

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 833**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2005 PCT/US2005/016441**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2005 WO05110456**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2005 E 05747869 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 1751300**

54 Título: **Epítomos que inducen la muerte de células T**

30 Prioridad:

11.05.2004 US 570161 P

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

21.02.2018

73 Titular/es:

**ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A. (100.0%)
Kingsfordweg 103
1043 GP Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**LIN, RONGHWA y
CHANG, CHUNG NAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 655 833 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

Epítomos que inducen la muerte de células T

SOLICITUD RELACIONADA

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° de Serie 60/570.161, presentada el 11 de Mayo de 2004.

ANTECEDENTES

- 10 El control de respuestas inmunitarias indeseadas es crítico para tratar enfermedades autoinmunitarias, un rechazo de trasplantes, enfermedades alérgicas y cánceres que se derivan de células T. La actividad de células T demasiado agresivas se puede refrenar por inmunosupresión o por inducción de tolerancia inmunológica. Se cree que una apoptosis está implicada en mantener apropiadas funciones del sistema inmunitario y eliminar células indeseadas, tales como células T demasiado agresivas (Kabelitz y colaboradores (1993) *Inmunol Today* 14,338-340; y Raff (1992) *Nature* 356, 397-399).

SUMARIO

- 15 Este invento se refiere a unos epítomos que inducen la muerte de células T. Los epítomos se pueden usar para, entre otras cosas, seleccionar compuestos que se fijan a los epítomos. Tales compuestos son útiles para tratar enfermedades que implican a células T demasiado agresivas. Ejemplos de tales enfermedades incluyen enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, enfermedades alérgicas y cánceres derivados de células T.

- 20 En un aspecto, el invento tiene la característica de un epítipo aislado que comprende X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 , en donde la fijación de un ligando al epítipo sobre células T activadas induce la muerte de las células, y
 25 X_1 es Tyr, Trp, His o Met;
 X_2 es Asp;
 X_3 es Ser, Phe, Pro, Glu o His;
 X_4 es cualquier aminoácido; y
 X_5 es Pro, Tyr, His o Trp,
 y además en donde el epítipo no es SEQ ID NO:5.

- 30 Opcionalmente, el epítipo se selecciona entre el conjunto que se compone de las SEQ ID NOs:4 y 6-13.

- En otro aspecto, el invento tiene la característica de un epítipo aislado que comprende X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} , en donde la fijación de un ligando al epítipo sobre células T activadas induce la muerte de las células, y
 35 X_6 es Asp;
 X_7 es Tyr, Met, Asn, Trp o Phe;
 X_8 es Phe o Leu;
 X_9 es Pro; y
 X_{10} es Glu,
 40 y además en donde el epítipo no es SEQ ID NO:19.

Opcionalmente, el epítipo se selecciona entre el conjunto que se compone de las SEQ ID Nos:14-18.

- 45 En otro aspecto, el invento tiene la característica de un epítipo aislado que comprende X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} , en donde la fijación de un ligando al epítipo sobre células T activadas induce la muerte de las células, y
 X_{11} es Pro;
 X_{12} es Met;
 X_{13} es Glu o Ser; y
 X_{14} es Ile.

- 50 Opcionalmente, el epítipo se selecciona entre el conjunto que se compone de las SEQ ID NOs: 20-22.

- 55 Cualquiera de esos epítomos más arriba descritos puede ser, p. ej., un polipéptido, una región interactuante de dos polipéptidos, un resto de hidrato de carbono, una glicoproteína, o cualquier equivalente funcional, conformacional suyo.

- 60 En otro aspecto, el invento tiene la característica de un polipéptido aislado que contiene el epítipo X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 , X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} o X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} definido en las reivindicaciones. La fijación de un ligando al polipéptido sobre células T activadas induce la muerte de las células. En una forma de realización, el polipéptido contiene de 4 a 400 aminoácidos (p. ej., cualquier número entero entre 4 y 400, inclusive). Por ejemplo, el polipéptido puede ser X_1 - X_2 -

X₃-X₄-X₅ (SEQ ID NO:1), X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO:2), X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO:3), o cualquiera de las SEQ ID NOs:4, 6-18 y 20-22.

Un "epítipo aislado" o "polipéptido aislado" se refiere a un epítipo o polipéptido sustancialmente libre de moléculas asociadas de un modo natural, es decir, él es puro por lo menos en un 75% (p. ej., cualquier número entre 75% y 100%, inclusive) por peso en seco. La pureza se puede medir por cualquier apropiado método clásico, por ejemplo, por cromatografía en columna, electroforesis en gel de poli(acrilamida) o análisis por HPLC. Un epítipo o polipéptido aislado del invento se puede purificar a partir de una fuente natural, producir por técnicas de ADN recombinante, o por métodos químicos.

La divulgación tiene la característica de un nuevo compuesto que se fija a uno de los epítipos más arriba descritos. El compuesto puede ser cualquier clase de molécula, incluyendo anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales. Un compuesto de la divulgación se puede usar para detectar un epítipo del invento y para inducir la muerte de células T activadas.

También está dentro del alcance del invento un método de producir anticuerpos. El método implica administrar a un individuo no humano una cantidad efectiva de uno de los epítipos más arriba descritos (p. ej., polipéptidos). Los anticuerpos se pueden usar para detectar un epítipo del invento o para inducir la muerte de células T activadas.

El invento tiene también la característica de un método de identificar a un compuesto candidato (p. ej., un anticuerpo monoclonal) para inducir la muerte de células T activadas. El método implica poner en contacto un compuesto de ensayo con un epítipo del invento y determinar si el compuesto de ensayo se fija al epítipo. Si el compuesto de ensayo se fija al epítipo, él es un candidato para inducir la muerte de células T activadas.

La divulgación tiene además la característica de un método de inducir la muerte de células T activadas por puesta en contacto de células T activadas con un compuesto de la divulgación.

En todavía otro aspecto, el invento tiene la característica de una composición farmacéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable y (1) un epítipo del invento, tal como un polipéptido.

El invento proporciona unas composiciones para tratar enfermedades que implican a células T demasiado agresivas tales como enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, enfermedades alérgicas y cánceres derivados de células T. Los detalles de una o más formas de realización del invento se exponen en la descripción acompañante más abajo. Otras características, objetos, y ventajas del invento resultarán evidentes a partir de la descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Este invento está basado en el inesperado descubrimiento de que se puede inducir a células T activadas a someterse a una apoptosis y a agotarse por compromiso de nuevos epítipos que inducen la muerte de células T. Una depleción de células T activadas es particularmente útil para tratar condiciones asociadas con una excesiva o indeseada respuesta inmunitaria mediada por células T o proliferación de células T. Por ejemplo, una depleción de células T activadas puede dar como resultado una reducción o eliminación de la indeseable actividad o una proliferación de células T relacionada con enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, enfermedades alérgicas, o cánceres derivados de células T.

Correspondientemente, la divulgación tiene la característica de una conformación tridimensional de un epítipo aislado. La fijación de un ligando al epítipo sobre células T activadas induce la muerte de las células. El epítipo es definido en las reivindicaciones. La conformación tridimensional de X₁-X₂-X₃-X₄-X₅, X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ o X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ puede ser determinada, p. ej., usando programas de modelado por ordenador como se describen en las referencias de Duggan y colaboradores, (1995) J Med Chem. 38: 3332-41 y Toogood (2002) J Med Chem. 45: 1543-57. Epítipos con equivalencia funcional, conformacional, se pueden diseñar de acuerdo con la conformación tridimensional de X₁-X₂-X₃-X₄-X₅, X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ o X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄, preparados usando métodos conocidos en la especialidad, y ensayados en cuanto a sus capacidades para ser implicados en la inducción de muerte de células T activadas por métodos tales como el que se describe en el ejemplo presentado más abajo. Véanse, p. ej., Barbas y colaboradores (2001) Phage display. A laboratory manual. CSHL Press; Parmley y colaboradores (1998) Gene 73,305-318; Scott y colaboradores (1990) Science 249, 386-390; Solicitud de Patente de los EE.UU. N°. 20030049252 A1; Documento WO 03/013603 A1; Osborne (1996) Curr Opin Immunol 8:245-248; Lin y colaboradores (1997) J. Immunol. 158, 598-603; Zhang y colaboradores (1995) Nature 377, 348-350; Lai y colaboradores (1995) Eur J Immunol 25, 3243-3248; Mollereau y colaboradores (1996) J Immunol 156; 3184-3190; y Gribben y colaboradores (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92, 811-815.

Como se usa en el presente contexto, una "célula T activada" es una célula T que tiene una frecuencia, tasa o extensión de proliferación más alta que la de una célula T no activada. La "muerte" de una célula incluye una muerte celular programada, es decir, una apoptosis. Una "inducción de la muerte celular" por un agente ocurre cuando una

población de células tratadas con el agente exhibe una más alta tasa de muertes comparada con la de una población de células tratadas. Por ejemplo, el porcentaje de células T activadas in vitro sometidas a apoptosis es casi duplicado cuando éstas se tratan con los anticuerpos monoclonales m128-9F9, m152-15A7 o m166-43B6 comparado con el de células no tratadas, como se determina por tinción con anexina V y análisis FACS (véase el ejemplo más abajo).

El invento también tiene la característica de un polipéptido aislado que contiene el epítipo $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$, $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ o $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ definido en las reivindicaciones. El polipéptido se puede usar para identificar compuestos que inducen la muerte de células T activadas. La fijación del compuesto al polipéptido expresado sobre la superficie de células T activadas induce la muerte celular. Además, unos polipéptidos libres (es decir, los no expresados sobre la superficie celular) pueden inhibir una muerte celular indeseada compitiendo en cuanto a ligandos endógenos que inducen la muerte con los polipéptidos de la superficie celular. La longitud o secuencia del polipéptido puede variar para estos usos. Un polipéptido del invento se puede obtener, p.ej., como una proteína de superficie de células T aislada, un polipéptido sintético, o un polipéptido recombinante. Para preparar un polipéptido recombinante, un ácido nucleico que lo codifica puede ser engarzado con otro ácido nucleico que codifica un partícipe en la fusión, p.ej., Glutación-S-Transferasa (GST), la marca de epítipo 6x-His, o la proteína del Gen 3 de M13. El resultante ácido nucleico de fusión expresa en apropiadas células anfitrionas una proteína de fusión que puede ser aislada por métodos clásicos. La proteína de fusión aislada puede ser además tratada, p.ej., por digestión enzimática, para retirar el partícipe en la fusión y obtener el polipéptido recombinante de este invento.

Un epítipo del invento o un polipéptido del invento se puede usar para generar anticuerpos en animales (para la producción de anticuerpos) o seres humanos (para tratamiento de enfermedades). Unos métodos de producir anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos de los mismos en animales son conocidos en la especialidad. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. El término "anticuerpo" incluye moléculas intactas así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, $F(ab')_2$, Fv, scFv (de single chain antibody), y dAb (de domain antibody; Ward, y colaboradores (1989) *Nature*, 341, 544). Estos anticuerpos se pueden usar para detectar el epítipo, p.ej., para identificar un compuesto que se fija al epítipo (véase más abajo). Los anticuerpos que son capaces de inducir la muerte de células T activadas son también útiles para tratar enfermedades tales como enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, enfermedades alérgicas, o cánceres derivados de células T. En general, un epítipo del invento, p.ej., un polipéptido, puede ser acoplado a una proteína de soporte, tal como KLH, mezclado con un adyuvante, e inyectado en un animal anfitrión. Los anticuerpos producidos en ese animal pueden luego ser purificados por cromatografía de afinidad de péptidos. Unos animales anfitriones corrientemente empleados incluyen conejos, ratones, cobayas y ratas. Los diversos adyuvantes que se pueden usar para aumentar la respuesta inmunológica dependen de la especie del anfitrión e incluyen el adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas superficiales tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa de bocallave, y dinitrofenol. Útiles adyuvantes humanos incluyen BCG (de bacille Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Unos anticuerpos policlonales, poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos, están presentes en los sueros de los individuos inmunizados. Unos anticuerpos monoclonales, poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno particular, se pueden preparar usando una clásica tecnología de hibridoma (véanse, por ejemplo, Kohler y colaboradores (1975) *Nature* 256, 495; Kohler y colaboradores (1976) *Eur J Immunol* 6, 511; Kohler y colaboradores (1976) *Eur J Immunol* 6, 292; y Hammerling y colaboradores (1981) *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridoma*, Elsevier, N.Y.). En particular, se pueden obtener anticuerpos monoclonales por cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por linajes continuos de células en cultivo tal como se ha descrito en Kohler y colaboradores (1975) *Nature* 256, 495 y la patente de los EE.UU. 4.376.110; la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor y colaboradores (1983) *Immunol Today* 4, 72; Cole y colaboradores (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 2026, y la técnica de hibridoma de EBV (Cole y colaboradores (1983) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulinas incluyendo las IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales del invento puede ser cultivado in vitro o in vivo. La capacidad de producir altos títulos de anticuerpos monoclonales in vivo hace que éste sea un método de producción particularmente útil.

Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos". Véanse, p.ej., Morrison y colaboradores (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 6851; Neuberger y colaboradores (1984) *Nature* 312, 604; y Takeda y colaboradores (1984) *Nature* 314:452. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies de animales, tales como las que tienen una región variable que se deriva de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Alternativamente, unas técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una única cadena (patentes de los EE.UU. 4.946.778 y 4.704.692) pueden ser adaptadas para producir una biblioteca de fagos de anticuerpos Fv de una única cadena. Los anticuerpos de una única cadena son formados engarzando los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos. Más aún, unos fragmentos de anticuerpos pueden ser generados por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos $F(ab')_2$ que pueden ser producidos por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo, y

fragmentos Fab que pueden ser generados reduciendo los puentes de disulfuro de fragmentos F(ab')₂. Ciertos anticuerpos pueden también ser humanizados por métodos conocidos en la especialidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos monoclonales con una deseada especificidad de fijación pueden ser comercialmente humanizados (Scotgene, Escocia; y Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.). Unos anticuerpos plenamente humanos, tales como los expresados en animales transgénicos, son también características de la divulgación (véase, p.ej., Green y colaboradores (1994) *Nature Genetics* 7,13; y patentes de los EE.UU. 5.545.806 y 5.569.825).

La divulgación tiene además la característica de un nuevo compuesto que se fija a un epítipo del invento e induce la muerte de células T activadas. Tal compuesto puede ser diseñado, p.ej., usando programas de modelado por ordenador, de acuerdo con la conformación tridimensional del epítipo, y sintetizado usando métodos conocidos en la especialidad. Él puede también ser identificado por escrutinio de bibliotecas como se describirá más abajo.

Los compuestos de ensayo se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos combinatorios de bibliotecas conocidas en la especialidad. Tales bibliotecas incluyen: bibliotecas de péptidos, bibliotecas de peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de péptidos, pero con una nueva cadena principal no peptídica que es resistente a la degradación enzimática), bibliotecas en fase sólida o fase de solución paralelas espacialmente direccionables, bibliotecas sintéticas obtenidas por desconvolución o selección por cromatografía de afinidad, las bibliotecas de "una perla un compuesto" y bibliotecas de anticuerpos. Véanse, p. ej., Zuckermann y colaboradores (1994) *J Med Chem* 37, 2678-85; Lam (1997) *Anticancer Drug Des* 12,145; Lam y colaboradores (1991) *Nature* 354, 82; Houghten y colaboradores (1991) *Nature* 354, 84; y Songyang y colaboradores (1993) *Cell* 72,767.

Ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en la especialidad, por ejemplo, en: DeWitt y colaboradores (1993) *PNAS USA* 90, 6909; Erb y colaboradores (1994) *PNAS USA* 91, 11422; Zuckermann y colaboradores (1994) *J Med Chem* 37,2678; Cho y colaboradores (1993) *Science* 261,1303; Carrell y colaboradores (1994) *Angew Chem Int Ed Engl* 33, 2059; Carell y colaboradores (1994) *Angew Chem Int Ed Engl* 33, 2061; y Gallop y colaboradores (1994) *J Med Chem* 37,1233.

Las bibliotecas de compuestos pueden ser presentadas en solución (p. ej., Houghten (1992) *Biotechniques*13, 412-421), o sobre perlas (Lam (1991) *Nature* 354, 82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364, 555-556), bacterias (patente de los EE.UU. 5.223.409), esporas (patente de los EE.UU. 5.223.409), plásmidos (Cull y colaboradores (1992) *PNAS USA* 89, 1865-1869), o fagos (Scott y Smith (1990) *Science* 249, 386-390; Devlin (1990) *Science* 249, 404-406; Cwirla y colaboradores (1990) *PNAS USA* 87, 6378-6382; Felici (1991) *J Mol Biol* 222, 301-310; y la patente de los EE.UU. 5.223.409).

Para identificar a un compuesto candidato para inducir la muerte de células T activadas, un epítipo del invento se pone en contacto con un compuesto de ensayo, y se evalúa la fijación del compuesto al epítipo. Si el compuesto se fija al epítipo, él es un candidato para inducir la muerte de células T activadas.

El ensayo de escrutinio se puede realizar de una diversidad de maneras. Por ejemplo, un método implica anclar el epítipo (o una molécula que contiene epítopos, p.ej., un polipéptido o una proteína de fusión) o el compuesto de ensayo sobre una fase sólida y detectar un complejo de epítipo y compuesto de ensayo formado sobre la fase sólida al final de la reacción. En la práctica, se pueden utilizar convenientemente placas de microtitulación como la fase sólida. El componente de ancla puede ser inmovilizado por anexiones no covalentes o covalentes. Una anexión no covalente se puede conseguir simplemente revistiendo la superficie sólida con una solución del componente de ancla y secando las placas. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado (p.ej., un anticuerpo monoclonal) específico para el componente de ancla se puede usar para inmovilizar el componente de ancla a la superficie sólida. El componente que no es de ancla se añade a la superficie sólida revestido con el componente de ancla. Después de que se haya completado la reacción, se retira (p.ej., por lavado) la fracción de los componentes que no son de ancla en condiciones tales que cualesquiera complejos formados permanecen inmovilizados sobre la superficie sólida. La detección de estos complejos se puede conseguir de un cierto número de maneras. Cuando el componente que no es de ancla está previamente marcado, la detección del marcaje inmovilizado sobre la superficie sólida indica que se habían formado complejos. Cuando el componente que no es de ancla no está previamente marcado, un marcaje indirecto se puede usar para detectar complejos formados sobre la superficie, p.ej., usando un anticuerpo específico para el componente que no es de ancla (el anticuerpo, a su vez, puede ser marcado directamente o marcado indirectamente con un anticuerpo anti-Ig marcado).

Alternativamente, la reacción se puede realizar en una fase líquida. Los complejos son separados de componentes no fijados, p.ej., usando un anticuerpo inmovilizado específico para el epítipo (o la molécula que contiene epítopos) o el compuesto de ensayo. Los complejos son entonces detectados, p.ej., usando un anticuerpo marcado específico para el otro componente.

El compuesto candidato puede ser validado por averiguación de su capacidad para inducir la muerte de células T activadas, usando el método descrito en el ejemplo presentado más abajo, o cualquier otro método conocido en la especialidad. El compuesto validado se puede usar para inducir la muerte de células T activadas y para tratar

enfermedades tales como enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, enfermedades alérgicas, o cánceres derivados de células T.

5 La divulgación proporciona un método de inducir la muerte de células T activadas, p.ej., poniendo en contacto in vitro células T activadas con un compuesto de la divulgación, o administrando a un individuo que necesita de él una cantidad efectiva de un compuesto de la divulgación. Los individuos que han de ser tratados pueden ser identificados como que tienen o están en riesgo de adquirir una condición caracterizada por una respuesta inmunitaria excesiva o indeseada mediada por células T, p. ej., pacientes padecen de enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, enfermedades alérgicas, o cánceres derivados de células T. Este método puede ser realizado a solas o en conjunción con otros fármacos u otra terapia.

15 El término "tratar" es definido como la administración de una composición a un individuo con la finalidad de curar, aliviar, mitigar, remediar, prevenir o mejorar un trastorno, el síntoma del trastorno, el estado de enfermedad secundario para el trastorno, o la predisposición hacia el trastorno. Una "cantidad efectiva" es una cantidad de la composición que es capaz de producir un resultado médicamente deseable, p. ej., como más arriba se ha descrito, en un individuo tratado.

20 Enfermedades ejemplares que han de ser tratadas incluyen, pero no se limitan a, diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoides, artritis reumatoides juvenil, osteoartritis y artritis psoriásica), esclerosis múltiple, encefalomiénelitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eczematosas), psoriasis, síndrome de Sjogren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, diabetes del tipo I, enfermedades inflamatorias intestinales, colitis ulcerativa, asma, asma alérgico, lupus eritematoso cutáneo, escleroderma, vaginitis, proctitis, erupciones causadas por fármacos, reacciones de inversión leprosas, eritema nudoso leproso, uveítis autoinmunitaria, encefalomiénelitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida de audición sensorineural progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprue idiopático, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, enfermedad de injerto frente a hospedante, casos de trasplantes (incluyendo trasplante usando tejidos alogeneicos o xenogeneicos) tales como trasplante de médula ósea, trasplante de hígado, o el trasplante de cualquier órgano o tejido, alergias tales como alergia atópica, SIDA, y neoplasmas de células T tales como leucemias o linfomas.

35 En un enfoque in vivo, una composición terapéutica (p. ej., una composición que contiene un epítipo del invento, un polipéptido del invento, o un compuesto de la divulgación) es administrada al individuo. Generalmente, el epítipo, el polipéptido, o el compuesto es suspendido en un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., una solución salina fisiológica) y administrado por vía oral o por infusión intravenosa, o inyectado o implantado por vía subcutánea, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal o intrapulmonar.

40 La dosificación requerida depende de la elección de la vía de administración; de la naturaleza de la formulación; de la naturaleza de la enfermedad del individuo; del tamaño, del peso, del área de superficie, de la edad y del sexo del individuo; siendo administrados otros fármacos; y del criterio del médico interviniente. Unas apropiadas dosificaciones están situadas en el intervalo de 0,01-100,0 mg/kg. Se pueden esperar amplias variaciones en la dosificación necesaria a la vista de la diversidad de composiciones disponibles y de las diferentes eficiencias de varias vías de administración. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral requiera más altas dosificaciones que la administración por inyección intravenosa. Se pueden ajustar variaciones en estos niveles de dosificación usando rutinas empíricas clásicas para la optimización, como se comprende bien en la especialidad. La encapsulación de la composición en un apropiado vehículo de suministro (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficiencia de suministro, particularmente para suministro por vía oral.

50 También está dentro del alcance de esta divulgación una composición farmacéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad efectiva de un compuesto de la divulgación. La composición farmacéutica se puede usar para tratar las enfermedades más arriba descritas. El vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un disolvente, un medio de dispersión, un revestimiento, un agente antibacteriano y antifúngico, y un agente isotónico y retardador de la absorción.

60 La composición farmacéutica se puede formular como formas de dosificación para diferentes vías de administración utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, se puede formular como una cápsula, un sello gelatinoso, o una tableta para administración por vía oral. Las cápsulas pueden contener cualesquiera materiales farmacéuticamente aceptables clásicos tales como gelatina o celulosa. Las tabletas se pueden formular de acuerdo con procedimientos convencionales por compresión de mezclas de la composición con un soporte sólido y un lubricante. Ejemplos de soportes sólidos incluyen un almidón y una bentonita de azúcar. La composición se puede administrar también en forma de una tableta con envoltura dura o una cápsula que contiene un aglutinante, p. ej., lactosa o manitol, un materiales de relleno convencional, y un agente para formar tabletas. La composición farmacéutica se puede administrar por la vía parenteral. Ejemplos de formas de dosificación parenterales incluyen soluciones acuosas, una solución salina isotónica o 5% de glucosa del agente activo, u otro excipiente farmacéuticamente aceptable bien

conocido. Unas ciclodextrinas, u otros agentes solubilizantes bien conocidos para los familiarizados con la especialidad, se pueden utilizar como excipientes farmacéuticos para el suministro del agente terapéutico.

5 La eficacia de una composición de esta divulgación puede ser evaluada tanto in vitro como in vivo. Véanse, p. ej., los ejemplos presentados más abajo. Brevemente, la composición se puede ensayar en cuanto a su capacidad para inducir la muerte de células T activadas in vitro. Para estudios in vivo, la composición se puede inyectar en un animal (p. ej., un modelo de ratón) y se accede entonces a sus efectos terapéuticos. Basándose en los resultados, se pueden determinar un apropiado intervalo de dosificación y una adecuada vía de administración.

10 El ejemplo específico presentado más abajo se ha de considerar como meramente ilustrativo, y no limitativo de ninguna de las maneras del resto de la divulgación. Sin más elaboración, se cree que un experto en la especialidad, basándose en la presente descripción, puede utilizar el presente invento en su más plena extensión.

Preparación de una suspensión de células esplénicas de ratón

15 El bazo de un ratón se sumergió en 8 ml de una solución salina equilibrada de Hank (HBSS), se picó suavemente con un cubreobjetos estéril, se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 ml (Costar), y se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos. El material sobrenadante se desechó, y el sedimento celular se resuspendió en el tampón residual por suave golpeo de la pared. Los glóbulos rojos contaminantes (RBC) se lisaron por adición de 1 ml de un tampón de lisis de RBC (0,6 M de NH₄Cl, 0,17 M de Tris base, pH 7,65), seguido por una incubación durante 2 min a temperatura ambiente y un rápido enfriamiento brusco con 9 ml de HBSS. Las células se sedimentaron a 200 x g
20 durante 5 minutos, se lavaron dos veces, y se resuspendieron en un medio RPMI. La concentración y viabilidad de las células en la mezcla se determinaron con un hemocitómetro (Cambridge Scientific Inc.) y exclusión con azul de Trypan.

Preparación de anticuerpos monoclonales anti-células T, inductores de apoptosis

25 Se generaron anticuerpos monoclonales inductores de la apoptosis de células T por inmunización de un ratón con células T humanas activadas con Concanavalina A y se escrutaron en cuanto a sus capacidades para fijarse a células T humanas activadas y subsiguientemente inducir la apoptosis de células T. Los anticuerpos monoclonales se prepararon de acuerdo con el bien conocido método de fusión de células de Kohler y Milstein ((1976) Euro J Immunol 6, 511-519) para producir un hibridoma que secrete deseados anticuerpos. Tres hibridomas generados de acuerdo con estos métodos segregaron anticuerpos monoclonales, designados m128-9F9, m152-15A7 y m166-
30 43B6, respectivamente, que eran capaces de inducir in vitro la apoptosis de células T.

El material sobrenadante de cultivo concentrado de cada uno de los hibridomas se centrifugó a 20000 x g durante 10 minutos, y el material sobrenadante se diluyó a una relación 1:1 con el tampón de fijación (0,1 M de acetato de sodio, pH 5,0). Una columna con proteína G (con un volumen de lecho de aproximadamente 1 ml) se lavó tres veces
35 con 3-5 ml del tampón de fijación. El material sobrenadante de cultivo aclarado se cargó sobre la columna con proteína G, y el flujo pasante se recogió y volvió a cargar en la columna. La columna se lavó luego con 6-10 ml del tampón de fijación, y el anticuerpo fijado se eluyó desde la columna con 5 ml del tampón de elución (0,1 M de glicina-HCl, pH 2,8). Cada fracción contenía 1 ml del anticuerpo eludido, y la fracción eludida se ajustó al pH neutro mezclando cada fracción de 1 ml con 50 microlitros de 1 M de Tris-HCl, pH 7,5. Las fracciones que contenían el
40 anticuerpo se agruparon y dializaron frente a 2 litros de PBS, pH 7,4 tres veces durante tres horas por diálisis. Las concentraciones de proteínas en las muestras de anticuerpos se determinaron siguiendo el procedimiento descrito por Bradford usando el Ensayo de Proteínas Bio-Rad (BIO-RAD, Hercules, CA).

Inducción de muerte de células T humanas activadas por anticuerpos monoclonales

45 Unas células T activadas (véase más arriba) se resuspendieron a una concentración final de 5×10^5 células/ml en un medio RPMI que contenía 5 ng/ml de IL-2, y se trataron con Ig testigo, m128-9F9, m152-15A7 o m166-43B6.

Es bien sabido que se pueden usar anticuerpos inductores de la muerte de células T como agentes terapéuticos para tratar enfermedades relacionadas con células T tales como rechazos de trasplantes, enfermedades autoinmunitarias y alergia. Se generaron tres anticuerpos monoclonales contra células T humanas, y se examinaron
50 las capacidades de estos anticuerpos monoclonales para inducir apoptosis de células T humanas activadas. Unos materiales de cultivo sobrenadantes que contenían anticuerpos monoclonales secretados por el linaje de células de hibridoma m128-9F9, m152-15A7 o m166-43B6 se incubaron o bien con células T humanas no activadas (Día 0) o con células T humanas activadas in vitro (Día 7) durante 6 horas. Las células se tiñeron con anexina V después de la incubación, y se sometieron a un análisis FACS. Unas células positivas para CD3 se encaminaron por puerta para asegurar el recuento o bien de células T humanas activadas in vitro o de células T humanas en reposo. Las células
55 apoptóticas eran positivas para tinción con anexina V. La Tabla 1 recopila el porcentaje de células apoptóticas T entre todas las células T escrutadas. Inesperadamente, unos anticuerpos monoclonales secretados por linajes de células de hibridoma m128-9F9, m152-15A7 y m166-43B6 indujeron la muerte de células T humanas activadas in vitro, pero no afectaron a células T humanas no activadas. Esta capacidad de inducir apoptosis de células T activadas pero salvando las células T en reposo es una característica singular de la ruta apoptótica y es una
60 particularidad dominante de reactivos terapéuticos que se dirigen a enfermedades mediadas por células T.

Tabla 1 Porcentaje de células T apoptóticas

	No tratadas	Anti-myc	m128-9F9	No tratadas	Anti-myc	m152-15A7	m166-43
Día 0	4,17	6,67	5,82	18,18	15,52	5,23	6,57
Día 7	12,63	13,36	28,71	24,18	23,08	51,66	49,44

Identificación de epítomos que inducen la muerte de células T

5 Con el fin de identificar epítomos que inducen la muerte reconocidos por los anticuerpos monoclonales m128-9F9, m152-15A7 y m166-43B6, estos anticuerpos monoclonales se usaron para escrutar secuencias de fijación de
 10 consenso en una biblioteca de polipéptidos (Ph. D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs, Inc.). La biblioteca contenía varios péptidos 12-meros engarzados a la proteína del Gen 3 de M13 406-aa. Unas
 15 placas de microtitulación de 96 pocillos se revistieron con 50 µl/pocillo de anticuerpos en la concentración de 10 µg/ml en 0,1 M de NaHCO₃ (pH 8,6) de un tampón de revestimiento durante una noche a 4°C. Después del lavado, las placas se bloquearon por incubación con el tampón de bloqueo que contenía 0,1 M de NaHCO₃ (pH 8,6), 5 mg/ml de BSA, 0,02% de NaN₃ (150 µl/pocillo) durante por lo menos una hora a 4°C. Las placas se incubaron luego con proteínas de fusión procedentes de la biblioteca de polipéptidos más arriba descritas en varias concentraciones durante una hora a la temperatura ambiente. Después del lavado con TBS que contenía 0,5% de Tween, las proteínas de fusión fijadas se eludieron con 1 mg/ml de BSA que contenían un tampón de 0,2 M de glicina-HCl (pH 2,2) y se neutralizaron con 1 M de Tris-HCl (pH 9,1). Se determinaron luego las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión.

Las secuencias de polipéptidos fijadas por el anticuerpo monoclonal m128-9F9 se muestran más abajo:

WPEDSS YDSW PRG	SEQ ID NO:4
LD YDFL PETEP	SEQ ID NO:5
TAT WDPDY FSDS	SEQ ID NO:6
AETD YDPDH FTPG	SEQ ID NO:7
DARYS HDP AWPYG	SEQ ID NO:8
AGQK WDPEW FSG	SEQ ID NO:9
EPN MDPNW ASPSG	SEQ ID NO:10
KSH YDES WWYNGG	SEQ ID NO:11
YDHHW TNPPTQK	SEQ ID NO:12
YDHHW PRDDIAP	SEQ ID NO:13

20 Se obtuvo una secuencia de polipéptidos de consenso de X₁-X₂-X₃-X₄-X₅, en donde X₁ = Y/W/H/M, X₂ = D, X₃ = S/F/P/E/H, X₄ = cualquier aminoácido, y X₅ = P/Y/H/W.

Las secuencias de polipéptidos fijadas por el anticuerpo monoclonal m166-43B6 se muestran más abajo:

QDTWYP DYFPES	SEQ ID NO:14
SHTLLN DMFPES	SEQ ID NO:15
SPLR DNFPE TLW	SEQ ID NO:16
ASPYM DNFPE EN	SEQ ID NO:17
QLVQ DWLPE ESH	SEQ ID NO:18
YLDY DFLPE TEPP	SEQ ID NO:19

25 Se obtuvo una secuencia de polipéptidos de consenso de X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀, en donde X₆ = D, X₇ = Y/M/N/W/F, X₈ = F o L, X₉ = P, y X₁₀ = E.

30 Las secuencias de polipéptidos fijadas por el anticuerpo monoclonal m152-15A7 se muestran más abajo:

YTPM <u>PMEI</u> SHSA	SEQ ID NO:20
MNDKYI <u>PMSI</u> SA	SEQ ID NO:21
KIFKTLV <u>PMEI</u>	SEQ ID NO:22
TDSA <u>AMEI</u> QTTQ	SEQ ID NO:23

Se obtuvo una secuencia de polipéptidos de consenso de X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} , en donde $X_{11} = P/A$, $X_{12} = M$, $X_{13} = E/S$, y $X_{14} = I$.

Ensayo ELISA de epítomos que inducen la muerte de células T reconocidos por anticuerpos monoclonales

5 Con el fin de identificar las especificidades de los epítomos que inducen la muerte, reconocidos por los anticuerpos monoclonales más arriba descritos, se ejecutó el ELISA en emparejado. Unas diluciones en serie (desde 0,0017 fmol hasta 17 fmol) de los polipéptidos que contenían epítomos se incubaron con los anticuerpos monoclonales m128-9F9, m152-15A7 o m166-43B6 aplicados previamente como revestimiento sobre las placas ELISA para determinar sus afinidades de fijación.

10 Unas placas de microtitulación de 96 pocillos se revistieron con 50 μ l/pocillo de anticuerpos en la concentración de 1 μ g/ml durante una noche a 4°C. Las placas se bloquearon por incubación con 0,25% de BSA en PBS (150 μ l/pocillo) durante 1 hora at 37 °C. Las placas se incubaron luego con proteínas de fusión que contenían varios polipéptidos durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de ser lavadas 4 veces con PBS que contenía 0,05% de Tween 20 (PBST), las placas se incubaron luego con anticuerpos específicos para los partícipes en la fusión a razón de 2 μ g/ml durante 1,5 horas a la temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron 4 veces con PBST. 50 μ l de anticuerpos anti-partícipes en fusión de cabra específicos diluidos de 1 a 3.000 veces conjugados con fosfotasa alcalina (AP) se añadieron luego a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. La reacción enzimática se llevó a cabo añadiendo 50 μ l de una solución de substrato de AP (1 tableta de substrato de AP se disolvió en 5 ml de tampón de substrato). Los resultados confirmaron que todos los polipéptidos seleccionados se fijan específicamente a sus correspondientes anticuerpos usados para la selección.

25

REIVINDICACIONES

1. Un epítopo aislado que comprende X₁-X₂-X₃-X₄-X₅, en donde la fijación de un ligando al epítopo sobre células T activadas induce la muerte de las células, y
 5 X₁ es Tyr, Trp, His o Met;
 X₂ es Asp;
 X₃ es Ser, Phe, Pro, Glu o His;
 X₄ es cualquier aminoácido; y
 X₅ es Pro, Tyr, His o Trp,
 y además en donde el epítopo no es SEQ ID NO:5.
- 10 2. El epítopo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el epítopo se selecciona entre el conjunto que se compone de las SEQ ID NOs:4 y 6-13.
- 15 3. Un epítopo aislado que comprende X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀, en donde la fijación de un ligando al epítopo sobre células T activadas induce la muerte de las células, y
 X₆ es Asp;
 X₇ es Tyr, Met, Asn, Trp, o Phe;
 X₈ es Phe o Leu;
 X₉ es Pro; y
 20 X₁₀ es Glu,
 y además en donde el epítopo no es SEQ ID NO:19.
- 25 4. El epítopo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el epítopo se selecciona entre el conjunto que se compone de las SEQ ID Nos:14-18.
- 30 5. Un epítopo aislado que comprende X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄, en donde la fijación de un ligando al epítopo sobre células T activadas induce la muerte de las células, y
 X₁₁ es Pro;
 X₁₂ es Met;
 X₁₃ es Glu o Ser; y
 35 X₁₄ es Ile.
6. El epítopo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el epítopo se selecciona entre el conjunto que se compone de las SEQ ID NOs: 20-22.
- 40 7. Un método de identificar un compuesto candidato para inducir la muerte de células T activadas, comprendiendo el método poner en contacto un compuesto con el epítopo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un polipéptido que comprende el epítopo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la fijación del compuesto al epítopo indica que el compuesto es un candidato para inducir la muerte de células T activadas.
- 45 8. El método de la reivindicación 7, en donde el compuesto es un anticuerpo.
9. El método de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 Un método de producir un anticuerpo para inducir la muerte de células T que comprende administrar a un animal no humano el epítopo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.