocitos en el sujeto para aumentar la respuesta Th2 y disminuir la respuesta Th1, respectivamente, por encima y por debajo de los niveles que prevalecen sin dicho tratamiento.

25 En una realización preferida, el péptido o conjugado va a administrarse en una cantidad suficiente para potenciar/inducir la respuesta de tipo Th2 en un sujeto, en comparación con la respuesta de tipo Th2 antes de la administración de péptido/conjugado (es decir, en ausencia de tratamiento) y reducir la respuesta de tipo Th1 en comparación con la respuesta de tipo Th1 antes de la administración de péptido/conjugado.

30 En otra realización preferida, el péptido o conjugado va a administrarse en una cantidad suficiente para modular inversamente las respuestas Th1 y Th2 de linfocitos en el sujeto para aumentar la respuesta Th2 y disminuir la respuesta Th1, respectivamente, por encima y por debajo de los niveles que prevalecen sin dicho tratamiento.

En una realización altamente preferida, el trastorno asociado a un desequilibrio de la expresión de linfocinas es una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria con un perfil inmunitario de Th1.

### 35 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 vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Aún cuando el péptido/conjugado de la presente invención (incluyendo sus sales farmacéuticamente aceptables, ésteres y solvatos farmacéuticamente aceptables) pueda administrarse solo, generalmente se administrará en mezcla con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico, particularmente para terapia humana. Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina y veterinaria.

45 Ejemplos de tales excipientes adecuados para las diversas formas diferentes de las composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento pueden encontrarse en "Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2<sup>a</sup> Edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller.

50 Vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son muy conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

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

55 La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el vehículo, excipiente o diluyente cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante adecuado.

60 Ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa fluida, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

65 Ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato sódico, cloruro sódico y similares. Conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso aromatizantes pueden proporcionarse en la composición farmacéutica. Ejemplos de conservantes incluyen benzoato

de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión.

#### SALES/ÉSTERES

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

10 Sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos/conjugados de la invención incluyen sales de adición de ácido o de base adecuadas de los mismos. Una revisión de sales farmacéuticas adecuadas puede encontrarse 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, por ejemplo ácido sulfúrico, ácido fosfórico o hidrácidos; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que están sin sustituir o sustituidos (por ejemplo, con halógeno), tales como ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo 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 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)- o aril-sulfónicos que están sin sustituir o sustituidos (por ejemplo, con un halógeno) tales como ácido metano- o p-toluenosulfónico.

20 Los ésteres se forman tanto usando ácidos orgánicos como alcoholes/hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que se esterifique. Ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 12 átomos de carbono que están sin sustituir o sustituidos (por ejemplo, con halógeno), tales como ácido acético; con ácido dicarboxílico saturado o insaturado, por ejemplo 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 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)- o aril-sulfónicos que están sin sustituir o sustituidos (por ejemplo, con un halógeno) tales como ácido metano- o p-toluenosulfónico. Hidróxidos adecuados incluyen hidróxidos inorgánicos, tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio. Alcoholes incluyen alcoholes de 1-12 átomos de carbono que pueden estar sin sustituir o sustituidos, por ejemplo con un halógeno).

#### 30 ENANTIÓMEROS/TAUTÓMEROS

En todos los aspectos de la presente invención previamente tratados, la invención incluye, cuando corresponda, 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 técnica.

#### ESTEREOISÓMEROS E ISÓMEROS GEOMÉTRICOS

40 Algunos de los péptidos/conjugados de la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos - por ejemplo, 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 e isómeros geométricos individuales, y mezclas de los mismos. Los términos usados en las reivindicaciones engloban estas formas, siempre que dichas formas retengan la actividad funcional apropiada (aunque no necesariamente al mismo grado).

La presente invención también incluye todas las variaciones isotópicas adecuadas de los péptidos/conjugados o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Una variación isotópica se define como una en la que al menos un átomo está sustituido con un átomo que tiene el mismo número atómico, pero una masa atómica diferente de la masa atómica normalmente encontrada en la 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 <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O, <sup>31</sup>P, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>18</sup>F y <sup>36</sup>Cl, respectivamente. Ciertas variaciones 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 <sup>3</sup>H o <sup>14</sup>C, son útiles en los estudios de distribución en tejido de fármaco y/o sustrato. Los isótopos tritados, es decir, <sup>3</sup>H, y carbon-14, es decir, <sup>14</sup>C, son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos tales como deuterio, es decir, <sup>2</sup>H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, elevada semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos y, por tanto, puede preferirse en algunas circunstancias. Las variaciones isotópicas de los péptidos/conjugados de la presente invención y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de la presente invención pueden generalmente prepararse mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de reactivos adecuadas.

## SOLVATOS

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

## POLIMORFOS

10 La invención se refiere además a los péptidos/conjugados de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas hidratadas (anhidas). Está bien establecido dentro de la industria farmacéutica que los compuestos químicos pueden aislarse en cualquiera de tales formas variando ligeramente el método de purificación y o forma de aislamiento de los disolventes usados en la preparación sintética de tales compuestos.

## 15 PROFÁRMACOS

La invención incluye además los péptidos/conjugados de la presente invención en forma de profármaco. Tales profármacos son generalmente péptidos/conjugados en los que uno o más grupos apropiados se han modificado de forma que la modificación pueda ser invertida tras la administración a un sujeto humano o mamífero. Tal inversión se realiza normalmente por una enzima naturalmente presente en tal sujeto, aunque es posible que un segundo agente se administre junto con un profármaco tal con el fin de realizar la inversión *in vivo*. Ejemplos de tales modificaciones incluyen éster (por ejemplo, cualquiera de aquellos descritos anteriormente), en los que la inversión puede llevarse a cabo por una esterasa, etc. Otros sistemas tales serán muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

## 25 ADMINISTRACIÓN

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

30 Para administración por vía oral, se hace uso particular de comprimidos por compresión, píldoras, comprimidos, pastillas, gotas y cápsulas.

35 Otras formas de administración comprenden soluciones o emulsiones que pueden inyectarse por vía intravenosa, intrarterial, 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, pomadas, cremas, geles, esprays, soluciones o polvos para extender sobre la piel.

40 Un medio alternativo de administración transdérmica es por el uso de un parche para la piel. 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 de entre el 1 y el 10 % en peso, en una pomada que consiste en una cera blanca o base de parafina blanda junto con tales estabilizadores y conservantes como pueda requerirse.

45 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 sub-unidad de una dosis unitaria.

## DOSIFICACIÓN

50 Un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente una dosis apropiada de una de las presentes composiciones para administrar a un sujeto sin excesiva experimentación. Normalmente, un médico determinará la dosificación actual que será la más adecuada para un paciente individual y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la longitud de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, velocidad de eliminación, combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y la terapia subyacente individual. Las dosificaciones en el presente documento se desvelan a modo de ejemplo del caso promedio. Puede haber, por supuesto, casos individuales donde se merezcan intervalos de dosificación más altos o más bajos, y tales están dentro del alcance de la presente invención.

## 60 COMBINACIONES

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

65

Se desea terapia de combinación con el fin de evitar un solapamiento de toxicidades importantes, mecanismo de acción y mecanismo(s) de resistencia. Además, también se desea administrar la mayoría de los fármacos a su máxima dosis tolerada con intervalos de tiempo mínimos entre tales dosis. Las principales ventajas de combinar fármacos quimioterapéuticos son que pueden promoverse los posibles efectos aditivos o sinérgicos mediante interacciones bioquímicas y también puede disminuirse la emergencia de resistencia en células tumorales tempranas que habrían sido de otro modo sensibles a la quimioterapia inicial con un único agente.

#### ENSAYO

Otro aspecto se refiere al uso de un péptido o un conjugado según la invención, en un ensayo para dilucidar agentes capaces de regular encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) o regular esclerosis múltiple.

#### VACUNAS

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende un péptido o un conjugado como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, la composición de vacuna comprende además uno o más adyuvantes. El término "adyuvante", como se usa en el presente documento, incluye un agente que tiene la capacidad para potenciar la respuesta inmunitaria de sistema inmunitario de un sujeto vertebrado a un antígeno o determinante antigénico.

La preparación de vacunas que contienen un polipéptido inmunogénico como principio activo será conocida para un experto en la materia. Normalmente, tales vacunas se preparan como inyectables, bien como soluciones líquidas o como suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o la proteína encapsularse en liposomas. Los componentes inmunogénicos activos se mezclan frecuentemente con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos.

Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH y/o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna. Ejemplos de adyuvantes que pueden ser eficaces incluyen, pero no se limitan, a: hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, trehalosa dimicolato y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión al 2 % de escualeno/Tween 80.

Ejemplos adicionales de adyuvantes y otros agentes incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y potasio (alumbre), sulfato de berilio, sílice, caolín, carbón, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, muramil dipéptido, endotoxina bacteriana, lípido X, *Corynebacterium parvum* (*Propionibacterium acnes*), *Bordetella pertussis*, polirribonucleótidos, alginato de sodio, lanolina, lisolecitina, vitamina A, saponina, liposomas, levamisol, DEAE-dextrano, copolímeros bloqueados u otros adyuvantes sintéticos. Tales adyuvantes están disponibles comercialmente de diversas fuentes, por ejemplo, Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) o adyuvante incompleto de Freund y adyuvante completo (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

Normalmente, se usan adyuvantes tales como Amphigen (aceite en agua), Alhydrogel (hidróxido de aluminio), o una mezcla de Amphigen y Alhydrogel.

La proporción de inmunogén y adyuvante puede variarse a lo largo de un amplio intervalo, mientras que ambos están presentes en cantidades eficaces. Por ejemplo, puede estar presente hidróxido de aluminio en una cantidad de aproximadamente el 0,5 % de la mezcla de vacuna (base de  $Al_2O_3$ ). Convenientemente, las vacunas se formulan para contener una concentración final de inmunogén en el intervalo de 0,2 a 200  $\mu\text{g/ml}$ , preferentemente 5 a 50  $\mu\text{g/ml}$ , lo más preferentemente 15  $\mu\text{g/ml}$ .

La eficacia de un adyuvante puede determinarse midiendo la cantidad de anticuerpos dirigidos contra un agente inmunogénico resultante de la administración de este agente en vacunas que también comprenden los diversos adyuvantes.

Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, bien por vía subcutánea o por vía intramuscular. Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para supositorios, aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferentemente 1 % al 2 %. Formulaciones orales incluyen tales excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras,

cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10 % al 95 % de principio activo, preferentemente 25 % al 70 %. Donde la composición de vacuna se liofiliza, el material liofilizado puede reconstituirse antes de la administración, por ejemplo como una suspensión. La reconstitución se efectúa preferentemente en tampón.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido o un conjugado como se ha descrito anteriormente en la preparación de una composición de vacuna.

La presente invención se describe además a modo de los siguientes ejemplos no limitantes, y con referencia a las figuras a continuación en las que:

La Figura 1 es una representación esquemática de la síntesis de péptidos cíclicos.

La Figura 2 es una representación esquemática de la conjugación entre péptidos MBP<sub>83-99</sub>-KLH y manano oxidado y reducción del complejo para producir conjugados de manano reducido-MBP<sub>83-99</sub>-KLH usados para inmunización.

La Figura 3 muestra respuestas de IFN- $\gamma$  en ratones SJL/J inmunizados con análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub>. Se administraron inmunizaciones dos veces intradérmicamente de 50  $\mu$ g de péptido conjugado con manano reducido y 14 días después de la inmunización las células del bazo se aislaron para análisis de ELISpot. Se muestran las respuestas de IFN- $\gamma$  como unidades formadoras de puntos (sfu) por 0,5x10<sup>6</sup> células. Los datos son representativos de dos experimentos con tres ratones por grupo.

La Figura 4 muestra respuestas de IL-4 en ratones SJL/J inmunizados con análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub>. Se administraron inmunizaciones dos veces por vía intradérmica de 50  $\mu$ g de péptido conjugado con manano reducido y 14 días después de la inmunización las células del bazo se aislaron para análisis de ELISpot. Las respuestas de IL-4 se muestran como unidades formadoras de puntos (sfu) por 0,5x10<sup>6</sup> células. Los datos son representativos de dos experimentos con tres ratones por grupo.

La Figura 5 muestra (a) respuestas de IL-10 en ratones SJL/J inmunizados con análogos de péptido [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> o MBP<sub>83-99</sub>[F<sup>91</sup>]. Se administraron inmunizaciones dos veces por vía intradérmica de 50  $\mu$ g de péptido conjugado con manano reducido y 14 días después de la inmunización las células del bazo se aislaron para análisis de ELISpot. Se muestran respuestas de IL-10 como unidades formadoras de puntos (sfu) por 0,5x10<sup>6</sup> células. No se usó péptido como control negativo (barras grises) y se muestra péptido de recuerdo como barras negras; (b) Proliferación de células del bazo en respuesta a péptido de recuerdo [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> o (c, d) [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> después de la inmunización de ratones SJL/J con manano reducido-KLH-[F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> o manano reducido-KLH-[Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, respectivamente; (d) ConA se eliminó de la figura. Se usó ConA como control interno positivo y sin péptido como control negativo. Los datos son representativos de tres experimentos de ratón diferentes.

La Figura 6 muestra ratones SJL/J inmunizados con (a) péptidos MBP<sub>83-99</sub> lineales o cíclicos o (b) análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> mutantes [[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [A<sup>91</sup>, R<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>]. Se midieron niveles de anticuerpo IgG total por recubrimiento de ELISA con cada péptido respectivo conjugado con BSA; (c) subclase de anticuerpo IgG1, IgG2a, IgGM; (d) se midieron niveles de anticuerpos IgG totales recubriendo con proteína MBP bovina nativa. Los datos son representativos de dos experimentos. Se muestran curvas de ratón individuales.

La Figura 7 muestra una representación esquemática para la síntesis de péptidos cíclicos.

La Figura 8 muestra antagonismo de IFN- $\gamma$ . Se inmunizaron ratones con péptido MBP<sub>83-99</sub> nativo emulsionado en CFA, y se aislaron células del bazo 25 días después. La capacidad de análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> mutantes cíclicos para antagonizar la producción de IFN- $\gamma$  se evaluó por análisis de ELISpot. El péptido MBP<sub>83-99</sub> nativo se añadió junto con análogos de MBP<sub>83-99</sub> mutados cíclicos y se muestra el % de inhibición de IFN- $\gamma$ .

La Figura 9 muestra (A) respuestas de IFN- $\gamma$  y (B) respuestas de IL-4 en ratones SJL/J inmunizados con MBP<sub>83-99</sub> agonista lineal, [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> antagonista lineal, análogos de péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> emulsionados en CFA. Se muestran respuestas de IFN- $\gamma$  o IL-4 como SFU (EEM por 0,5 millones de células menos el ruido de fondo (control negativo)). (C) Se midieron niveles de anticuerpo IgG total por recubrimiento de ELISA con cada péptido respectivo conjugado con KLH. (D) Los ratones se inmunizaron con péptido MBP<sub>83-99</sub> nativo emulsionado en CFA y se determinó la proliferación de células del bazo en respuesta a péptidos de memoria. Los datos se muestran como recuentos medios por minuto (cpm) de pocillos triplicados (EEM durante 6 días. Los resultados son representativos de dos experimentos con tres ratones por grupo.

La Figura 10 muestra (A) respuestas de IFN- $\gamma$  y (B) respuestas de IL-4 en ratones SJL/J inmunizados con MBP<sub>83-99</sub> lineal (agonista), [A91]MBP<sub>83-99</sub> mutante lineal (antagonista), análogos de péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y ciclo(83-99)[A91]MBP<sub>83-99</sub> mutante conjugados con manano reducido. Se muestran respuestas

de IFN- $\gamma$  o IL-4 como SFU (EEM por 0,5 millones de células menos ruido de fondo (control negativo). (C) Respuestas de IL-4 en ratones SJL/J inmunizados con análogos de péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> conjugados con manano reducido. (D) Se midieron niveles de anticuerpo IgG total por recubrimiento de ELISA con cada péptido respectivo conjugado con BSA. Los resultados son representativos de dos experimentos con tres ratones por grupo.

La Figura 11 muestra modelos de I-A<sup>s</sup> de clase II de MHC con ligandos de péptido MBP unidos. Las ranuras de unión de MHC se muestran como cintas (cadena  $\alpha$ , verde pálido; cadena  $\beta$ , gris) con los péptidos unidos como representaciones de varilla: (a) péptido no mutante MBP (K<sup>91</sup>) en cian; (b) análogo mutante [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> en magenta; (c) análogo mutante [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> en naranja. (d) Los péptidos se muestran como transparencias con las posiciones de restos de MBP correspondientes (87-96) indicadas.

La Figura 12 muestra (a) respuestas de IFN- $\gamma$  y (b) IL-4 en ratones SJL/J inmunizados con tanto péptidos MBP<sub>87-99</sub> como [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>. Inmunización con 50  $\mu$ g de péptido emulsionado en CFA (barra negra) o conjugado con manano reducido (barra blanca). Los negativos (niveles de ruido de fondo) se indican como barra gris. Las respuestas de IFN- $\gamma$  o IL-4 se muestran como unidades formadoras de puntos (SFU) por 0,5 millones de células  $\pm$  error estándar de la media. Representativo de 2 experimentos con 3 ratones por grupo. \*\*( $p < 0,01$ ).

La Figura 13 muestra respuestas de IFN- $\gamma$  en ratones SJL/J inmunizados con tanto péptidos MBP<sub>87-99</sub> como [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>. (a) Inmunización con 50  $\mu$ g de péptido emulsionado en CFA y (b) inmunización con 50  $\mu$ g de péptido conjugado con manano reducido. Las respuestas de IFN- $\gamma$  se muestran como unidades formadoras de puntos (SFU) por 0,5 millones de células  $\pm$  error estándar de la media. Representativo de 2 experimentos con 3 ratones por grupo.

La Figura 14 muestra respuestas de IL-4 en ratones SJL/J inmunizados con tanto péptidos MBP<sub>87-99</sub> como [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>. (a) Inmunización con 50  $\mu$ g de péptido emulsionado en CFA y (b) inmunizaciones con 50  $\mu$ g de péptido conjugado con manano reducido. Las respuestas de IL-4 se muestran como unidades formadoras de puntos (SFU) por 0,5 millones de células  $\pm$  error estándar de la media. Representativo de 2 experimentos con 3 ratones por grupo.

La Figura 15 muestra producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T de ratones SJL/J inmunizados con el péptido mutante [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (a) emulsionado en CFA o (b) conjugado con manano reducido. Los péptidos de memoria fueron tanto MBP<sub>87-99</sub>, [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> como [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> o ningún péptido (negativo) (eje x). La producción de IFN- $\gamma$  se muestra como unidades formadoras de puntos (SFU) / 0,5 millones de células  $\pm$  error estándar de la media. Representativo de 2 experimentos con 3 ratones por grupo.

La Figura 16 muestra ratones SJL/J inmunizados con (a) MBP<sub>87-99</sub> o análogos de péptido [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionados en CFA, o, (b) MBP<sub>87-99</sub> o análogos de péptido [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugados con manano reducido. Los niveles de anticuerpo IgG total se midieron por recubrimiento de ELISA con cada péptido respectivo conjugado con BSA o KLH. (c,d) Se midieron niveles de anticuerpo IgG que reaccionan de forma cruzada que se recubren con péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo y usando sueros de ratones SJL/J inmunizados con péptidos MBP<sub>87-99</sub> o [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (c) emulsionados en CFA o (d) conjugados con manano reducido. Las barras de error representan el error estándar de la media. Representativo de 2 experimentos con 3 ratones por grupo.

La Figura 17 muestra (a) RP-HPLC analítica de análogo de [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> lineal purificado después de su purificación por RP-HPLC semi-preparativa y liofilización. Columna: Nucleosil C18, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m. T<sub>R</sub>: 17,3 min. Condiciones: gradiente 5 % de (B)-100 % de (B), en 35 min, caudal 1 ml/min. [Eluyentes (A): Disolución de TFA en H<sub>2</sub>O 0,08 % (v/v), (B): Disolución TFA en AcN 0,08 % (v/v)]. (b) ESI-EM de análogo de [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> lineal. M<sup>+</sup>:1473,31, M+2H<sup>+</sup>/2:737,29.

La Figura 18 muestra las interacciones de enlace de hidrógeno en los complejos modelados de péptido MBP<sub>87-96</sub> y análogos mutantes con H2 I-A<sup>s</sup>.

La Figura 19 muestra interacciones de van der Waals en los complejos modelados de péptido MBP<sub>87-96</sub> y análogos mutantes con H2 I-A<sup>s</sup>.

La Figura 20 muestra respuestas de IFN- $\gamma$  (A, B) e IL-4 (C, D) en ratones SJL/J inmunizados con tanto MBP<sub>87-99</sub> como análogos de péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>. (A, C) Se administró inmunización una vez de 50  $\mu$ g de péptido emulsionado en adyuvante completo de Freund y 28 días después de la inmunización las células del bazo se aislaron para análisis de ELISpot. (B, D) Se administraron inmunizaciones dos veces por vía intradérmica de 50  $\mu$ g de péptido conjugado con manano reducido-KLH y 14 días después de la inmunización las células del bazo se aislaron para análisis de ELISpot. Se muestran respuestas de IFN- $\gamma$  y de IL-4 (el ruido de fondo se restó para respuestas de IL-4) como unidades formadoras de puntos (SFU) por 0,5 millones de células  $\pm$  error estándar de la media de pocillos triplicados. Representativo de dos experimentos con tres ratones por grupo (\*\* $p < 0,01$ )

La Figura 21 muestra ratones SJL/J que se inmunizaron con (A) MBP<sub>87-99</sub> o análogos de péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionados en adyuvante completo de Freund, o, (B) MBP<sub>87-99</sub> o análogos de péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugados con manano reducido. Se aislaron células del bazo para análisis de ELISpot y se cultivaron con péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo *in vitro*. Se muestran respuestas de IFN- $\gamma$  como unidades formadoras de puntos (SFU) por 0,5 millones de células +/- error estándar de la media de pocillos triplicados. Representativos de dos experimentos con tres ratones por grupo

La Figura 22 muestra ratones SJL/J que se inmunizaron con (A) MBP<sub>87-99</sub> o análogos de péptido de ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionados en adyuvante completo de Freund, o, (B) MBP<sub>87-99</sub> o análogos de péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugados con manano reducido-KLH. Se midieron los niveles de anticuerpo IgG total por recubrimiento de ELISA con cada péptido respectivo conjugado con BSA o KLH. (C) Se midieron niveles de anticuerpo IgG total que se recubren con péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo y usando sueros de ratones SJL/J inmunizados con MBP<sub>87-99</sub> o ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en adyuvante completo de Freund. (D) Se midieron niveles de anticuerpo IgG total que se recubren con péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo y usando sueros de ratones SJL/J inmunizados con MBP<sub>87-99</sub> o ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugado con manano reducido-KLH. Representativos de dos experimentos con tres ratones por grupo.

## EJEMPLO 1

### Materiales y métodos

#### Síntesis de péptidos en fase sólida de análogos lineales y cíclicos

Se prepararon péptidos (Tabla 1) sobre resina de cloruro de 2-clorotritilo (CTLR-Cl) usando metodología de Fmoc/tBu. La ciclación se logró con TBTU/HOAt y 2,4,6-colidina como base, como se describe previamente. Se realizaron HPLC preparativa para análogos de péptido usando una columna semipreparativa de fase inversa Lichrosorb RP-18 con material de relleno de 7  $\mu$ m. Los péptidos tuvieron >95 % de pureza como se analizó por espectrometría de masas.

Tabla 1: Análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> usados en este estudio

	Secuencia	Análogos de péptido
P1	ENPVVHFFKNIVTPRTP	MBP <sub>83-99</sub>
P2	ciclo(83-99)ENPVVHFFKNIVTPRTP	ciclo(83-99)MBP <sub>83-99</sub>
P3	ENPVVHFFANIVTPRTP	[A <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>
P4	ciclo(83-99)ENPVVHFFANIVTPRTP	ciclo(83-99)[A <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>
P5	ENPVVHFFENIVTPRTP	[E <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>
P6	ENPVVHFFFNIVTPRTP	[F <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>
P7	ENPVVHFFRNIVTARTP	[R <sup>91</sup> , A <sup>96</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>
P8	ENPVVHFFYNIVTPRTP	[Y <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>
P9	ENPVVHFFANIVTARTP	[A <sup>91</sup> , A <sup>96</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>

#### Ejemplos de ciclación

La ciclación del análogo protegido de MBP<sub>83-99</sub> lineal se logró usando tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol, 2,4,6-colidina en solución de DMF, permitiendo reacciones rápidas y productos de ciclación de alto rendimiento. Resultados recientes indican que HOAt, una variante que contiene 4 nitrógenos, es un aditivo de acoplamiento muy eficiente, más eficiente que HOBt para la síntesis en solución o fase sólida que conduce a productos de alto rendimiento.

#### Síntesis de péptidos cíclicos MBP humanos

Ciclo(83-99)[Arg<sup>91</sup>, Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (Glu-Asn-Pro-Val-Val<sup>87</sup>-His-Phe-Phe-Arg<sup>91</sup>-Asn-Ile-Val-Thr-Ala<sup>96</sup>-Arg-Thr-Pro<sup>99</sup>)  
 Ciclo(91-99)[Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (Glu-Asn-Pro-Val-Val<sup>87</sup>-His-Phe-Phe-Lys<sup>91</sup>-Asn-Ile-Val-Thr-Ala<sup>96</sup>-Arg-Thr-Pro<sup>99</sup>)

Se prepararon análogos cíclicos de MBP humano sobre resina de cloruro de 2-clorotritilo usando metodología de Fmoc/tBu. La síntesis de péptidos se logró usando DIC/HOBt en DMF y N<sup>t</sup>-NH<sub>2</sub> de aminoácidos se protegió con el grupo Fmoc. La cadena lateral de péptidos se protegió como sigue: Trt para His, Pbf para Arg, tBu para Ser, Thr, Asp, Glu, Boc para Lys, como considerando el análogo cíclico ciclo(91-99)[Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (por N $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de Lys y extremo C) Se usó el grupo protegido de Mtt, debido a que puede eliminarse fácilmente usando la mezcla HFIP (1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol)/DCM (2/8), que escinde péptidos de la resina. De otro modo, la cadena lateral de Lys de ciclo(87-99)[Arg<sup>91</sup>, Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> se protegió con el grupo Boc. Los péptidos lineales protegidos finales sobre la resina se secaron a vacío y luego se trataron con la mezcla de fraccionamiento DCM/HFIP (8/2) durante 7 h a temperatura ambiente para liberar el péptido de la resina y desproteger Lys de Mtt de ciclo(91-99)[Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub>. Cada uno del 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 por CCF y HPLC de fase inversa analítica (RP-HPLC). El disolvente se eliminó a presión reducida proporcionando un residuo aceitoso amarillo claro.

El péptido protegido cíclico (pureza  $\geq 90\%$ ) se precipitó en  $H_2O$  y se secó a vacío durante 16 h. El péptido protegido cíclico se trató con 65 % de TFA en DCM y 3 % de etanodiol como secuestrante durante 4 horas a temperatura ambiente. La solución resultante se concentró a un pequeño volumen y el péptido libre final se precipitó como un sólido amorfo amarillo claro añadiendo éter dietílico (pureza  $\geq 80\%$ ). Se evaluó la pureza de péptidos por repeticiones de HPLC analítica, cromatografía en capa fina (CCF) y espectrometría de masas (ESIMS) (Fig. 1).

#### Conjugación de manano reducido con análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> mediante un conector de KLH

Se conjugaron análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> (Tabla 1) con hemocianina de lapa californiana (KLH) mediante glutaraldehído (Figura 2); KLH actúa de conector entre el manano y el péptido. Se disolvieron 14 mg manano (de *Saccharomyces cerevisiae*, SIGMA, St Louis, EE.UU.) en 1 ml de tampón fosfato de sodio a pH 6,0, seguido de la adición de 100  $\mu$ l de peryoato de sodio 0,1 M (disuelto en tampón fosfato a pH 6,0) y se incubaron sobre hielo durante 1 hora en la oscuridad. Se añadieron 10  $\mu$ l de etanodiol a la mezcla y se incubaron durante otros 30 min sobre hielo. La mezcla resultante (manano oxidado) se pasó a través de una columna de PD-10 (columna Sephadex G-25 M, Amersham Biosciences, Suecia) pre-equilibrada en tampón fosfato a pH 9,0, para excluir el peryoato de sodio y etanodiol. Se eluyó manano oxidado (7,0 mg/ml) con 2,0 ml de tampón fosfato a pH 9,0, al que se añadieron 1,0 mg de análogos de péptido lineal o cíclico MBP<sub>83-99</sub>-KLH (Tabla 1) y se dejó que reaccionaran durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. La conjugación se produce mediante la formación de bases de Schiff entre grupos amino libres de KLH y manano oxidado (Figura 2). Se prepararon complejos de manano reducido-KLH-MBP<sub>83-99</sub> añadiendo 1,0 mg de borohidruro de sodio a cada mezcla durante 6-8 horas a TA en la oscuridad y se usaron sin más purificación como se describe previamente. Se tomaron muestras en alícuotas y se guardaron a -20 °C hasta que se usaron. Se caracterizaron previamente análogos de péptido MBP por electroforesis capilar para conjugación con manano y por gel de SDS-PAGE, tinción con Coomassie, reactivo de Silver o de Schiff (datos no mostrados). Los péptidos se conjugaron al 100 % con manano reducido.

#### Ratones y inmunizaciones

Los ratones SJL/J hembra de 6-8 semanas de edad usados en todos los experimentos se compraron de Walter and Eliza Hall Institute (VIC Australia) y se alojaron en el Laboratorio de Investigación Biológica del Instituto Burnet en Austin, Heidelberg, Australia. Se inmunizaron ratones SJL/J dos veces en los días 0, 14 por vía intradérmica (base de la cola) con 50  $\mu$ g de análogo de péptido MBP<sub>83-99</sub>-KLH-manano reducido.

#### Ensayos inmunológicos

ELISpot analiza respuestas de linfocitos T específicas a antígenos detectando la secreción de citocinas específicas. Se aislaron células del bazo de ratones SJL/J inmunizados 14 días después de la inmunización y se evaluaron por ELISpot para la secreción de IFN- $\gamma$ , IL-4 o IL-10 por linfocitos T. Se realizó ensayo de IFN- $\gamma$  ELISpot en placa filtrante MultiScreen-IP (MAIP S4510) con filtros de PVDF hidrófobos (Millipore, RU) mientras que se realizó ELISpot de IL-4 e IL-10 en placa filtrante de MultiScreen-HA (MAHA S4510) con filtros de ésteres de celulosa mixtos (Millipore, RU). Se humedecieron previamente placas MAIP S4510 con 50  $\mu$ l de etanol al 70 %, se lavaron 5 veces con 200  $\mu$ l de PBS estéril y se recubrieron con 70  $\mu$ l de 5  $\mu$ g/ml de anticuerpo de captura anti-IFN- $\gamma$ , AN18 (Mabtech, Australia) en PBS y se dejaron incubar a 4 °C durante la noche. Mientras se añadieron directamente 70  $\mu$ l de 5  $\mu$ g/ml de anticuerpo de captura anti-IL-4 y anti-IL-10 (Mabtech, Australia) a placas MAHA S4510 y se incubaron a 4 °C durante la noche sin tratamiento con etanol al 70 %. Tras 5 lavados con PBS, las placas se bloquearon añadiendo 200  $\mu$ l de medio de cultivo (complementado con 2,5 % de FCS) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Se desechó el medio de bloqueo y se añadieron 10  $\mu$ g/ml de péptidos de memoria (análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> no conjugados con KLH-manano reducido) en cada pocillo definido. Se usaron ConA (1,0  $\mu$ g/ml; IL-4 e IFN- $\gamma$ ) o LPS (1,0  $\mu$ g/ml; IL-10) como controles internos positivos y no se usó péptido como control negativo. Se establecieron pocillos triplicados para cada condición. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células del bazo en 100  $\mu$ l de medio de cultivo en cada pocillo y se incubaron durante 18 horas para IFN- $\gamma$ , 24 horas para IL-4 y 48 horas para IL-10 a 37 °C. Las placas se lavaron 5 veces con PBS/0,05 % de Tween 20 y 5 veces con PBS y se incubaron durante 2 horas a TA con anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ , IL-4 o IL-10 murino-biotina. Las placas se lavaron y se añadió estreptavidina-ALP a 1,0  $\mu$ g/ml y se incubaron durante 2,0 horas a TA. Se detectaron puntos de actividad usando un kit colorimétrico AP (Biorad, Hercules, C, EE.UU.) y se contaron usando un lector de placas AID ELISpot (Autoimmun Diagnostika GmbH, Alemania). Los datos se presentan como unidades formadoras de puntos (sfu) medias por  $0,5 \times 10^6$  células +/- error estándar de la media (EEM).

#### Proliferación

Se aislaron células del bazo de ratones SJL/J inmunizados 14 días después de la inmunización y se evaluaron por ensayo de proliferación de linfocitos T. Se sembraron  $1 \times 10^5$  células del bazo en 100  $\mu$ l de medio de cultivo en placas de fondo en U de 96 y se incubaron durante 1-6 días a 37 °C en presencia de péptido de recuerdo (10  $\mu$ g/ml), ConA (control positivo) o sin péptido (control negativo). La proliferación se evaluó añadiendo 1  $\mu$ Ci de [ $^3$ H]-timidina por pocillo a una placa por momento de tiempo (días 1-6). Las células se incubaron durante otras 6 h antes de la recogida sobre filtros de fibra de vidrio. Se midió captación de [ $^3$ H] usando un contador de centelleo  $\beta$  (Top Count Gamma Counter, Packard, EE.UU.).

ELISA

Se recogió sangre y los sueros se aislaron de ratones antes y 2 semanas después de la inmunización. Se recubrieron péptidos MBP<sub>83-99</sub> conjugados con BSA sobre placas de microtitulación de poli(cloruro de vinilo) (PVC) a 10 µg/ml o con 2,5 µg/ml de proteína bovina MBP nativa en tampón NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M, pH 9,6, durante la noche a 4 °C y se bloqueó la unión no específica con 2 % de BSA durante 1,0 hora a temperatura ambiente. Después de lavar (0,05 % de Tween 20/PBS), se añadieron diluciones sucesivas de sueros y se incubaron durante otras 2,0 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y el anticuerpo unido se detectó usando anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con HRP (1:1000 en PBS) (Amersham, RU) y se relevaron usando sulfonato de 2,2"-azino-di(3-etilbenzotiazolina) (ABTS) (Sigma, RU). Se registró la absorción a 405 nm usando un lector de microplacas de ELISA.

Inducción-inhibición y evaluación de MBP-EAE en ratas Lewis

Se usaron ratas Lewis criadas y mantenidas en el animalario del Instituto Pasteur Helénico en todos los experimentos. Se inmunizaron ratas hembra (220 g) con MBP<sub>72-85</sub> lineal (30 µg) (n=10, como control positivo), o MBP<sub>72-85</sub> (30 µg) más el análogo cíclico c-Ala<sup>81</sup>MBP<sub>72-85</sub>(500 µg) o [Arg<sup>91</sup>,Ala<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (n=5) en 200 µl de una emulsión que contiene volúmenes iguales de péptido diluido en solución salina estéril y adyuvante completo de Freund (Difco, EE.UU.) que contiene 4 mg/ml de *M. tuberculosis* muerta con calor (H37Ra) (Difco). La inmunización se realizó por vía subcutánea en las dos almohadillas plantares traseras y se repitió 7 días después con la misma dosificación. Las ratas se examinaron diariamente para signos clínicos de EAE y se puntuaron como sigue: 0, sin enfermedad clínica; 0,5, pérdida de peso; 1, debilidad de la cola; 2, paraparesia de las extremidades traseras; 3, paraplejia de las extremidades traseras; 4, paraplejia con debilidad de las extremidades delanteras, moribundas; 5, muerte. Animales inyectados con PBS/CFA sirvieron de controles negativos. Para los análisis histológicos, los ratones se anestesiaron con éter, se extrajo sangre y se perfundieron con PBS (pH 7,4) (PBS) seguido de 4 % de paraformaldehído en PBS. Se diseccionó la médula espinal y se fijó durante la noche en 4 % de paraformaldehído en PBS a 4 °C antes de incorporarse en parafina. Se tiñeron secciones de parafina con Luxol fast blue y Nuclear Fast Red para la visualización de la desmielinización e inflamación, respectivamente.

Inducción-inhibición y evaluación de MOG-EAE en ratones C57/bla. Manipulación de animales

Se compraron ratones libres de patógenos C57BL/6 hembra del Instituto Pasteur Helénico, Atenas, y se alojaron en el animalario del Departamento B' Neurológico del Hospital Universitario de AHEPA, Escuela Médica de la Universidad de Aristóteles, Tesalónica, Grecia. Todos los procedimientos experimentales fueron según las pautas del Instituto Nacional de la Salud. Los ratones se alimentaron con una dieta regular y se les dio agua sin antibióticos.

b. Inducción de EAE y evaluación de enfermedad clínica.Inducción de EAE crónica por MOG<sub>35-55</sub>

Se dividieron ratones hembra C57BL/6, 10 semanas de edad, en 2 grupos diferentes dependiendo de los péptidos usados para preparar la emulsión de inyección: el grupo A (o grupo de control, n=9) se inmunizó usando el péptido 35-55 de la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina lineal (MOG<sub>35-55</sub>) (Sigma) y el grupo B (n=8) se inmunizó usando una mezcla 1:1 de MOG<sub>35-55</sub> lineal y el análogo de péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub>. Ambos grupos se inmunizaron con inyecciones subcutáneas en la región para-lumbar izquierda de emulsiones compuestas de tanto 300 µg de MOG<sub>35-55</sub> lineal (grupo A) como 300 µg de MOG<sub>35-55</sub> lineal más 300 µg de ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> (grupo B) emulsionado en 200 µl de una solución que contiene 100 µl de adyuvante completo de Freund (CFA) que contiene 4 mg/ml de H37RA de *Mycobacterium tuberculosis* y 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) filtrada (día 0). Adicionalmente, en el día 0, ambos grupos de ratones también se administraron i.p. con 400 ng de toxina de Pertussis (Sigma) diluida en 0,5 ml de PBS filtrado y 48 horas después, en el día 2, otros 200 ng de toxina de Pertussis diluida otra vez en 0,5 ml de PBS. También se administró una inyección adicional de los péptidos emulsionados, como se describe previamente, 7 días después en la región para-lumbar derecha.

Evaluación clínica

Todos los animales se examinaron diariamente y se evaluaron para signos clínicos de enfermedad. Los primeros signos clínicos aparecen en el día 12-16 después de la inmunización, dependiendo del desarrollo y la gravedad de la enfermedad de EAE. El estado clínico de los ratones se clasificó del siguiente modo: 0: sin enfermedad clínica; 1: cola agitada; 2: parálisis de la cola; 3: debilidad de las extremidades traseras suficiente para alterar el enderezamiento; 4: paraplejia; 5: paraplejia con paresia o plejia de las extremidades delanteras; 6: muerte de EAE.

Se realizaron dos conjuntos experimentales usando exactamente los mismos procedimientos experimentales: el primer experimento evaluó la fase aguda de la enfermedad y los animales se sacrificaron en el día 17 después de la

inducción de enfermedad y el segundo experimento evaluó la evolución clínica crónica de la enfermedad y así los animales se sacrificaron en el día 46 después de la inducción de la enfermedad.

#### Recogida de tejido - Histopatología

En el día 17 (fase aguda de EAE) y día 46 después de la inducción de EAE (fase crónica de EAE), los animales se sometieron a perfusión transcardíaca con 4 % de paraformaldehído en PBS. Se extrajeron los cerebros y médulas espinales, posteriormente se fijaron en el mismo fijador durante aproximadamente 20 horas, se procesaron rutinariamente para la incorporación de parafina y se seccionaron a 6  $\mu$ m. Entonces se tiñeron secciones de animales de fases agudas y crónicas de la enfermedad usando los siguientes métodos: a) un método de tinción de la impregnación de plata de Bielschowsky modificado combinado con hematoxilina, para la evaluación simultánea de lesión axónica, pérdida axónica y procesos inflamatorios en EAE como se ha descrito previamente en detalle [Lourbopoulos *et al.*, 2007]; b) la tinción con Luxol fast blue se contratiñó con Nuclear fast Red para la detección de áreas desmielinizantes dentro del SNC de animales, usando protocolos histopatológicos rutinarios.

Se realizó evaluación patológica bajo un microscopio óptico (Olympus Axioplan-2) por dos investigadores cegados y se tomaron fotos usando una cámara CCD (Nikon). Se evaluaron cinco secciones longitudinales aleatoriamente seleccionadas por tejido (cerebros y médulas espinales) del siguiente modo: para cada animal, cada sección se evaluó bajo campos ópticos 20x o 40x (dependiendo del objeto del estudio) de manera que cubriera el área entera de la sección. El estudio inicial de patología reveló que las médulas espinales tenían la mayoría de las lesiones (en comparación con los cerebros) y así el estudio detallado adicional se centró en las secciones de médula espinal de los animales.

Dependiendo del objeto de interés se usaron las siguientes escalas para realizar la evaluación: (a) Para lesión axónica (AI), se usó la siguiente escala: 0 = son AI, 1+ = axones lesionados distróficos dispersados sin ningún esferoide u ovoide, 2+ = AI leve con presencia de al menos un esferoide u ovoide, 3+ = AI moderada, 4+ = AI grave; generalmente se definieron axones lesionados y se identificaron con esferoides y ovoides (que representan axonotmesis) y axones dilatados (distróficos) que representan axones lesionados que todavía no están cortados. (b) Para pérdida axónica (AL): 0 = densidad axónica normal, 1+ = <25 de % AL, 2+ = AL leve (26-50 %), 3+ = AL de moderada a grave (51-75 %), 4+ = AL grave (>75 %); se atribuyeron diversos grados de densidad reducida de axones a pérdida axónica y se evaluaron por consiguiente. (c) Para infiltraciones: número de células infiltrantes por campo óptico y número de células infiltrantes por infiltración. (d) Se evaluó la desmielinización bajo campos ópticos 40x; usando una rejilla prefrontal, los presentes inventores midieron el área de desmielinización y el área total de la materia blanca en cada campo óptico y entonces se restó el % de desmielinización presente en cada campo óptico.

#### Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los datos usando el software SPSS 11.5. Para modificar la escala de datos clínicos, histopatológicos y de proliferación *in vitro* los presentes inventores probaron inicialmente su normalidad usando pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov con el fin de evaluar su validez para la aplicación de la prueba de la t de Student. Dondequiera que se encontraran datos que violaban la suposición de normalidad y no pudiera aplicarse una transformación logarítmica, los presentes inventores usaron la prueba de la U de Mann-Whitney equivalente no paramétrica para la comparación de los dos grupos (tratado y control en cada EAE). Los valores dentro del texto se expresan como media  $\pm$  DE. Para datos nominales u ordinales se usó una prueba de la chi al cuadrado de Pearson o exacta de Fisher para la comparación de los dos grupos, dependiendo de las propiedades de las tablas. Se realizó análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en la evolución clínica de EAE con "aparición de enfermedad" como el criterio de valoración del análisis; la aparición de enfermedad se definió como el primer día con puntuación clínica de "1". Se calculó la puntuación máxima media (MMS) para cada grupo usando las puntuaciones máximas de cada animal de cada grupo. Se calculó el área bajo la curva (ABC) para cada animal usando la fórmula:

$$ABC = \left( \frac{\text{puntuación}_1}{2} \right) + \left( \sum_{i=2}^{k-1} \text{puntuación}_i \right) + \left( \frac{\text{puntuación}_k}{2} \right)$$

[Fleming, *et al.*, 2005]

#### Resultados

##### Respuestas de linfocitos T a péptidos MBP<sub>83-99</sub> lineales y cíclicos conjugados con manano reducido

Se midió la capacidad de péptidos MBP<sub>83-99</sub>, [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [R<sup>91</sup>,A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineales, ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> conjugados con manano reducido, para inducir respuestas de linfocitos T después de 2 inyecciones usando secreción de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 por análisis de ELISpot. Ratones inmunizados con lineal y ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineal generaron linfocitos T que secretan IFN- $\gamma$  débiles; todos los otros péptidos fueron negativos (Figura 3). Sin embargo, se indujeron altos niveles

de IL-4 a todos los análogos lineales, [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y [R<sup>91</sup>,A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (Figura 4). De forma interesante, péptidos MBP<sub>83-99</sub> nativos lineales y cíclicos no estimularon linfocitos T que secretan IL-4; ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> también fue negativo (Figura 4, Tabla 2). Los presentes inventores seleccionaron análogos de [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> para inmunizar ratones y medir la secreción de IL-10, y ambos análogos de péptido indujeron niveles moderados de producción de IL-10 por linfocitos T (Figura 5a, Tabla 2). No se usó péptido como control negativo (Figuras 3-5) y ConA se usó como control interno positivo que indujo coherentemente >1.000 sfu/0,5x10<sup>6</sup> células para tanto IFN-γ como IL-4 y LPS se usó para IL-10 (no mostrado). Además, la inmunización de ratones con manano reducido-KLH-[F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> indujo altos niveles de linfocitos T proliferativos en un ensayo de proliferación de linfocitos T, mientras que la inmunización con manano reducido-KLH-[Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> indujo niveles muy bajos de proliferación de linfocitos T (Figura 5b-d, Tabla 2).

#### Respuestas de anticuerpos a péptidos MBP<sub>83-99</sub> lineales y cíclicos conjugados con manano reducido

Se midió la producción de respuestas de anticuerpos IgG totales en ratones inmunizados con péptidos NOP<sub>83-99</sub>, [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [R<sup>91</sup>,A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineales y ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub>[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> conjugados con manano reducido usando ELISA. Se generaron niveles de anticuerpo IgG altos en ratones inmunizados con tanto péptidos lineales como ciclo(83-99)NMP<sub>83-99</sub> (título >1/25.600) (Figura 6a, Tabla 2). Además, se indujeron altos niveles de anticuerpo para los péptidos [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [R<sup>91</sup>,A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (título >1/25.600), niveles de anticuerpos medios a [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (título 1/6.400) y niveles de anticuerpo bajos en ratones inmunizados con ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (título 1/800) (Figura 6b, Tabla 2). La subclase de los anticuerpos inducida fueron IgG1 y no IgM o IgG2a (Figura 6c).

Como se generaron altos niveles de anticuerpos para péptidos MBP<sub>83-99</sub> y sus análogos mutantes, los presentes inventores determinaron si los sueros de estos ratones reaccionaron o no de forma cruzada con la proteína MBP nativa. Ratones inmunizados con péptidos lineales o ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y [A<sup>91</sup>, R<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> reaccionaron altamente de forma cruzada con proteína MBP nativa, ratones inmunizados con lineal o ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> reaccionaron moderadamente, mientras que ratones inmunizados con [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> o [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> no reaccionaron con proteína MBP nativa a dilución de sueros 1/200 y 1/1.600 (Figura 6d, Tabla 2).

#### Análogos de mutante único y doble de MBP83-99 cíclico son capaces de inhibir las respuestas de IFN-γ inducidas por el péptido MBP83-99 nativo

Los ensayos de ELISpot son un ensayo *ex vivo* de 18 h que mide la secreción de IFN-γ por linfocitos T. No requiere expansión de cultivos celulares, ya que detecta células efectoras específicamente activadas (tanto efectores terminales que producen citocinas CD4 como CD8). La sensibilidad del ensayo es superior al análisis de dilución limitante, análisis de FACscan o métodos de ELISA y puede detectar de forma fiable frecuencias precursoras de efectores específicos de antígeno de 1 entre cada 0,5 millones de células. Es, por tanto, un método apropiado para detectar células específicas de antígeno. Aquí, los presentes inventores midieron la producción de IFN-γ generada por el péptido MBP<sub>83-99</sub> nativo y evaluaron el % de inhibición (antagonizar) de IFN-γ producido en presencia de análogos de péptido mutante.

Se probaron análogos de mutante único y doble de MBP<sub>83-99</sub> de cabeza a cola cíclicos para su capacidad para inhibir respuestas de IFN-γ inducidas por el péptido MBP<sub>83-99</sub> agonista nativo. Los ratones se inmunizaron con el péptido MBP<sub>83-99</sub> agonista nativo emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA). Se aislaron células del bazo 25 días después, y se evaluó la capacidad de péptidos cíclicos para inhibir (antagonizar) la producción de IFN-γ en ensayos de ELISpot de antagonismo *in vitro* (Figura 8). Los resultados se muestran como el % de inhibición de IFN-γ de cada análogo de péptido mutante cíclico, en comparación con el péptido MBP<sub>83-99</sub> nativo solo. Todos los análogos de péptido cíclico inhibieron la producción de IFN-γ entre el 30 % y el 90 %. Se encontró que los análogos de mutante único ciclo(83-99)-[F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y ciclo(83-99)[Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y el análogo de mutante doble ciclo(83-99)[Y<sup>91</sup>,A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> inhibían IFN-γ entre el 60 % y el 80 %. Sin embargo, el análogo de mutante único ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> fue el más eficiente en inhibir la producción de IFN-γ inducida por el péptido MBP<sub>83-99</sub> nativo, hasta el 92 %. Basándose en la capacidad del péptido ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> para inhibir (antagonizar) la producción de IFN-γ por linfocitos T, los presentes inventores eligen examinar su eficacia *in vivo* en ratones SJL/J después de la emulsión en CFA o conjugación con manano reducido.

#### Ciclo(83-99)NOP83-99 y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]NMP83-99 en comparación con sus homólogos lineales potencian la producción de IL-4 cuando se emulsionan en CFA

Se determinó la capacidad de los análogos ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> antagonistas y ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> agonistas nativos para inducir respuestas de linfocitos T después de una inyección, en comparación con [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineal y NMP<sub>83-99</sub> lineal en ratones SJL/J. Se aislaron células del bazo 28 días después de la inyección, y se realizó ensayo ELISpot para medir la secreción de IFN-γ e IL-4 (Figura 9A y Figura 9B). Péptidos agonistas nativos MBP<sub>83-99</sub> lineales y cíclicos indujeron respuestas de IFN-γ que fueron más bajas en los análogos mutantes de [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> antagonistas lineales y cíclicos (Figura 9A). Sin embargo, no se observaron diferencias en la producción de IFN-γ entre análogos lineales y cíclicos (Figura 9A). De forma interesante, MBP<sub>83-99</sub> lineal no indujo IL-4; sin embargo, ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> indujo IL-4 (Figura 9B). Asimismo, [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineal no fue capaz de generar IL-4; sin

embargo, ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> generó IL-4 (Figura 9B). Es evidente que la ciclación de péptidos MBP<sub>83-99</sub> agonistas y [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> antagonistas nativos potencia la producción de IL-4 *in vivo*. No se usó péptido (células solas) como control negativo, y se usó ConA como control interno positivo que indujo coherentemente > 1000 SFU/0,5 millones de células (no mostrado).

5 Ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> en comparación con sus homólogos lineales potencian la producción de anticuerpos cuando se emulsionan en CFA

10 Se midió la producción de respuestas de anticuerpos IgG específicas en ratones inmunizados con péptidos MBP<sub>83-99</sub> lineal, [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineal, ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> emulsionados en CFA usando ELISA. El péptido MBP<sub>83-99</sub> lineal no generó anticuerpos IgG en ratones SJL/J; sin embargo, se generaron anticuerpos para ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> (Figura 9C). El análogo lineal mutado fue capaz de inducir respuestas de anticuerpos IgG que se potenciaron por su homólogo cíclico ciclo(83-99)-[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (Figura 9C). Así, la ciclación de MBP<sub>83-99</sub> agonista y [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> antagonista potenció la producción de anticuerpos en ratones SJL/J.

15 La ciclación no afecta la proliferación de linfocitos T para péptido MBP<sub>83-99</sub> nativo

20 Se usaron ensayos de proliferación para detectar el nivel de linfocitos T específicos de antígeno midiendo la captación de [3H]timidina de linfocitos T que proliferan en presencia de los péptidos en los días 1 - 6. Se aislaron células del bazo de ratones inmunizados con el péptido MBP<sub>83-99</sub> agonista lineal 28 días después de la inmunización y se evaluaron por ensayo de proliferación de linfocitos T. Los linfocitos T proliferaron a péptido MBP<sub>83-99</sub>, alcanzando un pico en el día 5 de hasta 25.000 cpm (Figura 9D). Además, los linfocitos T específicos de MBP<sub>83-99</sub> reaccionaron de forma cruzada con análogos de péptido [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineal y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> mutante (Figura 9D). El péptido ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> proliferó similarmente al péptido [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineal, alcanzando un pico en el día 5 (Figura 9D). ConA (control interno) dio proliferación superior a 75.000 cpm, que alcanzó el máximo en el día 2 y se excluyó de las figuras, y se usó sin péptido (células solas) como control negativo de ruido de fondo. De forma interesante, aunque la ciclación potenció las respuestas de IL-4 y la producción de anticuerpos, no afectó la proliferación de la proliferación de linfocitos T específica de MBP<sub>83-99</sub>.

30 Manano reducido conjugado con análogos [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineal y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> potencia la producción de IL-4

35 Se midió la capacidad de MBP<sub>83-99</sub> agonista lineal y cíclico, y los péptidos [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> antagonistas lineales y cíclicos conjugados con manano reducido, para inducir respuestas de linfocitos T después de dos inyecciones usando secreción de citocinas IFN- $\gamma$  y IL-4 por análisis de ELISpot. Ratones inmunizados con péptidos MBP<sub>83-99</sub> agonistas lineales y cíclicos generaron linfocitos T que secretan IFN- $\gamma$ ; sin embargo, tanto los péptidos [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> antagonistas lineales como cíclicos fueron negativos (Figura 10A). MBP<sub>83-99</sub> lineal y ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> generaron secreción de la citocina IL-4 débil o ninguna por linfocitos T (Figura 10B). Sin embargo, se indujeron respuestas de IL-4 muy fuertes al péptido [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineal (hasta 600 SFU/0,5 millones de células) y niveles moderados por ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (hasta 70 SFU/0,5 millones de células) (Figura 10B y Figura 10C). Así, la mutación [A<sup>91</sup>] al péptido MBP<sub>83-99</sub> agonista desvía respuestas inmunitarias de Th1 (IFN- $\gamma$ ) a Th2 (IL-4) cuando se conjuga con manano reducido. Se usó sin péptido (células solas) como control negativo, y se usó ConA como control interno positivo que indujo coherentemente > 1000 SFU/0,5 millones de células (no mostrado).

45 La ciclación no afecta las respuestas de anticuerpos cuando análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> cíclicos se conjugan con manano reducido

50 Se midió la producción de respuestas de anticuerpos IgG totales en ratones inmunizados con los análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> agonista lineal, [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> antagonista lineal, ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, conjugados con manano reducido, usando ELISA. Se generaron altos niveles de anticuerpo IgG en ratones inmunizados con análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> lineal y ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> (título hasta al menos 1/25600) (Figura 10D). Se indujeron niveles de anticuerpo más bajos por [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (títulos fuera de 1/640) y anticuerpos muy débiles para el análogo de péptido ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> (títulos fuera de 1/1600) (Figura 10D).

55 Evolución clínica de MOG-EAE en C57BL/6

60 Para probar el efecto de una administración preventiva de ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> en la inducción de EAE se diseñaron 2 conjuntos experimentales, cada uno con 2 grupos experimentales como se describe previamente en materiales y métodos: el primer experimento se diseñó para estudiar el efecto de ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> en los procedimientos patológicos en la fase aguda de EAE y el segundo para estudiar el efecto del péptido hasta la fase crónica de EAE.

65 Para el estudio de la fase aguda, se indujo EAE como se ha descrito previamente. Los animales desarrollaron una enfermedad grave y agresiva con y con aparición de enfermedad rápida y excesiva. La enfermedad de EAE desarrollada era una altamente homogénea, ya que la variabilidad en puntuaciones clínicas era muy baja. Todos los animales se sacrificaron en el día 17, es decir, 5 días después de su primer signo clínico de EAE (fase aguda). La puntuación clínica media fue estadísticamente significativamente diferente en los días 15, 16 y 17 (prueba de la t de

Student,  $p < 0,05$ ). Ningún animal murió de EAE, en ningún grupo, hasta el día del sacrificio. No se calcularon puntuaciones clínicas máximas medias (MMS) para este experimento, ya que no se dejó que los animales vivieran los suficientemente como para alcanzar sus puntuaciones máximas. Por otra parte, se han calculado áreas bajo la curva medias (ABCm) para cada grupo y son significativamente diferentes entre los 2 grupos: pareció que el grupo B tenía un ABCm más baja (ABCm del grupo B =  $13,32 \pm 2,55$  en comparación con el ABCm del grupo de control =  $18,042 \pm 3,34$ ; prueba de la U de Mann-Whitney  $p = 0,014$ ). La media de día de aparición de la enfermedad (primer signo clínico definitivo o puntuación "1") no fue diferente entre los 2 grupos (media de día de aparición para control =  $11,67 \pm 1,21$  y grupo B =  $12,00 \pm 0,81$ ; análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, orden logarítmico  $p = 0,7309$ ). Así, datos clínicos de la fase aguda indican que la co-administración preventiva de MBP<sub>83-99</sub> confirió un beneficio clínico leve en una forma grave y agresiva de MOG-EAE.

Para el estudio la fase crónica de EAE, se dejó que los animales sobrevivieran hasta el día 46 después de la inducción de EAE (fase crónica). Este segundo experimento de EAE fue ligeramente diferente del primero, ya que la EAE desarrollada era una moderada, con pendiente menos inclinada de la aparición. Además, este EAE tuvo una variación más alta referente a las puntuaciones clínicas de cada animal en cualquier grupo. Los animales que recibieron el péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> tuvieron una puntuación clínica media más baja en todo el periodo de observación, pero ésta dejó de alcanzar significación estadística (prueba de la t de Student,  $p > 0,05$ ). Ningún animal murió de EAE en ningún grupo. Las puntuaciones clínicas máximas medias (MMS) no fueron estadísticamente diferentes entre los 2 grupos a pesar de una MMS más baja del grupo B (grupo de control EM =  $3,125 \pm 1,45$  y grupo B EM =  $2,375 \pm 1,45$ ; prueba de la t de Student  $p = 0,32$ ); áreas bajo la curva medias (ABCm) para cada grupo tampoco fueron significativamente diferentes, aunque el grupo B tuvo un ABC más baja (ABCm del grupo B =  $51,08 \pm 36,58$  en comparación con el ABCm del grupo de control =  $66,54 \pm 39,38$ ; prueba de la t de Student  $p = 0,429$ ). La media del día de aparición de enfermedad (primer signo clínico definitivo o puntuación "1") no fue significativamente diferente entre los 2 grupos (media del día de aparición de enfermedad para el control =  $18,5 \pm 11,23$  y grupo B =  $17,00 \pm 11,74$ ; análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, orden logarítmico  $p = 0,1925$ ).

### Evaluación histopatológica

#### Proceso inflamatorio

El estudio de procesos inflamatorios en la fase aguda de EAE no mostró diferencias cuantitativas de procesos inflamatorios entre el grupo de control y el grupo B cuando se evaluaron los siguientes parámetros: el número de células infiltrantes por campo óptico (grupo de control:  $309,4 \pm 219,9$ , grupo B:  $290,8 \pm 277,7$ . Prueba de la t de Student,  $p = 0,593$ ) y células inflamatorias por infiltración (grupo de control:  $55,75 \pm 37,4$ , grupo B:  $53,72 \pm 62,0$ . Prueba de la t de Student,  $p = 0,780$ ).

Sin embargo, en el experimento de fase crónica, el proceso inflamatorio en las médulas espinales de cada grupo fue diferentes: ambos grupos redujeron aquí la carga inflamatoria dentro de sus tejidos, pero la inflamación residual fue más significativa en el grupo de control ya que ésta se representó por las células infiltrantes por campo óptico (grupo de control:  $33,18 \pm 67,03$ , grupo B:  $10,71 \pm 39,0$ . Prueba de la t de Student,  $p = 0,001$ ) y los números de células inflamatorias por infiltración (grupo de control:  $15,76 \pm 28,5$ , grupo B:  $6,0 \pm 15,8$ . Prueba de la t de Student,  $p = 0,000$ ).

Estos datos indican que la co-administración de ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> en la aparición de la enfermedad produce una carga inflamatoria cuantitativamente similar dentro de las médulas espinales de los animales, que no sigue durante la fase crónica, ya que los presentes inventores observaron significativamente menos células inflamatorias dentro del parénquima de la médula espinal de los animales tratados con ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub>.

#### Axonopatía

El estudio de patología axónica reveló un efecto beneficioso leve, pero estadísticamente significativo, del tratamiento con ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> sobre la lesión axónica y un efecto leve sobre la pérdida axónica en la fase aguda de enfermedad (pruebas de la chi al cuadrado de Pearson para lesión axónica y pérdida axónica, respectivamente:  $p = 0,006$  y  $p = 0,000$ , se refieren a las siguientes tablas).

Fase aguda: tabla de lesión axónica

			lesión axónica por campo 20x				
			0	1+	2+	3+	4+
GRUPO	control	% dentro de GRUPO	4,3 %	42,4 %	17,4 %	20,7 %	15,2 %
	+c.MBP <sub>83-99</sub>	% dentro de GRUPO	14,3 %	45,1 %	22,3 %	11,3 %	6,0 %

Fase aguda: tabla de pérdida axónica

			pérdida axónica por campo 20x				
			0	1+	2+	3+	4+
GRUPO	control	% dentro de GRUPO	4,3 %	22,8 %	29,3 %	30,4 %	13,0 %
	+c.MBP <sub>83-99</sub>	% dentro de GRUPO	16,5 %	36,1 %	31,6 %	12,0 %	3,8 %

Sin embargo, durante la fase crónica, la lesión axónica no fue diferente entre los 2 grupos (prueba exacta de Fisher,  $p=0,104$ ), pero se encontró pérdida axónica que era menos en el grupo B en comparación con el control (prueba exacta de Fisher,  $p=0,000$ ).

5

Fase crónica: tabla de lesión axónica

			lesión axónica por campo 20x				
			0	1+	2+	3+	4+
GRUPO	control	% dentro de GRUPO	48,7 %	24,7 %	22,7 %	4,0 %	0 %
	+c.MBP <sub>83-99</sub>	% dentro de GRUPO	49,3 %	29,0 %	13,0 %	8,0 %	0,7 %

Fase crónica: tabla de pérdida axónica

			pérdida axónica por campo 20x				
			0	1+	2+	3+	4+
GRUPO	control	% dentro de GRUPO	24,0 %	24,7 %	31,3 %	16,0 %	4,0 %
	+c.MBP <sub>83-99</sub>	% dentro de GRUPO	51,4 %	26,8 %	10,9 %	10,1 %	0,7 %

10 Estos datos indican que la co-administración de ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> en la aparición de la enfermedad se desvía ligeramente del proceso axonopático dentro de las médulas espinales de los animales, produciendo una reducción leve, pero estadísticamente significativa, de la lesión axónica durante la fase aguda. Esta reducida lesión axónica va seguida de menos pérdida axónica dentro de los haces blancos de la médula espinal durante la fase aguda de EAE y está contribuyendo además a menos pérdida axónica durante la fase crónica de la enfermedad.

15 Desmielinización

El estudio del proceso de desmielinización reveló un efecto protector significativo del tratamiento con ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> sobre la integridad de la mielina. La desmielinización fue mínima en el grupo B durante la fase aguda y crónica de EAE en comparación con el grupo de control, que presentó un alto porcentaje de desmielinización de la materia blanca de médulas espinales (Fase aguda: grupo de control= $20,73 \pm 16,53$  y grupo B= $9,58 \pm 10,5$ , prueba de la t de Student,  $p=0,000$ ; Fase crónica: grupo de control= $14,92 \pm 15,31$  y grupo B= $7,65 \pm 11,4$  prueba de la t de Student,  $p=0,000$ ).

25 Discusión

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante e inflamatoria del sistema nervioso central con patología autoinmunitaria. Hay evidencia cada vez mayor de que las respuestas de linfocitos T a antígenos de mielina candidatos, tales como proteína básica de mielina (MBP), pueden desempeñar una función importante en la patogénesis de la enfermedad. Se ha demostrado que las respuestas de linfocitos T a MBP están asociadas a reconocimiento preferencial de la región inmunodominante 83-99 de MBP<sub>83-99</sub> (ENPVVHFFKNIVTPRTP).

Los análogos de péptido de la invención se basan en el péptido encefalitogénico MBP<sub>83-99</sub>, (ENPVVHFFK<sup>91</sup>NIVTP<sup>96</sup>RTP) con los principales residuos de contacto de TCR en las posiciones 91 y/o 96 sustituidos para dar [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [R<sup>91</sup>,A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub>. También se sintetizaron derivados de ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y ciclo[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>. Se conjugaron péptidos con manano reducido mediante un conector de KLH y se inyectaron en ratones. Se usó manano reducido como vehículo para desviar las respuestas inmunitarias a Th2. El uso de manano reducido para desviar las respuestas inmunitarias hacia Th2 a péptidos MBP constituye una estrategia novedosa para la inmunoterapia de EM. Las respuestas inmunitarias inducidas en ratones se resumen en la Tabla 2.

40

Tabla 2: Resumen de respuestas inmunitarias inducidas en ratones SJL/J a análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> conjugados con manano reducido-KLH

Análogo de péptido	de IFN- $\gamma$	IL-4	IL-10	Proliferación	Anticuerpo	Reacción cruzada con MBP nativo
<u>Lineal</u>						
MBP <sub>83-99</sub>	++	-			+++	+++
[A <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	-	+++			+	+
[E <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	-	+++			+++	+
[F <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	++	+++	++	+++	+/-	
[Y <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	-	+++	++	+/-	+++	
[R <sup>91</sup> , A <sup>96</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	-	+++			+++	+++
<u>Cíclico</u>						
MBP <sub>83-99</sub>	+	-			+++	+++
[A <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	-	-			+/-	+

- negativa; +/- muy débil; + débil; ++ moderada; +++ fuerte

El péptido agonista MBP<sub>83-99</sub> conjugado con manano reducido indujo altos niveles de IFN-γ, bajos niveles de IL-4 y generó anticuerpos que son reactivos de forma cruzada con la proteína MBP nativa. La sustitución de K<sup>91</sup> a A<sup>91</sup>, E<sup>91</sup> o Y<sup>91</sup> desvió las respuestas de IFNγ a altas respuestas de IL-4 en ratones inmunizados. Además, la inmunización con análogo de manano reducido-[Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> indujo niveles moderados de producción de citocinas IL-10 y respuestas proliferativas de linfocitos T muy débiles. La inmunización con análogos de [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> o [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> generó anticuerpos IgG1, y los anticuerpos generados para [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> reaccionaron de forma cruzada débilmente con la proteína MBP nativa. Sin embargo, los anticuerpos producidos para el péptido [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> no reaccionaron de forma cruzada con proteína MBP nativa. El péptido [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> conjugado con manano reducido indujo respuestas de IFN-γ, IL-4 e IL-10, respuestas proliferativas de linfocitos T fuertes y respuestas de anticuerpos débiles. Mutaciones dobles en el análogo de péptido [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> cuando se conjugó con manano reducido fueron capaces de generar altos niveles de IL-4 y no IFN-γ, sin embargo los anticuerpos IgG1 generados fueron reactivos de forma cruzada con la proteína nativa. Ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> no indujeron respuestas deseadas. Es evidente que los péptidos [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> dieron el mejor perfil de citocinas con [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, que es el más prometedor (ya que, además de citocina, no tuvo reactividad con la proteína MBP nativa) como péptido terapéutico contra EM.

Se prefiere manano reducido para generar la respuesta inmunitaria apropiada

Es de interés que cuando todos los análogos de péptido se conjugaron con manano oxidado, no se generaron respuestas de IFN-γ o IL-4. Sin embargo, se indujeron niveles de anticuerpo moderados (no mostrados). Se ha mostrado que el manano oxidado genera preferencialmente respuestas CD8, y así, fue incapaz de inducir respuestas al epítipo de CD4 de MBP<sub>83-99</sub> y sus análogos. Además, la inmunización de ratones SJL/J con MBP<sub>83-99</sub>, [A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [E<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [F<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>, [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineales, ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> y ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> indujo tanto secreción de IFN-γ e IL-4 como producción de anticuerpos. Además, los linfocitos T contra el péptido agonista solo proliferaron débilmente en presencia de análogos de [Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub> o [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> y todos los análogos de péptido fueron capaces de inhibir (antagonizar) la producción de IFN-γ *in vitro* por linfocitos T contra el péptido MBP<sub>83-99</sub> agonista. Juntos, el perfil de citocinas, datos de anticuerpos, proliferación y experimentos de antagonismo indican que el análogo de péptido [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> muestra promesa para estudios terapéuticos adicionales cuando se emulsiona en adyuvante completo de Freund (Tabla 3). Como puede apreciarse en la tabla resumen (Tabla 3), el emulsionar todos los análogos de péptido en adyuvante completo de Freund fue capaz de regular por disminución la secreción de IFN-γ, pero fue incapaz de inducir citocina IL-4 (excepto [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub>). Sin embargo, cuando los análogos de péptido se conjugaron con manano reducido-KLH se generó citocina IL-4 muy fuerte y de poco a ningún IFN-γ, además de IL-10 (Tabla 2). Así, el conjugar análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> con manano reducido fue capaz de desviar la respuesta inmunitaria de Th1 a Th2 y así constituir un enfoque novedoso a la inmunoterapia de EM.

Tabla 3: Resumen de respuestas inmunitarias inducidas en ratones SJL/J a análogos de péptido MBP<sub>83-99</sub> emulsionados en adyuvante completo de Freund

Análogo de péptido	de IFN-γ	IL-4	Reacción cruzada de proliferación	Antagonismo	Anticuerpo	Reacción cruzada de Ab con MBP nativo
<b>Lineal</b>						
MAP <sub>83-99</sub>	+	-			-	-
[A <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	-	-	++	++	++	++
[E <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	-	-	++	++	++	-
[F <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	++	-	++	++	++	-
[Y <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>			+/-	++	-	-
[R <sup>91</sup> , A <sup>96</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	++	++	+/-	++	++	-
<b>Cíclico</b>						
MBP <sub>83-99</sub>	+	-			++	-
[A <sup>91</sup> ]MBP <sub>83-99</sub>	-	-	++	++	+	-

- negativa; +/- muy débil; + débil; ++ moderada; +++ fuerte

Efecto clínico e histopatológico de co-administrar el péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> como tratamiento preventivo en el modelo crónico de EAE en ratones C57BL/6.

Datos clínicos sugieren que la co-administración preventiva del péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> en la relación 1:1 tiene un efecto beneficioso leve, que no es tan fuerte como el observado en experimentos análogos en MBP-EAE de ratas de Lewis [Tselios T *et al.*, 2002, Tselios, *et al.*, 2000]. Los resultados sugieren que el beneficio observado en MOG-EAE de ratones C57BL/6 no es siempre estadísticamente significativo y depende de las características clínicas de la EAE producida (variabilidad entre grupos, gravedad de la enfermedad y agresividad).

A pesar del hecho que el péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> parece reducir la gravedad de la enfermedad y puntuación clínica, este efecto no siempre alcanza significación estadística. El cuidadoso estudio de ambos conjuntos experimentales (agudos y crónicos) conduce a la conclusión de que la co-administración de ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> con el péptido MOG<sub>35-55</sub> lineal tiene un leve efecto beneficioso que está fuertemente afectado por el tamaño de grupo y la varianza de las puntuaciones clínicas de cada experimento de EAE [Fleming, *et. al.*, 2005]. Así, cuando la EAE

inducida es altamente homogénea y tiene un tamaño de muestra suficiente, entonces el leve beneficio de la administración del péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> es estadísticamente significativo; por otra parte, cuando la EAE inducida no es muy homogénea y tiene alta variabilidad referente a las puntuaciones clínicas (como éste era el caso con el conjunto experimental crónico), entonces el leve beneficio de la administración del péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> alcanza significación estadística.

Por lo que se refiere a la histopatología, los resultados indican que hay una carga inflamatoria similar cuantitativa dentro de las médulas espinales de los 2 grupos (control y ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> o grupo B) durante la fase aguda; esta carga inflamatoria se elimina en ambos grupos, a medida que progresan a la fase crónica, pero la eliminación parece ser más eficiente en el grupo B y conduce a células inflamatorias reducidas dentro de sus médulas espinales. Cuando se estudió la desmielinización, se encontró que los animales en el grupo B tenían significativamente menos axones desmielinizados en comparación con los controles, tanto en fases agudas como crónicas de la enfermedad. Cuando se estudiaron procesos axonopáticos, se encontró que la lesión axónica y pérdida axónica eran significativamente más leves en el grupo B durante la fase aguda, un hecho que parece conducir a un aumento de la preservación de axones en el grupo B, mediante la progresión de EAE a fase crónica, como esto se indica por la reducida pérdida axónica en el grupo B en la fase crónica. Así, se observó una densidad axónica relativamente preservada en el grupo B durante la fase crónica que parece ajustarse al beneficio clínico leve de la co-administración de ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> durante la fase crónica.

Los resultados anteriormente mencionados no pueden explicarse simplemente mediante la carga inflamatoria de las médulas espinales de los animales ya que no hay diferencia entre los números absolutos de células infiltrantes dentro del parénquima del SNC durante la fase aguda de EAE. Sin embargo, es probable que números iguales de células infiltrantes durante la fase aguda de la enfermedad no se correspondan necesariamente con números iguales de linfocitos T específicos de MOG "reactivos" dentro del parénquima. Si esto es cierto y hay menos linfocitos T reactivos con MOG y más linfocitos T específicos de ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> pero no reactivos, entonces probablemente podría producirse desmielinización reducida, procesos axonopáticos reducidos y elevada eliminación de las células inflamatorias a medida que la enfermedad progresa a cronicidad [Lassmann *et al.*, 2007, Abromson-Leeman, *et al.*, 2005, Bauer J *et al.*, 1998, Berger T *et al.*, 1997, Suvannavejh GC *et al.*, 2000, Pender MP y Rist MJ 2001].

Así, como conclusión, el péptido ciclo(83-99)MBP<sub>83-99</sub> produce de hecho algún efecto beneficioso en la MOG-EAE de C57BL/6. Sin embargo, este efecto no es tan fuerte como en MBP-EAE en ratas Lewis.

## EJEMPLO 2

Resultados para [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub> lineal y comparación con [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub>

Interacciones de péptidos [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> y [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> en complejo con clase II de MHC, I-A<sup>s</sup>

En el complejo de I-A<sup>s</sup> de H2 modelado del péptido MBP, los restos V<sup>87</sup>, F<sup>90</sup>, N<sup>92</sup> y T<sup>95</sup> están anclados en los bolsillos de MHC P1, P4, P6 y P9, respectivamente<sup>11,12</sup>. El resto K<sup>91</sup> está señalando hacia arriba desde la ranura de MHC. Los modelos indican que las mutaciones del resto K<sup>91</sup> no producen alteraciones importantes a las estructuras y a las interacciones intermoleculares entre el péptido y la hendidura de MHC (Fig. 7). Se ha estudiado el efecto de la mutación en la posición 91 analizando interacciones intermoleculares en los complejos mutados. Estos se resumen en las tablas en las Figuras 14 y 15. Se han descrito previamente las interacciones intermoleculares en el complejo modelado con ([R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub>)<sup>11</sup>. El análogo ([A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub>) muestra tendencias similares como se describe a continuación.

Con respecto a las interacciones de enlace de hidrógeno, el efecto más pronunciado incluye la pérdida de contacto hecho por los átomos de nitrógeno de K<sup>91</sup> y F<sup>90</sup> (MBP). Por tanto, [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub> no muestra los contactos con los restos de MHC N<sup>82</sup>(B), Y<sup>67</sup>(B) y Y<sup>68</sup>(A), observados en el complejo con el péptido no mutante. Sin embargo, se observan interacciones compensatorias con los restos de MHC T<sup>77</sup>(B) y D<sup>57</sup>(B). Debe observarse que [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub> muestra la mayor desviación de las interacciones de enlaces de hidrógeno intermoleculares del complejo no mutante, en comparación con todos los otros mutantes que los presentes inventores han estudiado previamente<sup>11,12</sup>. De forma interesante, las diferencias en las interacciones de van der Waals (vdW) hechas por el péptido nativo frente a [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub> fueron menos pronunciadas que las que se observaron con otros análogos<sup>11,12</sup>. En este caso, se observa una vez más la pérdida de contacto hecha por K<sup>91</sup>. Para equilibrar, el análogo presenta las interacciones de A<sup>91</sup> (MBP) con F<sup>11</sup> (B) (MHC). Otras pérdidas de contactos por [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub> incluyen V<sup>87</sup> a Y<sup>9</sup>(A), H<sup>81</sup>(B) y N<sup>82</sup>(B), F<sup>89</sup> a Y<sup>9</sup>(A), y V<sup>94</sup> a T<sup>65</sup>(A). Todas éstas se compensaron por las interacciones, observadas en el complejo mutante, pero no se presentaron por el propio péptido MBP nativo: V<sup>87</sup> a F<sup>54</sup>(A), F<sup>89</sup> a V<sup>76</sup>(B) y V<sup>94</sup> a Y<sup>61</sup>(B), respectivamente. Basándose en las novedosas interacciones indicadas por el péptido [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub> y [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub> con I-A<sup>s</sup> de H2, los presentes inventores evaluaron su perfil inmunológico en ratones SJL/J (H2<sup>s</sup>) en comparación con el péptido nativo.

El péptido [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugado con manano reducido disminuye la producción de IFN-γ y genera altos niveles de IL-4

Se evaluó la capacidad del péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo y el análogo de mutante doble [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> para inducir respuestas inmunitarias en ratones SJL/J por ensayo ELISpot de IFN-γ e IL-4. Se generaron altos niveles de IFN-γ al péptido MBP<sub>87-99</sub> que disminuyeron el 30 % (p<0,01) cuando los ratones se inmunizaron con péptido [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA (Fig. 2a). Sin embargo, los niveles de IFN-γ disminuyeron adicionalmente (70 %) cuando el péptido [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> se conjugó con manano reducido (p<0,01) (Fig. 8a). Además, la inmunización de ratones con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo tanto emulsionado en CFA como conjugado con manano reducido no indujeron linfocitos T secretores de citocina IL-4 (Fig. 8b). Fue de interés, sin embargo, que la inmunización de ratones con el péptido [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA indujo bajos niveles de IL-4 (que fueron significativo por encima del ruido de fondo, p<0,01) y niveles muy altos de IL-4 cuando se conjugó con manano reducido (p<0,01) (Fig. 8b). Es evidente que [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> disminuye significativamente los niveles de IFN-γ y genera altos niveles de IL-4 cuando se conjugó con manano reducido.

#### Péptidos [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugados con manano reducido desvían las respuestas inmunitarias de Th1 (IFN-γ) a Th2 (IL-4)

Se midió la capacidad de los péptidos lineales MBP<sub>87-99</sub> o [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> tanto emulsionados en CFA como conjugados con manano reducido, para inducir respuestas de linfocitos T después de 1 o 2 inyecciones, respectivamente, usando secreción de citocinas IFN-γ e IL-4 por análisis de ELISpot. Ratones inmunizados con péptido MBP<sub>87-99</sub> indujeron altos niveles de linfocitos T secretores de IFN-γ cuando se inmunizaron con tanto CFA como manano reducido (p<0,01) (Fig. 9a-b). Se indujo citocina IL-4 no detectable después de la inmunización con el péptido MBP<sub>87-99</sub> en cualquier conjugado (Fig. 10a-b). Los ratones inmunizados con [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> lineal emulsionado en CFA fueron capaces de inducir altos niveles de IL-4 (p<0,01) (Fig. 10a), sin embargo, también se generaron fuertes niveles de IFN-γ (p<0,01) (Fig. 9a). De forma interesante, cuando el péptido [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> se conjugó con manano reducido se indujeron altos niveles de IL-4 (Fig. 10b) y no se detectó IFN-γ (p<0,01) (Fig. 9b). En general, [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA generó tanto respuestas Th1 como Th2, sin embargo, el uso de manano reducido conjugado con [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> es capaz de desviar las respuestas inmunitarias de Th1 a Th2. No se usó péptido como control negativo y se usó ConA como control interno positivo que indujo coherentemente >1.000 SFU/0,5 millones de células para tanto IFN-γ como IL-4 (no mostrados).

#### Linfocitos T de ratones SJL/J inmunizados con [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA o conjugado con manano reducido no reaccionan de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo

Se examinaron linfocitos T después de la inmunización con el péptido [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> mutante lineal emulsionado en CFA o conjugado con manano reducido para si reaccionaban de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo usando ensayo de ELISpot. Los linfocitos T de ratones inmunizados con péptido lineal [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA (Fig. 11a) o conjugado con manano reducido (Fig. 11b) no reaccionaron de forma cruzada con el péptido nativo MBP<sub>87-99</sub> (Fig. 11a-b). No se usó péptido como control negativo y se usó ConA como control interno positivo que indujo coherentemente >1.000 SFU/0,5 millones de células para tanto IFN-γ como IL-4 (no mostrado). Además, los linfocitos T de [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> no reaccionaron de forma cruzada con el péptido [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>, que actuó de control negativo adicional (ruido de fondo) (Fig. 11).

#### Respuestas de anticuerpos a MBP<sub>87-99</sub> o péptidos [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionados en CFA o conjugados con manano reducido

Se midió la producción de respuestas de anticuerpos IgG totales en ratones inmunizados con análogos de péptido MBP<sub>87-99</sub> o [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionados en CFA (Fig. 12a), o conjugados con manano reducido (Fig. 12b), usando ELISA. No se generaron niveles de anticuerpo IgG en ratones inmunizados con el péptido [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA, mientras que se generaron niveles muy bajos de IgG a MBP<sub>87-99</sub> nativo (Fig. 12a). Sin embargo, se indujeron altos niveles de anticuerpo a tanto péptidos MBP<sub>87-99</sub> como [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> cuando se conjugaron con manano reducido (título >1/1,6400) (Fig. 12b).

Como se generaron niveles de anticuerpos más altos al péptido lineal [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> cuando se conjugó con manano reducido, se determinó si los sueros de estos ratones reaccionaron de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo. Sueros de ratones inmunizados con MBP<sub>87-99</sub> reaccionaron con el péptido MBP<sub>87-99</sub> (control positivo), mientras que los anticuerpos de ratones inmunizados con [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> lineal conjugado con manano reducido no reaccionaron de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo a diluciones de suero 1/500 y 1/1.000 (Fig. 12d). Además, los ratones inmunizados con [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA tampoco reaccionaron de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo (Fig. 12c). En general, aunque los anticuerpos IgG se indicaron para [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugado con manano reducido, no reaccionaron de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo.

#### Discusión

La activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se inicia por la interacción entre TCR y un antígeno de péptido que se presenta por moléculas de clase II de MHC, y, la interacción de moléculas coestimulantes de células presentadoras de antígenos<sup>33</sup>. Este proceso va seguido de proliferación de linfocitos T, estimulación de linfocitos T reactivos específicos para el antígeno y secreción de citocinas relevantes. Muchos estudios han mostrado que los péptidos

con mutaciones en restos de contacto de TCR críticos producen función de linfocitos T alterada<sup>34-36</sup>. En particular, se ha encontrado que ligandos de péptidos alterados (o péptidos mutantes) desplazan el equilibrio de respuestas inmunitarias de Th1 a Th2<sup>34, 37, 38</sup>. Las respuestas Th1 (IFN- $\gamma$ ) implican citocinas proinflamatorias que median en enfermedades autoinmunitarias, y, las respuestas Th2 (IL-4, IL-10) reducen la secreción de IFN- $\gamma$  y otras citocinas inflamatorias, previniendo la autoinmunidad<sup>15, 39, 40</sup>

El desarrollo de vacunas seguras y eficaces y enfoques inmunoterapéuticos contra EM está siendo activamente estudiado. Hasta la fecha, se han realizado varios ensayos clínicos en pacientes con EM con ligandos de péptidos alterados<sup>41, 42</sup>. Aún cuando los péptidos demostraron inducir respuestas apropiadas en estudios preclínicos, estos ensayos clínicos se interrumpieron debido a reacciones adversas<sup>41, 42</sup>. En algunos pacientes, se estimularon reacciones adversas inesperadas por los análogos de péptido contra el péptido/proteína nativa<sup>41, 42</sup>. Así, se requieren pruebas preclínicas adicionales y necesitan diseñarse nuevos péptidos modificados con el fin de desarrollar una vacuna eficaz para EM. En el ámbito del cáncer, se demostró que la mutación del péptido derivado de HLA-A2 (de antígeno carcinoembrionario) en la posición 6 generó un superagonista. Indujo linfocitos T CD8<sup>+</sup> que reaccionaron de forma cruzada con altas concentraciones del péptido nativo, sin embargo, no reconocieron antígeno carcinoembrionario que expresa células cancerosas<sup>43</sup>. Así, existe la necesidad de amplios análisis de reconocimiento cruzado de tumores antes de cualquier uso clínico de APL como vacunas. Por tanto, los presentes inventores diseñaron y sintetizaron dos péptidos mutantes lineales, basados en el epítope inmunodominante corto MBP<sub>87-99</sub>, con mutaciones en las posiciones K<sup>91</sup> y P<sup>96</sup> (K<sup>91</sup> se modificó a R<sup>91</sup> o A<sup>91</sup> y P<sup>96</sup> a A<sup>96</sup>). Los análogos mutantes se inyectaron en ratones SJL/J con el fin de examinar su capacidad para desplazar respuestas inmunitarias de Th1 a Th2, y si los linfocitos T y anticuerpos reaccionaron de forma cruzada con el péptido nativo. Se usaron un adyuvante (CFA) o un vehículo adecuado (manano reducido).

La inmunización de ratones SJL/J con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo emulsionado en CFA generó altos niveles de IFN- $\gamma$ , mientras que el análogo mutante doble [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> disminuyó la secreción de IFN- $\gamma$  el 30 %. Estos hallazgos son similares a aquellos previamente publicados con el péptido mutante doble más largo [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>83-99</sub><sup>11</sup>. Es de interés que los niveles de IFN- $\gamma$  disminuyeron adicionalmente (70 %) cuando el péptido [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> se conjugó con el vehículo de manano reducido. Además, la inmunización de ratones con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo tanto emulsionado en CFA como conjugado con manano reducido no indujo linfocitos T secretadores de citocina IL-4. Así, la sustitución de K<sup>91</sup> y P<sup>96</sup> con R<sup>91</sup> y A<sup>96</sup>, respectivamente, podría disminuir los niveles de IFN- $\gamma$ , generando altos niveles de IL-4 cuando el péptido [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> se conjugó con manano reducido, pero todavía hubo secreción de IFN- $\gamma$ . Por el contrario, la inmunización con el análogo mutante doble [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugado con manano reducido indujo altos niveles de IL-4 y no se detectó IFN- $\gamma$ . La sustitución de los restos 91 y 96 a Ala ([A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>) tiene la capacidad de generar citocina IL-4, sin embargo, con el vehículo apropiado, es capaz de desviar las respuestas inmunitarias de IFN- $\gamma$  a IL-4. En general, el uso de adyuvante (CFA) genera tanto respuestas Th1 como Th2 y no parece ser beneficioso, sin embargo, el uso de un vehículo apropiado tal como manano reducido conjugado con [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> fue capaz de desviar las respuestas inmunitarias de Th1 a Th2. Y, lo que es más importante, linfocitos T que secretan IFN- $\gamma$  y anticuerpos IgG generados para el péptido [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> doble mutante no reaccionaron de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo. Es evidente que el análogo de péptido [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> mutante doble es un candidato prometedor para estudios adicionales para la inmunoterapia de EM.

Asimismo, los presentes inventores demostraron recientemente que usar mutaciones de uno solo aminoácido del péptido MBP<sub>83-99</sub> más largo, que un cambio de un solo aminoácido de K<sup>91</sup> a Y<sup>91</sup> ([Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>) cuando se conjugó con manano reducido, también desvió las respuestas inmunitarias de Th1 a Th2<sup>12</sup>, similar al péptido [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugado con manano reducido. Es evidente que la secuencia de péptidos y la longitud y el tipo de adyuvante/vehículo usado son importantes para provocar la respuesta inmunitaria deseada a una vacuna basada en péptido.

El modelado de los análogos ([A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub>) y ([R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub>) en complejo con I-A<sup>S</sup> de H2 reveló que las cadenas laterales de los restos mutados se exponen para hacer contactos con TCR y las mutaciones no producen alteraciones mayores a las estructuras complejas y a las interacciones intermoleculares entre los péptidos y la hendidura de MHC. Se observó que el esqueleto de péptidos [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub>, [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub> y NBP<sub>87-96</sub> nativo se solapó muy estrechamente y solo se observaron cambios conformacionales menores en los aminoácidos en las posiciones 91 y 96 (Fig. 7d). No inesperadamente, se perdieron ciertos contactos específicos observados en el complejo con el péptido nativo en los complejos con los mutantes (Fig. 14 y 15). Éstos se compensaron por las interacciones novedosas con restos de MHC. Lo más en particular, el análogo ([A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub>) presentó la mayor reducción de las interacciones de enlaces de hidrógeno intermoleculares del complejo nativo, en comparación con todos los otros mutantes que los presentes inventores han estudiado previamente<sup>11, 12</sup>. Esto no es sorprendente dado el grado de modificación de cadenas laterales cuando se usa un resto de alanina en lugar de arginina y prolina.

Se ha mostrado que los péptidos que causan antagonismo tienen menos contactos de enlaces de hidrógeno entre las cadenas laterales de péptido y los bucles de CDR3 de TCR<sup>44</sup>. La pérdida de contacto de enlaces de hidrógeno puede hacer que los péptidos agonistas o super-agonistas (APL hiper-estimulantes) lleguen a ser antagonistas. Por ejemplo, una mutación de un solo aminoácido del péptido del virus de la estomatitis vesicular VSV8 (RGYVYQGL a RGYVYEGL) conduce a antagonismo de hibridomas de linfocitos T específicos para VSV8 nativo. La estructura

crystalina de este APL con H-2K<sup>b</sup> demostró que una modificación de péptido menor indujo un profundo efecto biológico<sup>45</sup>. El TCR, que reconoce el péptido VSV8 (RGYVYQGL) y su APL (RGYVYEGL), se mutó por un solo aminoácido en el bucle de CDR3 $\beta$ , y éste fue capaz de modular las propiedades antagonistas de TCR de un APL<sup>46</sup>. Estos ejemplos validan los resultados de los estudios de modelado de los presentes inventores con respecto a péptidos mutantes MBP. Concretamente, que incluso cambios conformacionales mínimos son suficientes para tener profundos efectos biológicos.

## Procedimientos experimentales

### (1) Modelado molecular

Se llevó a cabo modelado molecular usando el paquete de modelado HiperChem (HiperCube Inc., versión 7.52) como se describe previamente<sup>11</sup>. Se usó campo de fuerza OPLS para optimización de la geometría de la mecánica molecular. Se generaron complejos de MHC-péptido basándose en la estructura cristalina del complejo I-A<sup>U</sup> con el péptido MBP<sub>1-11</sub> (código PDB 1K2D). Este molde se eligió tras la consideración de nueve estructuras cristalinas relevantes, basándose en la combinación de identidad de secuencia con la diana, estructura cristalina, resolución y el grado de alteración a los restos de interacción del péptido, tras la mutación<sup>12</sup>. El alineamiento del péptido MBP dentro de la hendidura de MHC se llevó a cabo basándose en el análisis de todas las posibles posiciones de MBP y se dedujo el siguiente registro de unión preferido<sup>12</sup>

1K2D	(G	G)	A <sup>1</sup>	S	Q	Y	R	P	S	Q <sup>8</sup>
MBP	V <sup>87</sup>	H	F	F	K	N	I	V	T	P <sup>96</sup>

Para producir péptidos MBP mutados, se mutaron el resto de lisina en la posición 91 y el resto de prolina en la posición 96 a A<sup>91</sup> y A<sup>96</sup> ([A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub>) y R<sup>91</sup> y A<sup>96</sup> ([R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-96</sub>), respectivamente. Los complejos se optimizaron entonces y se estudiaron las interacciones intermoleculares en los complejos usando el programa LigPlot<sup>47</sup>.

### (2) Síntesis de péptidos en fase sólida de análogos lineales

Se prepararon los péptidos MBP<sub>87-99</sub> (VHFFKNIVTPRTP), [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>(VHFFRNIVTARTP) y [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (VHFFANIVTARTP) sobre resina de cloruro de 2-clorotritilo (CLTR-Cl) usando metodología de Fmoc/tBu<sup>22, 48-51</sup>. Se realizaron HPLC preparativa para análogos de péptido MBP<sub>87-99</sub>, [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> y [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> usando una columna semipreparativa de fase inversa Lichrosorb RP-18 con material de relleno de 7  $\mu$ m.

Los péptidos tuvieron > 95 % de pureza como se analizaron por RP-HPLC analítica y ESI-EM (Fig. 13).

### (3) Conjugación de manano reducido con péptidos nativos y mutantes MBP<sub>87-99</sub> mediante un conector de KLH

Se conjugaron péptidos MBP<sub>87-99</sub>, [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> o [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> con hemocianina de lapa californiana (KLH) mediante glutaraldehído que actúa de conector entre el manano y el péptido.<sup>27</sup> Se disolvieron 14 mg de manano (de *Saccharomyces cerevisiae*, SIGMA, St Louis, EE.UU.) en 1 ml de tampón fosfato de sodio (pH 6,0), seguido de la adición de 100  $\mu$ l de peroato de sodio 0,1 M (disuelto en tampón fosfato a pH 6,0) y se incubó a 4 °C durante 1 hora (h) en la oscuridad. Se añadió etanodiol (10  $\mu$ l) a la mezcla y se incubó durante 30 minutos (min) a 4 °C. La mezcla resultante (manano oxidado) se pasó a través de una columna PD-10 (columna Sephadex G-25 M, Amersham Biosciences, Suecia) previamente equilibrada en tampón fosfato (pH 9,0) y se recogieron 2 ml de solución que comprendía manano oxidado. Se añadió un mg cada uno de los péptidos MBP<sub>87-99</sub>-KLH, [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>-KLH o [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>-KLH a 2 ml de una solución de manosa oxidada y se incubó durante la noche (durante la noche) a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad. La conjugación se produce mediante la formación de bases de Schiff entre grupos amino libres de KLH y manano oxidado. Se prepararon complejos de manano reducido-KLH-MBP<sub>87-99</sub>, manano reducido-KLH-[R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> o manano reducido-KLH-[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> añadiendo 1,0 mg de borohidruro de sodio durante 6-8 h a TA en la oscuridad y se usaron sin más purificación como se describe previamente<sup>12, 23, 30, 31</sup>. Previamente se caracterizaron análogos de péptido MBP por electroforesis capilar para la conjugación con manano<sup>52</sup> y por gel de SDS-PAGE, tinción con Coomassie, reactivo de Silver o Schiff (datos no mostrados). Los péptidos se conjugaron al 100 % con manano reducido.

### (4) Ratones

Los ratones SJL/J hembra de 6-8 semanas de edad usados en este estudio se compraron de Walter and Eliza Hall Institute (Victoria, Australia) y se alojaron en el Laboratorio de Investigación Biológica del Instituto Burnet, campus de Austin, Heidelberg, Australia.

### (5) Inmunización de CFA-péptido

Se disolvieron péptidos MBP<sub>87-99</sub>, [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> o [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> en PBS y se emulsionaron en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA) que contenía 1,0 mg/ml de H37RA de *Mycobacterium tuberculosis*

muerta por calor (Sigma, Victoria, Australia). Los ratones SJL/J se administraron con una inyección subcutánea que contiene 50 µg de péptido en la base de la cola.

#### (6) Inmunización de manano reducido-KLH-péptido

Se inmunizaron ratones SJL/J dos veces en los días 0 y 14 por vía intradérmica (base de la cola) con 50 µg de conjugados de MBP<sub>87-99</sub>-KLH-manano reducido, [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>-KLH-manano reducido o [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>-KLH-manano reducido.

#### (7) Ensayo de inmuno-puntos asociados a enzima (ELISpot)

ELISpot detecta respuestas de linfocitos T específicas a antígenos midiendo la secreción de citocinas específicas de células individuales. Se aislaron células del bazo de ratones SJL/J inmunizados 28 días después de la inmunización con CFA o 14 días después de la última inmunización con manano reducido-péptidos y se evaluó por ELISpot para la secreción de IFN-γ e IL-4 por linfocitos T. Se realizó ensayo ELISpot de IFN-γ en placa filtrante MultiScreen-IP (MAIP S4510) con filtros de PVDF hidrófobos (Millipore, RU), mientras que los ensayos ELISpot de IL-4 se realizaron en placa filtrante MultiScreen-HA (MAHA S4510) con filtros de ésteres de celulosa mixtos (Millipore, RU). Se humedecieron previamente placas MAIP S4510 con 50 µl de etanol al 70 %, se lavaron 5 veces con 200 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y se recubrieron con 70 µl de 5 µg/ml de anticuerpo de captura anti-IFN-γ, AN18 (Mabtech, Australia) en PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C. Se añadieron directamente 70 µl de 5 µg/ml de anticuerpo de captura anti-IL-4 (Mabtech, Australia) a placas MAHA S4510 y se incubaron durante la noche a 4 °C sin tratamiento con etanol al 70 %. Tras 5 lavados con PBS, las placas se bloquearon añadiendo 200 µl de medio de cultivo (complementado con 2,5 % de suero de ternero fetal) y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Se desechó el medio de bloqueo y se añadieron 10 µg/ml de péptidos de memoria MBP<sub>87-99</sub>, [R<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> o [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> en cada pocillo definido. Se usó ConA (1,0 µg/ml) como control interno positivo y sin péptido (células solas) como control negativo. Se establecieron pocillos triplicados para cada condición. Se sembraron células del bazo (0,5 millones de células) en 100 µl de medio de cultivo en cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 18 h para IFN-γ o 24 para IL-4, respectivamente. Las placas se lavaron 5 veces con PBS/0,05 % de Tween 20, seguido de 5 veces con PBS y se incubaron durante 2 h a TA con anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ o IL-4 de ratón-biotina. Las placas se lavaron y se añadió estreptavidina-ALP a 1,0 µg/ml y se incubaron durante otras 2 h a TA. Se detectaron puntos de actividad usando un kit colorimétrico AP (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.) y se contaron usando un lector de placas AID ELISpot (Autoimmun Diagnostika GmbH, Alemania). Los datos se presentan como unidades formadoras de puntos (sfu) medias por 0,5 x 10<sup>6</sup> células +/- error estándar de la media (EEM).

#### (8) Enzimoanálisis de adsorción (ELISA)

Se recogió sangre y sueros aislados de ratones antes de y 4 semanas después de la inmunización con CFA o 14 días después de la última inmunización con conjugados de manano reducido. Se recubrieron péptidos MBP<sub>87-99</sub> o [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugados con BSA o KLH sobre placas de microtitulación de poli(cloruro de vinilo) (PVC) a 10 µg/ml en tampón NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M, pH 9,6, durante la noche a 4 °C. La unión no específica se bloqueó con 2 % de BSA durante 1,0 h a TA. Después de lavar (0,05 % de Tween 20/PBS), se añadieron diluciones sucesivas de sueros y se incubaron durante otras 2 h a TA. Las placas se lavaron y se detectó anticuerpo unido usando anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con HRP (dilución 1/1000 en PBS) (Amersham, RU) y se revelaron usando ácido 2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazolina)6-sulfónico (ABTS) (Sigma, RU). La absorbancia a 405 nm se registró usando un lector de microplacas Fluostar Optima (BMG labtech, Offenburg, Alemania).

#### (9) Análisis estadístico

Se compararon valores medios usando la prueba de la *t* de Student bilateral. El valor umbral del valor de *p* de *p*<0,01 indica una diferencia estadísticamente significativa.

#### Referencias para el Ejemplo 2

1. Katsara, M.; Matsoukas, J.; Deraos, G.; Apostolopoulos, V. Towards immunotherapeutic drugs and vaccines against multiple sclerosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008, 40, 636-42.
2. Martin, R.; Howell, M. D.; Jaraquemada, D.; Flerlage, M.; Richert, J.; Brostoff, S.; Long, E. O.; McFarlin, D. E.; McFarland, H. F. A myelin basic protein peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1991, 173, 19-24.
3. Oksenberg, J. R.; Baranzini, S. E.; Barcellos, L. F.; Hauser, S. L. Multiple sclerosis: genomic rewards. *J Neuroimmunol* 2001, 113, 171-84.
4. Ota, K.; Matsui, M.; Milford, E. L.; Mackin, G. A.; Weiner, H. L.; Hafler, D. A. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990, 346, 183-7.
5. Zhang, J.; Markovic-Plese, S.; Lacet, B.; Raus, J.; Weiner, H. L.; Hafler, D. A. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994, 179, 973-84.

6. Hafler, D. A.; Slavik, J. M.; Anderson, D. E.; O'Connor, K. C.; De Jager, P.; Baecher-Allan, C. Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 2005, 204, 208-31.
7. Steinman, L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996, 85, 299-302.
- 5 8. Sakai, K.; Sinha, A. A.; Mitchell, D. J.; Zamvil, S. S.; Rothbard, J. B.; McDevitt, H. O.; Steinman, L. Involvement of distinct murine T-cell receptors in the autoimmune encephalitogenic response to nested epitopes of myelin basic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85, 8608-12.
9. Sakai, K.; Zamvil, S. S.; Mitchell, D. J.; Lim, M.; Rothbard, J. B.; Steinman, L. Characterization of a major encephalitogenic T cell epitope in SJL/J mice with synthetic oligopeptides of myelin basic protein. *J Neuroimmunol* 1988, 19, 21-32.
- 10 10. Karin, N.; Mitchell, D. J.; Brocke, S.; Ling, N.; Steinman, L. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis by a soluble peptide variant of a myelin basic protein epitope: T cell receptor antagonism and reduction of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1994, 180, 2227-37.
11. Katsara, M.; Yuriev, E.; Ramsland, P. A.; Deraos, G.; Tselios, T.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. A double mutation of MBP(83-99) peptide induces IL-4 responses and antagonizes IFN-gamma responses. *J Neuroimmunol* 2008.
- 15 12. Katsara, M.; Yuriev, E.; Ramsland, P. A.; Deraos, G.; Tselios, T.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Mannosylation of mutated MBP(83-99) peptides diverts immune responses from Th1 to Th2. *Mol Immunol* 2008, 45, 3661-70.
13. Brocke, S.; Gijbels, K.; Allegretta, M.; Ferber, I.; Piercy, C.; Blankenstein, T.; Martin, R.; Utz, U.; Karin, N.; Mitchell, D.; Veromaa, T.; Waisman, A.; Gaur, A.; Conlon, P.; Ling, N.; Fairchild, P. J.; Wraith, D. C.; O'Garra, A.; Fathman, C. G.; Steinman, L. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature* 1996, 379, 343-6.
14. Cannella, B.; Raine, C. S. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995, 37, 424-35.
- 15 15. Racke, M. K.; Bonomo, A.; Scott, D. E.; Cannella, B.; Levine, A.; Raine, C. S.; Shevach, E. M.; Rocken, M. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J Exp Med* 1994, 180, 1961-6.
16. Gaur, A.; Boehme, S. A.; Chalmers, D.; Crowe, P. D.; Pahuja, A.; Ling, N.; Brocke, S.; Steinman, L.; Conlon, P. J. Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol* 1997, 74, 149-58.
17. Gauthier, L.; Smith, K. J.; Pyrdol, J.; Kalandadze, A.; Strominger, J. L.; Wiley, D. C.; Wucherpfennig, K. W. Expression and crystallization of the complex of HLA-DR2 (DRA, DRB1\*1501) and an immunodominant peptide of human myelin basic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95, 11828-33.
18. Li, Y.; Huang, Y.; Lue, J.; Quandt, J. A.; Martin, R.; Mariuzza, R. A. Structure of a human autoimmune TCR bound to a myelin basic protein self-peptide and a multiple sclerosis-associated MHC class II molecule. *Embo J* 2005, 24, 2968-79.
19. Smith, K. J.; Pyrdol, J.; Gauthier, L.; Wiley, D. C.; Wucherpfennig, K. W. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA\*0101, DRB1\*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med* 1998, 188, 1511-20.
20. Wucherpfennig, K. W.; Hafler, D. A.; Strominger, J. L. Structure of human T-cell receptors specific for an immunodominant myelin basic protein peptide: positioning of T-cell receptors on HLA-DR2/peptide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92, 8896-900.
21. Kalbus, M.; Fleckenstein, B. T.; Offenhausser, M.; Bluggel, M.; Melms, A.; Meyer, H. E.; Rammensee, H. G.; Martin, R.; Jung, G.; Sommer, N. Ligand motif of the autoimmune disease-associated mouse MHC class II molecule H2-A(s). *Eur J Immunol* 2001, 31, 551-62.
22. Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V.; Kalbacher, H.; Papini, A. M.; Tselios, T.; Chatzantoni, K.; Biagioli, T.; Lolli, F.; Deraos, S.; Papanthanasopoulos, 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.
23. Katsara, M.; Deraos, G.; Tselios, T.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Design of novel cyclic altered peptide ligands of myelin basic protein MBP83-99 that modulate immune responses in SJL/J mice. *J Med Chem* 2008, 51, 3971-8.
24. Katsara, M.; Tselios, T.; Deraos, S.; Deraos, G.; Matsoukas, M. T.; Lazoura, E.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Round and round we go: cyclic peptides in disease. *Curr Med Chem* 2006, 13, 2221-32.
25. Acres, B.; Apostolopoulos, V.; Balloul, J. M.; Wreschner, D.; Xing, P. X.; Ali-Hadji, D.; Bizouarne, N.; Kieny, M. P.; McKenzie, I. F. MUC1-specific immune responses in human MUC1 transgenic mice immunized with various human MUC1 vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 2000, 48, 588-94.
26. Apostolopoulos, V.; Barnes, N.; Pietersz, G. A.; McKenzie, I. F. Ex vivo targeting of the macrophage mannose receptor generates anti-tumor CTL responses. *Vaccine* 2000, 18, 3174-84.
27. Apostolopoulos, V.; Karanikas, V.; Haurum, J. S.; McKenzie, I. F. Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J Immunol* 1997, 159, 5211-8.
28. Apostolopoulos, V.; McKenzie, I. F. Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr Mol Med* 2001, 1, 469-74.

29. Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. A.; Gordon, S.; Martinez-Pomares, L.; McKenzie, I. F. Aldehyde-mannan antigen complexes target the MHC class I antigen-presentation pathway. *Eur J Immunol* 2000, 30, 1714-23.
30. Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. A.; Loveland, B. E.; Sandrin, M. S.; McKenzie, I. F. Oxidative/reductive conjugation of mannan to antigen selects for T1 or T2 immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92, 10128-32.
- 5 31. Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. A.; McKenzie, I. F. Cell-mediated immune responses to MUC1 fusion protein coupled to mannan. *Vaccine* 1996, 14, 930-8.
32. Sheng, K. C.; Pouniotis, D. S.; Wright, M. D.; Tang, C. K.; Lazoura, E.; Pietersz, G. A.; Apostolopoulos, V. Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells. *Immunology* 2006, 118, 372-83.
- 10 33. Harding, C. V.; Leyva-Cobian, F.; Unanue, E. R. Mechanisms of antigen processing. *Immunol Rev* 1988, 106, 77-92.
34. Evavold, B. D.; Allen, P. M. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science* 1991, 252, 1308-10.
- 15 35. Evavold, B. D.; Sloan-Lancaster, J.; Hsu, B. L.; Allen, P. M. Separation of T helper 1 clone cytotoxicity from proliferation and lymphokine production using analog peptides. *J Immunol* 1993, 150, 3131-40.
36. Sloan-Lancaster, J.; Evavold, B. D.; Allen, P. M. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 1993, 363, 156-9.
- 20 37. Nicholson, L. B.; Greer, J. M.; Sobel, R. A.; Lees, M. B.; Kuchroo, V. K. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 1995, 3, 397-405.
38. Windhagen, A.; Scholz, C.; Hollsberg, P.; Fukaura, H.; Sette, A.; Hafler, D. A. Modulation of cytokine patterns of human autoreactive T cell clones by a single amino acid substitution of their peptide ligand. *Immunity* 1995, 2, 373-80.
- 25 39. Street, N. E.; Mosmann, T. R. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *Faseb J* 1991, 5, 171-7.
40. Swain, S. L. IL4 dictates T-cell differentiation. *Res Immunol* 1993, 144, 616-20.
41. Bielekova, B.; Goodwin, B.; Richert, N.; Cortese, L.; Kondo, T.; Afshar, G.; Gran, B.; Eaton, J.; Antel, J.; Frank, J. A.; McFarland, H. F.; Martin, R. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 2000, 6, 1167-75.
- 30 42. Kappos, L.; Comi, G.; Panitch, H.; Oger, J.; Antel, J.; Conlon, P.; Steinman, L. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group. *Nat Med* 2000, 6, 1176-82.
- 35 43. Iero, M.; Squarcina, P.; Romero, P.; Guillaume, P.; Scarselli, E.; Cerino, R.; Carrabba, M.; Toutirais, O.; Parmiani, G.; Rivoltini, L. Low TCR avidity and lack of tumor cell recognition in CD8(+) T cells primed with the CEA-analogue CAP1-6D peptide. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56, 1979-91.
44. Degano, M.; Garcia, K. C.; Apostolopoulos, V.; Rudolph, M. G.; Teyton, L.; Wilson, I. A. A functional hot spot for antigen recognition in a superagonist TCR/MHC complex. *Immunity* 2000, 12, 251-61.
- 40 45. Thomson, C. T.; Kalergis, A. M.; Sacchetti, J. C.; Nathenson, S. G. A structural difference limited to one residue of the antigenic peptide can profoundly alter the biological outcome of the TCR-peptide/MHC class I interaction. *J Immunol* 2001, 166, 3994-7.
46. Kalergis, A. M.; Nathenson, S. G. Altered peptide ligand-mediated TCR antagonism can be modulated by a change in a single amino acid residue within the CDR3 beta of an MHC class I-restricted TCR. *J Immunol* 2000, 165, 280-5.
- 45 47. Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* 1995, 8, 127-34.
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 MBP(87-99) altered peptide ligands in experimental allergic encephalomyelitis and human T-cell proliferation. *J Med Chem* 2002, 45, 275-83.
- 50 49. Tselios, T.; Daliani, I.; Deraos, S.; Thymianou, S.; Matsoukas, E.; Troganis, A.; Gerothanassis, L.; Mouzaki, A.; Mavromoustakos, T.; Probert, L.; Matsoukas, J. Treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by a rationally designed cyclic analogue of myelin basic protein (MBP) epitope 72-85. *Bioorg Med Chem Lett* 2000, 10, 2713-7.
- 55 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 MBP(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 MBP72-85: importance of the Ala81 carboxyl group and of a cyclic conformation for induction of experimental allergic encephalomyelitis. *J Med Chem* 1999, 42, 1170-7.
- 60 52. Tselios, T. V.; Lamari, F. N.; Karathanasopoulou, I.; Katsara, M.; Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. A.; Matsoukas, J. M.; Karamanos, N. K. Synthesis and study of the electrophoretic behavior of mannan conjugates with cyclic peptide analogue of myelin basic protein using lysine-glycine linker. *Anal Biochem* 2005, 347, 121-8.
- 65

## EJEMPLO 3

Resultados para [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> cíclico5 Ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en adyuvante completo de Freund o conjugado con manano reducido reduce la producción de IFN-γ e induce niveles moderados de IL-4

Se midió la capacidad de los péptidos MBP<sub>87-99</sub> lineal o ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> tanto emulsionados en adyuvante completo de Freund (CFA) como conjugados con manano reducido, para inducir respuestas de linfocitos T después de 1 o 2 inyecciones, respectivamente, usando la secreción de citocinas IFN-γ e IL-4 por análisis de ELISpot. En general, ratones inmunizados con el péptido MBP<sub>87-99</sub> indujeron altos niveles de linfocitos T que secretan IFN-γ cuando se inmunizaron con tanto CFA como manano reducido (Figura 20A, 20B). Se indujo citocina IL-4 no detectable después de la inmunización con el péptido MBP<sub>87-99</sub> en cualquier conjugado (Figura 20C, 20D). Sin embargo, los ratones inmunizados con el análogo de péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en adyuvante completo de Freund o conjugado con manano reducido fueron capaces de reducir la producción de IFN-γ (p<0,01) (Figura 20A, 20B), e inducir niveles moderados de IL-4 (p<0,01) (Figura 20C, 20D). En particular, cuando el péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> se conjugó con manano reducido se observaron niveles de IFN-γ significativamente reducidos de ~50 % en comparación con el péptido MBP<sub>87-99</sub> lineal (p<0,01) (Figura 20B). Además, se observó ~50 % de producción de IFN-γ reducida cuando se comparó el péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugado con manano reducido con el péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA y disminuyó ~70 % cuando se comparó con el péptido MBP<sub>87-99</sub> lineal emulsionado en CFA (Figura 20A, 16B) (p<0,01). Además, se indujeron niveles moderados de linfocitos T que secretan IL-4 al péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> después de la inmunización con ambos conjugados (p<0,01) (Figura 20D). No se usó péptido como control negativo y se usó ConA como control interno positivo que indujo coherentemente >1.000 SFU/0,5 millones de células para tanto IFN-γ como IL-4 (no mostradas). En general, el uso de manano reducido conjugado con ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> fue capaz de reducir significativamente la producción de IFN-γ e inducir niveles significativos de IL-4 en ratones SJL/J. Recientemente, se mostró que el homólogo lineal de este péptido mutante doble, [A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> lineal, inhibía la producción de IFN-γ cuando se conjugó con manano reducido (Katsara et al, presentado). El análogo cíclico no es tan eficiente en reducir la producción de IFN-γ en comparación con su homólogo lineal en ratones SJL/J, sin embargo, se observan niveles significativos de reducción de IFN-γ con el análogo cíclico. Además, los péptidos cíclicos que son más estables que sus homólogos lineales son de interés considerable en el diseño de novedosas vacunas basadas en péptido<sup>1, 2</sup>. Previamente, los presentes inventores habían demostrado que un péptido cíclico de MBP<sub>83-99</sub> con una única mutación de Ala en la posición 91, (ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>) conjugado con manano reducido era capaz de antagonizar respuestas de IFN-γ *in vitro* y potenció respuestas de IL-4 en ratones SJL/J<sup>3</sup>. Además, la mutación de solo Tyr en la posición 91, ([Y<sup>91</sup>]MBP<sub>83-99</sub>) conjugado con manano reducido condujo a la desviación de respuestas de IFN-γ a respuestas de IL-4<sup>4</sup>. Cuando los péptidos mutantes en todos los estudios se emulsionaron en CFA, los efectos antagonistas no fueron tan pronunciados. Así, demostrando la importancia de manano reducido en regular la respuesta inmunitaria apropiada. Se ha mostrado que el manano reducido induce respuestas Th2 e induce la secreción de citocinas Th2 por células dendríticas murinas y macrófagos<sup>3-10</sup>.

Linfocitos T y anticuerpos de ratones SJL/J inmunizados con ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA o conjugado con manano reducido no reaccionan de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo

45 Aunque el péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA o conjugado con manano reducido generó respuestas de IFN-γ, los presentes inventores examinaron si los linfocitos T productores de IFN-γ reaccionaron de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo usando el ensayo ELISpot. Se inmunizaron ratones SJL/J con el péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> y se evaluó la producción de IFN-γ contra el péptido MBP<sub>87-99</sub>. Linfocitos T de ratones inmunizados con ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA (Figura 21 A) o conjugado con manano reducido (Figura 21 B) indujeron respuestas de IFN-γ, pero no reaccionaron de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo (Figura 21A, 21B).

Se midieron la producción de respuestas de anticuerpos IgG totales en ratones inmunizados con análogos de péptido MBP<sub>87-99</sub> o ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA (Figura 22A), o conjugado con manano reducido (Figura 22B), usando ELISA. Se generaron bajos niveles de anticuerpo IgG en ratones inmunizados con el péptido MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA (Figura 22A), mientras que no se generaron anticuerpos IgG para el análogo de péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (Figura 22A). Sin embargo, se indujeron niveles más altos para tanto péptidos MBP<sub>87-99</sub> como ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> cuando se conjugaron con manano reducido (Figura 22B). Como los anticuerpos se generaron para el péptido ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>, los presentes inventores determinaron si los sueros de estos ratones reaccionaron de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo. Los ratones inmunizados con MBP<sub>87-99</sub> emulsionado en CFA o conjugado con manano reducido reaccionaron con el péptido MBP<sub>87-99</sub> (Figura 22C, 22D) (control positivo), mientras que los anticuerpos de ratones inmunizados con ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> conjugado con manano reducido o emulsionado en CFA no reaccionaron con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo a dilución de sueros 1/500 y 1/1.000 (Figura 22C, 22D). En general, aunque la producción total de IgG se indicó para análogos conjugados con manano reducido, estos anticuerpos no reaccionaron de forma cruzada con el péptido MBP<sub>87-99</sub> nativo.

Estos hallazgos son de importancia en el ámbito clínico, ya que los linfocitos T reactivos de forma cruzada y los anticuerpos para el péptido nativo se indujeron en ensayos clínicos con ligandos de péptidos alterados de péptido MBP que fueron el motivo de la terminación prematura de los ensayos<sup>11,12</sup>. Es evidente que la ciclación altera la conformación del péptido, así, siendo presentada en una forma alterada por el MHC, y de ahí, que los linfocitos T que se inducen reconozcan una conformación diferente en comparación con la forma nativa. Los presentes inventores habían demostrado previamente que los péptidos cíclicos se unen a clase II de MHC humano, HLA-DR4<sup>13</sup>, y, se mostró un modelo de viñetas de cómo los péptidos cíclicos pueden ser presentados por MHC murino<sup>3</sup>.

#### Procedimientos experimentales

##### (1) Síntesis de péptidos en fase sólida de análogos cíclicos

Se prepararon péptidos MBP<sub>87-99</sub> (VHFFKNIVTPRTP) y péptido de mutante doble cíclico con mutaciones de Ala en las posiciones 91 y 96, ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> (ciclo, cabeza a cola, VHFFANIVTARTP) sobre resina de cloruro de 2-clorotritilo (CLTR-Cl) usando metodología de Fmoc/tBu. Se logró ciclación de cabeza a cola del péptido MBP<sub>87-99</sub>[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>] usando tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol, 2,4,6-colidina en solución de DMF, permitiendo reacciones rápidas y productos de ciclación de alto rendimiento. Los resultados indican que HOAt, una variante que contiene 4 nitrógenos, es un aditivo de acoplamiento muy eficiente, más eficiente que HOBt para la síntesis en solución o fase sólida<sup>14-17</sup>. Se realizó HPLC preparativa para análogos de péptido usando una columna semi-preparativa de fase inversa Lichrosorb RP-18 con material de relleno de 7 µm. Los péptidos tuvieron >95 % de pureza como se analiza por espectrometría de masas (ESI-EM).

##### (2) Conjugación de manano reducido-KLH-péptido e inmunización

Se conjugaron péptidos MBP<sub>87-99</sub> o ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> con hemocianina de lapa californiana (KLH) mediante glutaraldehído; KLH actúa de conector entre manano y péptido<sup>18</sup>. Los procedimientos de conjugación fueron previamente publicados<sup>3-9, 18</sup>. Brevemente, se disolvió manano (de *Saccharomyces cerevisiae*, SIGMA, St Louis, EE.UU.) en tampón fosfato de sodio a pH 6,0, seguido de la adición de peryoato de sodio y se incubó durante 1 hora a 4 °C. Se añadió etanodiol a la mezcla y se incubó durante 30 min a 4 °C. La mezcla (manano oxidado) se pasó a través de una columna PD-10 (columna Sephadex G-25 M, Amersham Biosciences, Suecia) previamente equilibrada en tampón fosfato a pH 9,0. Se eluyó manano oxidado, al que se añadieron péptidos y se dejó que reaccionaran durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. La conjugación se produce mediante formación de bases de Schiff entre grupos amino libres de KLH y manano oxidado. Se prepararon complejos de manano reducido-KLH-MBP<sub>87-99</sub> o manano reducido-KLH-ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> añadiendo borohidruro de sodio. Los análogos de péptido MBP se caracterizaron previamente por electroforesis capilar para la conjugación con manano<sup>19</sup> y por gel de SDS-PAGE, tinción con Coomassie, reactivo de Silver o de Schiff (datos no mostrados). Se inmunizaron ratones SJL/J hembra de 6-8 semana de edad dos veces con 50 µg de MBP<sub>87-99</sub> o conjugados de ciclo(83-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>-KLH-manano reducido en los días 0, 14.

##### (3) Inmunización con CFA-péptido

Se disolvieron péptidos MBP<sub>87-99</sub> o ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub> en PBS y se emulsionaron en un volumen igual de CFA (Sigma, VIC Australia). Se administraron ratones SJL/J con una inyección subcutánea que contenía 50 µg del péptido MBP<sub>87-99</sub> o ciclo(87-99)[A<sup>91</sup>, A<sup>96</sup>]MBP<sub>87-99</sub>.

##### (4) Ensayos inmunológicos - ELISpot y ELISA y análisis estadístico

Se llevaron a cabo ensayos de ELISpot para secreción de IFN-γ e IL-4 por linfocitos T y ensayos de ELISA para la unión de sueros a proteína MBP nativa o péptido como se describe previamente<sup>3, 4, 20, 21</sup>.

Se compararon valores medios usando la prueba de la *t* de Student bilateral. El valor umbral de *p* de *p*<0,01 indica una diferencia estadísticamente significativa.

##### Referencias para el Ejemplo 3

1. Katsara, M.; Matsoukas, J.; Deraos, G.; Apostolopoulos, V. Towards immunotherapeutic drugs and vaccines against multiple sclerosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008, 40, 636-42.
2. Katsara, M.; Tselios, T.; Deraos, S.; Deraos, G.; Matsoukas, M. T.; Lazoura, E.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Round and round we go: cyclic peptides in disease. *Curr Med Chem* 2006, 13, 2221-32.
3. Katsara, M.; Deraos, G.; Tselios, T.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Design of novel cyclic altered peptide ligands of myelin basic protein MBP83-99 that modulate immune responses in SJL/J mice. *J Med Chem* 2008, 51, 3971-8.
4. Katsara, M.; Yuriev, E.; Ramsland, P. A.; Deraos, G.; Tselios, T.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. Mannosylation of mutated MBP(83-99) peptides diverts immune responses from Th1 to Th2. *Mol Immunol* 2008, 45, 3661-70.

5. Apostolopoulos, V.; Barnes, N.; Pietersz, G. A.; McKenzie, I. F. Ex vivo targeting of the macrophage mannose receptor generates anti-tumor CTL responses. *Vaccine* 2000, 18,3174-84.
6. Apostolopoulos, V.; McKenzie, I. F. Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr Mol Med* 2001, 1, 469-74.
7. Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. A.; Gordon, S.; Martinez-Pomares, L.; McKenzie, I. F. Aldehyde-mannan antigen complexes target the MHC class I antigen-presentation pathway. *Eur J Immunol* 2000, 30, 1714-23.
8. Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. A.; Loveland, B. E.; Sandrin, M. S.; McKenzie, I. F. Oxidative/reductive conjugation of mannan to antigen selects for T1 or T2 immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92, 10128-32.
9. Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. A.; McKenzie, I. F. Cell-mediated immune responses to MUC1 fusion protein coupled to mannan. *Vaccine* 1996, 14, 930-8.
10. Sheng, K. C.; Pouniotis, D. S.; Wright, M. D.; Tang, C. K.; Lazoura, E.; Pietersz, G. A.; Apostolopoulos, V. Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells. *Immunology* 2006, 118, 372-83.
11. Bielekova, B.; Goodwin, B.; Richert, N.; Cortese, I.; Kondo, T.; Afshar, G.; Gran, B.; Eaton, J.; Antel, J.; Frank, J. A.; McFarland, H. F.; Martin, R. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 2000, 6, 1167-75.
12. Kappos, L.; Comi, G.; Panitch, H.; Oger, J.; Antel, J.; Conlon, P.; Steinman, L. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group. *Nat Med* 2000, 6, 1176-82.
13. Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V.; Kalbacher, H.; Papini, A. M.; Tselios, T.; Chantzantoni, 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.
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 MBP(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 (MBP) 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 MBP(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 MBP72-85: importance of the Ala81 carboxyl group and of a cyclic conformation for induction of experimental allergic encephalomyelitis. *J Med Chem* 1999, 42, 1170-7.
18. Apostolopoulos, V.; Karanikas, V.; Haurum, J. S.; McKenzie, I. F. Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J Immunol* 1997, 159, 5211-8.
19. Tselios, T. V.; Lamari, F. N.; Karathanasopoulou, I.; Katsara, M.; Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. A.; Matsoukas, J. M.; Karamanos, N. K. Synthesis and study of the electrophoretic behavior of mannan conjugates with cyclic peptide analogue of myelin basic protein using lysine-glycine linker. *Anal Biochem* 2005, 347, 121-8.
20. Apostolopoulos, V.; Yuriev, E.; Ramsland, P. A.; Halton, J.; Osinski, C.; Li, W.; Plebanski, M.; Paulsen, H.; McKenzie, I. F. A glycopeptide in complex with MHC class I uses the GalNAc residue as an anchor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 15029-34.
21. Katsara, M.; Yuriev, E.; Ramsland, P. A.; Deraos, G.; Tselios, T.; Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V. A double mutation of MBP(83-99) peptide induces IL-4 responses and antagonizes IFN-gamma responses. *J Neuroimmunol* 2008.

#### 55 Referencias para Antecedentes, Descripción y Ejemplo 1

- Abromson-Leeman, S. et al. T-cell properties determine disease site, clinical presentation, and cellular pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 165, 1519-33 (2004).
- 60 Acres, B., V. Apostolopoulos, J. M. Balloul, D. Wreschner, P. X. Xing, D. Ali-Hadji, N. Bizouarne, M. P. Kiény, and I. F. McKenzie. 2000. MUC1-specific immune responses in human MUC1 transgenic mice immunized with various human MUC1 vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 48:588-594.
- 65 Apostolopoulos, V., G. A. Pietersz, and I. F. McKenzie. 1996. Cell-mediated immune responses to MUC1 fusion protein coupled to mannan. *Vaccine* 14:930-938.

- Apostolopoulos, V., G. A. Pietersz, B. E. Loveland, M. S. Sandrin, and I. F. McKenzie. 1995. Oxidative/reductive conjugation of mannan to antigen selects for T1 or T2 immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10128-10132.
- 5 Apostolopoulos, V., V. Karanikas, J. S. Haurum, and I. F. McKenzie. 1997. Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J Immunol* 159:5211-5218.
- Apostolopoulos, V.; Lofthouse, S.; Popovski, V.; Chelvanayagam G.; Sandrin, M.; McKenzie I. *Nature Biot.* 1998, 16, 278.
- 10 Bankovich, A. J., A. T. Girvin, A. K. Moesta, and K. C. Garcia. 2004. Peptide register shifting within the MHC groove: theory becomes reality. *Molecular immunology* 40:1033-1039.
- Barlos, K., and D. Gatos. 1999. 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl/ tbutyl-based convergent protein synthesis. *Biopolymers* 51:266-278.
- 15 Barlos, K., D. Gatos, and S. Koutsogianni. 1998. Fmoc/Trt-amino acids: comparison to Fmoc/tBu-amino acids in peptide synthesis. *J Pept Res* 51:194-200.
- 20 Bauer, J. et al. T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am J Pathol* 153, 715-24 (1998).
- Berger, T. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Lab Invest* 76, 355-64 (1997).
- 25 Bieganowska, K. D., L. J. Ausubel, Y. Modabber, E. Slovik, W. Messersmith, and D. A. Hafler. 1997. Direct ex vivo analysis of activated, Fas-sensitive autoreactive T cells in human autoimmune disease. *J Exp Med* 185:1585-1594.
- 30 Brocke, S.; Gijbels, K.; Allegretta, M.; Ferber, I.; Piercy, C.; Blankenstein, T.; Martin, R.; Utz, U.; Karin, N.; Mitchell, D.; Veroma, T.; Waisman, A.; Gaur, A.; Conlon, P.; Ling, N.; Fairchild, P.; Wraith, D.; O'Carra, A.; Farhman, G.; Steinman, L. *Nature* 1996, 379, 343.
- 35 Bruggle, F.; Timmermans, M.; Van Unen, A.; Ten Hove, J.; Van De Werken, G.; Poolman, T.; Hoogerhout, P. J. *Pept. Sci.* 1999, 5,381.
- Chaloin, L.; Mery, J.; Van Mau, N.; Divita, G.; Heitz, F. *J. Pept. Sci.* 1999, 5, 381.
- 40 Corper, A. L., T. Stratmann, V. Apostolopoulos, C. A. Scott, K. C. Garcia, A. S. Kang, I. A. Wilson, and L. Teyton. 2000. A structural framework for deciphering the link between I-Ag7 and autoimmune diabetes. *Science* 288:505-511.
- Davis, W. C., R. L. Konzek, K. Haas, D. M. Estes, M. J. Hamilton, D. R. Call, V. Apostolopoulos, and I. F. McKenzie. 2002. Use of the mannan receptor to selectively target vaccine antigens for processing and antigen presentation through the MHC class I and class II pathways. *Ann N Y Acad Sci* 969:119-125.
- 45 Encinas, J. A. et al. Identification of genetic loci associated with paralysis, inflammation and weight loss in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol* 13, 257-64 (2001).
- 50 Fleming, K. K. et al. Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 170, 71-84 (2005).
- Fontoura, P., Garren, H. & Steinman, L. Antigen-specific therapies in Multiple Sclerosis: Going beyond proteins and peptides. *Int Rev Immunol* 24, 415-446 (2005).
- 55 Fremont, D. H., D. Monnaie, C. A. Nelson, W. A. Hendrickson, and E. R. Unanue. 1998. Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope of lysozyme. *Immunity* 8:305-317.
- 60 Gauthier, L., K. J. Smith, J. Pyrdol, A. Kalandadze, J. L. Strominger, D. C. Wiley, and K. W. Wucherpfennig. 1998. Expression and crystallization of the complex of HLA-DR2 (DRA, DRB1\*1501) and an immunodominant peptide of human myelin basic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11828-11833.
- 65 Grigoriadis, N., Ben-Hur, T., Karussis, D. & Milonas, I. Axonal damage in multiple sclerosis: a complex issue in a complex disease. *Clin Neurol Neurosurg* 106, 211-7 (2004).

- Hafler, D.; Weiner, H. *Immunol. Rev.* 1995, 144, 75.
- He, X. L., C. Radu, J. Sidney, A. Sette, E. S. Ward, and K. C. Garcia. 2002. Structural snapshot of aberrant antigen presentation linked to autoimmunity: the immunodominant epitope of MBP complexed with I-Au. *Immunity* 17:83-94.
- Iwai, H.; Pluckthun, A. *FEBS Lett.* 1999, 459, 166.
- Kalbus, M., B. T. Fleckenstein, M. Offenhausser, M. Bluggel, A. Melms, H. E. Meyer, H. G. Rammensee, R. Martin, G. Jung, and N. Sommer. 2001. Ligand motif of the autoimmune disease-associated mouse MHC class II molecule H2-A(s). *European journal of immunology* 31:551-562.
- Karanikas, V., L. A. Hwang, J. Pearson, C. S. Ong, V. Apostolopoulos, H. Vaughan, P. X. Xing, G. Jamieson, G. Pietersz, B. Tait, R. Broadbent, G. Thynne, and I. F. McKenzie. 1997. Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *J Clin Invest* 100:2783-2792.
- Krakowski, M. L. & Owens, T. Naive T lymphocytes traffic to inflamed central nervous system, but require antigen recognition for activation. *Eur J Immunol* 30, 1002-9 (2000).
- Krissinel, E., and K. Henrick. 2007. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J Mol Biol.*
- Krogsgaard, M., K. W. Wucherpfennig, B. Cannella, B. E. Hansen, A. Svejgaard, J. Pyrdol, H. Ditzel, C. Raine, J. Engberg, and L. Fugger. 2000. Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp Med* 191:1395-1412.
- Kuchroo, V. K., J. M. Greer, D. Kaul, G. Ishioka, A. Franco, A. Sette, R. A. Sobel, and M. B. Lees. 1994. A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire. *J Immunol* 153:3326-3336.
- Lambert, J. D., R. O. Meyers, B. N. Timmermann, and R. T. Dorr. 2001. Pharmacokinetic analysis by high-performance liquid chromatography of intravenous nordihydroguaiaretic acid in the mouse. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 754:85-90.
- Lassmann H. Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol*, 2007;163(6-7):651-5.
- Latek, R. R., A. Suri, S. J. Petzold, C. A. Nelson, O. Kanagawa, E. R. Unanue, and D. H. Fremont. 2000. Structural basis of peptide binding and presentation by the type I diabetes-associated MHC class II molecule of NOD mice. *Immunity* 12:699-710.
- Lees, C. J., V. Apostolopoulos, B. Acres, C. S. Ong, V. Popovski, and I. F. McKenzie. 2000. The effect of T1 and T2 cytokines on the cytotoxic T cell response to mannan-MUC 1. *Cancer Immunol Immunother* 48:644-652.
- Lees, C. J., V. Apostolopoulos, B. Acres, I. Ramshaw, A. Ramsay, C. S. Ong, and I. F. McKenzie. 2000. Immunotherapy with mannan-MUC1 and IL-12 in MUC1 transgenic mice. *Vaccine* 19:158-162.
- Liu, X., S. Dai, F. Crawford, R. Fruge, P. Marrack, and J. Kappler. 2002. Alternate interactions define the binding of peptides to the MHC molecule IA(b). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8820-8825.
- Lofthouse, S. A., V. Apostolopoulos, G. A. Pietersz, W. Li, and I. F. McKenzie. 1997. Induction of T1 (cytotoxic lymphocyte) and/or T2 (antibody) responses to a mucin-1 tumour antigen. *Vaccine* 15:1586-1593.
- Lourbopoulos, S. Grigoriadis, C. Symeonidou, G. Deretzi, N. Taskos, E. Shohami and N. Grigoriadis. Modified Bielschowsky silver impregnation combined with Hematoxylin or Cresyl Violet counterstaining as a potential tool for the simultaneous study of inflammation and axonal injury in the central nervous system. *Aristotle University Med J*, 2007;34:31-39.
- Martin, R., M. D. Howell, D. Jaraquemada, M. Flerlage, J. Richert, S. Brostoff, E. O. Long, D. E. McFarlin, and H. F. McFarland. 1991. A myelin basic protein peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis. *J Exp Med* 173:19-24.
- Martin, R.; McFarland, H.; McFarlin, D. *Ann. Rev. Immunol.* 1992, 10,153
- Matsoukas, J., V. Apostolopoulos, H. Kalbacher, A. M. Papini, T. Tselios, K. Chantzantoni, T. Biagioli, F. Lolli, S. Deraos, P. Papathanassopoulos, A. Troganis, E. Mantzourani, T. Mavromoustakos, and A. Mouzaki. 2005. 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* 48:1470-1480.

Mezo, G.; Majer, Z.; Valero, L.; Andreu, D.; Hudecz, F. *J. Pept. Sci.* 1999, 5, 272.

Moreau, T., A. Coles, M. Wing, J. Isaacs, G. Hale, H. Waldmann, and A. Compston. 1996. Transient increase in symptoms associated with cytokine release in patients with multiple sclerosis. *Brain* 119 (Pt 1):225-237.

Oligino, L.; Lung, T.; Sastry, L.; Bigelow, J.; Cao, T.; Curran, M.; Burke, R.; Wang, S.; Krag, D.; Roller, P.; King, R. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 29046.

Ota, K., M. Matsui, E. L. Milford, G. A. Mackin, H. L. Weiner, and D. A. Hafler. 1990. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346:183-187.

Papadopoulos, D., Pham-Dinh, D. & Reynolds, R. Axon loss is responsible for chronic neurological deficit following inflammatory demyelination in the rat. *Exp Neurol* 197, 373-85 (2006).

Pender MP, Rist MJ Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia*, 2001;36(2):137-44.

Reizis, B., M. Eisenstein, F. Mor, and I. R. Cohen. 1998. The peptide-binding strategy of the MHC class II I-A molecules. *Immunology today* 19:212-216.

Rudensky, A., P. Preston-Hurlburt, B. K. al-Ramadi, J. Rothbard, and C. A. Janeway, Jr. 1992. Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature* 359:429-431.

Scott, C. A., P. A. Peterson, L. Teyton, and I. A. Wilson. 1998. Crystal structures of two I-Ad-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues. *Immunity* 8:319-329.

Scott, P.; Abel-Santos, E.; Wall, M.; Wahnou, C.; Benkovic, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 16,16.

Smith, K. J., J. Pyrdol, L. Gauthier, D. C. Wiley, and K. W. Wucherpfennig. 1998. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA\*0101, DRB1\*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med* 188:1511-1520.

Sommer, N., R. Martin, H. F. McFarland, L. Quigley, B. Cannella, C. S. Raine, D. E. Scott, P. A. Loschmann, and M. K. Racke. 1997. Therapeutic potential of phosphodiesterase type 4 inhibition in chronic autoimmune demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 79:54-61.

Steinman, L. 1996. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85:299-302.

Suvannavejh GC, Dal Canto MC, Matis LA, Miller SD. Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2000; 105(2):223-31.

Tam, P.; Clavijo, P.; Lu, Y.; Nussenzweig, S.; Nussenzweig, S.; Zavala, F. *J. Exp. Med* 1990,171,299.

Tamilarasu, N.; Huq, I.; Rana, T. *Bioor. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 971.

Tselios, T. V., F. N. Lamari, I. Karathanasopoulou, M. Katsara, V. Apostolopoulos, G. A. Pietersz, J. M. Matsoukas, and N. K. Karamanos. 2005. Synthesis and study of the electrophoretic behavior of mannan conjugates with cyclic peptide analogue of myelin basic protein using lysine-glycine linker. *Anal Biochem* 347:121-128.

Tselios, T., I. Daliani, L. Probert, S. Deraos, E. Matsoukas, S. Roy, J. Pires, G. Moore, and J. Matsoukas. 2000. Treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) induced by guinea pig myelin basic protein epitope 72-85 with a human MBP(87-99) analogue and effects of cyclic peptides. *Bioorg Med Chem* 8:1903-1909.

Tselios, T., I. Daliani, S. Deraos, S. Thymianou, E. Matsoukas, A. Troganis, I. Gerothanassis, A. Mouzaki, T. Mavromoustakos, L. Probert, and J. Matsoukas. 2000. Treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by a rationally designed cyclic analogue of myelin basic protein (MBP) epitope 72-85. *Bioorg Med Chem Lett* 10:2713-2717.

Tselios, T., L. Probert, I. Daliani, E. Matsoukas, A. Troganis, I. P. Gerothanassis, T. Mavromoustakos, G. J. Moore, and J. M. Matsoukas. 1999. Design and synthesis of a potent cyclic analogue of the myelin basic protein

- epitope MBP72-85: importance of the Ala81 carboxyl group and of a cyclic conformation for induction of experimental allergic encephalomyelitis. *J Med Chem* 42:1170-1177.
- 5 Tselios, T., V. Apostolopoulos, I. Daliani, S. Deraos, S. Grdadolnik, T. Mavromoustakos, M. Melachrinou, S. Thymianou, L. Probert, A. Mouzaki, and J. Matsoukas. 2002. Antagonistic effects of human cyclic MBP(87-99) altered peptide ligands in experimental allergic encephalomyelitis and human T-cell proliferation. *J Med Chem* 45:275-283.
- 10 Valli, A., A. Sette, L. Kappos, C. Oseroff, J. Sidney, G. Miescher, M. Hochberger, E. D. Albert, and L. Adorini. 1993. Binding of myelin basic protein peptides to human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules and their recognition by T cells from multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 91:616-628.
- 15 Vaughan, H. A., D. W. Ho, V. A. Karanikas, C. S. Ong, L. A. Hwang, J. M. Pearson, I. F. McKenzie, and G. A. Pietersz. 1999. Induction of humoral and cellular responses in cynomolgus monkeys immunized with mannan-human MUC1 conjugates. *Vaccine* 17:2740-2752.
- Vergeli, M.; Hemmer, B.; Utz, U.; Vogt, A.; Kalbus, M.; Tranquill, L.; Conlon, P.; Ling, N.; Steinman, L.; McFarland, H.; Martin R. *Eur. J. Immunol.* 1996, 26, 2624.
- 20 Wallace, A. C., R. A. Laskowski, and J. M. Thornton. 1995. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering* 8:127-134.
- 25 Wang, J. H., R. Meijers, Y. Xiong, J. H. Liu, T. Sakihama, R. Zhang, A. Joachimiak, and E. L. Reinherz. 2001. Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10799-10804.
- Willenborg, D. O., and M. A. Staykova. 2003. Cytokines in the pathogenesis and therapy of autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol* 520:96-119.
- 30 Wucherpfennig, K. W., D. A. Hafler, and J. L. Strominger. 1995. Structure of human T-cell receptors specific for an immunodominant myelin basic protein peptide: positioning of T-cell receptors on HLA-DR2/peptide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8896-8900.
- Zamvil, S. S., and L. Steinman. 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8:579-621.
- 35 Zamvil, S., P. Nelson, J. Trotter, D. Mitchell, R. Knobler, R. Fritz, and L. Steinman. 1985. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 317:355-358.
- 40 Zhang, J., S. Markovic-Plese, B. Lacet, J. Raus, H. L. Weiner, and D. A. Hafler. 1994. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179:973-984.
- 45 Zhu, Y., A. Y. Rudensky, A. L. Corper, L. Teyton, and I. A. Wilson. 2003. Crystal structure of MHC class II I-Ab in complex with a human CLIP peptide: prediction of an I-Ab peptide-binding motif. *J Mol Biol* 326:1157-1174.

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (I),



en la que K<sup>91</sup> está sustituido con un aminoácido seleccionado de A, R, E, F e Y y P<sup>96</sup> está sustituido con el aminoácido A, en la que dicho péptido está en forma lineal o cíclica.

10    2. Un péptido según cualquier reivindicación precedente que está seleccionado de los siguientes:

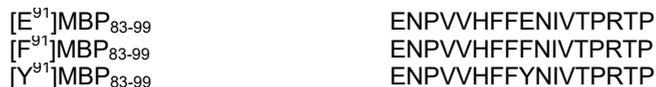


3. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (Ib),



en la que al menos uno de K<sup>91</sup> y P<sup>96</sup> está sustituido con un aminoácido seleccionado de R, E, F e Y.

20    4. Un péptido según la reivindicación 3 que está seleccionado de los siguientes:



5. Un péptido según cualquier reivindicación precedente en la que el péptido está en forma cíclica.

25    6. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de fórmula (IIa),



en la que K<sup>91</sup> está sustituido con el aminoácido A y P<sup>96</sup> está sustituido con el aminoácido A, y en la que dicho péptido está ciclado cabeza a cola.

30    7. Un conjugado que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y manano, preferentemente donde el manano es manano reducido.

35    8. Un conjugado según la reivindicación 7, en el que el péptido está unido al manano mediante un grupo conector, más preferentemente donde el grupo conector es una hemocianina de lapa californiana (KLH).

9. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, para su uso en medicina.

40    10. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno inmunitario.

45    11. Uso según la reivindicación 10, en el que el trastorno inmunitario es una enfermedad autoinmunitaria, preferentemente esclerosis múltiple (EM), o encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

12. Una composición farmacéutica que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, mezclado con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

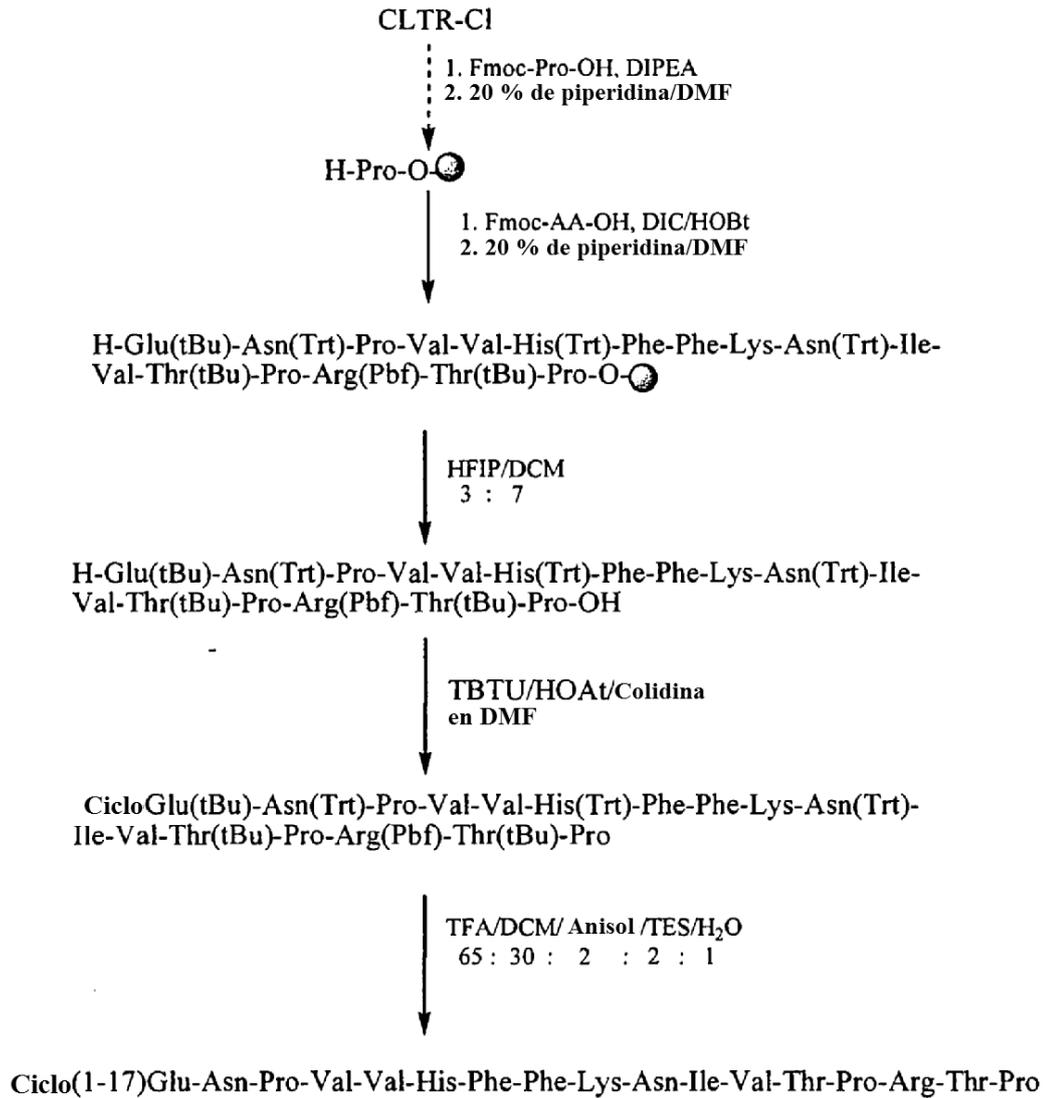
50    13. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, en un ensayo para dilucidar agentes capaces de regular encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) o regular esclerosis múltiple.

55    14. Un proceso de preparación de un conjugado según la reivindicación 8, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- (i) hacer reaccionar un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 con una hemocianina de lapa californiana (KLH);
- (ii) hacer reaccionar el producto formado en la etapa (i) con manano oxidado; y
- (iii) reducir el producto formado en la etapa (ii) para formar un conjugado de manano reducido.

60

15. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.
- 5 16. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 para su uso en desviar la respuesta inmunitaria en un sujeto de una respuesta Th1 a una respuesta Th2 o para inducir una respuesta inmunitaria específica de Th2 en un sujeto.
- 10 17. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que el péptido o conjugado va a administrarse en una cantidad suficiente para modular inversamente las respuestas Th1 y Th2 de linfocitos en el sujeto para aumentar la respuesta Th2 y disminuir la respuesta Th1, respectivamente, por encima y por debajo de los niveles que prevalecen sin dicho tratamiento.
- 15 18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, va a administrarse en una cantidad suficiente para potenciar/inducir la respuesta de tipo Th2 en un sujeto, en comparación con la respuesta de tipo Th2 antes de la administración de péptido/conjugado y reducir la respuesta de tipo Th1 en comparación con la respuesta de tipo Th1 antes de la administración de péptido/conjugado.
- 20 19. Una composición de vacuna que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8.
- 20 20. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 en la preparación de una composición de vacuna.



**FIGURA 1**

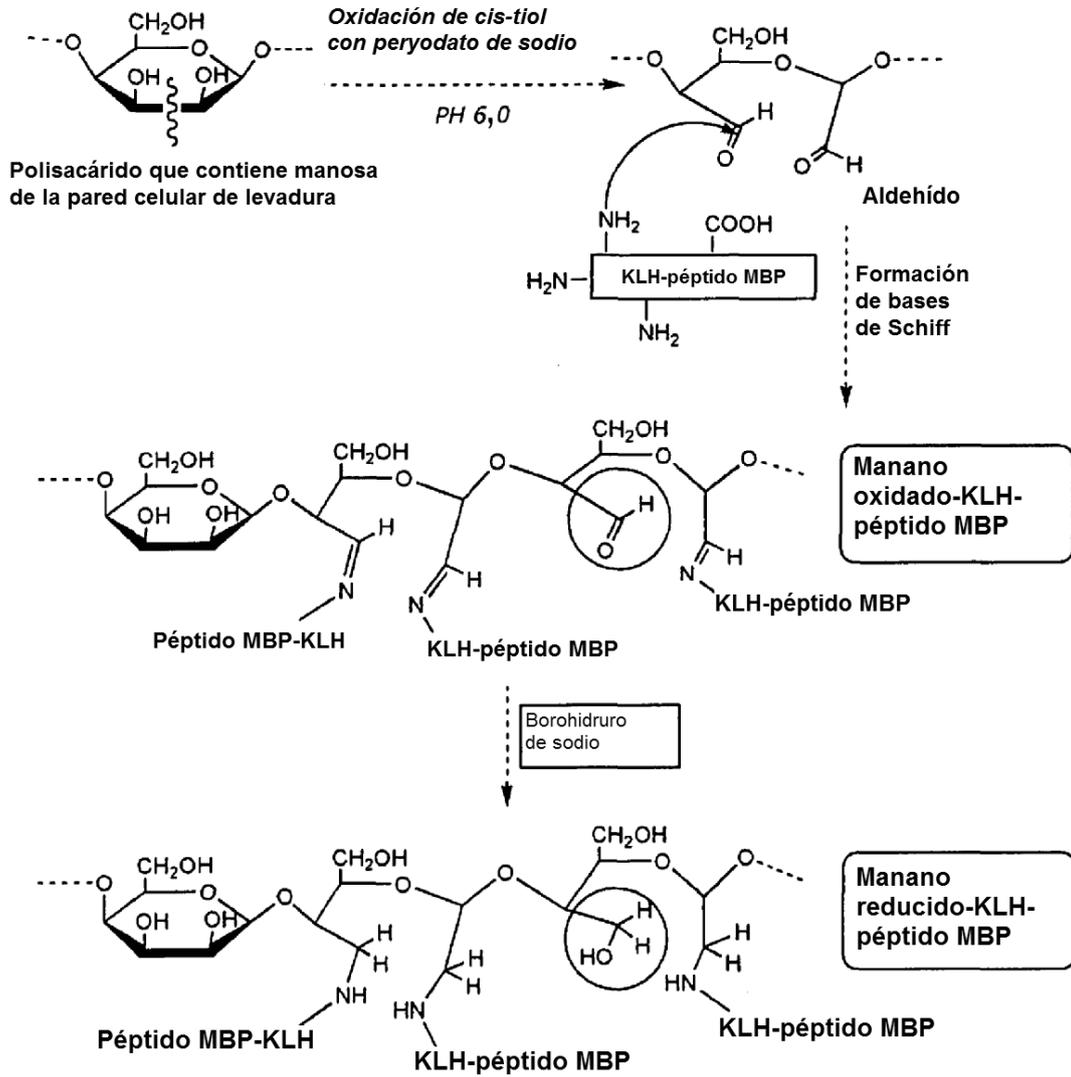


FIGURA 2

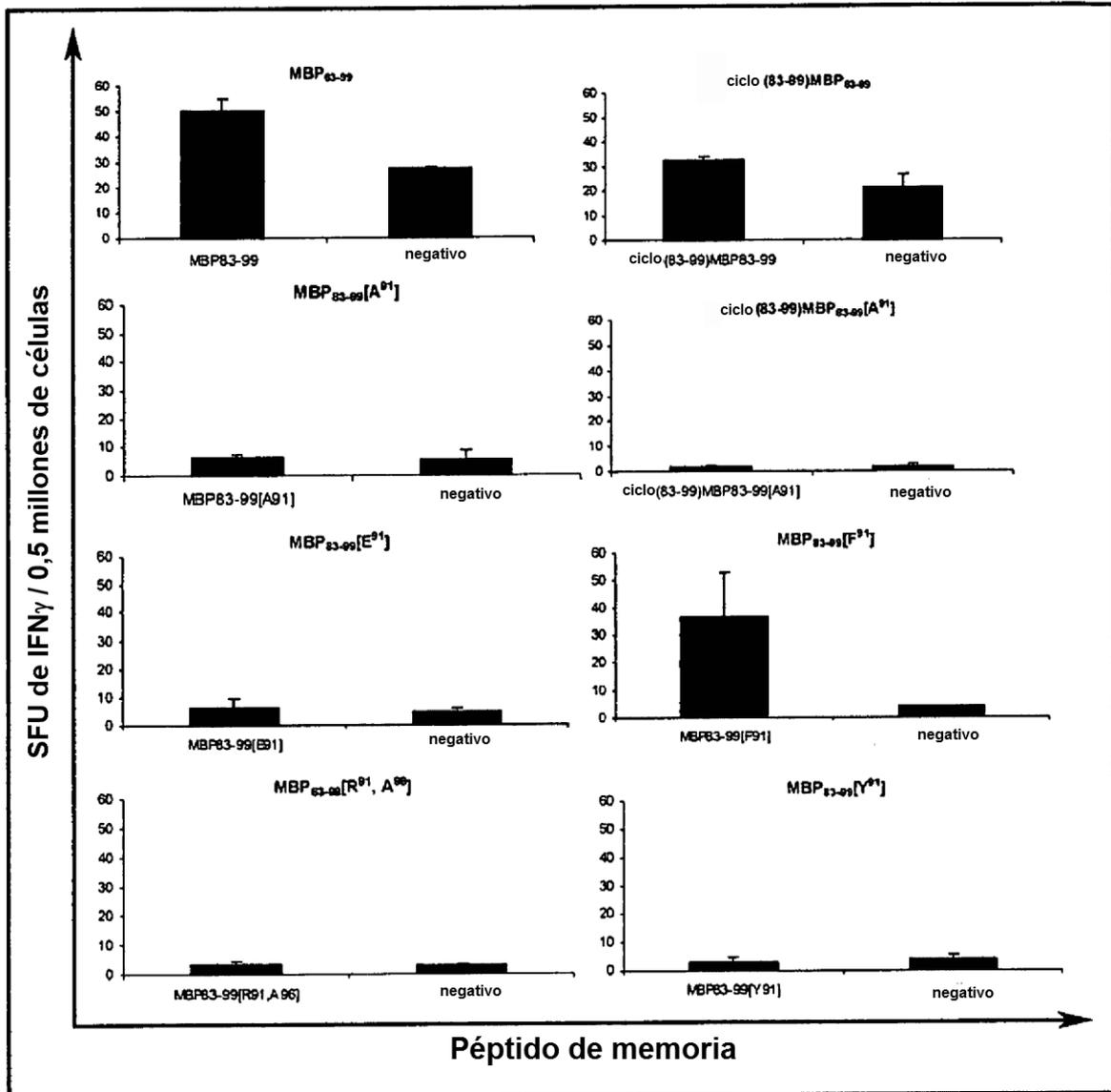


FIGURA 3

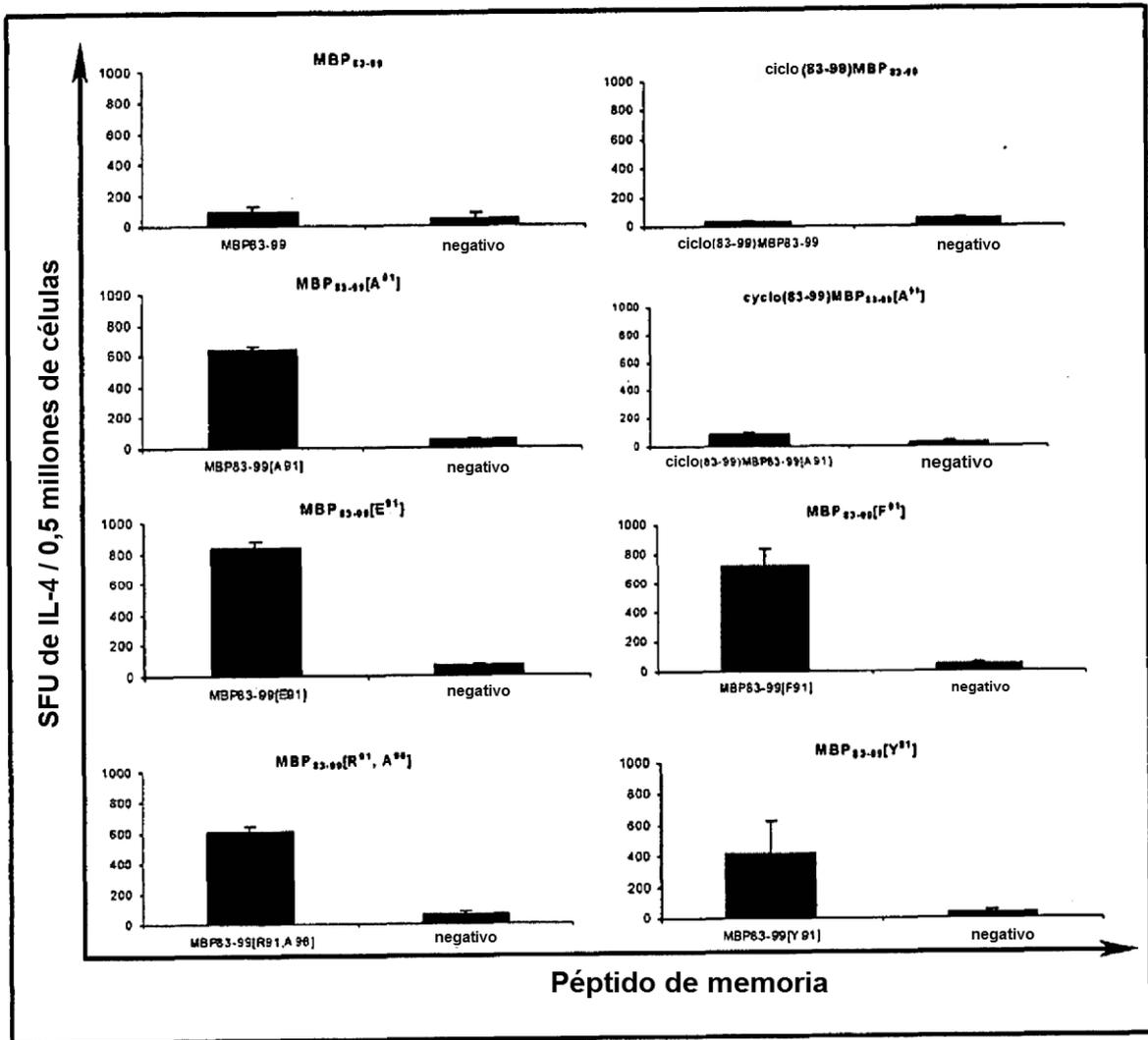


FIGURA 4

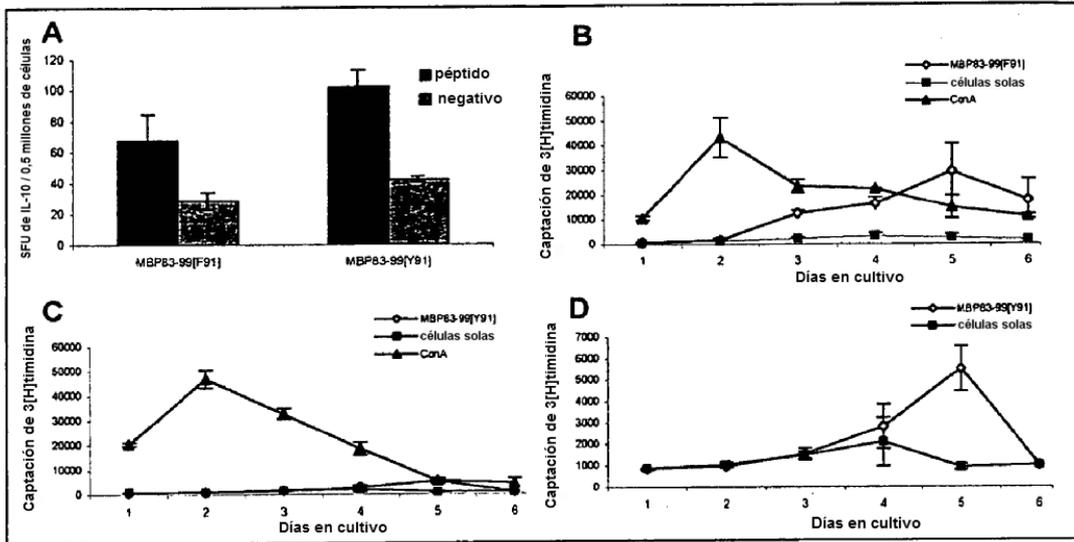


FIGURA 5

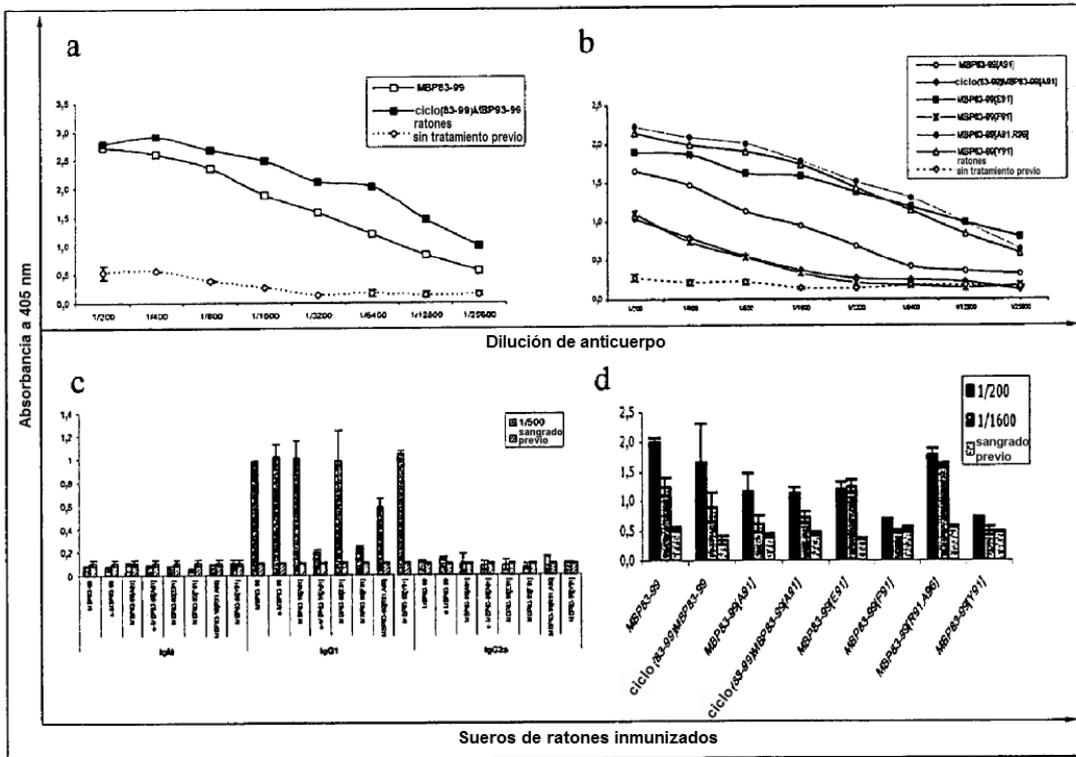


FIGURA 6

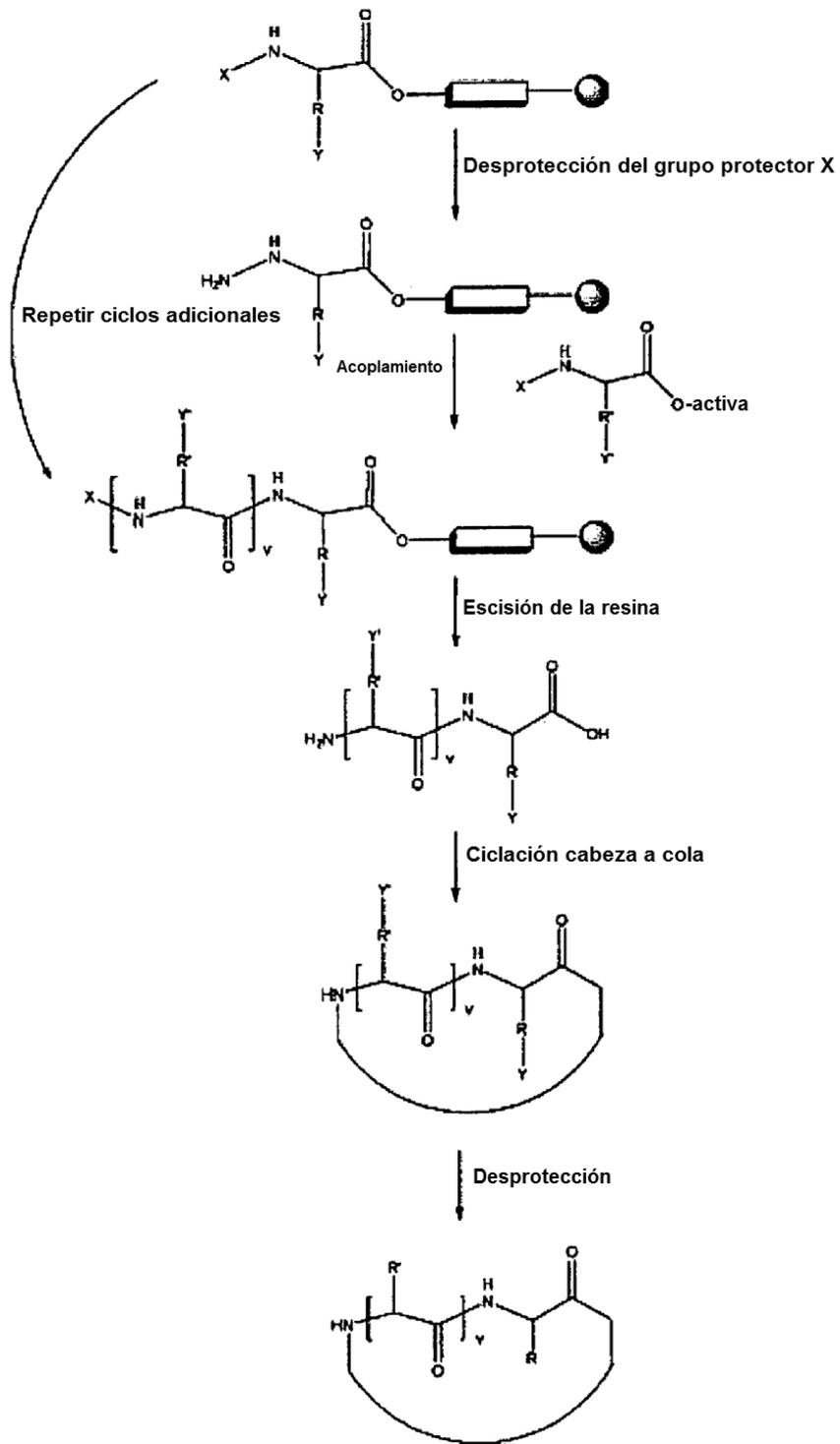


FIGURA 7

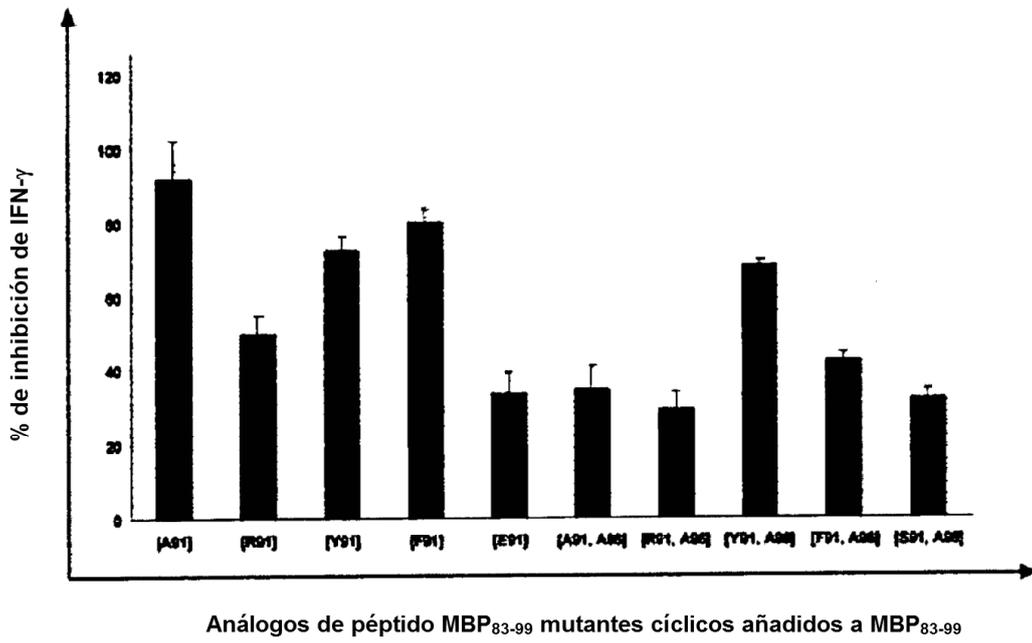


Figura 8

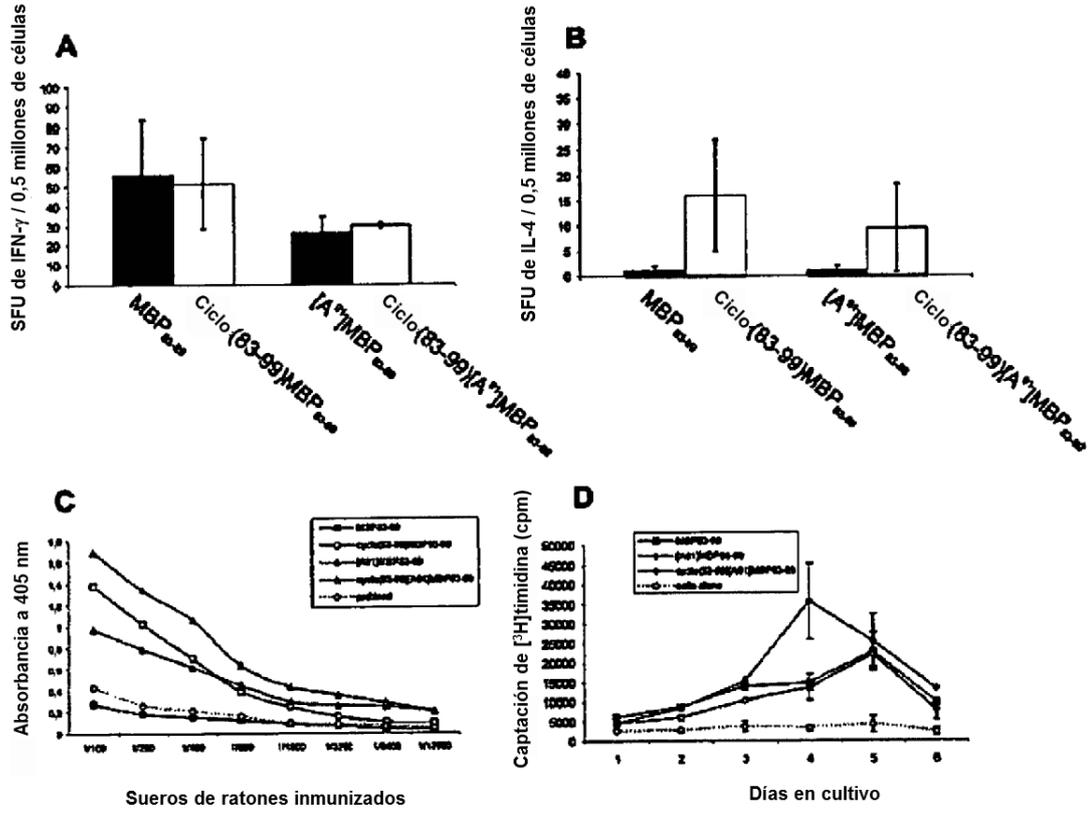


Figura 9

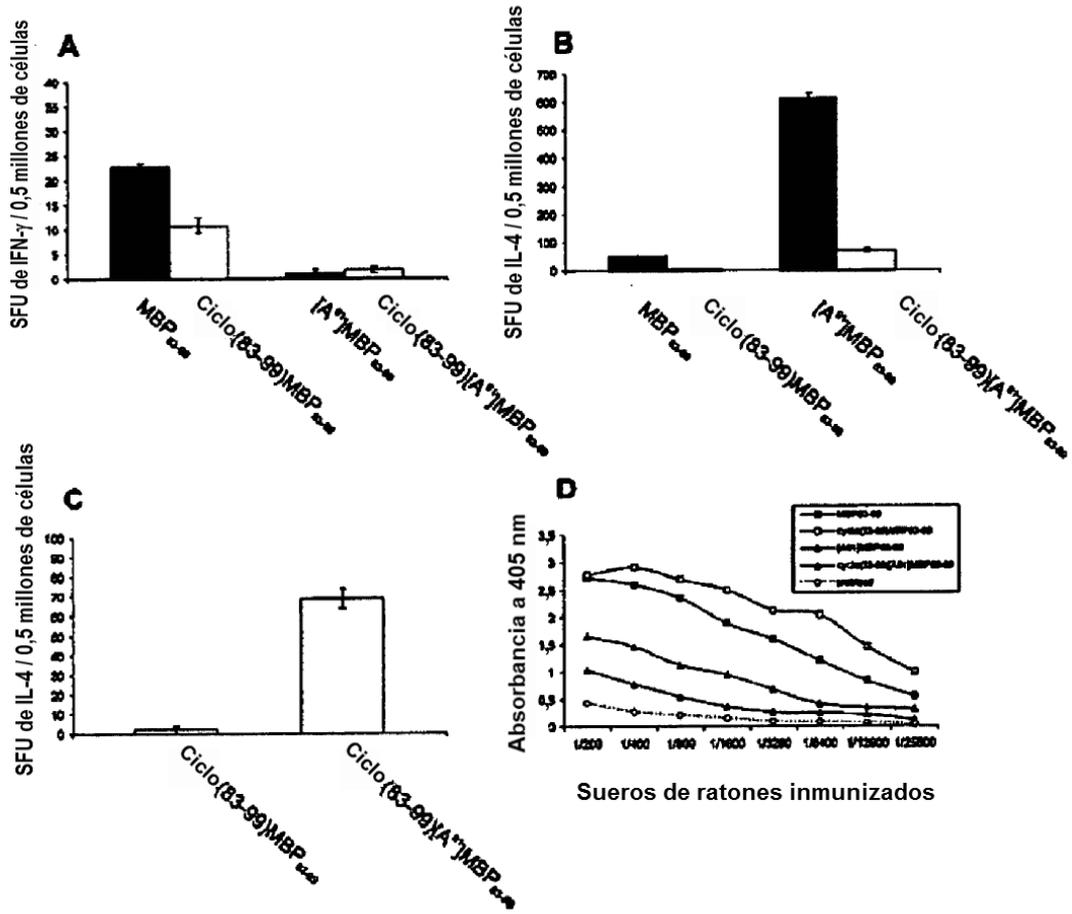


FIGURA 10

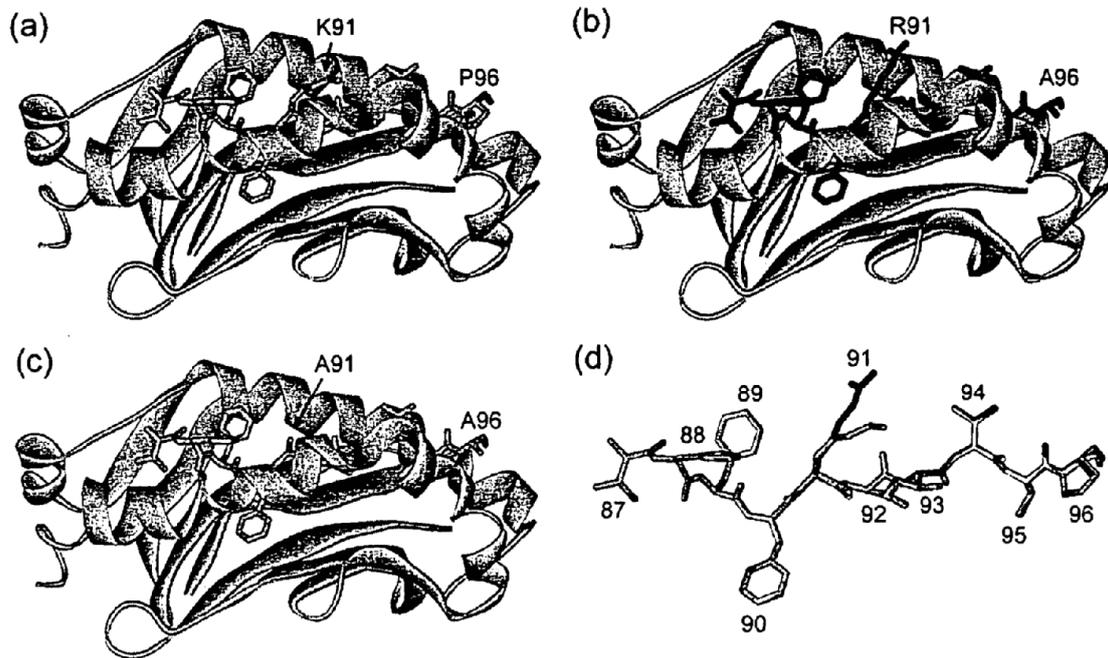


FIGURA 11

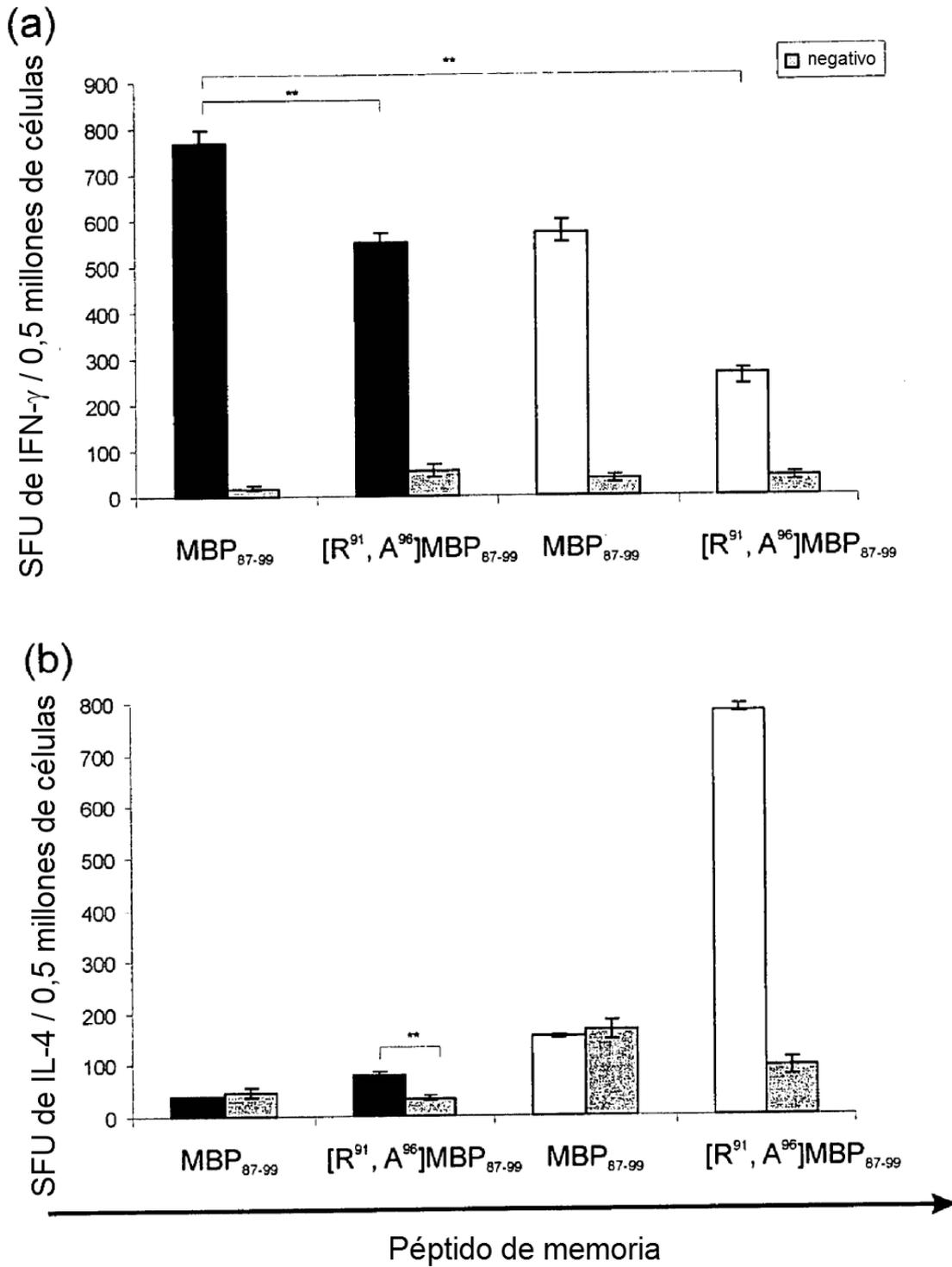


FIGURA 12

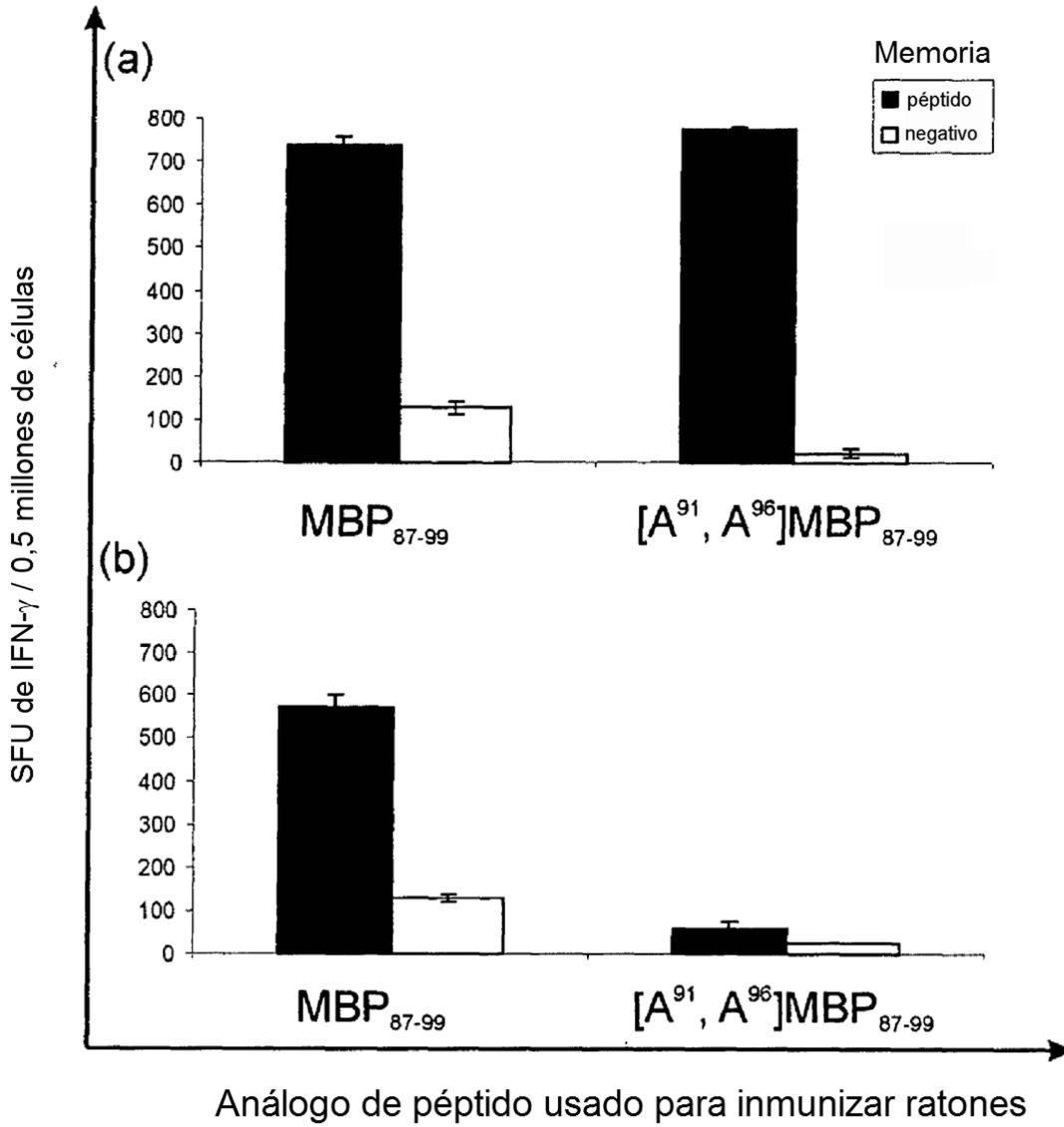


FIGURA 13

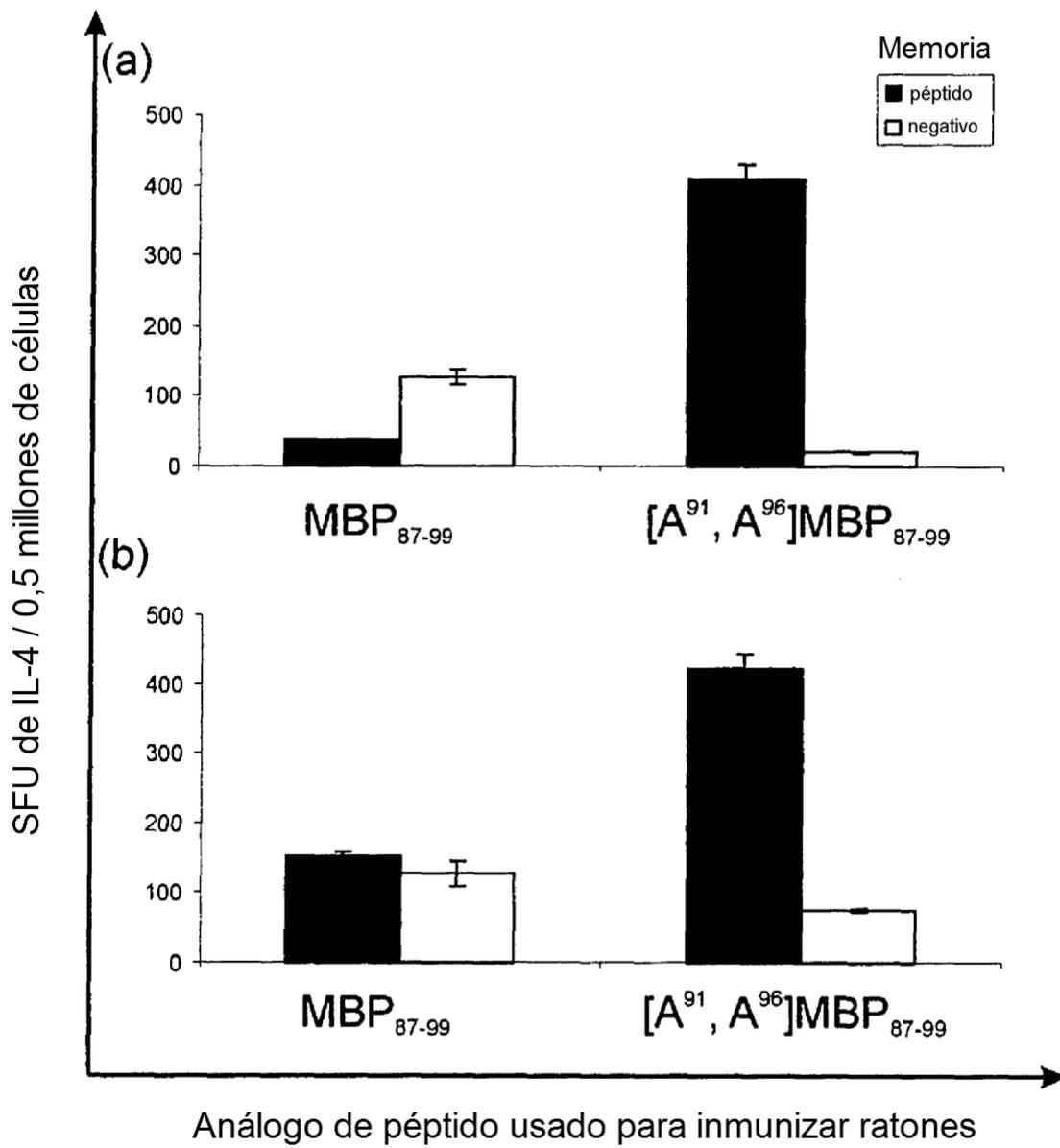


FIGURA 14

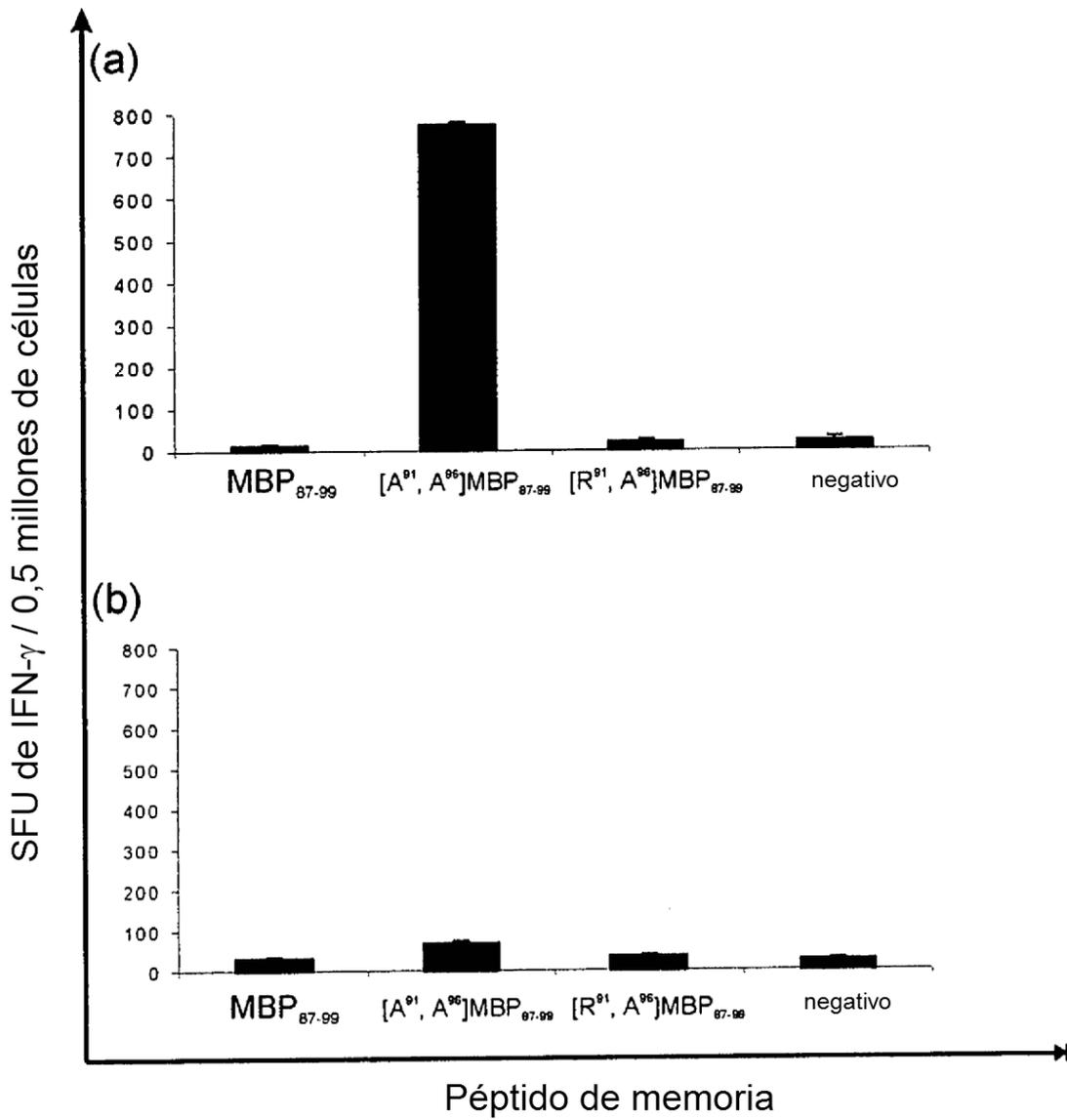


FIGURA 15

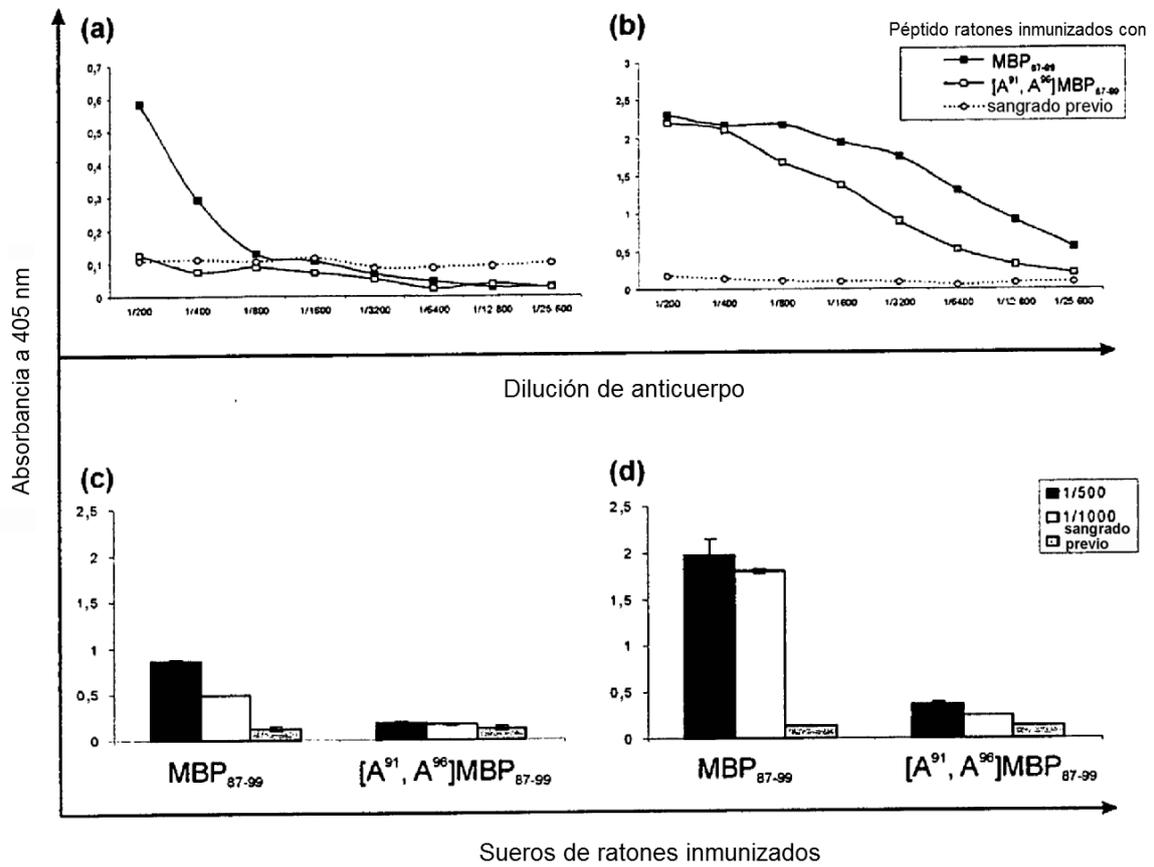


FIGURA 16

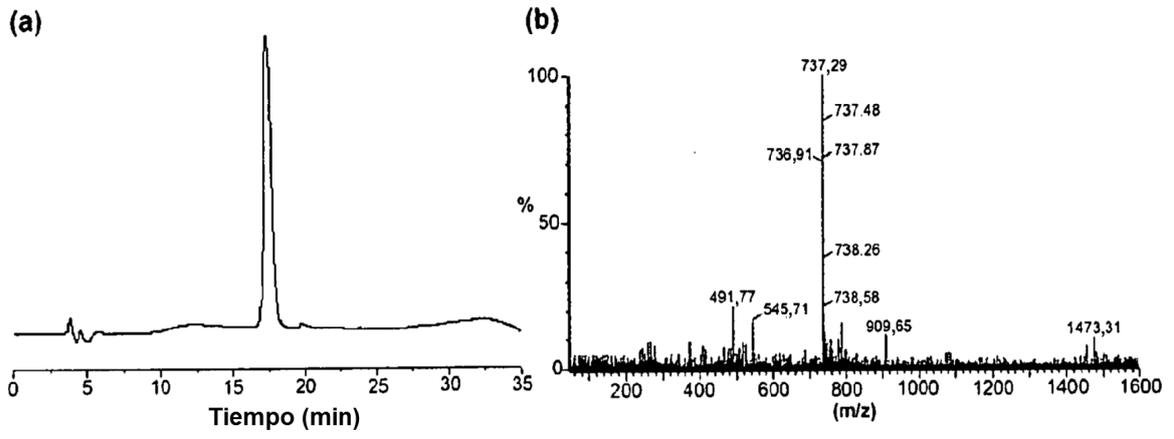


FIGURA 17

Péptido		MHC		MBP <sub>87-96</sub>	[A <sup>91</sup> ,A <sup>96</sup> ]MBP <sub>87-96</sub>	[R <sup>91</sup> ,A <sup>96</sup> ]MBP <sub>87-96</sub>
resto	átomo	resto	átomo			
V <sup>87</sup>	N	S <sup>53</sup> (A) <sup>†</sup>	O	+	+	+
H <sup>88</sup>	N	N <sup>82</sup> (B)*	OD1	+	-	+
H <sup>88</sup>	NE2	E <sup>74</sup> (B)	OE2	+	+	+
H <sup>88</sup>	O	N <sup>82</sup> (B)	ND2	+	+	+
H <sup>88</sup>	NE2	T <sup>77</sup> (B)	OG1	-	+	-
F <sup>90</sup>	N	Y <sup>9</sup> (A)	O	+	-	+
K <sup>91</sup> /A <sup>91</sup> /R <sup>91</sup>	N	E <sup>74</sup> (B)	OE1	+	-	+
K <sup>91</sup>	NZ	Q <sup>70</sup> (B)	OE1	+	n/a <sup>#</sup>	+ <sup>§</sup>
N <sup>92</sup>	N	N <sup>62</sup> (A)	OD1	+	+	+
N <sup>92</sup>	ND2	N <sup>62</sup> (A)	O	+	+	+
I <sup>93</sup>	N	Y <sup>30</sup> (B)	OH	+	+	+
V <sup>94</sup>	N	Y <sup>67</sup> (B)	OH	+	-	+
V <sup>94</sup>	O	Y <sup>67</sup> (B)	OH	+	-	+
T <sup>95</sup>	O	Y <sup>68</sup> (A)	OH	+	-	+
P <sup>96</sup> /A <sup>96</sup>	N	D <sup>57</sup> (B)	OD1	-	+	-

<sup>†</sup> cadena  $\alpha$ , \*cadena  $\beta$ , #no aplicable, <sup>§</sup>el átomo NH1 de R<sup>91</sup> en el péptido hace este contacto

**FIGURA 18**

resto de péptido	resto de MHC	MBP <sub>87-96</sub>	[A <sup>91</sup> ,A <sup>96</sup> ]MBP <sub>87-96</sub>	[R <sup>91</sup> ,A <sup>96</sup> ]MBP <sub>87-96</sub>
V <sup>87</sup>	Y <sup>9</sup> (A) <sup>†</sup>	+	-	+
V <sup>87</sup>	F <sup>54</sup> (A)	+	+	+
V <sup>87</sup>	H <sup>81</sup> (B)*	+	-	-
V <sup>87</sup>	N <sup>82</sup> (B)	+	-	+
H <sup>88</sup>	E <sup>74</sup> (B)	+	+	+
H <sup>88</sup>	T <sup>77</sup> (B)	+	+	+
H <sup>88</sup>	V <sup>78</sup> (B)	+	+	+
F <sup>89</sup>	Y <sup>9</sup> (A)	+	-	+
F <sup>89</sup>	F <sup>54</sup> (A)	+	+	+
F <sup>89</sup>	G <sup>58</sup> (A)	+	+	+
F <sup>89</sup>	V <sup>78</sup> (B)	-	+	-
F <sup>90</sup>	F <sup>11</sup> (B)	+	+	+
F <sup>90</sup>	G <sup>13</sup> (B)	+	+	+
F <sup>90</sup>	E <sup>14</sup> (B)	+	+	+
F <sup>90</sup>	C <sup>15</sup> (B)	+	+	+
F <sup>90</sup>	V <sup>78</sup> (B)	+	+	-
F <sup>90</sup>	C <sup>79</sup> (B)	-	+	-
K <sup>91</sup>	Q <sup>70</sup> (B)	+	n/a <sup>§</sup>	n/a
R <sup>91</sup> /A <sup>91</sup>	F <sup>11</sup> (B)	n/a	+	+
R <sup>91</sup>	Y <sup>67</sup> (B)	n/a	n/a	+
N <sup>92</sup>	T <sup>65</sup> (A)	+	+	+
N <sup>92</sup>	F <sup>11</sup> (B)	+	+	+
I <sup>93</sup>	T <sup>65</sup> (A)	+	+	+
I <sup>93</sup>	Y <sup>61</sup> (B)	+	+	+
I <sup>93</sup>	Y <sup>67</sup> (B)	+	+	+
V <sup>94</sup>	T <sup>65</sup> (A)	+	-	+
V <sup>94</sup>	Y <sup>61</sup> (B)	-	+	-
V <sup>94</sup>	Y <sup>68</sup> (A)	+	+	+
T <sup>95</sup>	D <sup>57</sup> (B)	+	+	+
T <sup>95</sup>	T <sup>69</sup> (A)	-	+	+
T <sup>95</sup>	Y <sup>61</sup> (B)	-	+	-
P <sup>96</sup>	Y <sup>60</sup> (B)	+	n/a	n/a

† cadena  $\alpha$ , \*cadena  $\beta$ , #no aplicable.

**FIGURA 19**

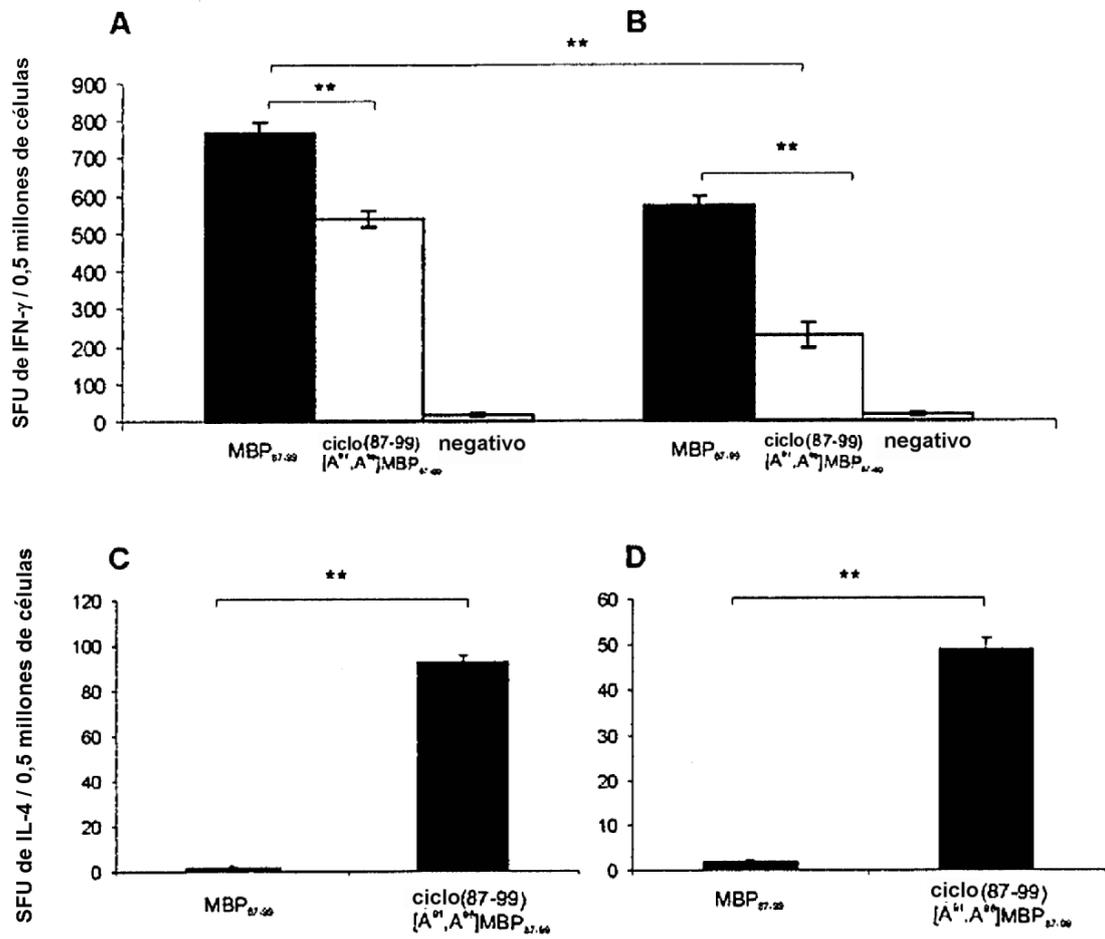


FIGURA 20

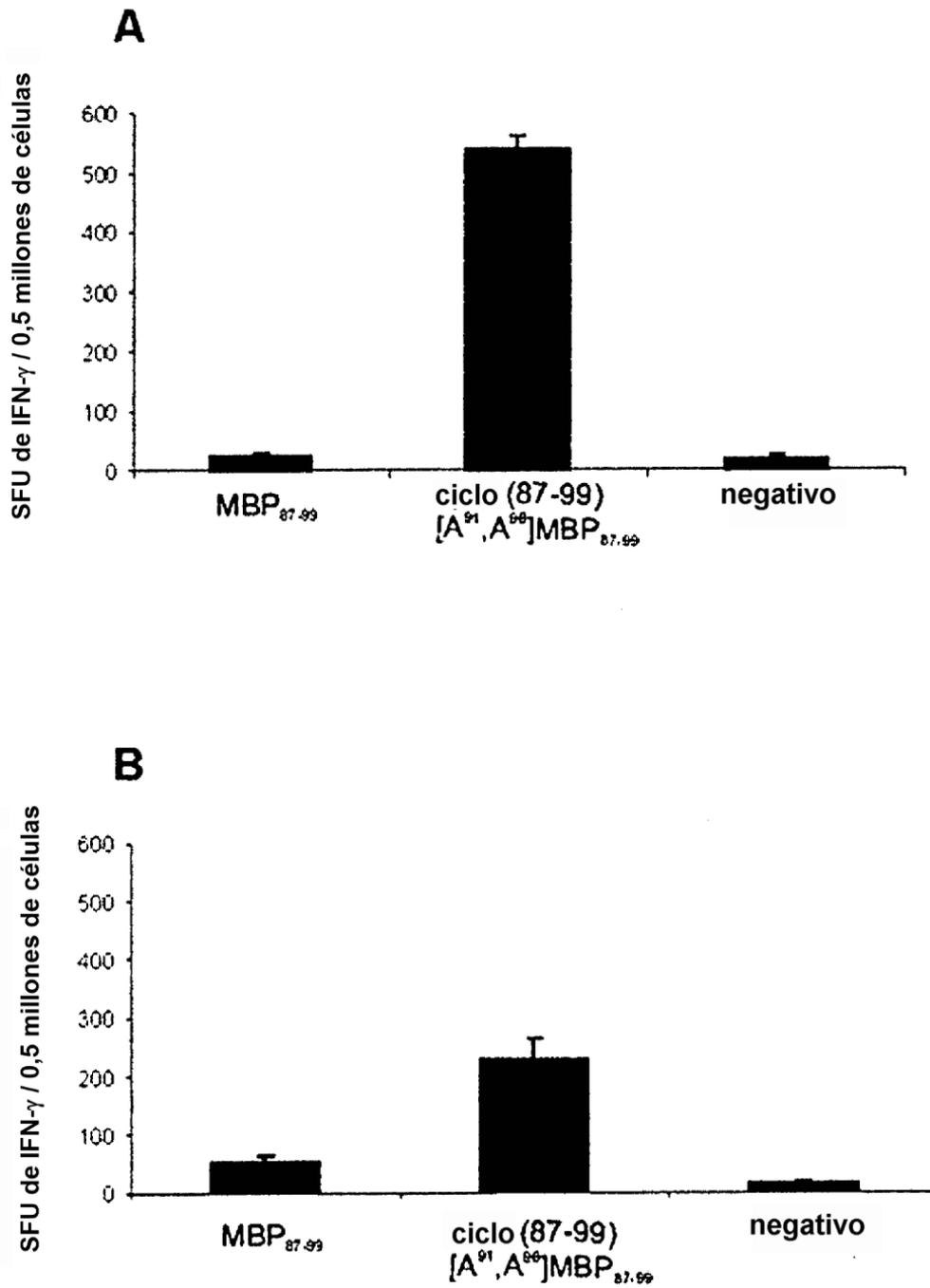


FIGURA 21

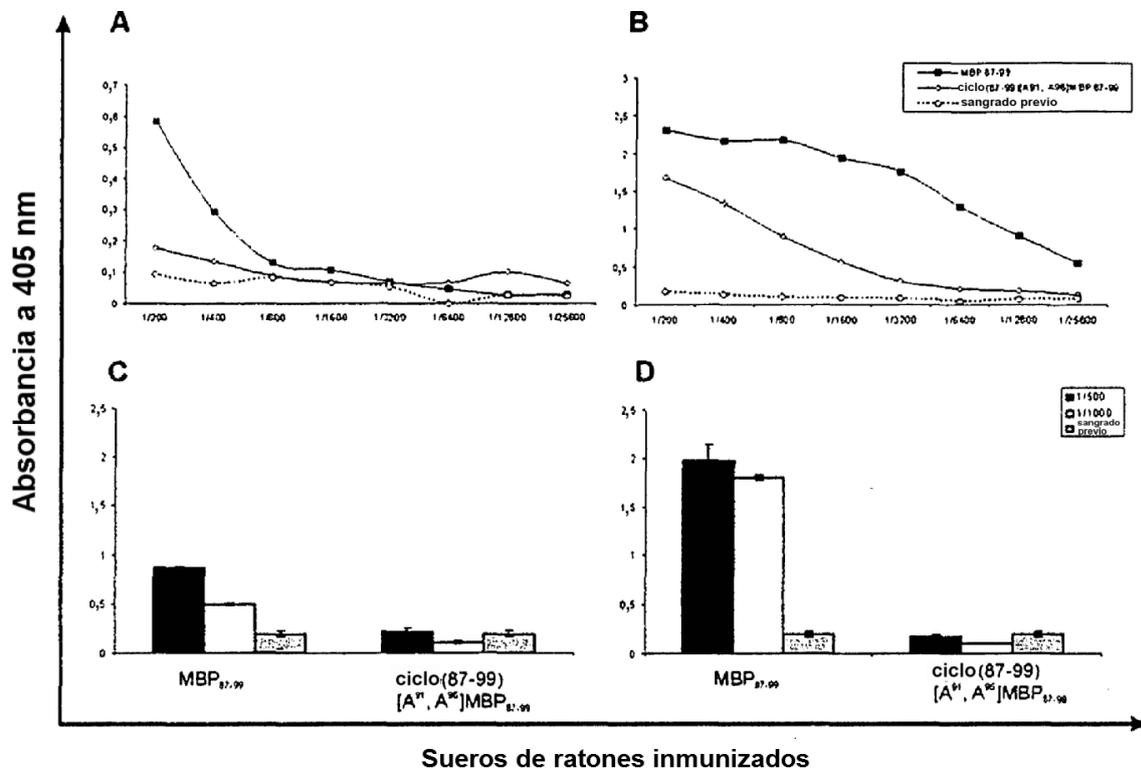


FIGURA 22