



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 832**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02700553 .7**
86 Fecha de presentación : **26.02.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1370575**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2003**

54 Título: **Péptidos humanos sintéticos y composiciones farmacéuticas que los comprenden para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico.**

30 Prioridad: **26.02.2001 IL 141647**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

73 Titular/es:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co. Ltd.
Weizman Institute of Science, P.O. Box 95
Rehovot 76100, IL

72 Inventor/es: **Mozes, Edna**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 275 832 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

Péptidos humanos sintéticos y composiciones farmacéuticas que los comprenden para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos sintéticos y, más particularmente, a péptidos sintéticos basados en la región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-ADN monoclonal humano, a las composiciones farmacéuticas que los comprenden y a su uso en la inmunomodulación de las respuestas asociadas al lupus eritematoso sistémico (LES).

15 *Abreviaturas: 16/6Id:* Acm 16/6Id (Acm frente a Id 16/6) humano; *CDR:* región determinante de la complementariedad; *ACF:* adyuvante completo de Freund; *péptido hCDR:* un péptido basado en una región CDR del Acm 16/6Id humano; *hCDR1:* el péptido humano de la SEQ ID NO: 6; *hCDR3:* el péptido humano de la SEQ ID NO: 7; *Acm 16/6Id humano:* Acm anti-ADN patógeno humano que lleva el 16/6Id; *ICD:* depósitos de complejos inmunitarios; *Id:* idiotipo; *CGL:* células de ganglio linfático; *Acm:* anticuerpo monoclonal; *MPM:* metaloproteínasa de la matriz; *mCDR1:* el péptido murino de la SEQ ID NO: 1; *mCDR3:* el péptido murino de la SEQ ID NO: 3; *LSP:* linfocitos en sangre periférica; *PBS:* solución salina tamponada con fosfato; *rev:* péptido invertido; *LES:* lupus eritematoso sistémico; *IAELES:* índice de actividad de la enfermedad de LES; *TGF-β:* factor de crecimiento transformante β; *NT:* no tratado.

20 **Antecedentes de la invención**

25 El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la presencia de una serie de autoanticuerpos, incluyendo anticuerpos frente al ADN, anticuerpos frente a antígenos nucleares y anticuerpos frente a ribonucleoproteínas. La progresión de la enfermedad está asociada con las manifestaciones clínicas generales y la lesión en tejidos y órganos producida por los complejos inmunitarios. De manera similar a otros estados autoinmunitarios, la etiología del LES es multifactorial que conlleva factores genéticos, ambientales, hormonales e inmunológicos. No se dispone de ningún tratamiento dirigido hacia la prevención o la cura del LES.

30 El anticuerpo anti-ADN monoclonal humano denominado 16/6Id lleva un idiotipo común (Shoenfeld *et al.*, 1983). Se encontró que el idiotipo tenía relevancia clínica en los pacientes con LES. Por tanto, se encontró que 16/6Id se expresaba en anticuerpos anti-ADN del 54% de los pacientes con LES con enfermedad activa (Isenberg *et al.*, 1984) y en los órganos afectados de los pacientes con LES (Isenberg y Collins, 1985). Se inmunizaron ratones de estirpes consanguíneas que no desarrollan ninguna enfermedad autoinmunitaria espontánea con este Acm 16/6Id anti-ADN humano y desarrollaron las principales características distintivas del LES en seres humanos y en los modelos murinos espontáneos para esta enfermedad (Mendlovic *et al.*, 1988). Por tanto, tras la inmunización, los ratones produjeron anticuerpos específicos frente a Id 16/6, anticuerpos que llevan el Id 16/6 y anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos nucleares (dsADN, ssADN, Sm, ribonucleoproteína, Ro, La y otros). Los hallazgos serológicos se asociaron con leucopenia, velocidad de sedimentación globular elevada, proteinuria, abundancia de complejos inmunitarios en los riñones y esclerosis de los glomérulos (Mendlovic *et al.*, 1988), que son las manifestaciones típicas del LES.

35 Un Acm anti-16/6Id murino (Ac2) derivado de ratones con LES experimental, también puede inducir la enfermedad experimental en ratones (Mendlovic *et al.*, 1989), de manera similar al 16/6Id (Ac1). Además, se preparó un Acm anti-ADN murino que expresa el Id 16/6 a partir de ratones afectados con LES experimental. El anticuerpo Ac3 denominado 5G12 reaccionó con anticuerpos específicos frente al Id 16/6. La inmunización con este último anticuerpo dio como resultado la inducción del LES experimental con manifestaciones similares, tal como se observó tras la inmunización con el 16/6Id humano (Ac1) y con los Acm anti-16/6Id murinos (Ac2) (Waisman *et al.*, 1993). Estos resultados muestran la importancia de la red del Id 16/6 en la inducción y la progresión del LES en ratones.

40 Con el fin de comprender el mecanismo por el que surgen los auto-anticuerpos asociados con el LES, la presente invención ha producido una variedad de anticuerpos monoclonales derivados de ratones C3H.SW en los que se indujo LES experimental. Como norma, se encontró que los anticuerpos monoclonales que daban lugar a anticuerpos que llevaban el Id 16/6 o que reaccionaban con él eran patógenos y, por tanto, podían inducir LES experimental en ratones (Fricke *et al.*, 1990; Sthoeger *et al.*, 1993).

45 Más tarde, se secuenciaron las regiones variables (V) de nueve autoanticuerpos que se unen, o bien al ADN, o al extracto nuclear (EN) de HeLa, aislado de ratones C3H.SW con LES experimental (Waisman y Mozes, 1993). Se analizaron anticuerpos monoclonales con diferente especificidad en un intento por determinar las conexiones entre los diferentes autoanticuerpos. Se encontraron tres Acm que se unían al ADN y se demostró que mostraban características de secuencia de los anticuerpos anti-ADN patógenos. Se demostró que uno de estos Acm, denominado 2C4C2, utilizaba un gen de la región V de la cadena pesada (H) (V_H) idéntico al V_H del Acm anti-ADN aislado de otros ratones propensos a padecer lupus, concretamente (NZB x NZW)F₁. El gen de la región V de la cadena ligera (L) (V_L) del Acm 2C4C2 es homólogo en un 98% al V_L de otro Acm anti-ADN, también aislado de ratones (NZB x NZW)F₁. Los otros dos Acm anti-ADN, denominados 5G12-4 y 5G12-6 comparten el 93% de sus secuencias V_H con las del Acm 2C4C2. Basándose en el análisis de estos Acm, parece que los autoanticuerpos encontrados en ratones con LES

experimental utilizan elementos génicos similares a los utilizados por el Acm que se aisló de estirpes de ratones que desarrollaban lupus espontáneamente.

Las células T desempeñan un papel importante en la inducción y el desarrollo del LES experimental. Por tanto, se demostró que las líneas de células T y clones específicos para el Id 16/6 inducían LES experimental en receptores singénicos de manera similar al anticuerpo 16/6Id. Por tanto, tras la inoculación de las células activadas de las líneas, los ratones desarrollaron tanto la serología como la lesión renal que es típica para el LES (Fricke *et al.*, 1991).

Tal como se describió anteriormente, el Acm 5G12 que se aisló de ratones con LES experimental y que se demostró que se unía al ADN y que lleva el Id 16/6 puede inducir LES experimental en ratones (Waisman *et al.*, 1993). Es probable que las células T que reaccionan específicamente con el Acm mediante proliferación, estén reaccionando con péptidos que representan las secuencias de sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Es muy probable que las células T reconozcan las regiones V de los anticuerpos anteriores, puesto que no reaccionan con otros anticuerpos que llevan la misma región constante pero que tienen diferentes especificidades. Dentro de la región variable, las regiones con la probabilidad más alta para reconocerse son las CDR, puesto que son las regiones que difieren más entre los diversos anticuerpos. Las regiones CDR de las secuencias V_H de los nueve Acm murinos patógenos mencionados anteriormente que inducen LES en ratones se indican mediante un recuadro en la figura 1 de Waisman y Mozes, 1993, en la que se presentan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida completas para las cadenas pesadas variables (V_H) de los nueve Acm.

La publicación de patente internacional PCT número WO 96/30057 de los presentes solicitantes describe péptidos basados en las regiones CDR de Acm patógenos aislados de ratones con LES experimental, en particular los péptidos Ia a IIIa, basados en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente de la cadena V_H del Acm murino denominado 5G12, y los péptidos IVa y Va, basados en las regiones CDR1 y CDR3, respectivamente, de la cadena V_H del Acm murino denominado 2C4C2. Estos péptidos tienen las secuencias indicadas sustancialmente mediante de SEQ ID NO: 1 una SEQ ID NO: 5, tal como sigue:

T G Y Y M Q W V K Q S P E K S L E W I G (Ia) [SEQ ID NO: 1]

E I N P S T G G T T Y N Q K F K A K A T (IIa) [SEQ ID NO: 2]

Y Y C A R F L W E P Y A M D Y W G Q G S (IIIa) [SEQ ID NO: 3]

G Y N M N W V K Q S H G K S L E W I G (IVa) [SEQ ID NO: 4]

Y Y C A R S G R Y G N Y W G Q T L (Va) [SEQ ID NO: 5]

El inventor demuestra que estos péptidos y, en particular, los péptidos Ia y IIIa, designados en el presente documento como mCDR1 [SEQ ID NO: 1] y mCDR3 [SEQ ID NO: 3], respectivamente, pueden inhibir, cuando se administran en PBS, la sensibilización de las células T o bien para el péptido mCDR apropiado o bien para la totalidad del Acm 16/6Id anti-ADN tanto de origen murino como humano (Waisman *et al.*, 1997). El inventor demostró además que los péptidos mCDR1 y mCDR3 previenen o tratan un LES ya establecido que, o bien se induce por el Acm 16/6Id anti-ADN humano o bien se desarrolla espontáneamente en los ratones propensos a LES (NZB x NZW)F₁ o MRL/lpr/lpr (Eilat *et al.*, 2000 y 2001).

Sumario de la invención

Ahora se ha encontrado según la presente invención que los péptidos basados en la CDR del anticuerpo 16/6Id anti-ADN monoclonal humano pueden inmunomodular respuestas asociadas a LES. Por tanto, los péptidos basados en la CDR1 y la CDR3 del Id 16/6 humano se sometieron a prueba y se demostró que inhibían la proliferación de las células de ganglio linfático de ratones inmunizados con los péptidos murinos mCDR1 (SEQ ID NO: 1) y mCDR3 (SEQ ID NO: 3) o con el Acm 16/6Id anti-ADN humano, que inhibían la respuesta proliferativa de los linfocitos en sangre periférica (LSP) de los pacientes con LES para el Acm 16/6Id anti-ADN humano, y que mejoraban las manifestaciones de la enfermedad de ratones afectados con LES espontáneo o experimental.

Estos hallazgos son completamente inesperados debido a que no todas las CDR de los autoanticuerpos patógenos se reconocen igualmente por las células T de los pacientes. Tal como se demostró anteriormente en el laboratorio del presente inventor (Dayan *et al.*, 2000), las CDR del autoanticuerpo anti-ADN 2C4C2 se reconocen peor por las células T de los pacientes con LES que los péptidos basados en las CDR del anticuerpo anti-ADN 5G12. Además, se demostró que muchos de los análogos de los péptidos basados en las CDR de los autoanticuerpos murinos descritos en el documento WO 96/30057 mencionado anteriormente no eran eficaces en sus efectos inhibidores y, por tanto, no podía predecirse o sugerirse que las modificaciones que se producen en las secuencias de los péptidos basados en las CDR de un anticuerpo anti-ADN monoclonal humano de la presente invención serían eficaces. Además, el uso de péptidos basados en un anticuerpo humano debe considerarse preferible para el uso en seres humanos en comparación con los péptidos basados en anticuerpos no humanos.

ES 2 275 832 T3

Por tanto, la presente invención se refiere, en un aspecto, a un péptido sintético seleccionado del grupo que consiste en:

5 (a) un péptido de al menos 19 y como máximo 22 residuos de aminoácidos que incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 19 o una amida del mismo;

(b) un péptido sintético doble que comprende dos péptidos diferentes de dicho péptido de (a) unidos covalentemente entre sí, o bien directamente o bien a través de una corta cadena de unión;

10 (c) un polímero peptídico que comprende una pluralidad de secuencias de dicho péptido de (a); y

(d) un péptido de (a) o un polímero peptídico de (c) unido a un vehículo macromolecular.

15 El anticuerpo 16/6Id anti-ADN monoclonal humano, denominado en el presente documento "Acm 16/6Id humano", es un anticuerpo anti-ADN monoclonal humano patógeno que puede inducir una enfermedad similar a LES en ratones.

20 Los péptidos de la invención están basados en la secuencia de CDR1 o CDR3, de la cadena pesada del Acm 16/6Id humano. En una realización, el péptido consiste en el péptido que tiene las secuencias tal como se indican por SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, respectivamente, tal como sigue:

G Y Y W S W I R Q P P G K G E E W I G [SEQ ID NO: 6]

25 Y Y C A R G L L R G G W N D V D Y Y G M D V [SEQ ID NO: 7]

En una realización, el péptido consiste en el péptido de la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7 amidado en el extremo C-terminal.

30 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido sintético o polímero peptídico de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica es particularmente útil para el tratamiento de LES y la mejoría de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, particularmente mediante la modulación de las respuestas asociadas a LES, por ejemplo regulando por disminución los niveles de MPM-3 y/o MPM-9, y/o las actividades de IL-2 y/o IFN- γ , o regulando por incremento el nivel de actividad de TGF- β en un paciente con LES.

35 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un péptido o polímero peptídico de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico (LES). La invención se refiere además al uso de un péptido o polímero peptídico de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del LES mediante la inmunomodulación de las respuestas asociadas al LES en un paciente con LES, por ejemplo, regulando por disminución los niveles de MPM-3 y/o MPM-9, y/o las actividades de IL-2 y/o IFN- γ , o regulando por incremento el nivel de actividad de TGF- β en un paciente con LES.

40 Todavía en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para evaluar la eficacia de un fármaco que comprende un péptido o polímero peptídico de la invención en el tratamiento de un paciente con LES, que comprende medir a diferentes intervalos de tiempo los niveles de MPM-3 y/o MPM-9 en una muestra de sangre obtenida de dicho paciente que se está tratando con dicho fármaco, mediante el cual un nivel disminuido de MPM-3 y/o MPM-9 se correlaciona con la eficacia del fármaco.

45 Todavía en otro aspecto adicional, la invención se refiere a un método para evaluar la eficacia de un fármaco que comprende un péptido o polímero peptídico de la invención en el tratamiento de un paciente con LES, que comprende medir a diferentes intervalos de tiempo el nivel de IL-2 y/o IFN- γ en una muestra de sangre obtenida de dicho paciente que se está tratando con dicho fármaco, mediante el cual un nivel disminuido de IL-2 y/o IFN- γ se correlaciona con la eficacia del fármaco.

50 Aún en todavía otro aspecto adicional, la invención se refiere a un método para evaluar la eficacia de un fármaco que comprende un péptido o polímero peptídico de la invención en el tratamiento de un paciente con LES, que comprende medir a diferentes intervalos de tiempo el nivel de TGF- β en una muestra de sangre obtenida de dicho paciente que se está tratando con dicho fármaco, mediante el cual un nivel aumentado de TGF- β se correlaciona con la eficacia del fármaco.

Breve descripción de los dibujos

65 La figura 1 muestra la inhibición de las respuestas proliferativas de las células de ganglio linfático de ratones inmunizados con el Acm 16/6Id humano a diversas concentraciones del Acm 16/6Id (0,1-10 $\mu\text{g/pocillo}$), mediante el tratamiento con 300 μg de hCDR1.

ES 2 275 832 T3

La figura 2 muestra la inhibición de las respuestas proliferativas de las células de ganglio linfático de ratones inmunizados con el Acm 16/6Id humano a diversas concentraciones del Acm 16/6Id (0,1-10 $\mu\text{g/pocillo}$), mediante el tratamiento con 50 μg de hCDR1.

5 Las figuras 3A-C muestran el patrón de citocinas en ratones BALB/c inmunizados con el Acm 16/6Id humano y tratados con hCDR1 o con un péptido p259-271 irrelevante. Figura 3A: patrón de IFN- γ ; figura 3B: patrón de TGF- β ; figura 3C: patrón de IL-10.

10 La figura 4 muestra las concentraciones del Acm 16/6Id anti-ADN humano requeridas para la estimulación óptima de los LSP de pacientes con LES y de controles sanos. Los LSP se estimularon con diversas concentraciones (0,1-40 $\mu\text{g/pocillo}$) del Acm 16/6Id. La concentración que produce el índice de estimulación más alto se definió como óptima para desencadenar una respuesta proliferativa.

15 La figura 5 muestra la proliferación de los LSP de un paciente con LES estimulado con la fitohemaglutinina (FHA) mitógena en ausencia o presencia de hCDR1 o hCDR3.

La figura 6 muestra la proliferación de los LSP de un paciente con LES estimulado con el Acm 16/6Id humano en ausencia o presencia de los péptidos humanos hCDR1 o hCDR3 o del péptido murino mCDR3.

20 La figura 7 muestra la proliferación de los LSP de un paciente con LES estimulado con el Acm 16/6Id humano en ausencia o presencia de los péptidos humanos hCDR1 o hCDR3 o de los péptidos murinos inversos revmCDR1 y revmCDR3.

25 La figura 8 muestra la inhibición de la secreción de IL-2 en los LSP de pacientes con LES desencadenada por el Acm 16/6Id humano en ausencia o presencia de hCDR1 o hCDR3.

La figura 9 muestra la regulación por incremento de la secreción de TGF- β en los LSP de un paciente con LES representativo estimulado con el Acm 16/6Id humano en ausencia o presencia de hCDR1 o hCDR3.

30 La figura 10 muestra los niveles de autoanticuerpo anti-ADN en ratones (NZB x NZW)F1 no tratados o tratados con 300 μg de hCDR1 o con el péptido inverso revhCDR1 (usado como control).

35 Las figuras 11A-11D son fotografías que muestran secciones de riñón representativas de ratones (NZB x NZW)F1 propensos a padecer LES que se trataron empezando a la edad de 5 meses y medio con PBS (11A, 11B) o con 100 μg de hCDR1 (11C, 11D). Las secciones son de ratones sacrificados a la edad de 9 meses. Para la detección de depósitos de Ig, se incubaron las secciones con IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC (específica de cadena γ) (11A, 11C x 100; 11B, 11D x 400).

40 Las figuras 12A-12F son fotografías que muestran secciones de riñón representativas de ratones (NZB x NZW)F1 que se trataron con PBS (12A, 12B) o con 300 μg de hCDR1 (12C, 12D) o con el péptido inverso revhCDR1 (12E, 12F). Las secciones son de ratones sacrificados a la edad de 9 meses. Para la detección de depósitos de Ig en complejos inmunitarios, se incubaron las secciones con IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC (específica de cadena γ) (12A, 12C, 12E x 100; 12B, 12D, 12F x 400).

45 Las figuras 13A-13C muestran el patrón de citocinas medido mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos estimulados con Con A de esplenocitos de ratones (NZB x NZW)F1 propensos a padecer LES que no se trataron o se trataron con hCDR1 o con el péptido inverso revhCDR1. Figura 13A: patrón de IFN- γ ; figura 13B: patrón de IL-10; figura 13C: patrón de TGF- β .

50 Las figuras 14A-14F son fotografías que muestran secciones de riñón representativas de ratones BALB/c con LES experimental inducido por 16/6Id, tratados con PBS (14A, 14B) o con 200 μg de hCDR1 (14C, 14D), o con el péptido inverso revhCDR1 (14E, 14F). Las secciones son de ratones sacrificados a la edad de 9 meses. Para la detección de depósitos de Ig en complejos inmunitarios, se incubaron las secciones con IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC (específica de cadena γ) (14A, 14C, 14E x 100; 14B, 14D, 14F x 400).

55 Las figuras 15A-15C muestran el patrón de citocinas medido mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos de ganglio linfático estimulados con 16/6Id de ratones BALB/c con LES experimental inducido por 16/6Id que no se trataron o se trataron con hCDR1 (200 ó 300 μg) o con el péptido inverso revhCDR1. Figura 15A: patrón de IFN- γ ; figura 15B: patrón de TNF- α ; figura 15C: patrón de IL-10; figura 15D: patrón de TGF- β ; figura 15E: patrón de TGF- β , medido en sobrenadantes de células de bazo desencadenadas con 16/6Id.

60 Las figuras 16A-16F son fotografías que muestran secciones de riñón representativas de ratones (NZB x NZW)F1 propensos a LES no tratados (16A, 16B) o ratones receptores de esplenocitos de ratones tratados o bien con 300 μg de hCDR1 (16C, 16D) o bien con el péptido inverso revhCDR1 (16E, 16F). Para la detección de depósitos de Ig en complejos inmunitarios, se incubaron las secciones con IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC (específica de cadena γ) (16A, 16C, 16E x 400; 16B, 16D, 16F x 100).

ES 2 275 832 T3

Las figuras 17A-17B representan la cinética de aparición de MPM-3, MPM-2 y MPM-9 en los sueros de ratones (NZB x NZW)F1. Se tomaron muestras de sangre de los ratones (NZB x NZW)F1 (10 ratones/grupo) en los puntos de tiempo indicados. Se sometieron a prueba los sueros combinados (4 μ l) de cada grupo para determinar los niveles de expresión de MPM-3 usando inmunotransferencia de tipo Western (figura 17A) o para determinar las actividades de MPM-9 y MPM-2 usando zimografía en gel (figura 17B). Los resultados representan 4 experimentos similares.

Las figuras 18A-18B representan la cinética de aparición de MPM-3, MPM-2 y MPM-9 en los sueros de ratones BALB/c. Se tomaron muestras de sangre de ratones BALB/c no inmunizados (10 ratones/grupo), o de ratones que se inmunizaron con PBS/ACF (10 ratones/grupo) o con el 16/6Id (en ACF; 10 ratones/grupo) en los puntos de tiempo indicados. Se sometieron a prueba los sueros combinados de los ratones (4 μ l) de cada grupo para determinar los niveles de expresión de MPM-3 usando inmunotransferencia de tipo Western (figura 18A) o para determinar las actividades de MPM-9 y MPM-2 usando zimografía en gel (figura 18B). Los resultados son representativos de 3 experimentos similares.

Las figuras 19A-19C representan la inmunotinción de las secciones de riñón de ratones BALB/c inmunizados para determinar MPM-3 y MPM-9. Se sacrificaron ratones BALB/c no inmunizados, o ratones que se inmunizaron con PBS/ACF o con el 16/6Id (en CFA), (3 ratones/grupo), a los 5,5 meses tras su inmunización de refuerzo con el 16/6Id. Se extirparon los riñones y se inmunotifieron sus secciones de criostato de 5 μ m para determinar MPM-3 (19A) y MPM-9 (19B). Se realizó una tinción de control con respecto a la eficacia de bloqueo (19C). (x200). Los resultados son representativos de 3 experimentos similares.

Las figuras 20A-20B representan los niveles de MPM-3 y MPM-9 en sueros de ratones (NZB x NZW)F1 tratados con mCDR1. En experimentos de prevención, se administraron a los ratones (10/grupo) semanalmente inyecciones s.c. con mCDR1, comenzando a la edad de 2 meses durante 10 semanas. Los resultados representan sueros tomados 4 meses después del final del tratamiento. En experimentos de tratamiento, se les inyectó por vía s.c. a los ratones (10/grupo) o bien PBS o bien 250 μ g/ratón de mCDR1 comenzando a la edad de 5 meses. Los resultados representan sueros tomados 3 semanas después del final del tratamiento. Se sometieron a prueba los sueros combinados de cada grupo experimental para determinar los niveles de MPM-3 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (20A) y para determinar la actividad de MPM-9 usando zimografía en gel (20B). NT: no tratados. Los resultados son representativos de 2 experimentos similares.

Las figuras 21A-21B representan los niveles de MPM-3 y MPM-9 en ratones BALB/c inmunizados con 16/6Id y tratados con mCDR1. En experimentos de prevención, se trataron los ratones (8/grupo) por vía i.v. con mCDR1 (100 μ g/ratón). Los resultados mostrados son de sueros tomados 4,5 meses después del final del tratamiento. En experimentos de tratamiento, se trataron los ratones (8/grupo) por vía s.c. con 100 μ g/ratón de mCDR1. Los resultados son de sueros obtenidos al final del tratamiento. Se sometieron a prueba los sueros combinados de cada grupo experimental para determinar MPM-3 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (21A) y para determinar la actividad de MPM-9 mediante zimografía en gel (21B). NT: no tratados. Los resultados son representativos de 2 experimentos similares.

Las figuras 22A-22B representan la inmunotinción para determinar MPM-3 y MPM-9 en secciones de riñón de ratones BALB/C inmunizados con 16/6Id que se trataron con mCDR1 para la prevención (22A) o el tratamiento (22B) de LES experimental. Se sacrificaron los ratones 8 meses después de la inducción de la enfermedad y se extirparon los riñones. Se prepararon secciones de criostato (5 μ m) y se inmunotifieron para determinar MPM-3, MPM-9 y para determinar la presencia de depósitos de complejos inmunitarios (x200). (W/O): tinción de control con respecto a la eficacia de bloqueo, sin el primer anticuerpo. Los resultados son representativos de 2 experimentos similares.

Las figuras 23A-23B representan los niveles de MPM-3 y MPM-9 en sueros de ratones (NZB x NZW)F1 tratados con hCDR1. En experimentos de tratamiento se les inyectó por vía s.c. a los ratones (10/grupo) o bien PBS o bien 100 μ g ó 30 μ g/ratón de hCDR1, una vez a la semana durante diez semanas, comenzando a la edad de 7 meses. Los resultados representan sueros recogidos a la mitad del tratamiento. Se sometieron a prueba los sueros combinados de cada grupo experimental para determinar los niveles de MPM-3 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (23A) y para determinar la actividad de MPM-9 usando zimografía en gel (23B). Los resultados son representativos de 2 experimentos similares.

La figura 24 representa un gel representativo que muestra la actividad de MPM-2 y MPM-9 en sueros de pacientes con LES y controles sanos. Se analizaron los sueros (5 μ l) de 40 pacientes individuales con LES y 25 controles sanos para determinar sus actividades de MPM-2 o MPM-9 mediante zimografía en gel. La figura muestra resultados representativos con muestras de suero de los dos grupos.

La figura 25 representa un gráfico que muestra el análisis cuantitativo de las actividades de MPM-2 y MPM-9 en sueros de pacientes con LES (columnas oscuras) y controles sanos (columnas blancas). Se sometieron a prueba 36 muestras de suero de pacientes con LES y 15 muestras de suero de controles sanos para determinar la actividad de MPM-2 y MPM-9 usando kits de ensayo de la actividad específica. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. * $P = 0,0302$.

Las figuras 26A-26B son gráficos que muestran niveles de actividad de MPM-9 e índices de actividad de la enfermedad (IAELES) en pacientes con LES. Se sometieron a prueba 35 muestras de suero de 8 pacientes masculinos

ES 2 275 832 T3

(figura 26A) y 27 femeninos (figura 26B) con LES para determinar la actividad de MPM-9 mediante un kit de ensayo de la actividad específica. Se presenta la distribución de la actividad de MPM-9 según el IAELES de los pacientes. La línea discontinua representa la actividad de MPM-9 en controles sanos.

5 Las figuras 27A-27B son gráficos que muestran el patrón de las actividades de MPM-2 (círculos blancos) y MPM-9 (círculos negros) en los sueros de dos pacientes con LES a los que se les tomaron muestras durante 4-6 años de enfermedad. Se sometieron a prueba los sueros para determinar las actividades de MPM-2 o MPM-9 mediante kits de ensayo de la actividad específica. Los ensayos se realizaron por duplicado.

10 Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere, en un aspecto, a péptidos sintéticos que comprenden una secuencia que consiste en, o se encuentra dentro de, una CDR que se encuentra en la cadena pesada del anticuerpo 16/6Id anti-ADN monoclonal humano patógeno (identificado en el presente documento como "Acm 16/6Id anti-ADN humano" o "Acm 16/6Id humano"), anticuerpo que induce una enfermedad similar a LES en ratones.

20 Las regiones CDR de la secuencia V_H del Acm 16/6Id humano están recuadrados en la figura 4A de Waisman *et al.*, 1995. Las regiones CDR de las cadenas pesadas del Acm 16/6Id humano tienen las secuencias sustancialmente tal como se indica mediante la SEQ ID NO: 8 a la SEQ ID NO: 10, tal como sigue:

25 CDR1: FSGYYWS [SEQ ID NO: 8]

CDR2: EINHSGSTNYKTSLKS [SEQ ID NO: 9]

30 CDR3: GLLRGGWNDVDY YYGMDV [SEQ ID NO: 10]

Los péptidos hCDR de la invención contienen al menos 19 y como máximo 22 residuos de aminoácidos que incluyen una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 19 o una amida de las mismas.

35 Por tanto, en una realización, la presente invención proporciona un péptido sintético basado en la CDR1 de la cadena pesada del Acm 16/6Id humano, siendo dicha región CDR1 de la secuencia sustancialmente tal como se indica mediante SEQ ID NO: 8, seleccionándose dicho péptido del grupo que consiste en: (a) un péptido que consiste en SEQ ID NO: 11 o una amida del mismo; (b) un péptido sintético doble que comprende dos péptidos diferentes de dicho péptido de (a) unidos covalentemente entre sí, o bien directamente o bien a través de una corta cadena de unión, (c) un polímero peptídico que comprende una pluralidad de secuencias de dicho péptido de (a); y (d) un péptido de (a) o un polímero peptídico de (c) unido a un vehículo macromolecular.

40 En una realización preferida de la invención, un péptido basado en la CDR1 de la cadena pesada del Acm 16/6Id humano es un péptido de la secuencia sustancialmente tal como se indica mediante SEQ ID NO: 11:

45 $X_1 Y Y W S W I X_2 Q X_3 P X_4 X_5 G X_6 E W I G$ [SEQ ID NO: 11]

en la que X_1 es G o TG; X_2 es R o K; X_3 es P o S; X_4 es G o E; X_5 es K o D; y X_6 es E, L o S.

50 En una realización más preferida, el péptido de SEQ ID NO: 11 es el péptido 19-mérico designado en el presente documento como "péptido hCDR1" o simplemente "hCDR1", de la secuencia sustancialmente tal como se indica mediante SEQ ID NO: 6:

55 $G Y Y W S W I R Q P P G K G E E W I G$ [SEQ ID NO: 6]

En una realización, el péptido de SEQ ID NO: 6 está amidado en el extremo C-terminal.

60 En hCDR1, la secuencia GYYWS comprendida dentro de SEQ ID NO: 8, viene seguida por la secuencia natural de la CDR1 de la cadena pesada del Acm 16/6Id humano, con la excepción de que el residuo de leucina (L) natural de la secuencia del Acm se substituyó por un residuo de ácido glutámico (E) (en negrita) en la posición 15 del péptido hCDR1.

65 En otra realización, el péptido de SEQ ID NO: 11 es un análogo del péptido hCDR1 obtenido mediante sustitución y/o adición de residuos de aminoácidos a la secuencia del péptido hCDR1, siendo ejemplos del mismo los péptidos de las secuencias sustancialmente tal como se indica mediante SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 18 (en las que los aminoácidos substituidos o añadidos se representan en negrita):

ES 2 275 832 T3

G Y Y W S W I R Q P P G K G L E W I G [SEQ ID NO: 12]

G Y Y W S W I R Q P P G K G S E W I G [SEQ ID NO: 13]

5 G Y Y W S W I R Q P P G **D** G E E W I G [SEQ ID NO: 14]

G Y Y W S W I **K** Q P P G K G E E W I G [SEQ ID NO: 15]

10 G Y Y W S W I R Q S P G K G E E W I G [SEQ ID NO: 16]

G Y Y W S W I R Q P P **E** K G E E W I G [SEQ ID NO: 17]

15 **T** G Y Y W S W I R Q P P G K G E E W I G [SEQ ID NO: 18]

20 En una realización adicional, la invención proporciona un péptido sintético basado en la CDR3 de la cadena pesada del Acm 16/6Id humano, siendo dicha región CDR3 de la secuencia sustancialmente tal como se indica mediante SEQ ID NO: 10, seleccionándose dicho péptido del grupo que consiste en: (a) un péptido que consiste en SEQ ID NO: 19 o una amida del mismo; (b) un péptido sintético doble que comprende dos péptidos diferentes de dicho péptido de (a) unidos covalentemente entre sí, o bien directamente o bien a través de una corta cadena de unión; (c) un polímero peptídico que comprende una pluralidad de secuencias de dicho péptido de (a); y (d) un péptido de (a) o un polímero peptídico de (c) unido a un vehículo macromolecular.

25 En una realización preferida de la invención, el péptido basado en la CDR3 de la cadena pesada del Acm 16/6Id humano es un péptido de la secuencia sustancialmente tal como se indica mediante SEQ ID NO: 19:

Y Y C A R X₁ L L X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ D V D Y X₇ G X₈ D V [SEQ ID NO: 19]

30 en la que X₁ es G o F; X₂ es R o A; X₃ es G o A; X₄ es G o A; X₅ es W o A; X₆ es N o A; X₇ es Y o W; y X₈ es M o Q.

35 En una realización más preferida, el péptido de SEQ ID NO: 19 es el péptido designado en el presente documento como "péptido hCDR3" o simplemente "hCDR3", de la SEQ ID NO: 7:

Y Y C A R G L L R G G W N D V D Y Y G M D V [SEQ ID NO: 7]

40 En una realización, el péptido de SEQ ID NO: 7 está amidado en el extremo C-terminal.

En hCDR3, la secuencia GLLRGGWNDVDY Y Y G M D V [SEQ ID NO: 10] de la región CDR3 de la cadena pesada del Acm 16/6Id humano está modificada mediante la delección de uno de los residuos de tirosina (Y) y está precedida por la secuencia natural del Acm.

45 En otra realización, el péptido de SEQ ID NO: 19 es un análogo del péptido hCDR3 obtenido mediante sustitución y/o adición de residuos de aminoácidos a la secuencia del péptido hCDR3, siendo ejemplos del mismo los péptidos de las secuencias SEQ ID NO: 20 a SEQ ID NO: 27 (en las que los aminoácidos sustituidos o añadidos se representan en **negrita**):

50 Y Y C A R G L L R G G W A D V D Y Y G M D V [SEQ ID NO: 20]

Y Y C A R G L L R G G A N D V D Y Y G M D V [SEQ ID NO: 21]

55 Y Y C A R G L L R G A W N D V D Y Y G M D V [SEQ ID NO: 22]

Y Y C A R G L L R A G W N D V D Y Y G M D V [SEQ ID NO: 23]

60 Y Y C A R G L L A G G W N D V D Y Y G M D V [SEQ ID NO: 24]

Y Y C A R F L L R G G W N D V D Y Y G M D V [SEQ ID NO: 25]

65 Y Y C A R G L L R G G W N D V D Y Y G **Q** D V [SEQ ID NO: 26]

Y Y C A R G L L R G G W N D V D Y **W** G M D V [SEQ ID NO: 27]

Los péptidos sintéticos de la presente invención pueden fabricarse mediante síntesis química o mediante tecnología recombinante, mediante métodos bien conocidos en la técnica.

5 Cuando se preparan análogos tal como se describió anteriormente, obtenidos mediante sustitución de residuos de aminoácidos, es importante que las sustituciones se seleccionan de aquellas que acumulativamente no cambian sustancialmente el volumen, el patrón hidrófobo-hidrófilo y carga de la parte correspondiente del péptido original no sustituido. Por tanto, puede sustituirse un residuo hidrófobo por un residuo hidrófilo, o viceversa, siempre que el efecto total no cambie sustancialmente el volumen, el patrón hidrófobo-hidrófilo ni la carga del péptido original no sustituido correspondiente.

10 La presente invención también incluye derivados químicos de un péptido de la invención. El “derivado químico” contiene restos químicos adicionales que no son normalmente parte del péptido y está englobado por la invención siempre que conserve al menos una parte de la función del péptido que permita su utilidad en prevenir o inhibir las respuestas proliferativas de células T y la enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, un derivado químico puede resultar de la reacción de un agente de derivatización orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados de dicho péptido, y preferiblemente conservará al menos una parte de la función del péptido que inhibe específicamente la respuesta proliferativa y la secreción de citocinas de linfocitos T de ratones que responden bien a los autoanticuerpos que inducen LES. Entre estos derivados químicos, las amidas son de particular interés, tanto amidas de grupos carboxilo en el extremo C-terminal como de amidas de grupos carboxílicos libres de residuos de ácido aspártico o glutámico. Se conocen en la técnica muchos derivados químicos de este tipo y métodos para prepararlos.

25 También están incluidas en el alcance de la invención las sales de los péptidos y análogos de la invención. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “sales” se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de la molécula peptídica. Pueden formarse sales de un grupo carboxilo por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc, y similares, y sales con bases orgánicas tales como las formadas por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina, o lisina, piperidina, procaína, y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Tales derivados químicos y sales se usan preferiblemente para modificar las propiedades farmacéuticas del péptido en lo que se refiere a la estabilidad, solubilidad, etc.

30 Los péptidos basados en hCDR según la invención pueden seleccionarse sometiéndolos a prueba para determinar su potencial en la inhibición de la respuesta proliferativa de linfocitos T de ratones que responden bien a autoanticuerpos que inducen LES. Una vez que se produce un péptido según la presente invención, puede determinarse fácilmente su capacidad para inhibir la respuesta proliferativa de linfocitos T de ratones que responden bien a autoanticuerpos que inducen LES por los expertos habituales en la técnica sin excesiva experimentación usando pruebas tales como las descritas en el presente documento. Una prueba que puede realizarse fácilmente es para determinar la capacidad de los péptidos para inhibir *in vitro* las respuestas proliferativas de ciertas líneas de células T y clones específicos para autoanticuerpos que inducen LES. Las líneas de células T y los clones pueden ser, por ejemplo, las líneas de células T y clones específicos para el Acm 16/6 Id (Fricke *et al.*, 1991) establecidos a partir de células de ganglio linfático inmunizadas de ratones mediante la metodología descrita previamente (Axelrod, O. y Mozes, E. *Immunobiology*, 172, 99 (1986)). Se exponen las células al anticuerpo estimulador presentado en células de bazo singénicas irradiadas en presencia de medio enriquecido cada dos semanas. Se clonaron las líneas de células T mediante la técnica de dilución limitante habitual. Se someten a prueba las respuestas proliferativas de estas líneas de células T y clones, por ejemplo, mediante el método descrito en el documento WO 96/30057, en Materiales y métodos, sección (g).

35 Otra prueba que puede realizarse con el fin de seleccionar análogos que tienen la actividad deseada es someter a prueba la capacidad de los péptidos sintéticos para inhibir la capacidad de las líneas de células T y clones para proporcionar ayuda a las células B específicas del péptido en presencia del péptido original. También pueden someterse a prueba los péptidos sintéticos para determinar su capacidad para unirse directamente, tras biotilación, a productos de MHC de clase II en células presentadoras de antígenos de las estirpes relevantes. Para este fin, la biotilación N-terminal de los péptidos relevantes se realiza a 0°C con un exceso de biotina-N-hidroxisuccinimida en disolución acuosa (Mozes *et al.*, 1989). Se incuban células adherentes esplénicas de ratón o células adherentes a LSP (1×10^6 /muestra) con péptidos biotilados en PBS que contiene albúmina de suero bovino al 0,1% (PBS/BSA) a 37°C durante 20 h, seguido por incubación con ficoeritrina-estreptavidina durante 30 min. a 4°C. Tras cada incubación, se lavaron dos veces las células con la disolución anterior. Posteriormente, se analizaron las células mediante citometría de flujo usando FACScan. En cada análisis, se examinaron un mínimo de 5000 células (para los procedimientos anteriores, véase, por ejemplo, Mozes *et al.*, 1989).

40 Una prueba adicional que puede realizarse es someter a prueba la capacidad de los péptidos para inhibir la secreción de citocinas por la línea de células T o por linfocitos T o células de ganglio linfático de ratones que responden bien a autoanticuerpos que inducen LES. Las citocinas se detectan tal como sigue: la actividad de IL-1 se evalúa mediante ELISA usando un par de anticuerpos de captura y detección (tal como se describe a continuación para IL-4, IL-6, IL-10). IL-2 se detecta directamente usando la línea CTLL dependiente de IL-2 o mediante ELISA. Se determinan los niveles de IL-4, IL-6, IL-10, INF- γ y TNF- α en los sobrenadantes mediante ELISA usando anticuerpos frente a diversas citocinas (Pharmingen, San Diego, Ca., EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Además, puede evaluarse la capacidad de los péptidos para elevar el nivel de secreción de la citocina inmunosupresora TGF- β mediante ELISA tal como se describe en el presente documento en los ejemplos.

ES 2 275 832 T3

Los péptidos que dan positivo en una o más de estas pruebas *in vitro* proporcionarán expectativas razonables de actividad *in vivo*. Sin embargo, también pueden realizarse pruebas *in vivo* sin excesiva experimentación. Por tanto y por ejemplo, puede inyectarse a ratones adultos el péptido candidato en el día -3 o el día 0. Entonces se inmunizan los ratones con el autoanticuerpo que induce la enfermedad o con el péptido. Diez días después, se someten a prueba 5 células de ganglio linfático de los ratones para determinar su capacidad para proliferar para el inmunógeno con el fin de descubrir la capacidad inhibidora del péptido candidato.

Otra prueba con animales *in vivo* de este tipo consiste en medir la actividad terapéutica directamente en el modelo murino *in vivo* para la producción de LES tal como se describió anteriormente. Pueden inyectarse los péptidos a los 10 ratones en los que se induce LES experimental mediante varias vías a diferentes dosificaciones y con diferentes programas de tiempo. Además, pueden someterse a prueba periódicamente los ratones tratados con el fin de determinar el efecto de los péptidos sobre las respuestas de autoanticuerpos y sobre las manifestaciones de la enfermedad producidas en los ratones por el autoanticuerpo que induce LES.

Otro procedimiento *in vivo* consiste en evaluar la capacidad del péptido candidato para tratar ratones que desarrollan LES espontáneamente, por ejemplo, ratones (NZB x NZW)F1, tal como se describe en el presente documento en los ejempls.

Por tanto, puede observarse que, además de las realizaciones preferidas que se han mostrado que pueden ser factibles en los ejemplos del presente documento, los expertos habituales en la técnica podrán determinar análogos adicionales que también serán factibles siguiendo las directrices presentadas en el presente documento sin excesiva 20 experimentación.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un péptido individual con múltiples epítomos tal como un péptido doble. En una realización, el péptido doble consiste en dos péptidos diferentes basados en la misma CDR de la cadena pesada del Acm 16/6Id humano.

El péptido doble según la invención consiste en dos péptidos diferentes, siendo uno un péptido de SEQ ID NO: 11 y siendo el otro un péptido de SEQ ID NO: 19, más preferiblemente un péptido seleccionado del grupo que consiste 30 en SEQ ID NO: 6 y NO: 12-18 y otro péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y NO: 20-27, lo más preferiblemente siendo un péptido el péptido de SEQ ID NO: 6 y siendo el otro el péptido de SEQ ID NO: 7, estando los dos péptidos diferentes unidos covalentemente entre sí, o bien directamente o bien a través de una corta cadena de unión tal como un tramo de residuos de alanina o por un supuesto sitio para la proteólisis por catepsina. Véanse, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 5.126.249 y la patente europea 495049 con respecto a tales sitios.

Aún en otra realización preferida, la presente invención proporciona un péptido individual con múltiples epítomos que comprende varios péptidos iguales o diferentes de la presente invención en la forma de un polímero peptídico, obtenido, por ejemplo, mediante polimerización de los péptidos con un agente de polimerización adecuado, tal como 40 glutaraldehído al 0,1% (Audibert *et al.*, 1981, Nature 289: 593). El polímero contendrá preferiblemente desde 5 hasta 20 residuos peptídicos, preferiblemente un péptido de SEQ ID NO: 6, 7 y 11-27. Tales polímeros peptídicos también pueden formarse mediante reticulación de los péptidos o uniendo múltiples péptidos a vehículos macromoleculares. Vehículos macromoleculares adecuados son, por ejemplo, proteínas, tales como el toxoide tetánico; y copolímeros lineales o ramificados de aminoácidos, tales como un copolímero lineal de L-alanina, L-ácido glutámico y L-lisina y un copolímero ramificado de L-tirosina, L-ácido glutámico, L-alanina y L-lisina (T,G)-A-L-, o poli-DL-alanina de múltiples cadenas (M. Sela *et al.*, 1955, J. Am. Chem. Soc. 77: 6175). Se obtienen los conjugados, por ejemplo, acoplando en primer lugar el péptido con una carbodiimida soluble en agua, tal como clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilamino-propil)carbodiimida, y realizando luego la conjugación con el vehículo macromolecular tal como describen Muller, G.M. *et al.* (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 569. Se determina el contenido del péptido acoplado en cada conjugado mediante análisis de aminoácidos, en comparación con la composición del vehículo solo. 50

Según una realización adicional de la presente invención, pueden unirse uno o más péptidos activos a un vehículo macromolecular adecuado o pueden polimerizarse en presencia de glutaraldehído.

Se administran a los pacientes los péptidos, polímeros de los mismos o sus conjugados, con vehículos macromoleculares adecuados, en una forma que garantice su biodisponibilidad, haciéndolos adecuados para el tratamiento. Si se encuentra que más de un péptido de la invención tiene una actividad inhibidora significativa, estos péptidos pueden administrarse a los pacientes en una formulación que contenga una mezcla de los mismos.

Por tanto, la invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un péptido sintético o un polímero peptídico según la invención, opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un péptido sintético de la invención, más preferiblemente un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos hCDR1 [SEQ ID NO: 6] y hCDR3 [SEQ ID NO: 7] y péptidos obtenidos mediante sustitución y/o adición de residuos de aminoácidos en las secuencias de hCDR1 y hCDR3, en particular un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos de SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 18 y de SEQ ID NO: 20 a SEQ ID NO: 27.

ES 2 275 832 T3

En una realización, la composición farmacéutica comprende un péptido que consiste en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 amidado en el extremo C-terminal, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 La invención engloba cualquier vía de administración adecuada, incluyendo oral, intravenosa, subcutánea, intraarticular, intramuscular, inhalación, intranasal, intratecal, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica u otras vías conocidas, incluyendo la vía enteral. En realizaciones preferidas, los péptidos de la invención se administran por las vías oral, intranasal o subcutánea.

10 Los intervalos de dosis para la administración de las composiciones de la presente invención deben ser lo suficientemente grandes como para producir el efecto deseado mediante el cual, por ejemplo, se previene o inhibe sustancialmente una respuesta inmunitaria al autoanticuerpo que induce LES, medida mediante la proliferación de células T *in vitro*, y además, en el que se trata significativamente la enfermedad. Las dosis no deben ser tan grandes que produzcan efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, inmunosupresión generalizada, reacciones anafilácticas y similares.

15 Las dosis eficaces de los péptidos de esta invención en el tratamiento de LES están en el intervalo de aproximadamente 1 μ g a 1 mg y hasta 100 mg/kg de peso corporal.

20 Los péptidos humanos sintéticos de la invención tienen como objetivo inhibir o suprimir las respuestas frente a antígenos específicos de pacientes con LES, sin afectar a todas las demás respuestas inmunitarias. Este enfoque es de primordial importancia puesto que la mayor parte de los pacientes diagnosticados son mujeres jóvenes que tienen que tratarse durante muchos años y el tratamiento aceptado actualmente para el LES implica la administración de agentes inmunosupresores, tales como corticosteroides y/o fármacos citotóxicos, que son ambos no específicos y tienen múltiples efectos secundarios adversos.

25 La invención proporciona métodos para evaluar la eficacia de un fármaco que comprende un péptido o un polímero peptídico de la invención en el tratamiento de un paciente con LES, que comprende medir a diferentes intervalos de tiempo los niveles de MPM-3, MPM-9, IL-2, IFN- γ y/o TGF- β en una muestra de sangre obtenida de dicho paciente que se está tratando con dicho fármaco, mediante el cual un nivel disminuido de MPM-3, MPM-9, IL-2 y/o IFN- γ o un nivel aumentado de TGF- β , se correlaciona con la eficacia del fármaco.

30 La invención se refiere todavía adicionalmente al uso de un péptido de o un polímero peptídico de la invención para la preparación de una composición farmacéutica, en particular para el tratamiento de LES, más particularmente para la inmunomodulación de las respuestas asociadas a LES en un paciente con LES tales como la regulación por disminución de MPM-3 y/o MPM-9 y/o IL-2 y/o IFN- γ o la regulación por incremento de los niveles de TGF- β en un paciente con LES. En una realización preferida, se usa el péptido de la SEQ ID NO: 6, opcionalmente amidado en el extremo C-terminal. En otra realización preferida, se usa el péptido de la SEQ ID NO: 7, opcionalmente amidado en el extremo C-terminal.

40 Ahora se describirá la presente invención en más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes y las figuras adjuntas.

Ejemplos

45 *Materiales y métodos*

Ratones. Se obtuvieron ratones (NZB x NZW)F1 hembra del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se obtuvieron ratones hembra de la estirpe consanguínea BALB/c a la edad de 6-8 semanas, de la Unidad de Animales de Experimentación, Instituto Científico Weizmann, Rehoboth, Israel.

50 *Anticuerpo monoclonal anti-ADN.* Se caracterizó previamente (Shoenfeld *et al.*, 1982; Waisman *et al.*, 1995) el Acm anti-ADN humano que lleva el Id 16/6 (IgG1/k). Se secretó el Acm por células de hibridoma que se hicieron crecer en cultivo y se purificaron usando una columna de proteína G-Sepharose (Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Suecia).

55 *Péptidos sintéticos.* Los péptidos murinos sintéticos mCDR1 (SEQ ID NO: 1) y mCDR3 (SEQ ID NO: 3) así como los péptidos inversos que se sintetizaron en el orden inverso de mCDR1 y mCDR3 y en el orden inverso del péptido humano hCDR1, identificados en este documento como revmCDR1 [SEQ ID NO: 28], revmCDR3 [SEQ ID NO: 29], y revhCDR1 [SEQ ID NO: 30], respectivamente, usados como control, se prepararon tal como se describió anteriormente (documento WO 96/30057 o usando un sintetizador automático (modelo 430A de Applied Biosystems, Alemania)) usando los protocolos de la compañía para la técnica de t-butiloxicarbonilo (t-BOC).

65

ES 2 275 832 T3

Los péptidos inversos tienen las secuencias:

GIWELSKEPSQKVWQMYYGT revmCDR1 [SEQ ID NO: 28]

5 SGQGWYDMAYPEWLFRCYY revmCDR3 [SEQ ID NO: 29]

GIWEEGKGPPQRIWSWYYG revhCDR1 [SEQ ID NO: 30]

10 *Inducción y tratamiento de LES experimental.* Con el fin de inducir LES experimental, se inmunizaron ratones BALB/c con 1-2 μg de Acm 16/6Id humano y se realizó una inmunización de refuerzo 3 semanas después. Para la prevención de LES experimental, se administró a los ratones hCDR1 o hCDR3 (mCDR1 o revmCDR1 como péptido control en el ejemplo 12) por vía intravenosa (i.v.) o s.c., de manera concomitante con la inmunización, y después de esto, se les inyectó semanalmente durante 5 semanas. Se empezó el tratamiento de una enfermedad establecida tres meses y medio después de la inducción de la enfermedad con el 16/6Id, cuando ya se habían observado manifestaciones clínicas. En el ejemplo 12, los ratones recibieron 10 inyecciones semanales (i.v. o s.c.) de mCDR1 o revmCDR1 en una dosis de 100 μg /ratón.

20 *Prevención y tratamiento de la enfermedad similar a LES en ratones (NZB x NZW)F1 con el péptido hCDR1 o mCDR1.* Para la prevención de LES, se inyectó por vía s.c. hCDR1 (o mCDR1 en el ejemplo 12, 250 μg /ratón) a ratones a la edad de 2 meses, antes de observarse las manifestaciones de la enfermedad, una vez a la semana durante 10 semanas. Para tratar una enfermedad establecida, se inyectó a ratones a la edad de 5-7 meses hCDR1 (en el ejemplo 12, mCDR1 s.c., 250 μg /ratón) una vez a la semana durante 10 semanas.

25 *Respuestas proliferativas.* Se aislaron LSP de la sangre venosa heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Se realizaron todos los ensayos por triplicado en placas de microtitulación con fondo plano (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, California, EE.UU.) en las que se cultivaron 2×10^5 LSP en RPMI-1640 enriquecido, tal como se describe (Dayan *et al.*, 2000). Se expusieron los LSP a diversas concentraciones (0,1-40 μg /pocillo) de Acm 16/6Id anti-ADN humano con o sin la adición de diversos péptidos basados en CDR, a una concentración de al menos 10 veces superior a la del 16/6Id. Se utilizó fitohemaglutinina (PHA; 2 mg/pocillo) como control de las condiciones de cultivo en cada experimento. Se incubaron los cultivos, en CO_2 al 7,5% a 37°C durante 6 días. Dieciocho horas antes de que las células se recogieran, se añadió [^3H]-timidina (0,5 μCi de 5 Ci/mmol) (Nuclear Research Center, Negev, Israel) a todos los cultivos. Los resultados se expresan como la incorporación media de timidina, en cuentas por minuto (CPM) de cultivos por triplicado \pm DE, o como el índice de estimulación (I.E.; la razón de las CPM medias en la concentración óptima de 16/6Id humano con respecto a las CPM medias en presencia de medio solo). Un I.E. ≥ 2 se consideró una respuesta positiva (Dayan *et al.*, 2000). Se consideró positiva una inhibición (la razón de las CPM medias en presencia de 16/6Id y diversos péptidos basados en CDR con respecto a las CPM medias con el 16/6Id sin el péptido basado en CDR) superior al 50%.

40 *Inducción de la producción de citocinas.* Se sacrificaron ratones que se inmunizaron con el Acm 16/6Id humano y, o bien se trataron o bien no con el péptido basado en CDR, en periodos diferentes durante o después del tratamiento con el péptido. Se recogieron e incubaron esplenocitos y células de ganglio linfático (CGL) (5×10^6 /ml) en presencia del 16/6Id. Se recogieron los sobrenadantes después de 48 y 72 h.

45 *Evaluación de las citocinas en los sobrenadantes.* Se recogieron los sobrenadantes 48 horas después del inicio de los cultivos y se guardaron a -70°C. Se realizaron mediciones de IL-2, IL-10, IFN- γ , y TNF- α mediante ELISA usando los patrones relativos, los Ac de captura y detección (Pharmingén) según las instrucciones del fabricante. Se determinó TGF- β mediante un ELISA. En resumen, se recubrieron placas con la quimera sRII/Fc de TGF- β humano recombinante (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.), y el segundo Ac usado fue el anticuerpo anti-TGF- β 1 humano biotinilado (R & D Systems Inc.). La disolución de sustrato utilizada fue el reactivo colorante TMB (Helix Diagnostics, West Sacramento, CA), y se evaluó la actividad enzimática usando filtros de 570 y 630 nm.

55 *Detección de las manifestaciones clínicas y patológicas asociadas a LES.* Se midió la proteinuria de manera semicuantitativa usando el kit Combistix (División Ames, Bayer Diagnostics, Newbury, R.U.). Se contaron los glóbulos blancos (WBC, para determinar leucopenia) después de una dilución de 10 veces de sangre heparinizada con agua destilada que contenía un 1% de ácido acético (vol/vol). Para el análisis de inmunohistología se fijaron y tiñeron secciones congeladas de riñón (6 μm), con Ac de cabra conjugados con FITC frente a IgG de ratón (específicos de cadena γ ; Sigma).

60 *ELISA.* Se recubrieron placas de microtitulación Maxisorb de 96 pocillos (Nunc) con o bien BSA metilada o bien poli-L-lisina (Sigma), para medir los Ac anti-ADN. Las placas se lavaron y recubrieron entonces con o bien 10 μg /ml de ADN desnaturalizado de timo de ternera (Sigma) o bien ADN de doble cadena del fago γ (Boehringer Mannheim, 5 μg /ml). Después de la incubación con diferentes diluciones de los sueros, se añadió a las placas la IgG de cabra anti-ratón (específica de cadena γ) conjugada con la peroxidasa del rábano (Jackson ImmunoResearch), seguida de la adición del sustrato, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Sigma). Se leyeron los resultados mediante un lector de ELISA.

ES 2 275 832 T3

Medición de las actividades de MPM-2 y MPM-9. Se sometió a prueba la actividad de las MPM mediante zimo-
grafía en gel. Se separaron los sueros combinados de ratones individuales de los diferentes grupos experimentales
mediante un SDS-PAGE al 8% polimerizado con gelatina 1 mg/ml. Después de la electroforesis, se lavaron los geles
una vez durante 30 min. en Tritón X-100 al 2,5% para eliminar el SDS y una vez durante 30 min. en un tampón de
reacción que contiene Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM y Brij 35 al 0,02% (p/v) (pH 7,5). Se cambió el
tampón de reacción por uno nuevo y se incubaron los geles a 37°C durante 24 h. Se visualizó la actividad gelatinolítica
mediante la tinción de los geles con azul brillante de Coomassie al 0,5%.

Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de MM-3 en sueros. Se cargaron muestras de 5 µl de cada
suero en SDS/PAGE al 12%, se separaron en condiciones reductoras, y se transfirieron a nitrocelulosa. Se trataron
con sonda las inmunotransferencias (0,5 µg/ml, 1 h, temperatura ambiente) con anticuerpos anti-MPM-3 (Oncogene
Research Products, MA, EE.UU.), y se revelaron usando quimioluminiscencia.

Inmunotinción de secciones de riñón para determinar MPM-3 o MPM-9. Para la inmunotinción de MPM-3 o
MPM-9, se fijaron secciones de riñón (5 µm) con acetona fría (5 min. a temperatura ambiente), se lavaron dos veces
con PBS, se permeabilizaron (1 min. a temperatura ambiente) en Triton X-100 al 0,05% (diluido en PBS), y se
lavaron dos veces con PBS. Con el fin de conseguir una tinción específica anti-MPM y evitar la tinción de depósitos
de complejos inmunitarios por el anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con FITC; se bloquearon las secciones de
riñón (1 h a temperatura ambiente) con IgG+IgM de cabra anti-ratón sin marcar (diluido 1:1 con BSA al 1%/PBS;
Jackson ImmunoResearch Laboratories), y se lavaron 3 veces con PBS que contiene Tween al 0,05%. Se añadió
durante 30 min. el anticuerpo monoclonal anti-MPM-9 (1:100; Chemicon International, Inc.) o anti-MPM-3 (1: 50;
Oncogene Research Products) diluido con BSA al 1%/PBS, a temperatura ambiente. Para todos los procedimientos
de inmunotinción, se usó IgG+IgM de cabra anti-ratón marcado con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories),
diluido 1:30 con BSA al 1%/PBS (30 min. a temperatura ambiente).

Análisis estadístico. Los resultados se presentan como la media ± DE. Para el análisis estadístico se emplearon las
pruebas chi-cuadrado, de Wilcoxon, de Mann-Whitney y de la t. Se consideró significativo un $P \leq 0,05$.

Ejemplo 1

Síntesis de los péptidos humanos hCDR1 y hCDR3

Se prepararon los péptidos humanos hCDR1 (SEQ ID NO: 6) y hCDR3 (SEQ ID NO: 7) mediante métodos bien
conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante síntesis química en fase sólida o en fase de disolución usando un
sintetizador automático mediante el uso de los protocolos del fabricante para el procedimiento con t-butiloxicarbonilo
(t-Boc), fluorenilmethoxycarbonilo (Fmoc) u otros grupos protectores de alfa-aminoácidos esencialmente tal como
se describe (véase, por ejemplo, Peptides: Synthesis, Structure and Applications, ed. por B. Gutte, Academic Press,
1995; Peptide Synthesis Protocols, ed. por M. Pennington y B. Dunn, Humana Press, 1994; Schnolzer M. *et al.*, *In situ*
neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. *Int.*
J. Pept. Protein Res. 40: 180-193, 1992).

Ejemplo 2

Inhibición *in vivo* de la proliferación de células de ganglio linfático (CGL) de ratones inmunizados con mCDR1 y mCDR3 y tratados con hCDR1 y hCDR3

Con el fin de determinar la eficacia inhibidora de los péptidos humanos hCDR1 y hCDR3, se sometió a prueba en
primer lugar su capacidad para inhibir el cebado *in vivo* de ratones con los péptidos murinos mCDR1 y mCDR3.

Para este fin, se inmunizaron ratones BALB/c y SJL con mCDR1 y mCDR3, respectivamente. Los péptidos mu-
rinos de inmunización se inyectaron (10 µg/ratón) con ACF por vía intradérmica en las almohadillas de las patas
traseras. De manera concomitante con la inmunización, se inyectó a grupos de ratones BALB/c por vía subcutánea
(s.c.) 200 µg de hCDR1 en PBS y de manera similar, se inyectó hCDR3 a grupos de ratones SJL. Diez días después
de la inmunización, se sacrificaron los ratones y se recogieron sus ganglios linfáticos y se sometieron a prueba las
células para determinar su capacidad de proliferar después de su activación con los péptidos de inmunización. En
resumen, se cultivaron CGL de ratones inmunizados (0,5 x 10⁶/pocillo) (por triplicado) en presencia de diferentes
concentraciones (1-20 µg/pocillo) de los péptidos de inmunización murinos en medio RPMI-1640 enriquecido y com-
plementado con suero normal de ratón al 1%. Después de cuatro días de incubación, se añadió ³H-timidina durante 16
horas adicionales. Después se recogieron las células y se contó la radioactividad usando un contador β.

Los resultados en las tablas 1A y 1B representan el % de inhibición máxima de la proliferación de CGL de ratones
inmunizados con mCDR1 y mCDR3 y tratados con hCDR1 y hCDR3, respectivamente. La inhibición se calculó
basada en la proliferación de CGL de ratones que no se trataron con los péptidos inhibidores hCDR1 y hCDR3. Puede
observarse que hCDR1 y hCDR3 pudieron inhibir las respuestas proliferativas frente a los péptidos de inmunización
murinos CDR.

ES 2 275 832 T3

TABLA 1A

Inhibición por hCDR1 de la proliferación de CGL derivadas de BALB/c frente a mCDR1

Inhibidor	% de Inhibición
hCDR1	55%

TABLA 1B

Inhibición por hCDR3 de la proliferación de CGL derivadas de SJL frente a mCDR3

Inhibidor	% de Inhibición
hCDR3	55%

Ejemplo 3

Inhibición in vivo de la proliferación de CGL en ratones inmunizados con el Acm 16/6Id anti-ADN humano y tratados con hCDR1 y hCDR3

Debido a que el objetivo era someter a prueba la capacidad inhibitoria de los péptidos basados en la CDR del anticuerpo 16/6Id humano, era importante averiguar si los péptidos hCDR1 y hCDR3 pueden inhibir el cebado con respecto a la totalidad de la molécula de Acm 16/6Id humano. Para esto, se cebaron ratones BALB/c y SJL con el Acm 16/6Id humano (2 µg/ratón) en ACF por vía intradérmica en las almohadillas de las patas traseras. El cebado se realizo de manera concomitante con la administración s.c. de 200 µg/ratón de hCDR1 en PBS a grupos de ratones BALB/c y de hCDR3 a ratones SJL. Diez días después de la inmunización, se sacrificaron los ratones y se sometieron a prueba *in vitro* sus CGL para determinar su capacidad de proliferar a diferentes concentraciones (0,1-10 µg/pocillo) del Acm 16/6Id anti-ADN humano.

Se muestran resultados representativos de estos experimentos en las tablas 2A y 2B. Los resultados se presentan como el % de inhibición máxima de la proliferación frente al Acm 16/6Id humano de células de ganglio linfático de ratones inmunizados y tratados con los péptidos hCDR1 y hCDR3, comparado con ratones que se inmunizaron con el Acm 16/6Id pero que no se trataron con los péptidos. Tal como puede observarse, ambos péptidos hCDR1 y hCDR3 pudieron inhibir eficazmente el cebado con el Acm 16/6Id humano.

TABLA 2A

Inhibición por hCDR1 de la proliferación de CGL derivadas de BALB/c frente al Acm 16/6Id humano

Inhibidor	% de Inhibición
hCDR1	88%

TABLA 2B

Inhibición por hCDR3 de la proliferación de CGL derivadas de SJL frente al Acm 16/6Id humano

Inhibidor	% de Inhibición
hCDR3	68%

Se demostró mediante experimentos adicionales que la administración nasal de dosis de tan sólo 10 o incluso 2 µg/ratón del péptido hCDR1 o hCDR3, de manera concomitante con la inmunización con el Acm 16/6Id humano, inhibieron las respuestas proliferativas de las células de ganglio linfático frente al anticuerpo de inmunización hasta en un 100%.

ES 2 275 832 T3

En otro experimento, se inmunizaron ratones BALB/c con 1 μg de 16/6Id humano en ACF, por vía intradérmica en las almohadillas de las patas traseras, y o bien se les inyectó hCDR1 s.c., 300 μg /ratón en PBS, o bien no se trataron adicionalmente. Diez días después se sacrificaron los ratones y sus CGL se sometieron a prueba para determinar su capacidad de proliferar *in vitro* frente al 16/6Id humano. Por tanto, se incubaron CGL poplíteas ($0,5 \times 10^6$) en presencia de diversas concentraciones (0,1-10 μg /pocillo) de Acm 16/6Id anti-ADN humano. Al final de la incubación durante 4 días, se añadió ^3H -timidina a los cultivos durante al menos 18 horas de incubación. Después se recogieron las células y se contó la radioactividad.

La figura 1 muestra los resultados de tales experimentos y demuestra que hCDR1 inhibió eficazmente las respuestas proliferativas de las células de ganglio linfático de los ratones tratados. El % de inhibición de la proliferación a las diversas concentraciones de Acm 16/6Id fue tal como sigue: 0,1 μg /pocillo - 47%; 1 μg /pocillo - 66%; 5 μg /pocillo - 76%; y 10 μg /pocillo - 62%.

Se repitió el mismo experimento anterior con 50 μg de hCDR1/ratón en PBS. La figura 2 muestra que hCDR1 es muy eficaz para inhibir el cebado *in vivo* de ratones con la macromolécula 16/6Id anti-ADN completa e incluso una inyección s.c. con tan sólo 50 μg de hCDR1 inhibió significativamente la capacidad de las células de ganglio linfático para proliferar frente al autoanticuerpo 16/6Id. El % de inhibición de la proliferación a las diversas concentraciones de Acm 16/6Id fue tal como sigue: 0,1 μg /pocillo - 98%; 1 μg /pocillo - 76%; 5 μg /pocillo - 73%; y 10 μg /pocillo - 64%.

Ejemplo 4

El péptido hCDR1 inmunomodula la producción de citocinas

Las células de ganglio linfático de los ratones BALB/c tratados con 50 μg de hCDR1 del ejemplo 3 también se estimularon con el Acm 16/6Id humano para la producción de citocinas y se sometieron a prueba los sobrenadantes para determinar la secreción de citocinas (INF- γ TGF- β e IL-10) mediante ELISA.

La figura 3 muestra los resultados de un experimento representativo. Puede observarse que hCDR1 reguló por disminución la producción de INF- γ (figura 3A) y reguló por incremento la secreción de TGF- β (figura 3B) e IL-10 (figura 3C). Debe observarse que un péptido usado como control (p259-271, que demostró ser un péptido miastenogénico) no afectó significativamente la producción de INF- γ e IL-10 y fue menos eficaz en la regulación por incremento de TGF- β .

Ejemplo 5

Los péptidos hCDR1 y hCDR3 inhiben la respuesta proliferativa de los LSP de pacientes con LES frente al Acm 16/6Id humano

Sesenta y dos pacientes con LES, 9 masculinos (14,5%) y 53 femeninos (85,5%) participaron en el estudio. La edad media en el diagnóstico era de $32,95 \pm 12,92$ (intervalo de 12-61) años y el periodo medio de seguimiento fue de $10,98 \pm 10,76$ (intervalo de 1-32) años. Todos los pacientes cumplían al menos 4 de los criterios para el diagnóstico de LES revisados del Colegio Americano de Reumatología (ACR) (Tan *et al.*, 1982). Los pacientes se reclutaron en tres centros médicos israelíes (Kaplan, Rehovot; Ichilov, Tel Aviv; Asaf-Harofeh, Rishon Lezion). Se determinó la actividad de la enfermedad según el índice de actividad del lupus (IAELES) (Bombardier *et al.*, 1992). Se estudió un grupo control de 36 voluntarios de control sanos con sexo y edad coincidentes de manera concomitante con los pacientes con LES. El estudio fue aprobado por el comité ético del centro médico.

Era de interés investigar si los péptidos hCDR1 y hCDR3, que están basados en la CDR1 y CDR3 del Acm 16/6Id humano, pueden inhibir las respuestas proliferativas específicas de los LSP de pacientes con LES frente al Acm 16/6Id humano. Para este fin, se tuvo que identificar en primer lugar los pacientes cuyos LSP se pudieron estimular para proliferar por el Acm 16/6Id humano (pacientes que responden).

Por tanto, se cultivaron los LSP de 62 pacientes con LES consecutivos en presencia del 16/6 Id humano y se determinaron sus respuestas proliferativas y su capacidad para secretar IL-2. Respondieron los LSP de 24 de un total de 62 (39%) y de 23 de 55 (42%) de pacientes con LES que se sometieron a prueba (IE ≥ 2 , intervalo de 2-5,6) mediante proliferación y mediante secreción de IL-2 (IE ≥ 2 , intervalo de 2-60), respectivamente. La frecuencia de pacientes que responden en el grupo de pacientes con LES fue menor que la observada en el grupo de donantes sanos que se sometió a prueba como control. Por tanto, los LSP de 21 de un total de 36 (58%) de donantes sanos respondieron mediante proliferación frente al 16/6 Id. El grado de proliferación (niveles de IE) fue similar para pacientes con LES y para los controles sanos que respondieron al 16/6 Id. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 4, la respuesta óptima frente al 16/6 Id de los LSP de los donantes control se observó a concentraciones superiores de 16/6 Id comparado con las de los pacientes con LES.

No pudo demostrarse ninguna diferencia entre el sexo y la edad de los pacientes con LES que respondieron al 16/6 Id y el grupo de pacientes que no responden. Sin embargo, los pacientes cuyos LSP proliferaron en respuesta al 16/6 Id estuvieron enfermos durante un periodo de tiempo más corto (una media de $9,78 \pm 8,36$ frente a $11,73 \pm 12,06$ años para pacientes que responden y que no responden, respectivamente; $P \leq 0,036$). La tabla 3 resume la caracterización clínica de los grupos de pacientes con LES que responden y no responden a 16/6 Id. Tal como

ES 2 275 832 T3

5 puede observarse en la tabla, ambos grupos son similares en la mayoría de manifestaciones clínicas relacionadas con LES. La puntuación de la actividad de la enfermedad de LES (IAELES) y el número de criterios de diagnóstico de LES fueron también similares en los dos grupos. Sin embargo, se observaron una mayor frecuencia de afectación neurológica (tanto convulsiones como psicosis) y hematológica y una menor tasa de afectación renal en el grupo de
10 pacientes que responde en comparación con el grupo de pacientes que no responden. Sin embargo, probablemente debido al bajo número de pacientes en los subgrupos relevantes, las diferencias anteriores no alcanzaron significación estadística. Además, se determinaron menos pacientes que responden entre los tratados con o bien esteroides o bien agentes citotóxicos en el momento del estudio. Es de interés que significativamente más pacientes que nunca recibieron esteroides respondieron al 16/6 Id, en comparación con el grupo que no respondió (54% frente al 21%; $P = 0,023$).

15 Es de interés que la eficacia de los péptidos basados en CDR para inhibir las respuestas proliferativas de los LSP de donantes sanos frente al 16/6Id fue mucho menor que la observada para los LSP de pacientes con LES (no mostrado).

TABLA 3

Caracterización clínica y de laboratorio de pacientes con LES

*A: Criterios de diagnóstico**

	Todos los pacientes	Pacientes que responden	Pacientes que no responden
Número de pacientes (%)	62 (100)	24 (39)	38 (61)
Exantema malar	19/62 (30,1)	8/24 (33,3)	11/38 (29)
Exantema discoide	9/62 (15)	3/24 (12,5)	6/38 (16)
Fotosensibilidad	21/62 (34)	9/24 (37,5)	12/38 (32)
Úlceras mucosas	17/62 (27,4)	8/24 (33,3)	9/38 (23,7)
Artritis	46/62 (74,2)	19/24 (79,2)	27/38 (71)
Serositis	14/62 (22,6)	5/24 (20,8)	9/38 (23,7)
Trastornos neurológicos	5/62 (8,1)	4/24 (16,7)	1/38 (2,7)
Trastornos renales [†]	24/62 (38,8)	7/24 (29,2)	17/38 (44,8)
Trastornos hematológicos [†]	44/62 (71)	19/24 (79,2)	25/38 (65,8)
ANA	61/62 (98,4)	24/24 (100)	37/38 (92,1)
α -dsADN	54/62 (87,1)	19/24 (79,2)	35/38 (92,1)
APLA	35/62 (56,5)	12/24 (50,0)	23/38 (60,53)

B: Actividad de la enfermedad

Puntuación de IAELES	6,65 \pm 5,12	7,29 \pm 1,06	6,24 \pm 0,84
Número de criterios de diagnóstico de ACR	5,44 \pm 1,39	5,54 \pm 0,33	5,34 \pm 0,2

ES 2 275 832 T3

C: Tratamiento actual†

5	AINE	17/62 (27,4)	6/24 (25)	11/38 (29)
	Antipalúdico	37/62 (59,7)	15/24 (62,5)	22/38 (57,9)
	Esteroides‡	33/62 (53,2)	11/24 (45,8)	22/38 (57,9)
10	Citotóxico‡	10/62 (16,1)	2/24 (8,3)	8/38 (21)

*Se definió la participación clínica según los criterios revisados del ACR. Se determinaron los anticuerpos antinucleares (ANA) y los anticuerpos anti-dsADN usando células Hep2 y *Crithidia luciliae*, respectivamente. Se definieron los anticuerpos anti-fosfolípidos (APLA) como reactividad en uno o más de los siguientes ensayos: VDRL falso positivo, anticoagulante de lupus (LAC) o ELISA para determinar anticuerpos anti-cardiolipina.

† Se usó el agente antipalúdico, hidroxiclороquina, a una dosis de 200-400 mg/día; se definió el tratamiento con esteroides como una dosis diaria ≥ 5 mg de prednisona; los agentes citotóxicos usados fueron ciclofosfamida (0,75-1,0 g/m²; al mes) o azatioprina (100-150 mg/día).

‡Parámetros para los que se observó tendencia hacia diferencias entre los dos grupos de pacientes con LES que responden y que no responden al tratamiento.

Para someter a prueba la capacidad de los péptidos hCDR1 y hCDR3 para inhibir la respuesta proliferativa de LSP de pacientes con LES para el Acm 16/6Id humano, se estimularon LSP (2×10^5 /pocillo) de pacientes con LES *in vitro* por triplicado con diferentes concentraciones (0,1-20 μ g/pocillo) del Acm 16/6Id humano en ausencia o presencia de los péptidos hCDR1 y hCDR3 (o bien 50 o bien 100 μ g/pocillo). Tras 6 días de incubación, se añadió ³H-timidina (0,5 μ Ci de 5 Ci/mmol) a cada pocillo durante 18 horas de incubación adicionales. Entonces se recogieron las células y se contó la radiactividad usando un contador β . Los resultados se expresaron como las cuentas medias por minuto (cpm) de cultivos por triplicado. Entonces se calcularon los índices de estimulación (la razón de las cpm medias a la concentración óptima de 16/6Id con respecto a las cpm medias sin 16/6Id). Se consideró positivo un índice de estimulación (IE) ≥ 2 .

Se encontró que los LSP de 24 del total de 62 (39%) de pacientes con LES proliferaban frente al Acm 16/6Id. Se sometió a prueba la capacidad de los péptidos hCDR1 y hCDR3 para inhibir las respuestas proliferativas frente a la molécula completa del autoanticuerpo 16/6Id en los LSP de los 19 pacientes con LES que responden.

La tabla 4 muestra los resultados de estos experimentos. Se consideró positiva una inhibición superior al 50% de la capacidad proliferativa. La tabla representa la mayor capacidad de inhibición positiva para cada péptido. Puede observarse que los hCDR1 y hCDR3 humanos inhibieron la proliferación de los LSP de 16/19 (84,2%) y 15/19 (78,9%), respectivamente, de los 19 pacientes que responden sometidos a prueba. Ambos péptidos inhibieron la proliferación de los LSP de 18/19 (95%) de los pacientes que responden sometidos a prueba. También puede observarse en la tabla que las magnitudes de las inhibiciones fueron similares para ambos péptidos. Por tanto, puede concluirse que los péptidos basados en CDR1 y CDR3 del Acm 16/6Id humano son inhibidores eficaces de la proliferación de los LSP de pacientes con LES frente al Acm 16/6Id.

TABLA 4

Inhibición de la proliferación de las LSP de pacientes con LES por los péptidos hCDR1 y hCDR3

Número	Iniciales	Inhibición en porcentaje	
		hCDR1	hCDR3
1.	B.L.	62	< 50
2.	M.D.	70	75
3.	T.L.	69	< 50

ES 2 275 832 T3

4.	Z.D.	< 50	< 50
5.	N.N.	88,5	87,5
6.	S.S.	80	80
7.	S.H.	76	70,4
8.	S.D.	58	56
9.	A.N.	69,5	65
10.	I.J.	68,2	71,8
11.	L.J.	< 50	72
12.	V.L.	82	86
13.	M.S.	63	64
14.	D.S.	56	74
15.	Z.A.	63	69
16.	B.M.	< 50	68
17.	S.N.	70,5	77,8
18.	G.M.	51,5	< 50
19.	N.J.	63	60,8
Media ± DE		68,12 ± 9,57	71,82 ± 8,44

Ejemplo 6

Especificidad de la capacidad inhibidora de hCDR1 y hCDR3

Es importante demostrar que los efectos inhibidores de los péptidos basados en hCDR son específicos frente a las respuestas asociadas a LES. Para este fin, se añadieron los péptidos hCDR1 y hCDR3 a cultivos de LSP de pacientes con LES que se estimularon con la fitohemaglutinina mitógena (PHA, 2 µg/ml). Los resultados de un experimento de este tipo realizado con los LSP de un paciente con LES se muestran en la figura 5. Los péptidos hCDR1 y hCDR3 no pudieron inhibir las respuestas proliferativas (expresadas en cpm) de los LSP frente a la PHA mitógena y las respuestas proliferativas fueron altas de manera similar en ausencia (columna negra) o presencia de o bien hCDR1 o bien hCDR3.

En otro experimento, se estimularon cultivos de LSP de pacientes con LES con el Acm 16/6Id humano y luego se incubaron con los péptidos humanos hCDR1 o hCDR3 o con el péptido murino mCDR3 como control. Los resultados de un experimento de este tipo realizado con los LSP de un paciente con LES se muestran en la figura 6. Tal como se muestra en la figura 6, mientras que ambos péptidos hCDR1 y hCDR3 basados en el autoanticuerpo humano inhibieron eficazmente las respuestas proliferativas de LSP frente al Acm 16/6Id humano, el péptido mCDR3 basado en la CDR3 del anticuerpo murino no inhibió la proliferación.

Se usaron dos péptidos control adicionales en estos experimentos, concretamente los péptidos sintetizados en el orden inverso de los péptidos mCDR1 y mCDR3 murinos (revmCDR1 y revmCDR3), y los resultados se muestran en la figura 7. Puede observarse que los dos péptidos inversos fracasaron en inhibir significativamente las respuestas proliferativas de los LSP del paciente con LES frente a Acm 16/6Id humano mientras que los péptidos hCDR1 y hCDR3 sí que inhibieron eficazmente la proliferación, lo que demuestra que la inhibición de la proliferación por los péptidos basados en hCDR humano es específica para los péptidos y para las respuestas de células T asociadas a LES.

Ejemplo 7

Regulación por disminución de la secreción de IL-2 por LSP de pacientes con LES en presencia de los péptidos hCDR1 y hCDR3

5 Era de interés averiguar si los péptidos hCDR pueden inhibir la secreción de IL-2 mediante los LSP de pacientes con LES tras estimulación con el Acm 16/6Id humano. Tal inhibición podría sugerir también que los péptidos basados en CDR humanos inhiben las respuestas proliferativas frente al Acm 16/6Id al menos parcialmente regulando por
10 disminución la secreción de IL-2. Con este fin, se incubaron LSP de pacientes con LES con el Acm 16/6Id humano en ausencia o presencia de los péptidos hCDR1 o hCDR3. Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos tras 48 horas de incubación. Se realizaron ensayos para determinar los niveles de IL-2 en los sobrenadantes usando la línea dependiente de IL-2 CTLL. En resumen, las células de la línea CTLL (2×10^4 /pocillo) se incubaron en presencia de los
15 diferentes sobrenadantes durante 24 horas, seguido por la adición de ^3H -timidina durante un periodo de incubación adicional de 18 horas. Entonces se recogieron las células y se contó la radiactividad usando un contador (Se calcularon los resultados basándose en IL-2 humano recombinante usado como patrón. Se sometió a prueba la capacidad de los péptidos para inhibir la secreción de IL-2 de los LSP de 23 pacientes que responden estimulados mediante el 16/6Id humano. Los resultados, mostrados en la tabla 5, muestran que hCDR1 y hCDR3 inhibieron la secreción de IL-2 mediante los LSP de 21/23 y 19/23 pacientes, respectivamente. La inhibición de las respuestas proliferativas de los LSP se correlacionó directamente con la inhibición de IL-2 por los péptidos basados en CDR. Por tanto, se observó la
20 inhibición de la secreción de IL-2 en todos los casos en los que se determinó inhibición de la proliferación.

Los resultados obtenidos con los LSP de un paciente con LES representados en la figura 8 (la secreción de IL-2 se expresa en pg/ml) muestran que tanto hCDR1 como hCDR3 inhibieron el 100% de la secreción de IL-2 por los LSP de un paciente con LES activados mediante el Acm 16/6Id humano.

TABLA 5

Inhibición de la proliferación de LSP de pacientes con LES por los péptidos hCDR1 y hCDR3

30

Péptido	Actividad inhibidora*	Máxima inhibición
	%	%
hCDR1	91 (21/23)	84 \pm 31
hCDR3	83 (19/23)	78 \pm 34

35

40

* La secreción de IL-2 en presencia de 16/6Id solo se consideró como el 100%. Se consideró significativa una inhibición del 50% o superior.

45

Ejemplo 8

Regulación por incremento de la secreción de la citocina inmunosupresora TGF- β por péptidos basados en CDR

50

En un intento de arrojar luz sobre los mecanismos mediante los cuales los péptidos basados en CDR humanos inhiben las respuestas proliferativas frente al anticuerpo 16/6Id anti-ADN monoclonal humano, se determinaron los niveles de la citocina inmunosupresora TGF- β en los sobrenadantes de los cultivos celulares. La justificación subyacente a estos experimentos se basa en los hallazgos previos de niveles elevados de TGF- β en cultivos de esplenocitos de ratones con LES o bien inducidos con el Acm 16/6Id anti-ADN humano o {ratones (NZB x NZW) F1} espontáneos tras el tratamiento con los péptidos basados en CDR de ratón (Eilat *et al.*, 2001). La elevación en los niveles de TGF- β se correlacionó con la mejoría de las manifestaciones de la enfermedad en los ratones tratados.

55

Para este fin, se extrajeron los sobrenadantes de los cultivos de LSP de diversos pacientes con LES tras una incubación de 48 horas con el Acm 16/6Id humano en ausencia o presencia de los péptidos hCDR1 o hCDR3. Se determinó TGF- β mediante ELISA según las instrucciones del fabricante. En resumen, se recubrieron placas Maxisorb (Nunc) con quimera TGF β sRII/Fc recombinante humana (R&D Systems) diluida en PBS (100 ng/ml). Tras el bloqueo, se añadieron sobrenadantes celulares. Tras 18 de incubación se añadió el anticuerpo anti-TGF- β humano biotinilado de detección (R&D Systems). La disolución de sustrato usada fue el reactivo colorante TMB (Helix Diagnostics) y se evaluó la actividad enzimática mediante el lector MRX ELISA usando los filtros de 570 nm y 630 nm. Los resultados se muestran en la tabla 6.

60

65

ES 2 275 832 T3

Los resultados en la figura 9 demuestran que los péptidos hCDR1 y hCDR3 activaron una regulación por incremento significativa en la secreción de TGF- β (expresada en pg/ml) mediante los LSP de un paciente con LES representativo que se estimularon con el Acm 16/6Id humano patógeno.

TABLA 6

Regulación por incremento de la secreción de TGF- β de la estimulación inducida con 16/6 Id de los LSP de pacientes con LES con los péptidos hCDR1 y hCDR3

	Péptido	Regulación incremento de TGF- β %	por Máxima regulación por incremento %
	hCDR1	100 (19/19)	305 \pm 221
	hCDR3	100 (19/19)	338 \pm 242

Se consideró como el 100% la secreción de TGF- β en presencia de 16/6 Id solo (media de 636 \pm 25 pg/ml). Los resultados se expresan como secreción en porcentaje por encima del porcentaje en presencia de 16/6Id solo.

Ejemplo 9

Inmunomodulación de las manifestaciones de LES en ratones mediante hCDR1: Mejoría de las manifestaciones de la enfermedad tras el tratamiento de ratones (NZB x NZW)F1 con hCDR1

Tal como se mostró anteriormente, los péptidos basados en la CDR del Acm 16/6Id anti-ADN humano podían inhibir el cebado de células de ganglio linfático frente al Acm 16/6Id y las respuestas proliferativas de los LSP de pacientes con LES frente al Acm 16/6Id con eficacia similar. Por tanto, era de interés averiguar si estos péptidos pueden inmunomodular una enfermedad similar a LES en modelos animales.

Los experimentos dirigidos a tratar la capacidad de los péptidos humanos para tratar una enfermedad de LES establecida se realizaron en primer lugar con el péptido hCDR1. Con este fin, se diseñaron unos cuantos experimentos en los que se trataron con el péptido hCDR1 ratones (NZB x NZW)F1 propensos a padecer LES a la edad de 5 meses y medio, cuando ya se observan manifestaciones de la enfermedad similar a LES (anti-dsADN, proteinuria, etc.). Se administró por vía s.c. semanalmente el péptido hCDR1 en PBS, durante 10 semanas. Se sometió a prueba la eficacia de diferentes dosis (50, 100 y 200 μ g/ratón) del péptido hCDR1. Se les inyectó a los grupos control el PBS vehículo. El tratamiento condujo a una reducción moderada de los títulos de autoanticuerpos anti-dsADN. Por tanto, se midieron valores de D.O. de 0,586 \pm 0,1, 0,27 \pm 0,1, 0,37 \pm 0,1 y 0,29 \pm 0,1 en diluciones de sueros 1:1250, al final del tratamiento para sueros de ratones tratados con PBS, ratones tratados con 50 μ g/ratón, 100 μ g/ratón y 200 μ g/ratón de hCDR1, respectivamente.

Se realizó otro experimento en el que se trataron semanalmente ratones (NZB x NZW)F1 de 7 meses de edad durante 10 semanas con 300 μ g de hCDR1 inyectado por vía s.c. en PBS. Pudo observarse una reducción leve en los títulos de anticuerpos anti-ADN en los sueros de ratones tratados con hCDR1. No obstante, la tabla 7 muestra que el tratamiento con hCDR1 dio como resultado una reducción en la proteinuria y una disminución significativa en los depósitos de complejos inmunitarios (DCI) en los riñones de los ratones tratados. Los resultados en la tabla expresan la intensidad de los DCI en la que 0 = ningún DCI; 1 = DCI moderado; 2 = DCI grave y 3 = DCI grave y extremadamente intenso.

TABLA 7

Manifestaciones clínicas de los ratones (NZB x NZW)F1 tratados con hCDR1 a la edad de 7 meses

Tratamiento	Proteinuria g/L \pm EEM	Depósitos de complejos inmunitarios \pm EEM
Sin tratar	4,80 \pm 2,56	2,57 \pm 0,29
hCDR1 300 μ g/ratón	1,08 \pm 0,38	1,44 \pm 0,41 p = 0,035

p se calculó en comparación con el grupo de ratones no tratados.

ES 2 275 832 T3

Luego se realizó un experimento adicional usando 400 μg /ratón de hCDR1 para averiguar si pueden lograrse efectos más beneficiosos aumentando la dosis del péptido. El tratamiento con 400 μg /ratón de hCDR1 no tuvo un efecto mayor sobre los títulos de anticuerpos anti-ADN y, tal como puede observarse en la tabla 8, el efecto sobre la enfermedad renal era similar al observado tras el tratamiento con la dosis de 300 μg .

TABLA 8

Manifestaciones clínicas de ratones (NZB x NZW)F1 tratados con hCDR1 a la edad de 6 meses

Tratamiento	Proteinuria g/L \pm EEM	Depósitos de complejos inmunitarios \pm EEM
Sin tratar	4,99 \pm 2,53	2 \pm 0,29
hCDR1 400 μg /ratón	0,77 \pm 0,32	1,42 \pm 0,19 p = 0,05

p se calculó en comparación con el grupo de ratones no tratados.

Por tanto, se ha realizado un experimento adicional en el que se trataron ratones con 300 μg de hCDR1 a la edad de 7 meses y se usó un péptido control, concretamente el hCDR1 inverso. El objetivo del experimento era averiguar si, además de la mejoría en las manifestaciones clínicas, el tratamiento con hCDR1 inmunomodula la producción de citocinas. La figura 10 demuestra la reducción leve de los niveles de autoanticuerpos anti-ADN. La tabla 9 muestra la proteinuria medida a diferentes puntos de tiempo.

TABLA 9

Manifestaciones clínicas de ratones (NZB x NZW)F1 tratados con hCDR1 a la edad de 7 meses

Tratamiento	Proteinuria g/L \pm EEM		
	Tras tratamiento n°		
	5	7	9
No tratado	2,65 \pm 1,76	3,89 \pm 2,73	7,55 \pm 3,95
hCDR1 300 μg /ratón	0,61 \pm 0,23	0,65 \pm 0,32	1,02 \pm 0,39 p = 0,05
revhCDR1 300 μg /ratón	6,94 \pm 2,53	6,76 \pm 2,91	5,99 \pm 3,08

El efecto del tratamiento con hCDR1 puede observarse en todas las mediciones. El daño renal es una de las principales manifestaciones de la enfermedad similar a LES en los ratones (NZB x NZW)F1. Un tratamiento de diez semanas con el péptido hCDR1 redujo significativamente la enfermedad renal. La dosis de 50 μg fue menos eficaz que las dosis de 100 y 200 μg en el tratamiento de la enfermedad renal. Estas últimas dos dosis fueron eficaces de manera similar.

Las figuras 11A-11D son fotografías que muestran secciones de riñón representativas de ratones tratados con la dosis de 100 μg de hCDR1. Así, se sacrificaron los ratones a la edad de 9 meses y se extrajeron sus riñones y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se secaron al aire secciones de criostato congeladas de 5 μm y se fijaron en acetona. Para la detección de los depósitos de Ig, se incubaron las secciones con IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC (específica de cadena γ). Las figuras 11A y 11B muestran secciones de riñón de un ratón del grupo tratado con PBS (control) mientras que las figuras 11C y 11D muestran secciones de riñón de un ratón tratado con 100 μg de hCDR1. Puede observarse en las figuras que el tratamiento redujo el número de complejos inmunitarios así como su intensidad (11A, 11C x 100; 11B, 11D x 400).

Se obtuvieron resultados similares cuando se trataron los grupos de ratones (NZB x NZW)F1 con hCDR1 a la edad de 7 meses cuando ya se observaba su enfermedad totalmente desarrollada. Se trataron los ratones durante 10 semanas

ES 2 275 832 T3

con o bien 100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ o bien 300 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. El tratamiento con ambas dosis condujo a una reducción moderada en los títulos de autoanticuerpo anti-ADN, similar a los resultados descritos anteriormente. También se midió una reducción en la proteinuria en comparación con el grupo tratado con PBS. La enfermedad renal mejoró tras el tratamiento con ambas dosis; no obstante, se determinó un efecto más significativo en el grupo de los ratones tratados con la dosis de 300 μg . Las figuras 12A-12F son secciones de riñón de ratón representativas de cada grupo en las que A, B representan un ratón no tratado; C, D representan un riñón de un ratón tratado con hCDR1 y E, F representan una sección de riñón de un ratón tratado con el hCDR1 inverso. A, C, E x 100 y B, D, F x 400.

Las figuras 13A-13C muestran el patrón de citocinas (INF- γ , IL-10 y TGF- β) medido mediante ELISA en sobrenadantes de cultivos estimulados con Con A de esplenocitos de ratones de los 3 grupos tomados al final del tratamiento (10 inyecciones s.c. semanales). Puede observarse que INF- γ (figura 13A) e IL-10 (figura 13B, en menor medida) estuvieron regulados por disminución en los ratones tratados. Pudo observarse un aumento de la secreción de TGF- β en los sobrenadantes de las células no estimuladas (figura 13C, a la izquierda). Con A no estimuló las células para secretar más TGF- β (figura 13C, a la derecha).

Los resultados resumidos anteriormente indican que el tratamiento a largo plazo con hCDR1 mejora las manifestaciones de la enfermedad e inmunomodula la secreción de citocinas.

Ejemplo 10

Tratamiento de ratones BALB/c con el péptido hCDR1 humano tras la inducción de LES experimental

Era de interés averiguar si el péptido hCDR1 puede tratar LES experimental inducido en ratones con el Acm 16/6Id anti-ADN humano. Por tanto, se inmunizaron ratones BALB/c y se realizó una inmunización de refuerzo con el autoanticuerpo patógeno 16/6Id. Tres meses y medio después de la inyección de refuerzo, cuando los ratones ya habían desarrollado manifestaciones de la enfermedad, se dividieron en tres grupos. Un grupo no se trató, el segundo grupo se trató con 100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ del hCDR1 y el tercer grupo se trató durante 10 semanas con 300 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ del péptido hCDR1. Se sometieron a seguimiento los ratones para determinar las manifestaciones de la enfermedad.

La tabla 10 presenta los resultados obtenidos en las pruebas de los ratones individuales al final del tratamiento. Se observó una mejoría de todas las manifestaciones clínicas medidas con ambas dosis usadas para el tratamiento [autoanticuerpos anti-dsADN, recuento de glóbulos blancos (WBC) y proteínas en orina]. El análisis de los riñones de los ratones sacrificados al final del experimento (7 meses después de las inyecciones de refuerzo) demostraron depósitos de complejos inmunitarios en los riñones de 9/10 ratones que se inmunizaron con el Acm 16/6Id y no se trataron. Por el contrario, se observaron depósitos de complejos inmunitarios en los riñones de sólo 3/10 y 2/9 ratones que se inmunizaron con el Acm 16/6Id y se trataron con 100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ y 300 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de hCDR1, respectivamente. Por tanto, se demuestra que el péptido humano hCDR1 puede tratar un LES experimental establecido.

TABLA 10

El efecto del tratamiento de ratones BALB/c afectados con LES experimental con 100 μg o 300 μg de péptido hCDR1

	Control, ratones sanos Media \pm DE	Con 16/6Id inyectado Media \pm DE	Con 16/6Id inyectado + 100 μg de hCDR1 Media \pm DE	Con 16/6Id inyectado + 300 μg de hCDR1 Media \pm DE
Proteinuria g/l	0,12 \pm 0,16	0,65 \pm 0,36	0,3 \pm 0,02	0,34 \pm 0,25
WBC/mm ³	7440 \pm 960	3260 \pm 920	6090 \pm 2160*	5890 \pm 2660*
Anti-dsADN D.O. (1:50)	0,1 \pm 0,05	1,1 \pm 0,6	0,3 \pm 0,2*	0,55 \pm 0,3*

* = diferente significativamente ($p < 0,05$) del grupo al que se le inyectó 16/6Id.

ES 2 275 832 T3

En otro experimento, se inmunizaron ratones BALB/c y se realizó una inmunización de refuerzo con el 16/6Id humano para la inducción de LES experimental. Dos meses después de la inmunización de refuerzo, se dividieron los ratones en grupos (8 ratones por grupo). Se trataron los ratones con 200, 300 o 400 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ durante 10 semanas. Se sometieron a seguimiento los ratones para determinar la producción de anticuerpos, leucopenia, proteinuria y, cuando se sacrificaron, dos meses después del final del tratamiento, se analizaron sus riñones para determinar los depósitos de complejos inmunitarios. Los resultados, resumidos en la tabla 11, no muestran efecto del tratamiento sobre la respuesta de anticuerpos específica a 16/6Id.

TABLA 11

Efecto del tratamiento de ratones BALB/c afectados con LES experimental con 200 μg , 300 μg o 400 μg de péptido hCDR1

	16/6Id Media \pm DE	16/6Id + hCDR1 200 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ Media \pm DE	16/6Id + hCDR1 300 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ Media \pm DE	16/6Id + hCDR1 400 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ Media \pm DE	Control Media \pm DE
Proteinuria g/l	0,5 \pm 0,34	0,13 \pm 0,16 p=0,0131	0,16 \pm 0,16 p=0,0209	0,11 \pm 0,15 p=0,0070	0,03 \pm 0,09 p=0,0002
WBC/ mm^3	2781 \pm 1205	5625 \pm 1659 p=0,0047	4677 \pm 1508 p=0,0209	4012 \pm 1421 p=0,0760	7280 \pm 352 p=0,0001
Intensidad de DCI en los riñones	1,86 \pm 0,38	0,57 \pm 0,97 p=0,0189	0,75 \pm 0,71 p=0,0047	0,71 \pm 0,76 p=0,0055	0
Anticuerpos anti-dsADN a un dilución de 1:250	1,16 \pm 0,37	0,69 \pm 0,39 p=0,0189	0,45 \pm 0,24 p=0,0003	0,8 \pm 0,39 p=0,0603	0,029 \pm 0,025 p=0,0001
Anticuerpos anti-Id 16/6 a un dilución de 1:1000	2,55 \pm 0,09	2,7 \pm 0,12	2,8 \pm 0,11	2,75 \pm 0,1	0

Sin embargo, el tratamiento afectó a los títulos de anticuerpo anti-ADN, leucopenia, niveles de proteinuria y, de manera más importante, a los depósitos de complejos inmunitarios en los riñones. El grupo control del experimento es de ratones BALB/c de la misma edad que no se inmunizaron ni trataron en absoluto. Este experimento sugirió que hCDR1 es eficaz en el tratamiento de LES experimental y no pudo observarse ninguna ventaja de la dosis de 400 μg .

Por tanto, se realizó un experimento adicional en el que se trataron ratones con 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. Se usó un péptido control en este experimento, el inverso hCDR1. El objetivo de este experimento ha sido, además de la comparación entre las dosis de tratamiento de 200 y 300 μg , estudiar el efecto del tratamiento sobre la producción de citocinas en los ratones tratados. Se inmunizaron sesenta ratones BALB/c y se realizó una inmunización de refuerzo con el 16/6Id.

ES 2 275 832 T3

Tres meses después de la inmunización de refuerzo, se dividieron los ratones en grupos (15 ratones por grupo) que o bien no se trataron adicionalmente o bien se trataron semanalmente con 200 ó 300 μg de hCDR1. Se trató un grupo adicional con 300 μg de hCDR1 inverso. No se inmunizó un quinto grupo (control) y no se trató adicionalmente. Se sometieron a seguimiento los ratones para determinar la producción de anticuerpos y las manifestaciones de la enfermedad. Tal como se observa en la tabla 12, los niveles de anticuerpos anti-16/6Id (a una dilución de 1: 10000) en los sueros de los ratones no difirieron entre los grupos. El tratamiento tanto con 200 como con 300 μg redujo los niveles de anticuerpos anti-ADN, tal como puede observarse en la tabla (los sueros se diluyeron 1:1250). La tabla 12 también resume las manifestaciones clínicas en los diferentes grupos de ratones. Puede observarse que, aunque ambas dosis fueron eficaces en la reducción de la leucopenia y la proteinuria, el efecto de la dosis de 200 μg en este experimento no alcanzó significación (se sacrificaron los ratones un mes después del final del tratamiento).

TABLA 12

Efecto del tratamiento de ratones BALB/c afectados con LES experimental con 200 μg o 300 μg e revhCDR1

	16/6Id Media \pm DE	16/6Id + hCDR1 200 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ Media \pm DE	16/6Id + hCDR1 300 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ Media \pm DE	16/6Id + hCDR1 400 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ Media \pm DE	Control Media \pm DE
Proteinuria g/l	0,58 \pm 0,34	0,17 \pm 0,15 p=0,0366	0,085 \pm 0,01 p=0,0088	0,8 \pm 0,3 p>0,5	0,031 \pm 0,09
WBC/mm ³	2800 \pm 300	4900 \pm 800 p=0,004	5800 \pm 300 p=0,004	4180 \pm 831 p=0,0079	7900 \pm 400
Intensidad de DCI en los riñones	1,6 \pm 0,55	1 \pm 0,63 p=0,0887	0,5 \pm 0,5 p=0,0152	0,85 \pm 0,75 p=0,0628	0
Anticuerpos anti-dsADN 1:250	0,47 \pm 0,3	0,23 \pm 0,1 p=0,0234	0,2 \pm 0,1 p=0,0145	0,35 \pm 0,3 p=0,343	0,002 \pm 0,002
Anticuerpos anti-Id 16/6 1:10000	0,89 \pm 0,1	0,96 \pm 0,2	0,93 \pm 0,1	0,95 \pm 0,13	0,03 \pm 0,1

Las figuras 14A-F representan un riñón de cada grupo en las que A,B representan un ratón no tratado; C,D representan un riñón de un ratón tratado con hCDR1 y E,F representan una sección de riñón de un ratón tratado con el hCDR1 inverso. Fotografías A,C,E x 100 y B,D,F x 400.

Las figuras 15A-E muestran los niveles de las diferentes citocinas en sobrenadantes de cultivos de ganglios linfáticos estimulados con 16/6Id de los ratones tratados. Estas últimas pruebas se realizaron al final del tratamiento (tras 10 inyecciones del tratamiento). Puede observarse que el tratamiento con hCDR1 (ambas dosis) reguló por disminución a INF- γ (figura 15A), IL-10 (figura 15C) y TNF- α (figura 15B). Por otro lado, hCDR1 reguló por incremento los niveles de TGF- β . Dado que normalmente los esplenocitos secretan más TGF- β (figura 15D) que las células de ganglio linfático, también se midió TGF- β en sobrenadantes de células de bazo de ratones de los diferentes grupos, activadas por 16/6Id (figura 15E).

Por tanto, hCDR1 mejora las manifestaciones de la enfermedad e inmunomodula la producción de citocinas en ratones afectados con un LES experimental inducido.

Ejemplo 11

Transferencia de los efectos beneficiosos sobre las manifestaciones del lupus mediante esplenocitos de ratones tratados con hCDR1

5 Era de importancia investigar si los efectos beneficiosos del tratamiento con hCDR1, que se manifiestan mediante la regulación por disminución de las manifestaciones de la enfermedad, pueden transferirse mediante células de bazo de ratones tratados. Con este fin, se ha realizado un experimento en el que se dividieron ratones (NZB x NZW)F1 de 8 meses de edad, que padecían ya la enfermedad similar al lupus totalmente desarrollada, en 2 grupos. El grupo 1 no se trató y a los ratones del grupo 2 se les transfirieron 20×10^6 células de bazo de ratones (NZB x NZW)F1 de 3 meses de edad a los que se les inyectó 3 veces (s.c., días alternos) $300 \mu\text{g}$ /ratón de hCDR1. Todos los esplenocitos se inyectaron por vía intraperitoneal. Se sometieron a prueba los ratones para determinar la producción de autoanticuerpos anti-dsADN, las manifestaciones de la enfermedad y se sacrificaron 4 semanas después de la transferencia celular. La transferencia de células de ratones tratados con hCDR1 produjo una leve reducción en los niveles de anticuerpos anti-ADN.

15 La tabla 13 demuestra que la transferencia de esplenocitos de ratones tratados con hCDR1 dio como resultado una proteinuria significativamente inferior y una reducción de los complejos inmunitarios en los riñones.

TABLA 13

20 *Manifestación clínica del lupus en ratones receptores de células de bazo de ratones tratados con hCDR1*

Nº de grupo	Tratamiento	Proteinuria g/L \pm EEM	D.C.I. (EEM
1	No tratado	15,07 \pm 4,92	2,25 \pm 0,47
2	20×10^6 células de bazo de ratones tratados con hCDR1	0,97 \pm 0,67 p = 0,05	0,75 \pm 0,47 p = 0,05

35 Los valores de p se calculan en comparación con gr1 de los ratones no tratados.

40 El experimento se repitió una cuantas veces más usando revhCDR1 como control. Los resultados fueron similares a los del primer experimento, concretamente, la transferencia celular de los ratones tratados afectó ligeramente a los títulos de anticuerpos anti-ADN y significativamente a la proteinuria y el daño renal. Las manifestaciones clínicas de un experimento representativo se muestran en la tabla 14.

TABLA 14

45 *Manifestaciones clínicas del lupus en ratones receptores de células de bazo de ratones tratados con hCDR1*

Nº de grupo	Tratamiento	Proteinuria g/L \pm EEM	D.C.I. \pm EEM
1	No tratado	10,9 \pm 3,05	2,3 \pm 0,26
2	20×10^6 células de bazo de ratones tratados con hCDR1	2,91 \pm 1,6 p = 0,0402	1,33 \pm 0,35 p = 0,034
3	20×10^6 células de bazo de ratones tratados con revhCDR1	5,38 \pm 2,34 p = 0,0931	1,7 \pm 0,23 p = 0,065

65 Los valores de p se calculan en comparación con gr1 de los ratones no tratados.

Puede observarse que el efecto de regulación por disminución del tratamiento con hCDR1, podía transferirse mediante las células de bazo de los ratones tratados.

Las figuras 16A-F representan secciones de riñón de ratones del grupo 1 (A, B - ratones no tratados), grupo 2 (C, D - receptores de esplenocitos de ratones de 2 meses de edad tratados con hCDR1) y grupo 3 (E, F - receptores de esplenocitos de ratones de 2 meses de edad tratados con revhCDR1). A,C,E x 400; B,D,F x 100.

Los resultados de los experimentos anteriores indican que los efectos de mejoría sobre las manifestaciones de la enfermedad de hCDR1 pueden transferirse mediante inmunocitos de ratones sanos que se trataron con hCDR1.

Ejemplo 12

Regulación por disminución de MPM-3 y MPM-9 por los péptidos murinos mCDR

Las metaloproteinasas de la matriz (MPM) (Shingleton *et al.*, 1996; Goetzl *et al.*, 1996; Massova *et al.*, 1998) constituyen una familia de endoproteinasas que contienen zinc que desempeñan un importante papel en la remodelación de la matriz extracelular en los tejidos normales, y también contribuyen a procesos patológicos. Comparten dominios estructurales pero difieren en la especificidad de sustrato, fuentes celulares e inductibilidad.

Las MPM se sintetizan como precursores latentes de tipo zimógeno y se convierten posteriormente en una forma activa. MPM-2 y MPM-9, que son ambas gelatinasas, pueden degradar colágeno de tipo IV, colágenos desnaturados, colágenos de los tipos V, VII, X y XII, vitronectina, agrecano, galectina-3 y elastina. MPM-2 es la MPM más ampliamente expresada. Se produce por una variedad de células y frecuentemente está elevada en metástasis de tumores malignos.

En cuanto a la estructura de dominios y de la proteína, MPM-9 es el miembro mayor y más complejo identificado hasta el momento. La expresión de MPM-9 se caracteriza por una compleja regulación con un control estricto de la transcripción génica y de los mediadores inflamatorios de la secreción de proteínas (tales como citocinas, quimiocinas, eicosanoides), y la acción de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (ITMP). Además, se modula la actividad de MPM-9 mediante la activación de pro-MPM-9, por los componentes del sistema de activación del plasminógeno u otras MPM (Guedez *et al.*, 1996).

Se demostró la participación de las MPM en enfermedades autoinmunitarias en diversas enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple (Ozenci *et al.*, 1999) y encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE) de su modelo animal (Gijbels *et al.*, 1994), artritis reumatoide (Keyszer *et al.*, 1999), síndrome de Guillain-Barré (Creange *et al.*, 1999), penfigoide ampolloso experimental (Liu *et al.*, 1998) y neuritis autoinmunitaria experimental (Hughes *et al.*, 1998). Se notificó que los niveles séricos de MPM-3 e ITMP-2 en pacientes con nefritis por lupus que era significativamente superior a los de los controles sanos, pero no se observó correlación con la actividad de la enfermedad (Zucker, 1999; Keyszer *et al.*, 1999).

Se ha sugerido la posible importancia de las muchas actividades de las MPM en las respuestas inflamatorias por los efectos inhibidores de los inhibidores de MPM en varios modelos animales de enfermedades autoinmunitarias. La inhibición específica de las MPM *in vivo* suprime el edema, la proliferación patológica de tejido y el daño de estructuras tisulares especializadas en varias enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias (Gijbels *et al.*, 1994; Wallace *et al.*, 1999; Conway *et al.*, 1995).

Según la presente invención, se demuestra que los niveles de MPM-3 y MPM-9 están elevados tanto en los sueros como en los riñones de ratones afectados con o bien el LES espontáneo o bien el experimental inducido. También se demuestra que el tratamiento de ratones afectados con LES con péptidos murinos basados en CDR, que mejora las manifestaciones del lupus en los ratones, disminuyó los niveles de MPM-3 y MPM-9 en el suero y los riñones de los ratones tratados y también produjo la mejoría de las manifestaciones de la enfermedad. Se espera que se presenten los mismos efectos mediante los péptidos hCDR humanos de la invención.

Ejemplo 12(i)

Cinética de aparición de MPM-3, MPM-2 y MPM-9 en sueros de ratones (NZBxNZW)F1

En primer lugar, se examinó si el desarrollo de LES espontáneo en ratones (NZB x NZW)F1 está asociado con cambios en los niveles de MPM-3, MPM-2 y MPM-9 en sus sueros. Por tanto, se sometieron a seguimiento los niveles de éstas últimas comenzando a la edad de 2 meses, antes de observarse las manifestaciones de la enfermedad, hasta la edad de 8 meses cuando los ratones padecen la enfermedad totalmente desarrollada. Los resultados se muestran en la figura 17. Tal como puede observarse en la figura 17A, las dos formas de 34 kd y 40 kd MPM-3 en sueros de ratones de 2 meses de edad están en baja cantidad, tal como se detecta mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Los niveles de todas las formas se elevan gradualmente hacia la edad de 8 meses, el último punto de tiempo sometido a prueba. De manera similar, la figura 17B muestra que la actividad de MPM-9, evaluada mediante zimografía en gel, es baja a la edad de 2 meses y se eleva gradualmente en los sueros de los ratones con la progresión de la enfermedad, hasta la edad de 8 meses. También se observa en la figura 17B que los niveles de MPM-2 no cambian significativamente con la progresión de la enfermedad.

Ejemplo 12(ii)

Cinética de aparición de MPM-3, MPM-2 y MPM-9 en sueros de ratones BALB/c que se inmunizaron con 16/6Id

5 Los resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que puede inducirse LES en ratones BALB/c tras inmunización con el 16/6Id (Mendlovic *et al.*, 1988; Waisman *et al.*, 1993). Por tanto, era de interés someter a prueba si el modelo inducido de LES se asemeja al modelo de (NZB x NZW)F1 con respecto a los cambios en MPM-3 y MPM-9. Por tanto, se estudiaron los niveles de MPM-3 y MPM-9 en este modelo experimental de LES. Los resultados mostrados en la figura 18 indican que los niveles de MPM-3 (todas las isoformas) se elevaron 10 días después de la inmunización de refuerzo (4,5 semanas tras la inmunización), y fueron superiores que en ratones BALB/c no inmunizados control o inmunizados con ACF de la misma edad (figura 18A). Los niveles de MPM-3 aumentaron con la edad en todos los grupos, sin embargo, los últimos fueron siempre superiores en los ratones inmunizados con 16/6Id que en los grupos control. Por el contrario, no pudieron detectarse cambios en la actividad de MPM-9 hasta 2 meses después de la inmunización de refuerzo (figura 18B). Pudo observarse una mayor actividad de MPM-9 en los ratones inmunizados con 16/6Id que en ratones no inmunizados, aproximadamente 4 meses después de la inmunización de refuerzo.

Ejemplo 12(iii)

20 *Regulación por incremento específica de MPM-3 y MPM-9 en secciones de riñón de ratones BALB/c que se inmunizaron con el 16/6Id*

Puesto que la inmunización de ratones BALB/c con el 16/6Id conduce a manifestaciones clínicas característica de LES incluyendo daño renal (Mendlovic *et al.*, 1988; Waisman *et al.*, 1993), y dado que se notificó que el daño renal en ratones (NZB x NZW)F1 estaba asociada con la elevación en los niveles de MPM-3 y MPM-9 (Nakamura *et al.*, 1993), se estudió la expresión de estas enzimas en los riñones de ratones BALB/c que se inmunizaron con 16/6Id. Como controles, se usaron ratones que se inmunizaron con ACF y ratones no inmunizados con edades coincidentes. A ambos grupos control se les inyectó PBS en el punto de tiempo de la inmunización de refuerzo. Dos meses y 5 meses después de la inmunización de refuerzo con 16/6Id, se inmunotifieron secciones de riñón de ratones para determinar MPM-3 o MPM-9. La figura 19 representa la inmunohistología de los riñones extraídos 5 meses después de la inmunización de refuerzo. Tal como puede observarse en la figura, la inmunización de los ratones con ACF reguló por incremento la expresión tanto de MPM-3 (19A) como de MPM-9 (19B) en los riñones, en los glomérulos y en el tejido circundante. No obstante, la inmunización con 16/6Id en ACF además elevó significativamente los niveles de expresión de estas dos MPM. Esta elevación se observó ya dos meses después de la inmunización de refuerzo con el 16/6Id (datos no mostrados). También se muestran los niveles de fondo no específicos de la tinción (19C).

Ejemplo 12(iv)

40 *El péptido mCDR1 murino regula por disminución los niveles de MPM-3 y la actividad de MPM-9 en sueros de ratones (NZB x NZW)F1*

Dado que se pudo demostrar que los niveles de MPM-3 y MPM-9 están elevados en ambos modelos experimentales de LES, era de interés examinar si la mejoría en los síntomas clínicos de LES observados tras el tratamiento con el péptido mCDR1 (Eilat *et al.*, 2000; Eilat *et al.*, 2001), estaba acompañada por una reducción en los niveles de MPM-3 y MPM-9. Por tanto, se trataron ratones (NZB x NZW)F1 que desarrollan una enfermedad similar a LES espontáneamente, a la edad de 2 meses (antes de que se observen manifestaciones clínicas) inyectándoles semanalmente mCDR1 en PBS (250 µg/ratón) por vía s.c. durante 10 semanas. Este protocolo de prevención dio como resultado la mejoría de todos los síntomas clínicos (Eilat *et al.*, 2000). Tal como puede observarse en la figura 20, hay una reducción en las dos bandas inferiores de MPM-3 (20A) y en la actividad de MPM-9 (20B) en el suero. Esta reducción está asociada con la reducción en las manifestaciones clínicas (Eilat *et al.*, 2000). Tal como se observa en la figura 20A, la forma de 45 kd de MPM-3 no se vio afectada.

También era de interés averiguar si el péptido mCDR1 puede regular por disminución los niveles elevados de MPM-3 y la actividad de MPM-9. Por tanto, se examinaron los niveles de MPM-3 y la actividad de MPM-9 en los sueros de ratones (NZB x NZW) F1 que se trataron con mCDR1 en el momento en que se observaron ya las manifestaciones de la enfermedad. Como péptido control se usó el mCDR1 inverso. Tal como puede observarse (figura 20, a la derecha), el tratamiento de ratones enfermos con mCDR1, pero no con revmCDR1, reguló por disminución específicamente los niveles de MPM-3 (20A) y la actividad de MPM-9 (20B) en los sueros.

Ejemplo 12(v)

El péptido mCDR1 regula por disminución los niveles de MPM-3 y la actividad de MPM-9 en sueros de ratones inmunizados con 16/6Id

65 Tal como se ha demostrado, la actividad de MPM-9 está elevada en ambos modelos experimentales [(NZB x NZW)F1 e inducido con 16/6Id] de LES. Dado que se demostró que el péptido mCDR1 mejora la enfermedad en ambos modelos, y regula por disminución los niveles de MPM-3 y la actividad de MPM-9 en sueros de ratones (NZB x NZW)F1 tratados, se buscó adicionalmente el efecto del tratamiento sobre estas enzimas en sueros de ratones

BALB/c inmunizados con 16/6Id. La figura 21 representa los resultados de un experimento de prevención y uno de tratamiento. La figura muestra que mCDR1 también podía regular por disminución MPM-3 y MPM-9 en este modelo experimental. Se observó la regulación por disminución de los niveles de MPM-3 y de la actividad de MPM-9 para ambos protocolos de prevención y tratamiento. Por tanto, la administración *in vivo* de mCDR1, o bien en la fase de inducción de la enfermedad o bien en la fase de una enfermedad totalmente desarrollada, pudo reducir los niveles de MPM-3 (21A) y MPM-9 (21B). Esta reducción fue específica, dado que el tratamiento con el mCDR1 inverso no afectó a la actividad de MPM-3 o MPM-9 (no mostrado). Los resultados preliminares, usando el sistema de ensayo de la actividad de MPM-9 (de Amersham-Pharmacia Biotech UK Limited, Inglaterra) muestran que la actividad de sueros de ratones BALB/c no inmunizados es comparable a 7 ng/ml de MPM-9 activa pura. La inmunización con el 16/6Id eleva la actividad hasta 16 ng/ml y el tratamiento con el péptido mCDR1 la regula por disminución casi hasta los niveles normales (8,5 ng/ml).

Ejemplo 12(vi)

Efecto del tratamiento con el péptido mCDR1 sobre los niveles de MPM-3 y MPM-9 en secciones de riñón de ratones inmunizados con 16/6Id BALB/c

Dado que se demostró que MPM-3 y MPM-9 estaban elevadas en los riñones de ratones con LES experimental inducido, era de interés buscar el efecto del tratamiento con el péptido mCDR1 sobre la expresión de estas últimas MPM en los riñones de los ratones tratados. La figura 22 demuestra que tanto en los experimentos de prevención (figura 22A) como de tratamiento (figura 22B), mCDR1 reguló por disminución la expresión de los niveles tanto de MPM-3 como de MPM-9 en los riñones de los ratones tratados. Se observó la reducción en los niveles de MPM tanto en los glomérulos como en el intersticio. La reducción observada en la expresión de las MPM se correlacionó con la reducción en la tinción para los depósitos de complejos inmunitarios usando anti-Ig (figura 22B).

Dada la aparente participación de MPM-3 y MPM-9 en la patogénesis de LES, se sometió a prueba si el péptido hCDR1 humano podía regular por disminución los niveles de estas últimas en correlación con la mejoría de las manifestaciones de la enfermedad. Con este fin, se sometieron a prueba sueros combinados de grupos de ratones (NZB x NZW)F1 que se trataron con el hCDR1 mediante inyecciones s.c. de 100 μ g o 300 μ g/ratón una vez a la semana durante diez semanas para determinar los niveles de las MPM en diversos periodos durante el tratamiento. La figura 23 representa los resultados de un experimento en el que se trataron ratones comenzando a la edad de 7 meses, cuando se observaron todas las manifestaciones clínicas. Los resultados son de sueros recogidos a la mitad del tratamiento, tras 5 inyecciones de hCDR1. Los resultados de la figura 23 indican que el tratamiento de ratones con 300 mg de hCDR1 reguló por disminución los niveles de MPM-3 y la actividad de MPM-9. Estos resultados están de acuerdo con la mejoría significativa de las manifestaciones de la enfermedad tras el tratamiento con hCDR1.

Discusión

Los resultados anteriores muestran que tanto MPM-3 como MPM-9 están elevadas en los sueros y en los riñones de modelos murinos de LES. El péptido mCDR1 murino pudo regular por disminución los niveles de MPM-9 y MPM-3 tanto en los sueros como en los riñones de ratones afectados con LES. Se demuestra que en el modelo espontáneo de LES, se produce la regulación por incremento tanto de MPM-9 como de MPM-3 en el suero en los primeros 3,5 meses. En el modelo inducido, la elevación en los niveles de MPM-3 en los sueros es muy temprana (10 días tras la inmunización de refuerzo con el 16/6Id), mientras que la elevación de la actividad de MPM-9 se produce aproximadamente 3-4 meses después. Basándose en los resultados con el modelo inducido con 16/6Id que nos permite seguir los procesos en las primeras fases de la enfermedad, parece que MPM-3 participa en la inducción de la enfermedad mientras que MPM-9 participa en la progresión de la enfermedad.

Estos resultados que muestran la elevación de MPM-3 en los modelos de ratón de LES, están de acuerdo con los resultados que demuestran un aumento significativo de MPM-3 en los sueros de pacientes con LES (Kotajima *et al.*, 1998) y que el transcrito de MPM-3 aumenta significativamente con la progresión de nefritis en ratones (NZB x NZW) F1 (Nakamura *et al.*, 1993). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que MPM-3 puede contribuir al desarrollo de lesión glomerular en nefritis por lupus.

Los resultados muestran que los niveles de actividad de MPM-2 en sueros no se elevan significativamente con la progresión de la enfermedad en ambos modelos inducido y espontáneo de LES. Estos resultados son compatibles con los notificados previamente (Zucker, 1999) de que los niveles de MPM-2 no aumentaron en LES. En consecuencia, esta enzima no se modula mediante el tratamiento con el péptido basado en CDR (datos no mostrados). Los niveles de MPM-2 se secretaron constitutivamente y no cambiaron tampoco en otros estados patológicos (como neuritis óptica y escleritis múltiple), mientras que los niveles de MPM-9 se elevaron relativamente con respecto a los controles sanos (Gijbels *et al.*, 1992; Paemen *et al.*, 1994).

De manera interesante, el péptido mCDR1, que afecta específica y directamente a las respuestas de células T asociadas con LES, pudo regular por disminución los niveles de MPM-3 y MPM-9 que ya están regulados por incremento (protocolo de tratamiento) así como prevenir su elevación (protocolo de prevención).

No se notificó actividad de MPM-9 en los sueros ni en pacientes con LES ni en modelos animales de LES. Es la primera vez que se muestra una correlación entre LES y MPM-9 y que se demuestra que MPM-9 está elevada

en los sueros y los riñones de ratones afectados con LES. Aunque la elevación en los sueros aparece relativamente tarde (aproximadamente 4 meses después de la inmunización de refuerzo), la elevación de MPM-9 en los riñones se observa en fases tempranas tras la inducción de la enfermedad (2 meses) (datos no mostrados). Además se muestra en el presente documento por primera vez que los péptidos que mejoran las manifestaciones de LES en ratones (mCDR1 y hCDR1 tal como se mostró anteriormente), también regulan por disminución MPM-9 tanto en los sueros como en los riñones. Estos últimos datos también están apoyados por los resultados preliminares, usando el sistema de ensayo de la actividad de MPM-9, que mostraron que la inmunización con el 16/6Id elevó la actividad de MPM-9, mientras que el tratamiento con el péptido basado en CDR1 la reguló por disminución hasta los niveles de actividad de ratones no inmunizados.

También se demuestra en el presente documento por primera vez que MPM-3 y MPM-9 difieren en la cinética de su inducción en modelos experimentales de enfermedades autoinmunitarias, tal como se muestra en el presente documento específicamente para LES. Esto puede indicar los diferentes papeles de las MPM anteriores en la patogénesis de la enfermedad. Estos resultados demuestran que los péptidos que inmunomodulan las respuestas de células T asociadas a LES y regulan por disminución las manifestaciones de la enfermedad pueden controlar la secreción (aunque no necesariamente por las propias células T) de esas MPM en los sueros y los riñones. Estos resultados indican que MPM-3 y MPM-9 desempeñan un papel en la patogénesis de LES y pueden servir como marcadores sustituto de la progresión de la enfermedad, por un lado, y de la mejoría de la enfermedad mediante un tratamiento dado, por otro lado.

Ejemplo 13

La actividad de MPM-9 (pero no de MPM-2) se eleva en sueros de pacientes con LES

En el presente ejemplo, se determinaron los niveles de MPM-9 y MPM-2 en los sueros de 40 pacientes con LES y se demostró que la actividad de MPM-9 pero no la de MPM-2 se eleva significativamente en los sueros de pacientes con LES comparado con controles sanos. La alta actividad de MPM-9 se correlacionó con la presencia de exantema discoide, fenómeno de Raynaud, neumonía, úlceras mucosas y la presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos (APLA). Además, los niveles elevados de MPM-9 se correlacionaron con la actividad de LES en el grupo de pacientes masculinos.

Materiales y métodos

Pacientes. Participaron 40 pacientes, 32 mujeres y 8 hombres con LES en este estudio. Todos los pacientes revelaron al menos cuatro de los criterios de diagnóstico revisados del Colegio Americano de Reumatología (ACR, American College of Rheumatism) para el diagnóstico de LES (Winchester, 1996). Veintiséis voluntarios sanos de sexo y edad coincidentes sirvieron como grupo control en estos estudios. La edad media de los pacientes en el diagnóstico fue de $29 \pm 9,7$ (intervalo de 15-48) años y el periodo medio de seguimiento fue de 11 ± 10 (intervalo de 1-32) años. Se determinó la actividad de la enfermedad según el índice de actividad del lupus IAELES (Bombardier *et al.*, 1992) y mediante el índice BILAG (Hay *et al.*, 1993). El estudio fue aprobado por el comité ético del Centro Médico Kaplan, Rehovot, Israel.

Medición de MPM-2 y MPM-9 mediante kits de ensayo de la actividad. Se midieron las actividades de MPM-2 y MPM-9 mediante kits de ensayo de la actividad de MPM-2 o MPM-9 específicos de Biotrak (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, R.U.) según las instrucciones del fabricante. Se diluyeron los sueros 1: 100 y 1: 32 para la determinación de las actividades de MPM-2 y MPM-9, respectivamente. Se añadieron los patrones adecuados en cada ensayo. Con el fin de medir el contenido total de las MPM, se realizó la activación de la forma pro de las MPM usando acetato p-aminofenilmercúrico (APMA).

Medición de las actividades de MPM-2 y MPM-9 mediante zimografía en gel. Se sometieron a prueba las actividades de MPM-2 y MPM-9 mediante zimografía en gelatina. Se separó una muestra de $5 \mu\text{l}$ de suero mediante un gel de SDS-PAGE al 8% polimerizado con gelatina 1 mg/ml. Se lavaron los geles una vez durante 30 min. con Triton X-100 al 2,5% para eliminar el SDS, y una vez durante 30 min. con el tampón de reacción que contiene Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl_2 10 mM y Brij 35 al 0,02% (w/v) (pH 7.5). Se cambió el tampón de reacción por uno nuevo, y se incubaron los geles a 37°C durante 24 h. se visualizó la actividad gelatinolítica mediante tinción de los geles con azul brillante de Coomassie al 0,5% y se cuantificó mediante densitometría.

Análisis estadísticos. Se evaluaron los datos usando pruebas de chi-cuadrado o exacta de Fisher, la prueba de la t para datos independientes y valores de P de dos colas. También se utilizaron análisis de Pearson, Spearman y multivariante.

Ejemplo 13 (i)

La actividad de MPM-9, pero no la de MPM-2, se eleva en LES

Tal como se describió anteriormente, se mostró que MPM-9 participa en enfermedades autoinmunitarias así como en modelos animales de LES. Por tanto, tenía interés estudiar si MPM-9 también está elevada en los sueros de pacientes con LES. Para este fin, se examinaron los sueros de 40 pacientes con LES y de 25 controles sanos mediante zimografía

en gel, en la que pueden visualizarse las actividades de MPM-9 y MPM-2. Se muestra un gel representativo en la figura 24. Tal como puede observarse en esta figura, los niveles de MPM-9 se elevan en los sueros de pacientes con LES en comparación con controles sanos. El análisis densitométrico de los zimogramas de los sueros de 40 pacientes con LES y 25 controles sanos indicó que la actividad media de MPM-9 para los pacientes con LES era de $109 \pm 5,6$ unidades de densitometría y para los controles sanos, $76,5 \pm 4,2$ unidades de densitometría. ($P = 0,0001$). Los valores de actividad superiores a 85 unidades de densitometría (media de los controles sanos + 2 e.e.) se consideraron altos. Los resultados demostraron altos niveles de actividad de MPM-9 en el 68% de los pacientes con LES. Sólo el 3% de controles sanos mostraron una alta actividad de MPM-9 ($P = 0,001$). El análisis densitométrico de los niveles de MPM-2 en las mismas muestras de suero reveló que las diferencias en la actividad de MPM-2 entre los sueros de pacientes con LES y de controles sanos no fueron significativas. Por tanto, se determinaron valores de 109 ± 7 y de 123 ± 5 (unidades de densitometría de actividad media \pm e.e.) para los controles sanos y pacientes con LES, respectivamente ($P = 0,0531$). Para cuantificar los niveles de actividad de MPM-9 y MPM-2 en el suero adicionalmente, se usaron los kits de ensayo de la actividad.

La figura 25 muestra que la actividad de MPM-9 está elevada en tres veces en los sueros de pacientes con LES en comparación con los sueros de controles sanos, y esta elevación es estadísticamente significativa ($P = 0,0302$). Por el contrario, las diferencias en los niveles de MPM-2 entre los dos grupos no fueron significativas ($P = 0,1254$).

Puesto que los inventores, así como otros (Ebihara *et al.*, 1998 y 1999) detectaron altos niveles de MPM-9 en los sueros de pacientes con insuficiencia renal crónica sin LES (por ejemplo, diabetes mellitus, hipertensión) probablemente debido a la retención de la enzima, se analizó la correlación entre los niveles de MPM-9 y la función renal en el grupo de pacientes con LES sometido a prueba. No se observó correlación entre los niveles de creatinina y los niveles de MPM-9 ($r^2 = 0,01$), lo que indica que los niveles elevados de MPM-9 en pacientes con LES no fueron el resultado de la retención de la enzima debido a la insuficiencia renal.

Ejemplo 13(ii)

Correlación de la actividad de MPM-9 con los parámetros clínicos y de laboratorio

La elevación en los niveles de actividad de MPM-9 en sueros de pacientes con LES condujo a la búsqueda de una posible correlación entre los parámetros clínicos y de laboratorio; y los niveles séricos de MPM-9. Se realizó un análisis estadístico (pruebas de chi-cuadrado o exacta de Fisher) investigando el número de pacientes con niveles de MPM-9 altos y normales para cada manifestación clínica (tabla 15) así como teniendo en cuenta los niveles de actividad media reales de MPM-9 para pacientes con o sin un determinado síntoma clínico. Los resultados fueron similares mediante ambos análisis. Es notable que para todos los síntomas clínicos, el porcentaje de pacientes con niveles de MPM-9 elevados es muy superior que en el grupo de controles sanos. Los niveles de MPM-9 no se correlacionaron con el sexo, la duración de la enfermedad o la edad de su comienzo (Pearson, Spearman).

La tabla 15 muestra las características clínica y de laboratorio de pacientes con LES según sus niveles de actividad de MPM-9 (inferiores o iguales a los controles sanos = normal). Los niveles altos de MPM-9 se correlacionaron significativamente con la presencia de fenómeno de Raynaud ($P = 0,0138$) y APLA ($P = 0,041$). Pudo observarse una fuerte correlación con neumonía, exantema discoide, trastornos neurológicos y úlceras mucosas. Sin embargo, el número de pacientes con estas últimas manifestaciones era demasiado pequeño para realizar un análisis estadístico. El análisis multivariante reveló que el fenómeno de Raynaud y los niveles bajos de complemento (C3, C4) se correlacionan positivamente con altos niveles de MPM-9 ($P = 0,0001$ y $0,0137$, respectivamente). Por el contrario, la fotosensibilidad, artritis y trastornos hematológicos se correlacionan negativamente con los niveles de actividad de MPM-9 ($P = 0,0381$, $0,0014$ y $0,0065$, respectivamente).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 275 832 T3

TABLA 15

Características clínicas de pacientes con LES con actividades de MPM-9 altas y normales según sus niveles de MPM-9

5

NIVELES DE MPM-9 (%)			
		<u>Alto</u>	<u>Normal</u>
Nº de pacientes (%)	40 (100)	27 (68)	13 (32)
Fotosensibilidad	13	8 (62)	5 (38)
Úlceras mucosas	9	8 (89)	1 (11)
Exantema malar	9	7 (78)	2 (22)
Exantema discoide	5	5 (100)	0 (0)
Fenómeno de Raynaud	8	8 (100)	0 (0)
Vasculitis	18	14 (78)	4 (22)
Artritis	31	21 (68)	10 (32)
Serositis	9	7 (78)	2 (22)
Neumonía	4	4 (100)	0 (0)
Trastornos neurológicos	4	4 (100)	0 (0)
Trastorno renal	16	11 (69)	5 (31)
Trastornos hematológicos	29	18 (62)	11 (38)
ANA	40	27 (68)	13 (32)
αds-ADN	36	24 (67)	12 (33)
APLA	25	20 (80)	5 (20)
Bajo complemento (C3, C4)	30	21 (70)	9 (30)

45 Se define la participación clínica según los criterios revisados del ACR (Winchester, 1996). Se determinaron los anticuerpos antinucleares (ANA) y los anticuerpos anti-dsADN usando células Hep2 y *Crithidia luciliae*, respectivamente. se definieron los anticuerpos anti-fosfolípidos (APLA) como reactividad con uno o más de los siguientes ensayos: VDR falso positivo, anticoagulante de lupus (LAC) o ELISA para determinar anticuerpos anti-cardiolipina.

50 También se buscó una posible correlación entre IAELES y la actividad de MPM-9 en pacientes masculinos (figura 26A) y femeninos (figura 26B). De manera interesante, el coeficiente de correlación fue significativo y positivo para los hombres ($r^2 = 0,6333$) pero no significativo y negativo para las mujeres ($r^2 = 0,0571$). Se obtuvieron resultados similares usando el sistema de puntuación de BILAG. Por tanto, se observó un coeficiente de correlación positivo entre la actividad de MPM-9 y las puntuaciones de BILAG para los hombres ($r^2 = 0,6442$) y uno no significativo para las mujeres.

60 También era de interés determinar si existe una correlación entre el uso de diversas modalidades de tratamiento por los pacientes y la actividad de MPM-9. Tal como puede observarse en la tabla 16(A), no hubo una correlación significativa entre el tratamiento actual de los pacientes y la actividad de MPM-9. Sin embargo, cuando se examinó el tratamiento de los pacientes en cualquier momento durante el transcurso de su enfermedad (tabla 16(B)), se asociaron altos niveles de MPM-9 con el uso de agentes citotóxicos (82%).

65

TABLA 16

Modalidades de tratamiento de pacientes con LES según sus niveles de MPM-9

	Número total de pacientes	Niveles de MPM-9 (%)	
		Alto	Normal
A. Tratamiento actual.			
Agentes citotóxicos	8	6 (75)	2 (25)
Esteroides	23	17 (74)	6 (26)
Antipalúdicos	21	14 (67)	7 (33)
AINE	7	5 (71)	2 (29)
B. Tratamiento durante el periodo de seguimiento			
Agentes citotóxicos	17	14 (82)	3 (18)
Esteroides	29	19 (66)	10 (34)
Antipalúdicos	26	16 (62)	10 (38)
AINE	18	12 (67)	6 (33)

Se usó el agente antipalúdico hidroxiclороquina a una dosis de 200-400 mg/día. El tratamiento con esteroides se definió, como una dosis diaria ≥ 5 mg de prednisona. Los agentes citotóxicos usados fueron ciclofosfamida (0,5-1 g/m² al mes) o azatioprina (100-150 mg/día).

Ejemplo 13(iii)

Variaciones en MPM-9 actividad en muestras de suero tomadas de pacientes con LES individuales en diferentes puntos de tiempo

Puesto que la actividad de la enfermedad varía con el tiempo, se midieron los niveles de actividad de MPM-9 y MPM-2 en el suero de pacientes individuales de los que se tomaron muestras durante 4-6 años de seguimiento. Se analizaron los sueros de nueve pacientes tomados en diferentes puntos de tiempo. Los niveles de MPM-2 no variaron significativamente entre los pacientes y los controles sanos. En 5 de los 9 pacientes sometidos a prueba, pudieron observarse variaciones en la actividad de MPM-9 en las muestras de suero de los pacientes individuales con el tiempo. Los resultados para 2 pacientes con LES representativos se muestran en la figura 27. Tal como puede observarse, la actividad de MPM-9, pero no la actividad de MPM-2, ha estado cambiando con el tiempo en los mismos pacientes. Estos cambios no se asociaron con los índices de actividad de la enfermedad determinados mediante cualquiera de los sistemas IAELES o BILAG. No se detectaron cambios en la actividad de MPM-9 en los sueros de 5 controles sanos de los que se tomaron muestras en diferentes puntos de tiempo (datos no mostrados). En otros 4 pacientes con LES, no se observaron cambios sustanciales en la actividad de MPM-9 o MPM-2 con el tiempo, y los niveles de actividad de MPM-9 permanecieron siendo o bien altos o bien bajos, dependiendo del paciente individual.

Discusión

El presente estudio demuestra por primera vez la participación de MPM-9 en LES humano. Se muestra que la actividad de MPM-9, pero no la de MPM-2, se eleva significativamente en los sueros del 68% de los pacientes con LES comparado con los controles sanos. Los altos niveles de MPM-9 se correlacionaron con el fenómeno de Raynaud, neumonía, trastornos neurológicos, exantema discoide y la presencia de APLA. Se observaron cambios en la actividad de MPM-9 en el suero del mismo paciente en diferentes periodos de tiempo de la enfermedad. Los niveles de actividad de MPM-9 no se correlacionaron con el índice de actividad de la enfermedad (IAELES, BILAG) en pacientes femeninas, pero se correlacionó con la actividad de LES en el grupo de pacientes masculinos.

El presente estudio muestra que los niveles de actividad de MPM-2 no se elevan significativamente en los sueros de pacientes con LES. Estos resultados son compatibles con los notificados previamente (Zucker, 1999) de que los niveles de MPM-2 no aumentaron en LES. Los niveles de MPM-2 también fueron constitutivos e inalterados en otros estados patológicos (como neuritis óptica y esclerosis múltiple) en los que los niveles de MPM-9 se elevaron relativamente con respecto a los controles sanos (Gijbels *et al.*, 1992; Paemen *et al.*, 1994).

Se sugirió la participación de una MPM adicional, concretamente, MPM-3 en la patogénesis de LES, puesto que aumentó significativamente en los sueros de los pacientes con LES (Kotajima *et al.*, 1998). La frecuencia de pacientes con LES con actividad de MPM-9 elevada (68%) mostrada en el presente ejemplo, se asemeja a las frecuencias notificadas (Kotajima *et al.*, 1998) para los altos niveles de MPM-3 en pacientes con LES (76%) y en AR (82%).
 5 Además, se demostró que el transcrito de MPM-3 aumenta significativamente con la progresión de nefritis en ratones (NZB x NZW)F1 (Nakamura *et al.*, 1993).

No se conoce el origen de las MPM elevadas en los sueros de pacientes con LES. Se ha demostrado que MPM-9 se secreta por las células de sangre periférica tales como células T, neutrófilos y macrófagos (para revisión, véase Goetzl
 10 *et al.*, 1996). El hecho de que no se encontró correlación entre los niveles de actividad de MPM-9 y el número de células de sangre periférica en los pacientes puede sugerir que MPM-9 no se secretó por las células inmunitarias de sangre periférica sino en su lugar, por los órganos afectados con LES como los riñones o los pulmones/pleura. La observación de que todos los pacientes con neumonía mostraron altos niveles de actividad de MPM-9 puede sugerir que el pulmón enfermo es una fuente de altos niveles de MPM-9. Además, la asociación entre el tratamiento citotóxico, que representa
 15 la gravedad de lesión orgánica relacionada con LES, y altos niveles de MPM-9 en los sueros también pueden apoyar el concepto de que los órganos enfermos son la fuente de actividad de MPM-9 en pacientes con LES. No obstante, todavía existe la posibilidad de que menos linfocitos de sangre periférica secreten niveles de actividad de MPM-9 superiores.

Se ha mostrado que TNF- α e IL-1 desempeñan un papel importante en la patogénesis de LES tanto en la enfermedad de seres humanos (Dean *et al.*, 2000) como en modelos murinos (Segal *et al.*, 1997; Theofilopoulos *et al.*,
 20 1999; Eilat *et al.*, 2001). Se ha demostrado en varios sistemas que estas citocinas inducen la producción de MPM-9 (Guedez *et al.*, 1996), y por tanto, es posible que la inducción de estas últimas MPM sea parte del efecto patogénico de estas citocinas en LES. Se ha notificado que los niveles de MPM-9, que se secretan espontáneamente por monocitos de sangre periférica de individuos sanos, se regularon por incremento con la exposición a TNF- α e IL-1 β (Saren *et al.*,
 25 *et al.*, 1996). Además, las MPM tanto de células T como de macrófagos facilitan la secreción de TNF- α mediante la escisión de la forma unida a la membrana (Gearing *et al.*, 1994). Por tanto, estos ejemplos demuestran los efectos reguladores mutuos de MPM sobre las citocinas proinflamatorias y viceversa. No obstante, el hecho de que en el suero de algunos de los pacientes los niveles de actividad de MPM-9 permanezcan dentro del intervalo normal durante el periodo de seguimiento, mientras que se midieron altos niveles de actividad de MPM-9 en los sueros de la mayoría de
 30 los pacientes, puede sugerir la participación de factores genéticos en la regulación de esta última.

Los resultados del presente documento indican que MPM-9 podría desempeñar un papel en la patogénesis de LES, y que la medición de los niveles de actividad en plasma/suero de esta metaloproteinasa puede proporcionar importante información cuando se monitorizan pacientes tratados con fármacos que interfieren en la actividad de MPM-9.

Bibliografía

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB *et al.* Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 35:630-40 (1992).

Conway, J.G., J.A. Wakefield, R.H. Brown, B.E. Marron, L. Sekut, R.L. Clark, G. McGeechan, and K.M. Connolly. Inhibition of cartilage and bone destruction in adjuvant arthritis in the rat by a matrix metalloproteinase inhibitor. *J. Exp. Med.* 182, 449 (1995).

Creange, A., Sharshar, T., Planchenault, T., Christov, C., Poron, F., Raphael, J-C. and Gherardi, R.K., Matrix metalloproteinase-9 is increased and correlates with severity in Guillain-Barre syndrom. *Neurology* 53:1683-1691 (1999).

Dayan, M., Segal, R., Sthoeger, Z., Waisman, A., Brosh, N., Elkayam, O., Eilat, E., Fridkin, M. and Mozes, E. Immune response of SLE patients to peptides based on the complementarity determining regions of a pathogenic anti-DNA monoclonal antibody. *J. Clin. Immunol.* 20, 187 (2000).

Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E *et al.* Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 59:243- (2000).

Ebihara I, Nakamura T, Shimada N *et al.* Increased plasma metalloproteinase-9 concentrations precede development of microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 32:544-50 (1998).

Ebihara I, Nakamura T, Ushiyama C *et al.* Effect of oral adsorbent AST-120 on plasma metalloproteinase-9 and serum tissue inhibitor of metalloproteinase-1 concentrations in chronic renal failure. *Nephron* 83:169 (1999).

Eilat, E., Zinger, H., Nyska, A. and Mozes, E. Prevention of systemic lupus erythematosus-like disease in (NZBxNZW)F1 mice by treating with CDR1- and CDR3-based peptides of a pathogenic autoantibody. *J. Clin. Immunol.* 20, 2(2000).

Eilat, E., Dayan, M., Zinger, H. and Mozes, E. The mechanism by which a peptide based on the complementarity determining region-1 of a pathogenic anti-DNA autoantibody ameliorates experimental SLE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 1148 (2001).

- Fricke, H., Offen, D., Mendlovic, S., Shoenfeld, Y., Bekimer, R., Sperling, J. and Mozes, E.** Induction of experimental systemic lupus erythematosus in mice by immunization with a monoclonal anti-La autoantibody. *Int. Immunol.* 2, 225 (1990).
- 5 **Fricke, H., Mendlovic, S., Blank, M., Shoenfeld, Y., Ben-Bassat, M. and Mozes, E.** Idiotype specific T-cell lines inducing experimental systemic lupus erythematosus in mice. *Immunology.* 73, 421 (1991).
- Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M et al.** Processing of tumour necrosis factor alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370:555-7(1994).
- 10 **Gijbels K, Masure S, Carton H et al.** Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol* 41:29-34 (1992).
- 15 **Gijbels, K., R.E. Galardy, and L. Steinman.** Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteinases. *J. Clin. Invest.* 94: 2177-82 (1994).
- Goetzl, E.J., Banda, M.J. and Leppert, D.,** Matrix metalloproteinases in immunity. *J. Immunol.* 156:1-4 (1996).
- 20 **Guedez, L., Lim, M.S. and Stetler-Stevenson, W.G.,** The role of metalloproteinases and their inhibitors in hematological disorders. *Crit. Rev. Oncogenesis* 7: 205-225 (1996).
- Hay EM, Bacon PA, Gordon C et al.** The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 86: 447-58 (1993).
- 25 **Hughes, P.M., G.M.A. Wells, J.M. Clements, A.J. Gearing, E.J. Redford, M. Davies, K.J. Smith, R.A. Hughes, M.C. Brown, and K.M. Miller.** Matrix metalloproteinase expression during experimental neuritis. *Brain.* 121, 481 (1998).
- 30 **Isenberg, D.A., Shoenfeld, Y., Madaio, M.P., Rauch, J., Reichlin, M., Stollar, B.D. and Schwartz, R.S.** Anti-DNA antibody idiotypes in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 2, 417 (1984).
- Isenberg, D.A. and Collins, C.** Detection of cross-reactive anti-DNA antibody idiotypes of renal tissue-bound immunoglobulins from lupus patients. *J. Clin. Invest.* 76, 287 (1985).
- 35 **Keyszer, G., I. Lambiri, R. Nagel, C. Keysser, M. Keysser, E. Gromnica-hle, J. Franz, G.R. Burmester, and K. Jung.** Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers. *J. Rheumatol.* 26, 251 (1999).
- 40 **Kotajima, L., Aotsuka, S., Fujimani, M., Okawa-Takatsuji, M., Kinoshita, M., Sumiya, M. and Obata, K.,** Increased levels of matrix metalloproteinase-3 in sera from patients with active lupus nephritis. *Clin. Exp. Rheum.* 16:409-4(1998).
- 45 **Liu, Z., Shipley, J.M., Vu, T.H., Zhou, X., Diaz, L.A., Werb, Z. and Senior, R.M.,** Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous Pemphigoid. *J. Exp. Med.* 188:475-482 (1998).
- Massova, I., Kotra, L.P., Fridman, R. and Mobashery, S.,** Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *Faseb. J.* 12: 1075-1095 (1998).
- 50 **Mendlovic, S., Brocke, S., Shoenfeld, Y., Ben-Bassat, M., Meshorer, A., Bakimer, R. and Mozes, E.** Induction of a systemic lupus erythematosus-like disease in mice by a common human anti-DNA idiotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2260 (1988).
- 55 **Mendlovic, S., Fricke, H., Shoenfeld, Y., and Mozes, E.** The role of anti-idiotypic antibodies in the induction of experimental systemic lupus erythematosus in mice. *Eur. J. Immunol.* 19,729 (1989).
- Mozes, E., Dayan, M., Zisman, E., Brocke, S., Licht, A. and Pecht, I.** Direct binding of a myasthenia gravis related epitope to MHC class II molecules on living murine antigen-presenting cells. *EMBO J.* 8, 4049 (1989)
- 60 **Nakamura, T., I. Ebihara, S. Osada, T. Takahashi, M. Yamamoto, Y. Tomino, and H. Koide.** Gene expression of metalloproteinases and their inhibitor in renal tissue of New Zealand Black/White F1 mice. *Clin. Sci.* 85: 295-3(1993).
- 65 **Ozenci, V., L. Rinaldi, N. Teleshova, D. Matusevicius, p. Kivisak, M. Kouwenhoven, and H. Link.** Metalloproteinases and their tissue inhibitors in multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* 12, 297 (1999).

Paemen, L., Olsson, T., Soderstrom, M., van Damme, J. and Opdenakker, G., Evaluation of gelatinases and IL-1 in the cerebrospinal fluid of patients with optic neuritis, multiple sclerosis and other inflammatory neurological disease. *Eur. J. Neurol.* 1:55-63 (1994).

5 **Saren P, Welgus HG, Kovanen PT.** TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* 157:4159-65 (1996).

Segal R, Bermas BL, Dayan M et al. Kinetics of cytokine production in experimental systemic lupus erythematosus: involvement of T helper cell 1/T helper cell 2-type cytokines in disease. *J Immunol* 158:3009-16 (1997).

10 **Shingleton, W.D. Hodges, D.J., Brick, P. and Cawston, T.E.**, Collagenases: a key enzyme in collagen turnover. *Biochem. Cell. Biol.* 74:759-775 (1996).

15 **Shoenfeld, Y., Isenberg, D.A., Rauch, J., Madaio, M.P., Stollar, B.D. and Schwartz, R.S.** Idiotypic cross-reaction of monoclonal human lupus antibodies. *J. Exp. Med.* 158:718 (1983).

Shoenfeld, Y., Hsu-Lin, S.C., Gabriels, J.E., Silberstein, L.E., Furie, B.C., Furie, B., Stollar, B.D. and Schwartz, R.S., Production of autoantibodies by human-human hybridomas. *J. Clin. Invest.* 70:205-208 (1982).

20 **Sthoeger, Z.M., Tartakovsky, B., Bentwich, Z. and Mozes, E.** Monoclonal anticardiolipin antibodies derived from mice with experimental systemic lupus erythematosus: characterization and the induction of a secondary antiphospholipid syndrome. *J. Clin. Immunol.* 13, 127 (1993).

25 **Tan EM, Cohen AS, F. FJ, Talal N, Winchester RJ.** The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-77 (1982)

Theofilopoulos AN, Lawson BR. Tumor necrosis factor and other cytokines in murine lupus. *Ann Rheum Dis suppl:* 149-55 (1999).

30 **Waisman, A. and Mozes, E.** Variable region sequences of autoantibodies from mice with experimental systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* 23, 1566 (1993).

Waisman, A., Mendlovic, S., Ruiz, P.J., Zinger, H., Meshorer, A. and Mozes, E. The role of the 16/6Id idiotype network in the induction and manifestations of systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* 5, 1293 (1993).

35 **Waisman, A., Shoenfeld, Y., Blank, M., Ruiz, P.J. and Mozes, E.** The pathogenic human monoclonal anti-DNA that induces experimental systemic lupus erythematosus in mice is encoded by a VH4 gene segment. *Int. Immunol.* 7, 689 (1995).

40 **Waisman, A., Ruiz, P.J., Israeli, E., Eilat, E. Konin-Waisman, S., Zinger, H., Dayan, M. and Mozes, E.** Modulation of murine systemic lupus erythematosus with peptides based on complementarity determining regions of a pathogenic anti-DNA monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4 620 (1997).

45 **Wallace, G.R., R.A. Whiston, M.R. Stanford, G.M.A. Wells, A.J.H. Gearing, and J.M. Clements.** The matrix metalloproteinase inhibitor BB-1101 prevents experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Clin. Exp. Immunol.* 118, 364 (1999).

Winchester RJ. Systemic lupus erythematosus pathogenesis. In: Koopman WJ, ed. Birmingham. Alabama: William and Wilkins, pp.1361-91 (1996).

50 **Zucker, S.** Increased serum stromelysin-1 levels in systemic lupus erythematosus: lack of correlation with disease activity. *J. Rheumatol.* 26, 78 (1999).

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Péptido sintético seleccionado del grupo que consiste en:

5 (a) un péptido de al menos 19 y como máximo 22 residuos de aminoácidos que incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 19 o una amida del mismo;

10 (b) un péptido sintético doble que comprende dos péptidos diferentes de dicho péptido de (a) unidos covalentemente entre sí, o bien directamente o bien a través de una corta cadena de unión;

(c) un polímero peptídico que comprende una pluralidad de secuencias de dicho péptido de (a); y

(d) un péptido de (a) o un polímero peptídico de (c) unido a un vehículo macromolecular.

15 2. Péptido sintético según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un péptido que consiste en una SEQ ID NO: 11;

20 (b) un péptido sintético doble que comprende dos péptidos diferentes de dicho péptido de (a) unidos covalentemente entre sí, o bien directamente o bien a través de una corta cadena de unión;

(c) un polímero peptídico que comprende una pluralidad de secuencias de dicho péptido de (a); y

25 (d) un péptido de (a) o un polímero peptídico de (c) unido a un vehículo macromolecular.

3. Péptido sintético según la reivindicación 2, que consiste en un péptido de SEQ ID NO: 11.

30 4. Péptido sintético según la reivindicación 3, seleccionado de los péptidos que consisten en las secuencias de la SEQ ID NO: 12 a NO: 18.

5. Péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 6.

35 6. Péptido según la reivindicación 5, que consiste en el péptido de SEQ ID NO: 6 amidado en el extremo C-terminal.

7. Péptido sintético según la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un péptido que consiste en SEQ ID NO: 19;

40 (b) un péptido sintético doble que comprende dos péptidos diferentes de dicho péptido de (a) unidos covalentemente entre sí, o bien directamente o bien a través de una corta cadena de unión;

(c) un polímero peptídico que comprende una pluralidad de secuencias de dicho péptido de (a); y

45 (d) un péptido de (a) o un polímero peptídico de (c) unido a un vehículo macromolecular.

8. Péptido sintético según la reivindicación 7, que consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 19.

50 9. Péptido sintético según la reivindicación 8, seleccionado de los péptidos que consisten en las secuencias de la SEQ ID NO: 20 a NO: 27.

10. Péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 7.

55 11. Péptido según la reivindicación 10, que consiste en el péptido de SEQ ID NO: 7 amidado en el extremo C-terminal.

60 12. Péptido sintético doble según la reivindicación 1, en el que un péptido según la reivindicación 3 está unido covalentemente a un péptido según la reivindicación 8, o bien directamente o bien a través de una corta cadena de unión.

13. Péptido sintético doble según la reivindicación 12, en el que un péptido de SEQ ID NO: 11 está unido covalentemente de manera directa a un péptido de SEQ ID NO: 19.

65 14. Péptido sintético doble en el que el péptido de SEQ ID NO: 6 está unido covalentemente al péptido de SEQ ID NO: 7.

ES 2 275 832 T3

15. Polímero peptídico según la reivindicación 1, que contiene una pluralidad de secuencias idénticas seleccionadas de las secuencias de SEQ ID NO: 6, 7, y 11-27.

5 16. Composición farmacéutica que comprende al menos un péptido sintético o un polímero peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. Composición farmacéutica que comprende el péptido de la secuencia de SEQ ID NO: 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 18. Composición farmacéutica que comprende el péptido de la secuencia de SEQ ID NO: 6 amidado en el extremo C-terminal, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. Composición farmacéutica que comprende el péptido de la secuencia de SEQ ID NO: 7, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 20. Composición farmacéutica que comprende el péptido de la secuencia de SEQ ID NO: 7 amidado en el extremo C-terminal, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 21. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico.

22. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, adaptada para la administración oral, intravenosa, subcutánea, intraarticular, intramuscular, inhalación, intranasal, intratecal, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica o enteral.

25 23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22, para la administración intranasal.

24. Uso de un péptido o un polímero peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico (LES).

30 25. Uso según la reivindicación 24 del péptido de la SEQ ID No. 6, opcionalmente amidado en el extremo C-terminal.

35 26. Uso según la reivindicación 24 del péptido de la SEQ ID No. 7, opcionalmente amidado en el extremo C-terminal.

40 27. Uso de un péptido o un polímero peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico (LES) mediante la inmunomodulación de las respuestas asociadas a LES en un paciente con LES.

28. Uso según la reivindicación 27, en el que la inmunomodulación comprende la regulación por disminución de los niveles de las actividades de la metaloproteinasas de la matriz MPM-3 y/o MPM-9 en un paciente con LES.

45 29. Uso según la reivindicación 27, en el que la inmunomodulación se refiere al nivel de actividad de una citocina en un paciente con LES.

30. Uso según la reivindicación 29, en el que la inmunomodulación comprende la regulación por disminución del nivel de la actividad de IL-2 y/o IFN- γ en un paciente con LES.

50 31. Uso según la reivindicación 29, en el que la inmunomodulación comprende la regulación por incremento del nivel de actividad de TGF- β en un paciente con LES.

32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, del péptido de la SEQ ID No. 6.

55 33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, del péptido de la SEQ ID No. 7.

60 34. Método para evaluar la eficacia de un fármaco que comprende un péptido o un polímero peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el tratamiento de un paciente con LES, que comprende medir a diferentes intervalos de tiempo los niveles de MPM-3 y/o MPM-9 en una muestra de sangre obtenida de dicho paciente que se está tratando con dicho fármaco, mediante el cual un nivel disminuido de MPM-3 y/o MPM-9 se correlaciona con la eficacia del fármaco.

65 35. Método para evaluar la eficacia de un fármaco que comprende un péptido o un polímero peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el tratamiento de un paciente con LES, que comprende medir a diferentes intervalos de tiempo los niveles de IL-2 y/o IFN- γ en una muestra de sangre obtenida de dicho paciente que se está tratando con dicho fármaco, mediante el cual un nivel disminuido de IL-2 y/o IFN- γ se correlaciona con la eficacia del fármaco.

ES 2 275 832 T3

36. Método para evaluar la eficacia de un fármaco que comprende un péptido o un polímero peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el tratamiento de un paciente con LES, que comprende medir a diferentes intervalos de tiempo el nivel de TGF- β en una muestra de sangre obtenida de dicho paciente que se está tratando con dicho fármaco, mediante el cual un nivel aumentado de TGF- β se correlaciona con la eficacia del fármaco.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

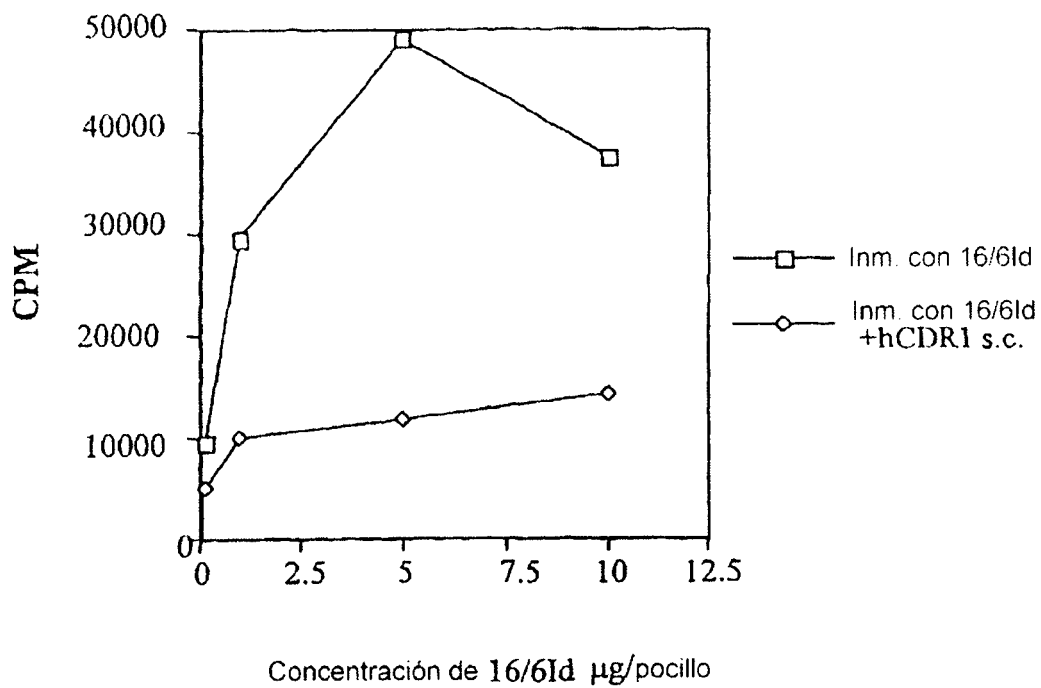


Fig. 1

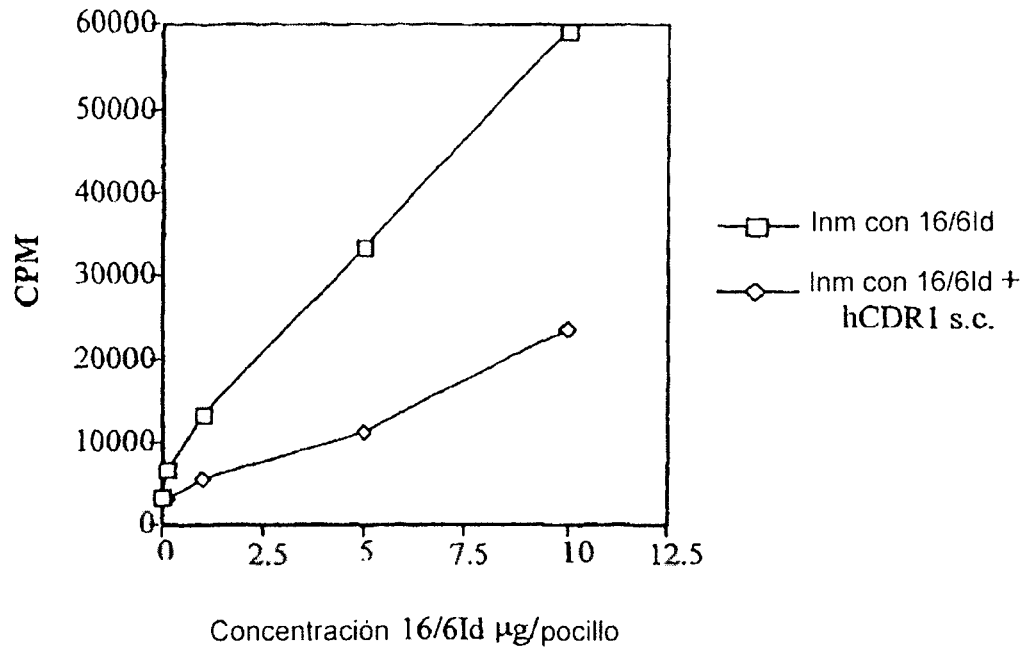
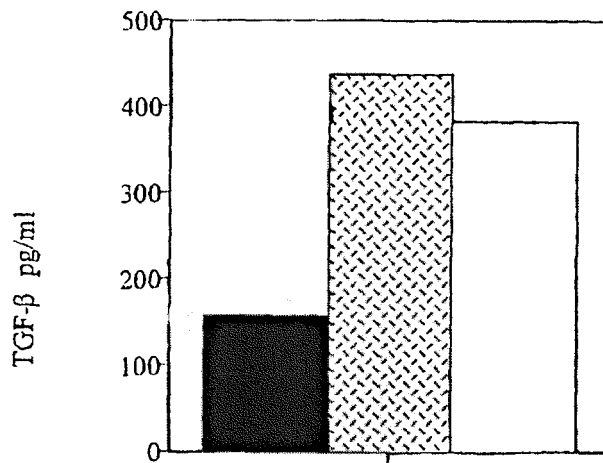
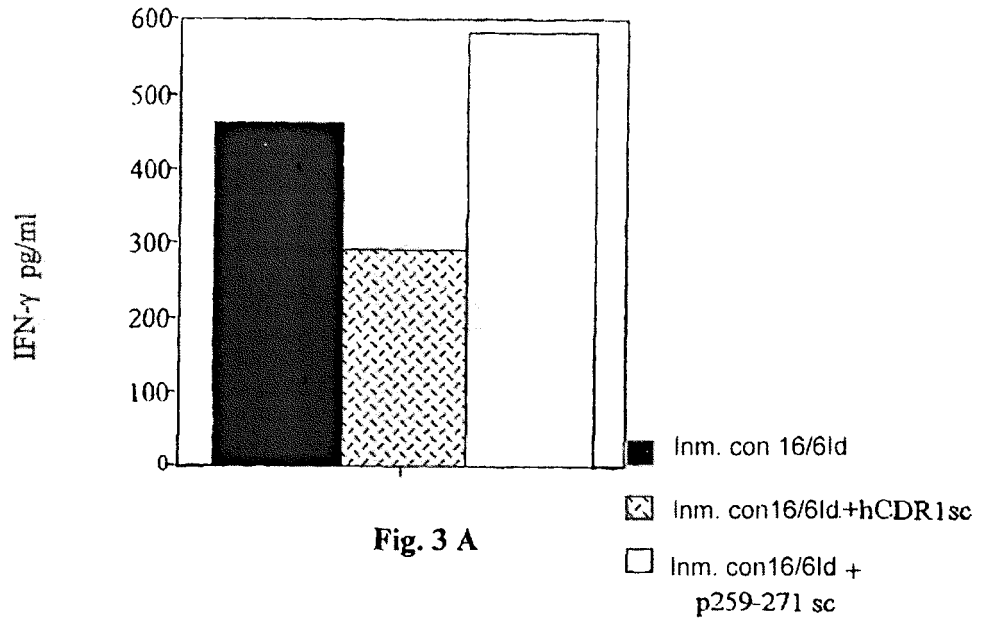


Fig. 2



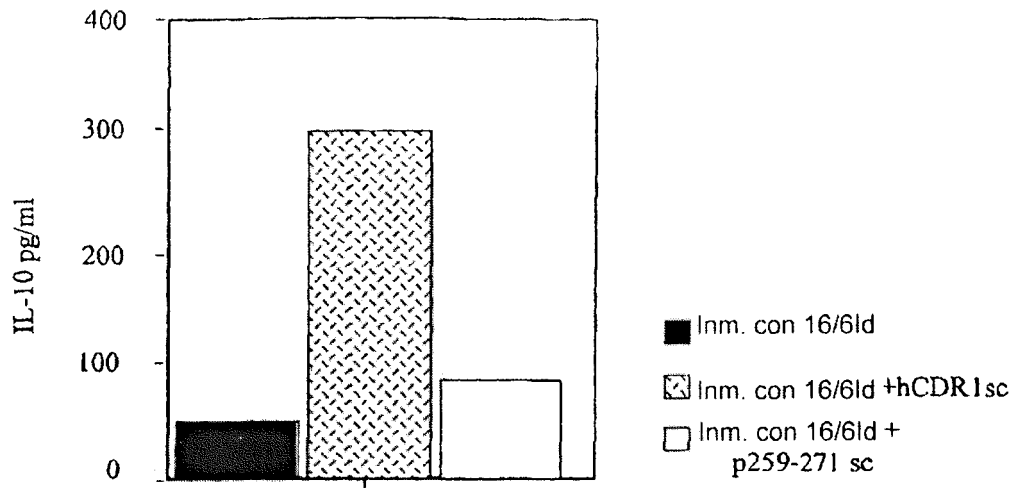


Fig. 3 C

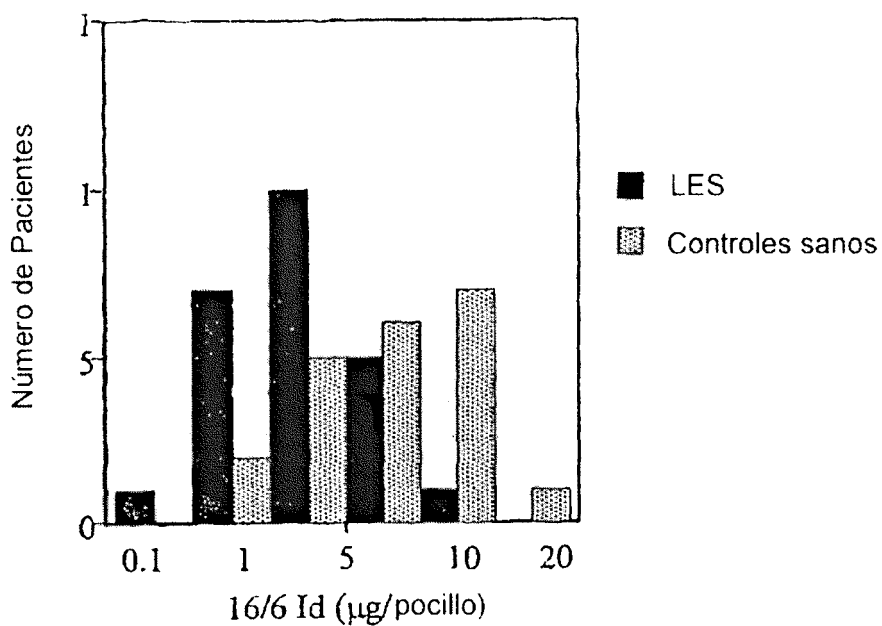


Fig. 4

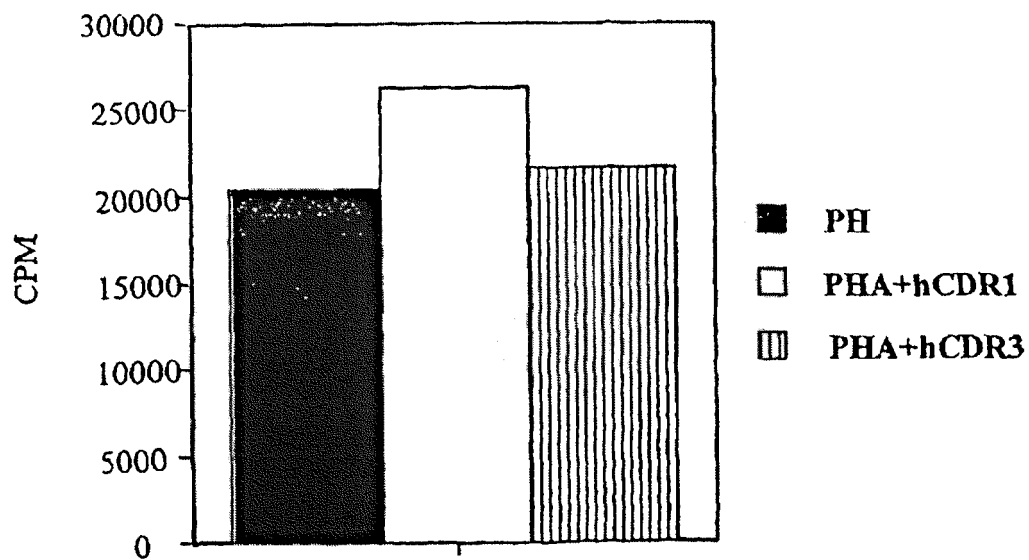


Fig. 5

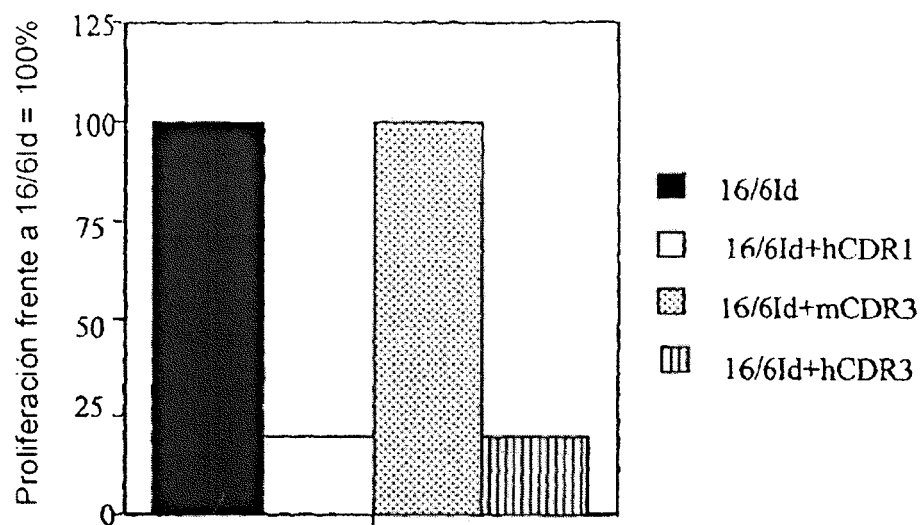


Fig. 6

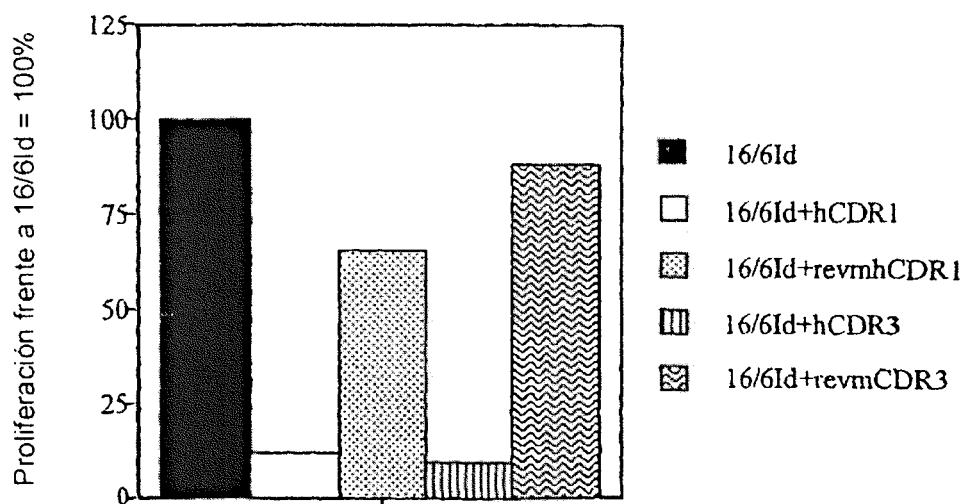


Fig. 7

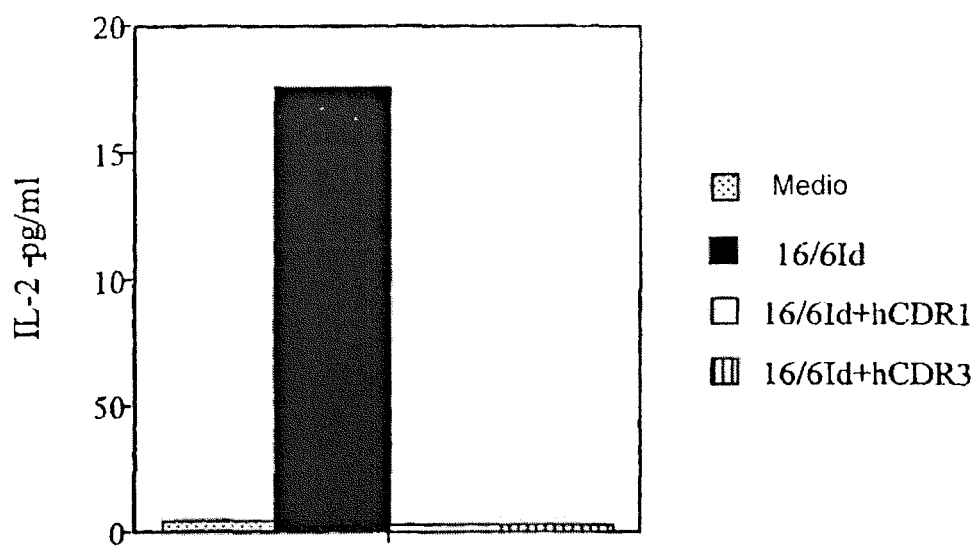


Fig. 8

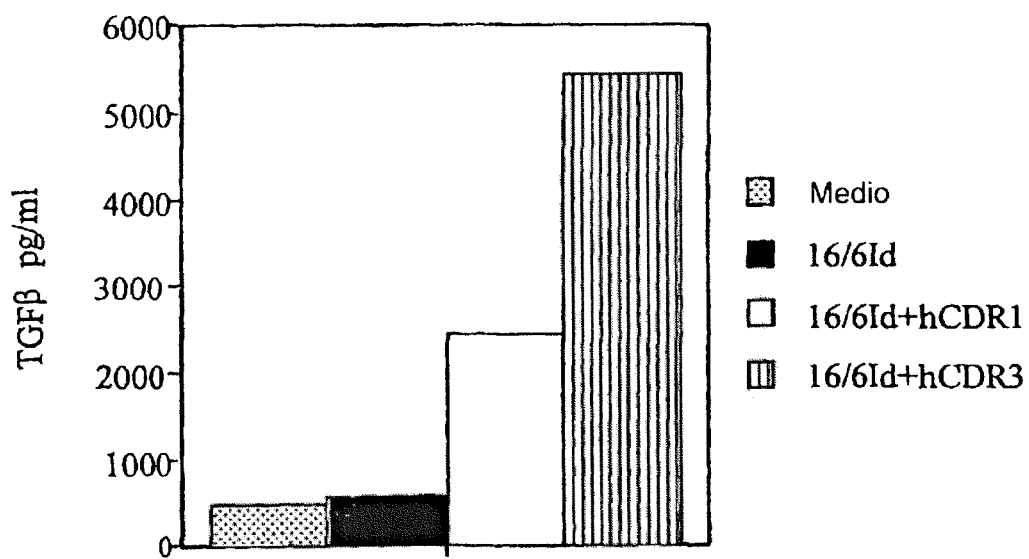


Fig. 9

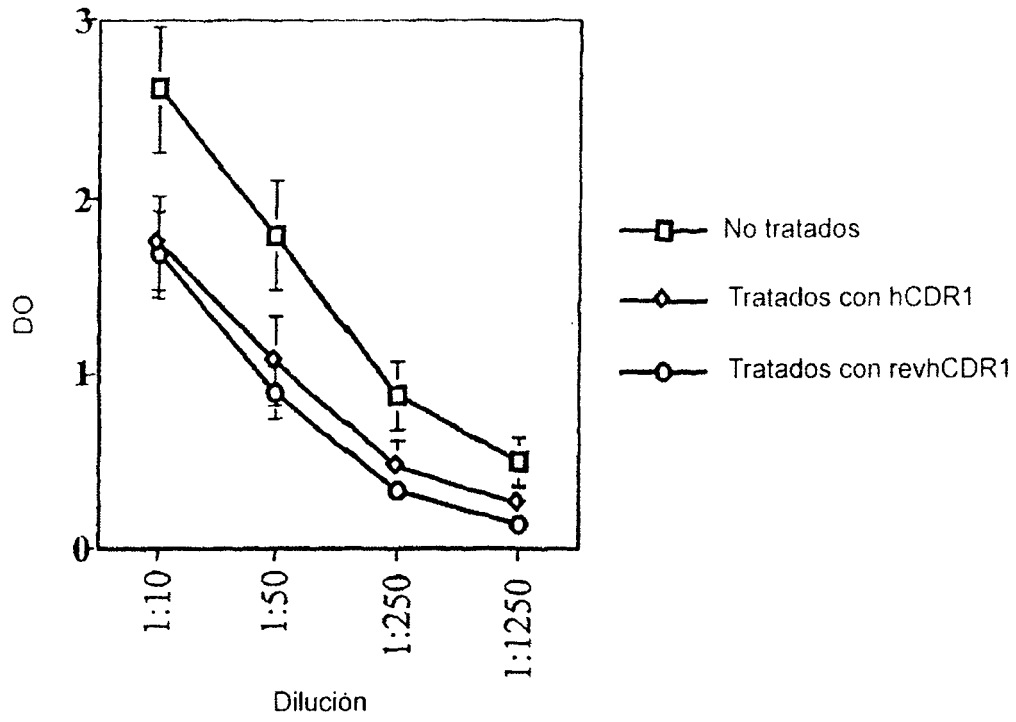


Fig. 10

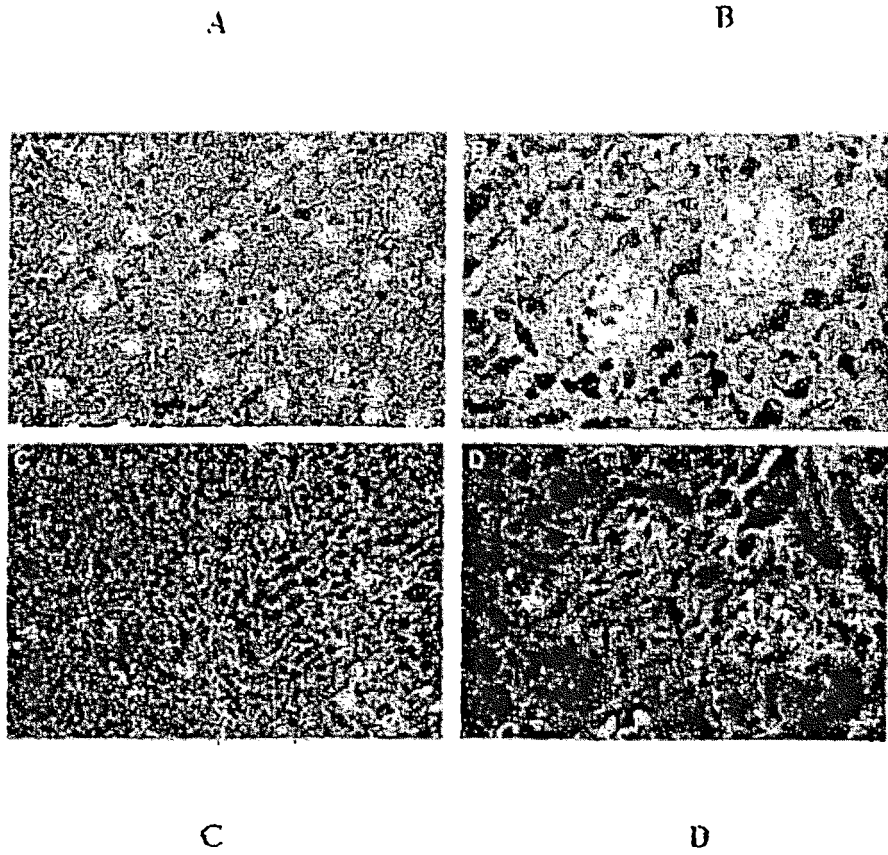


Fig. 11

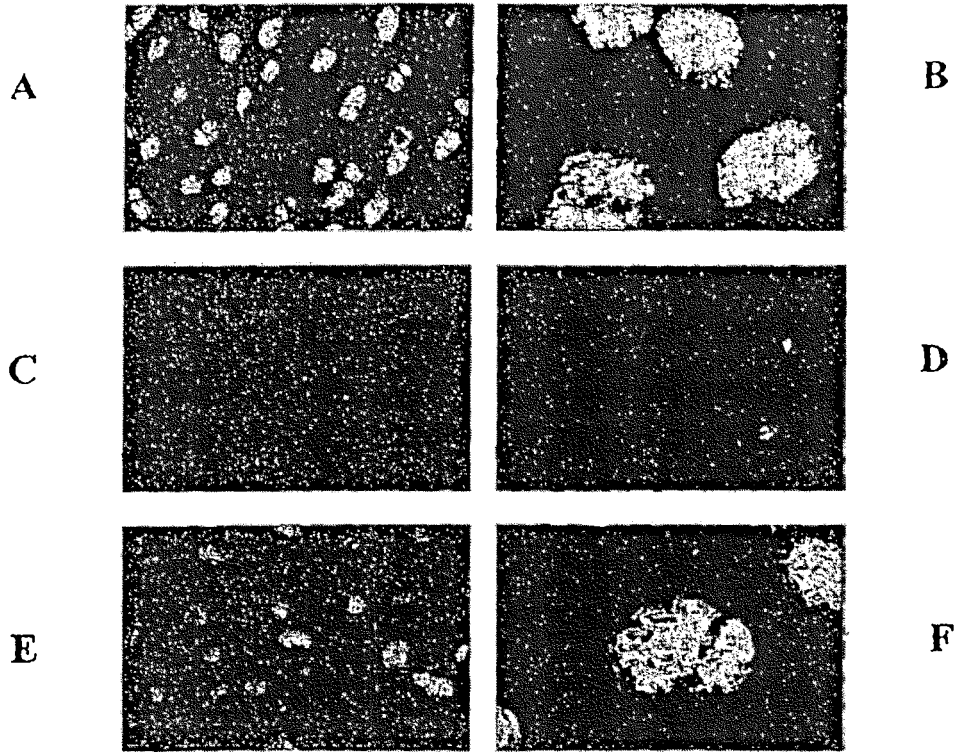


Fig. 12

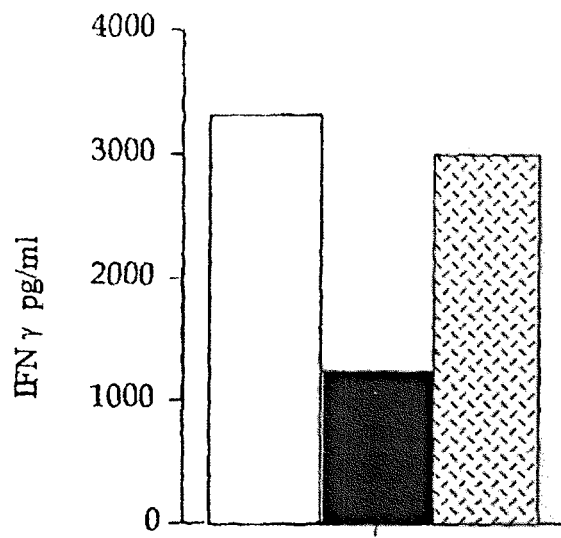


Fig. 13 A

□ No tratados

■ hCDR1

▨ rev hCDR1

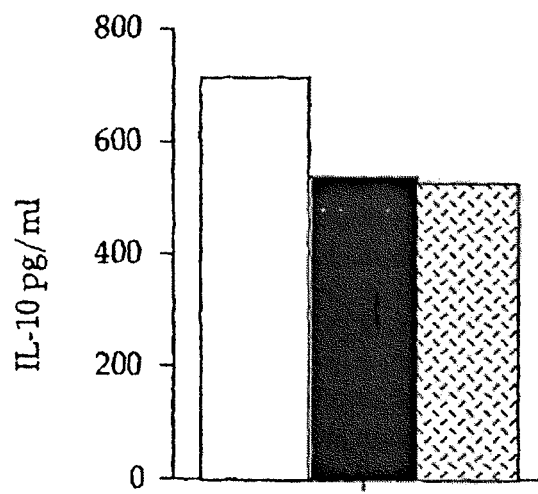


Fig. 13 B

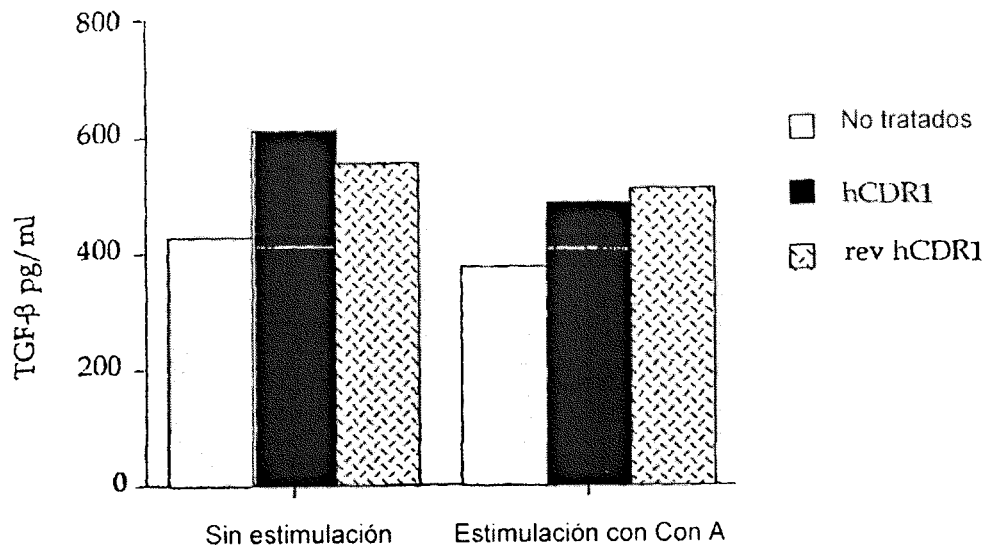


Fig. 13 C

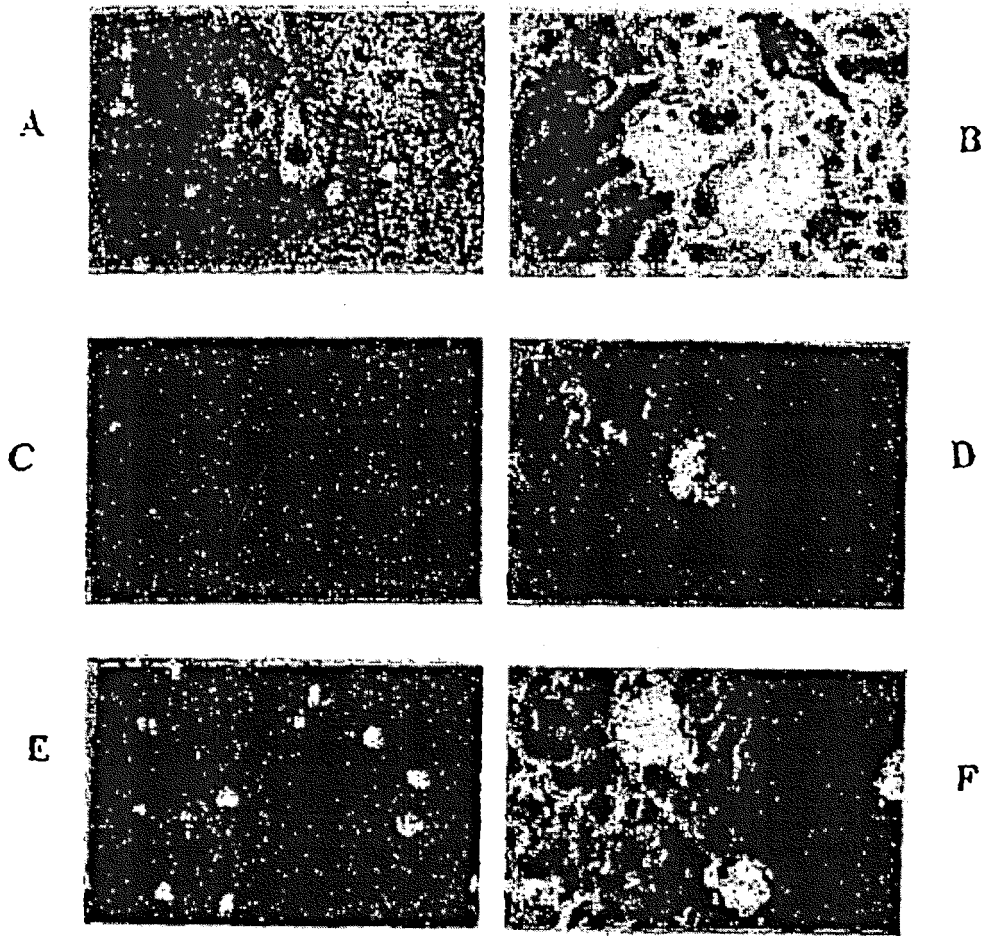
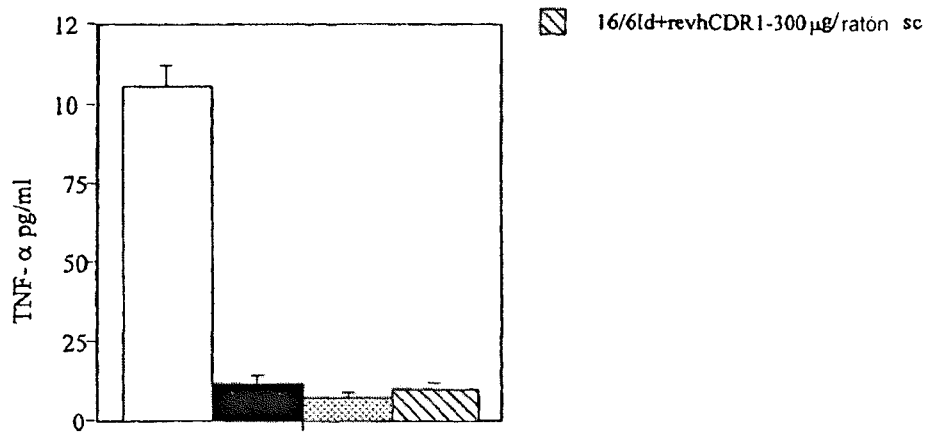
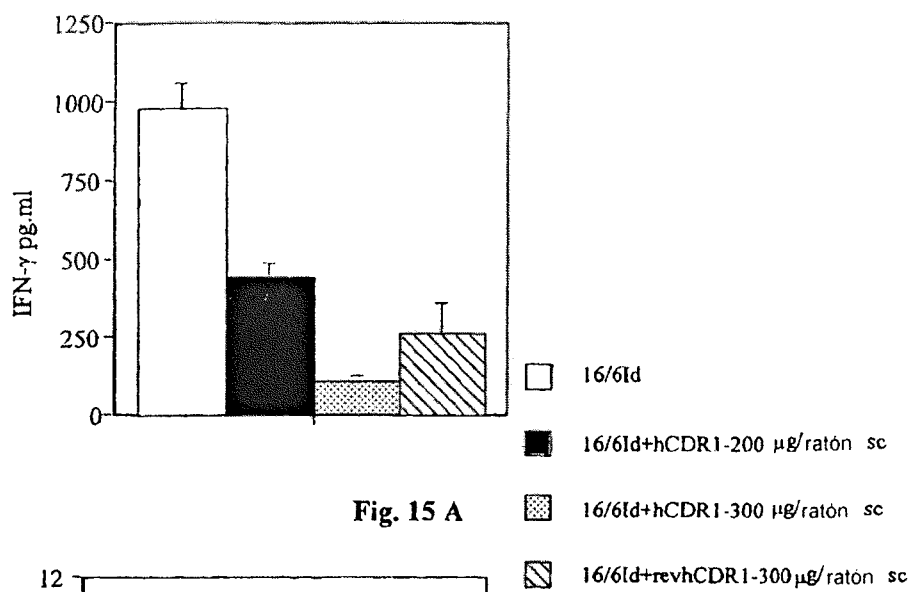


Fig. 14



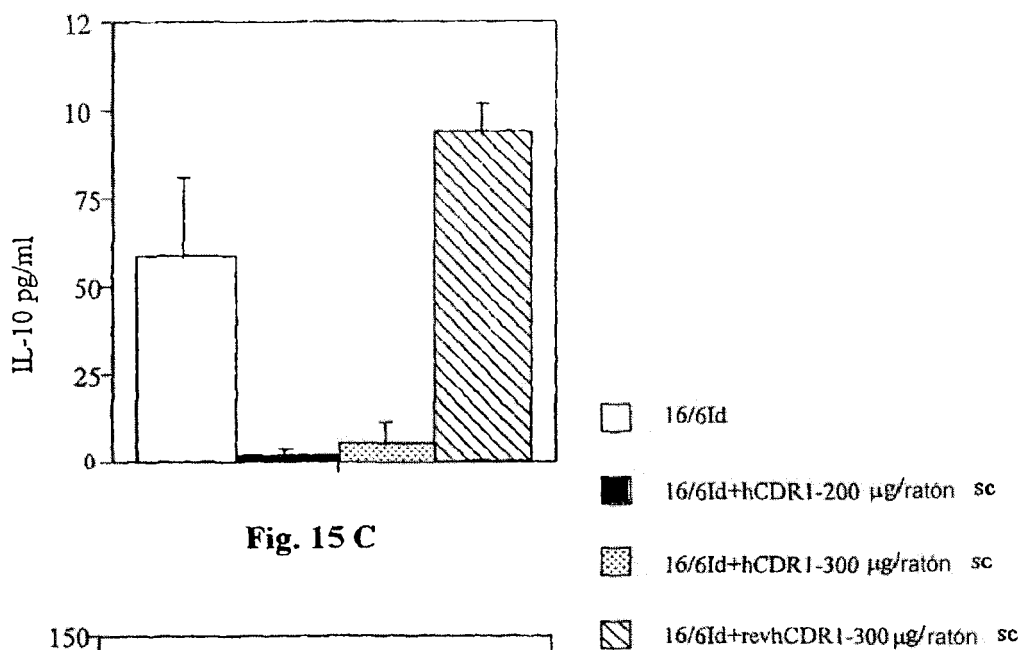


Fig. 15 C

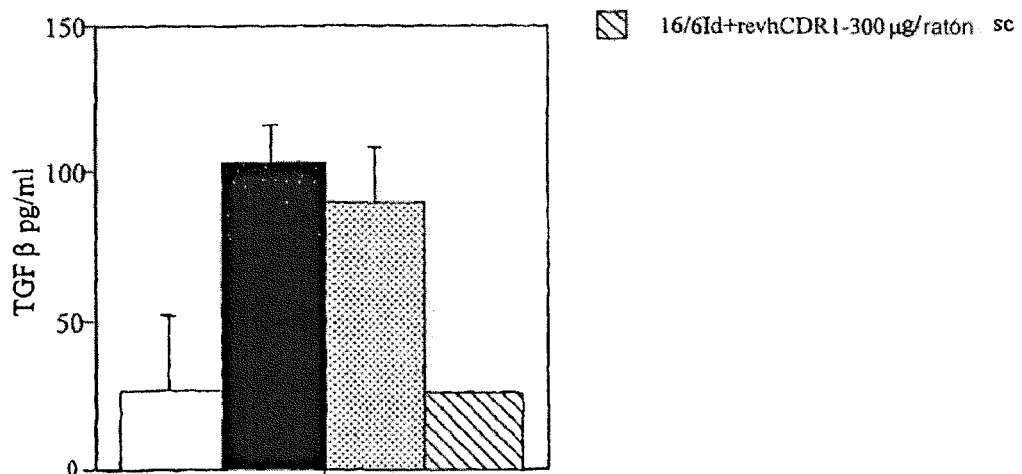


Fig. 15 D

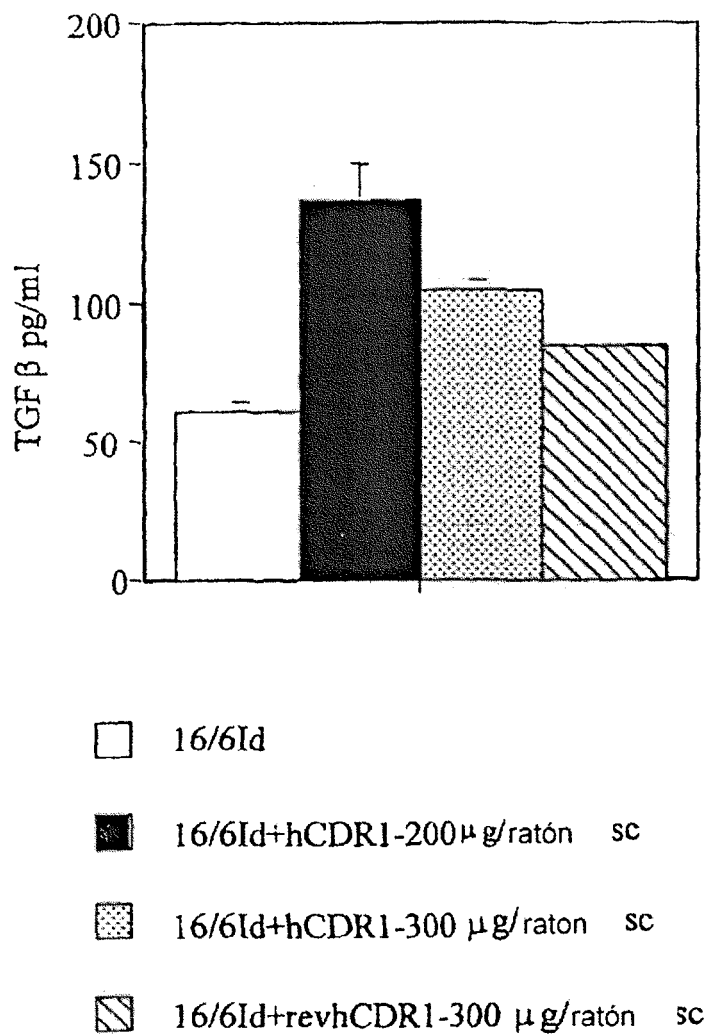


Fig. 15 E

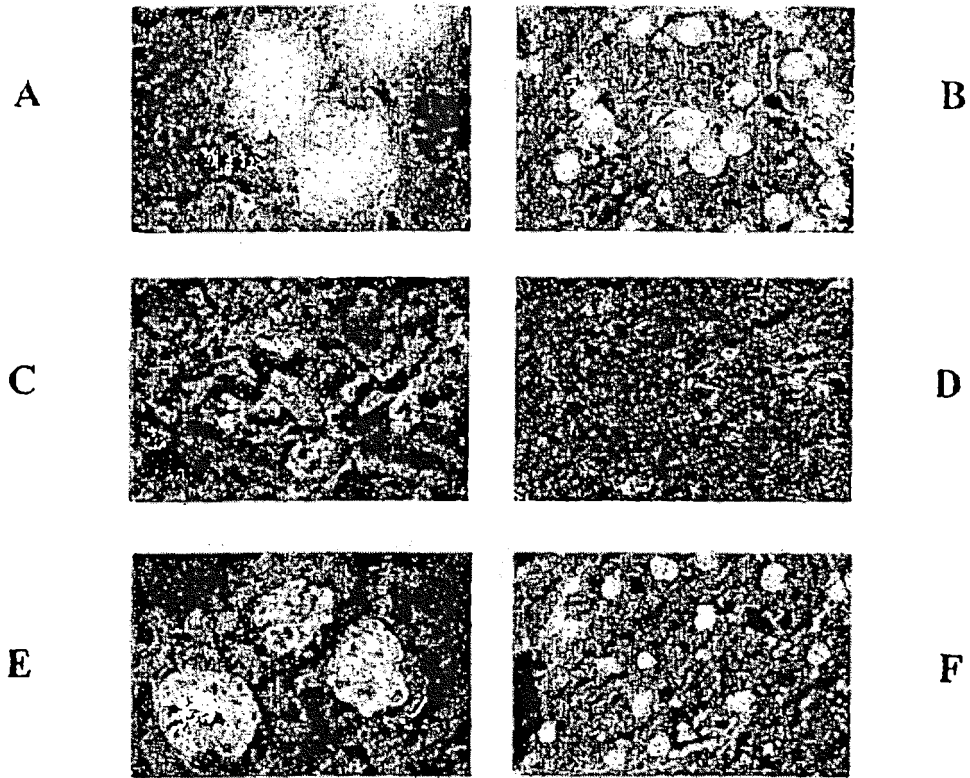


Fig. 16



Fig. 17 A

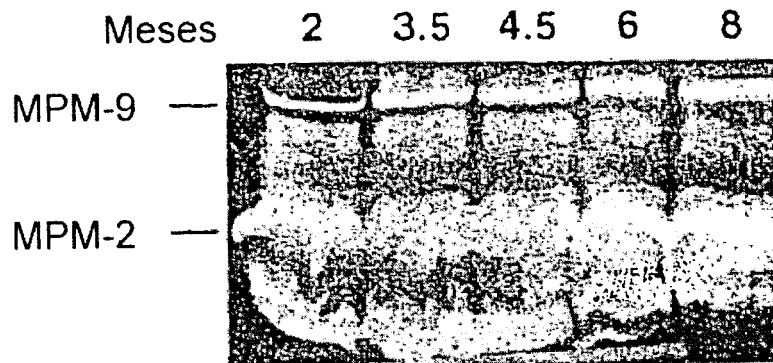


Fig. 17 B

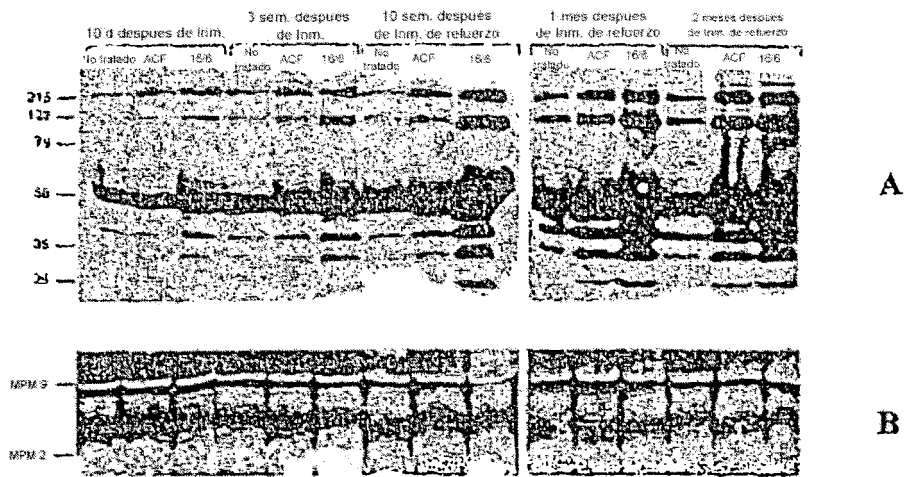


Fig. 18

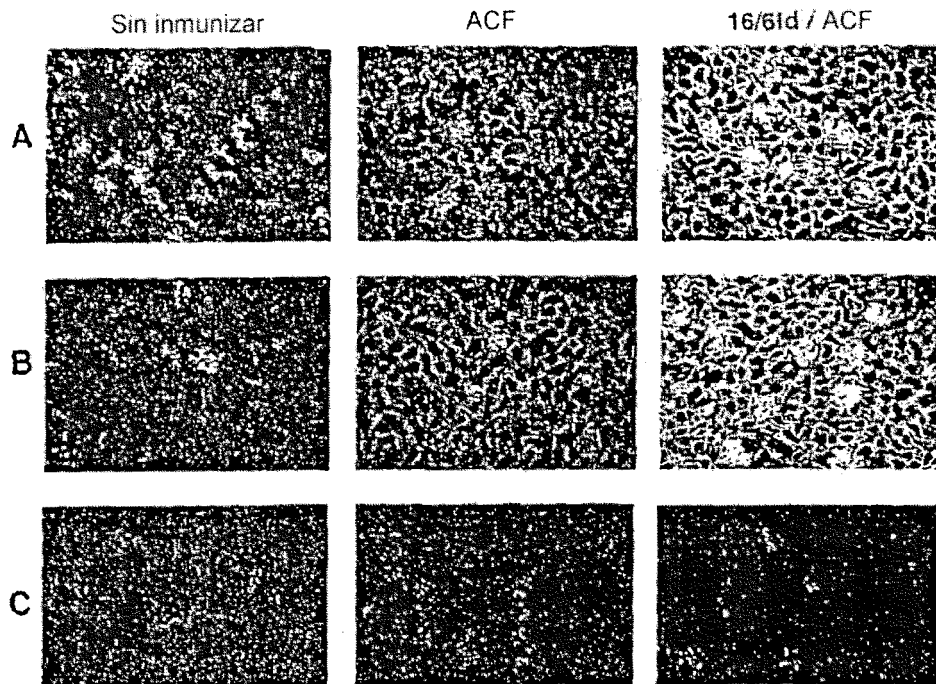


Fig. 19

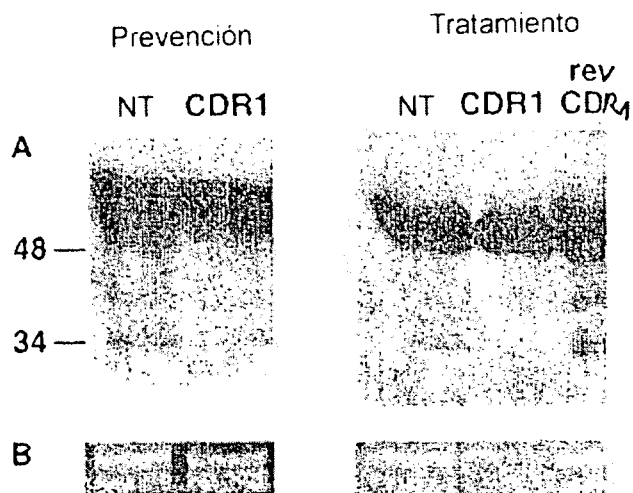


Fig. 20

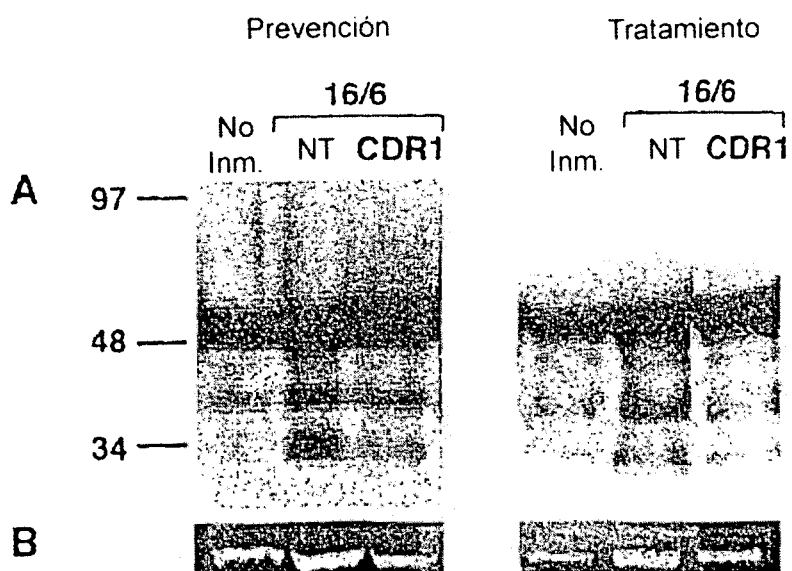


Fig. 21

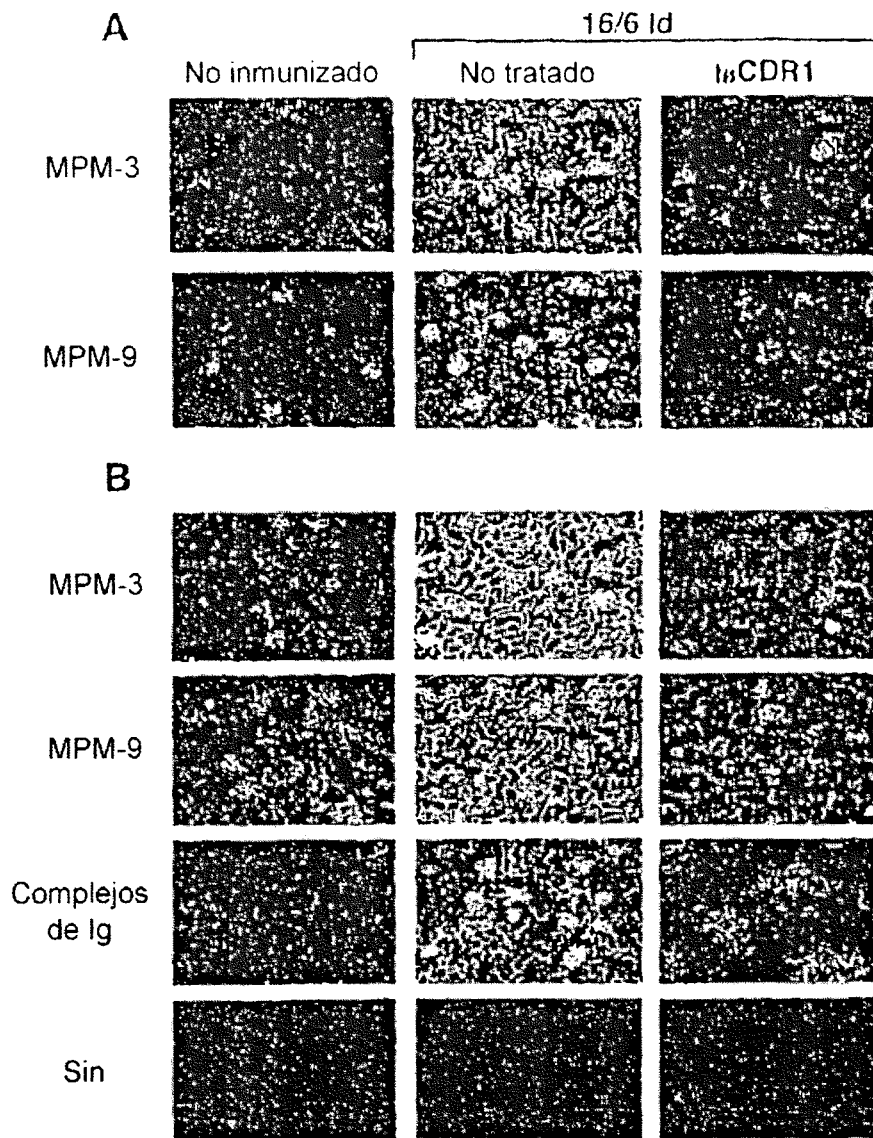


Fig. 22

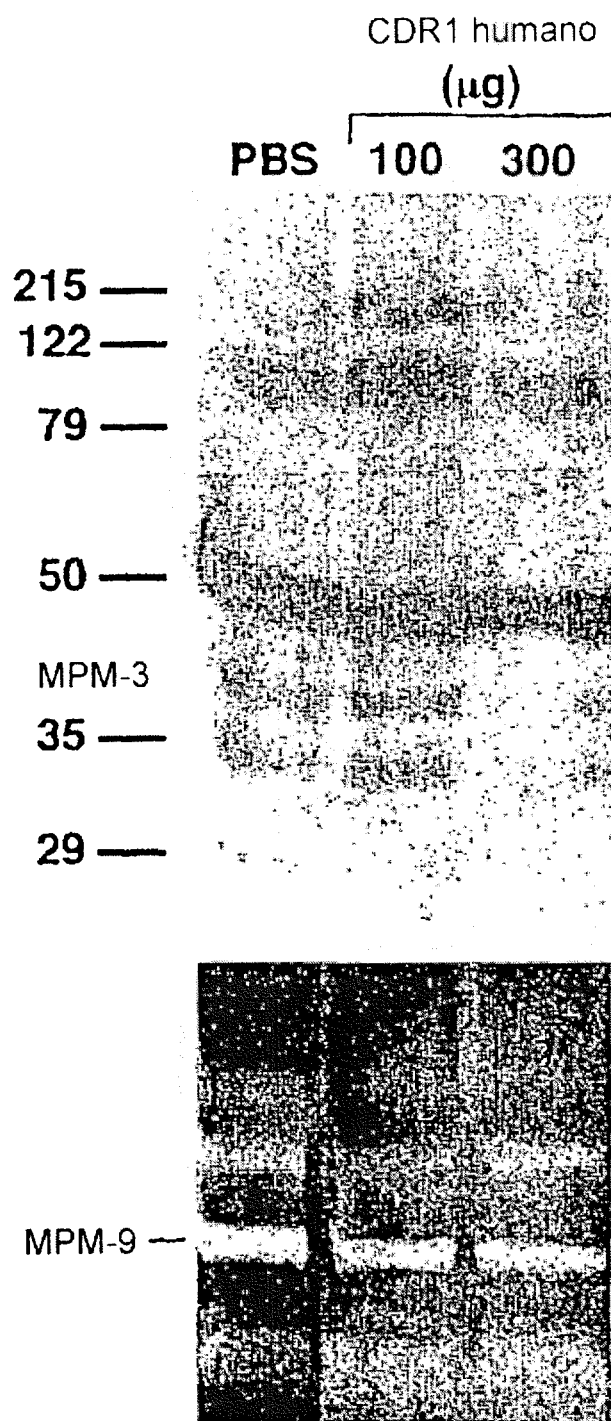


Fig. 23

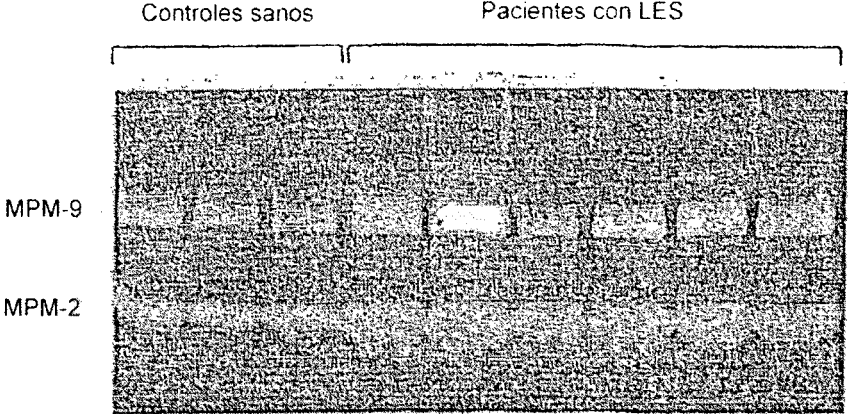


Fig. 24

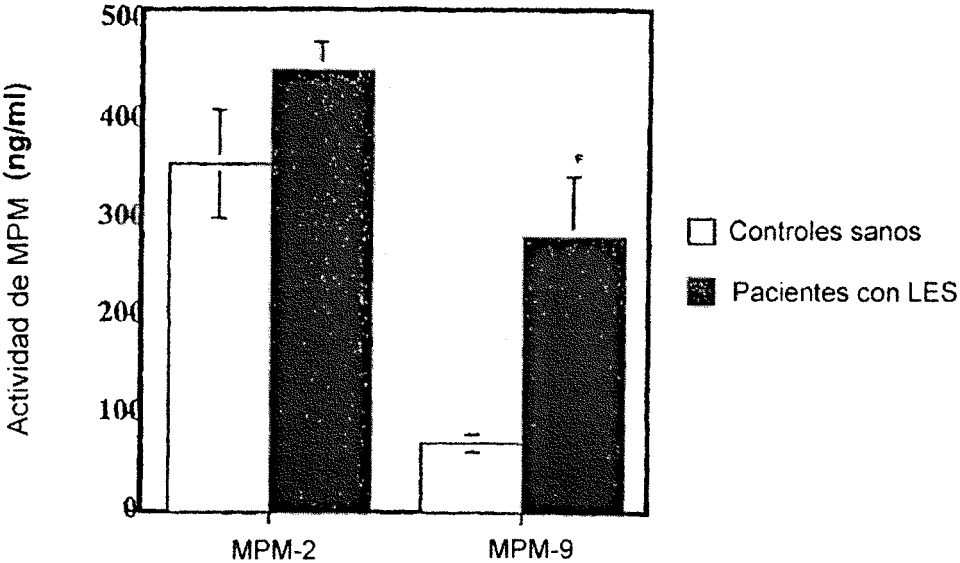


Fig. 25

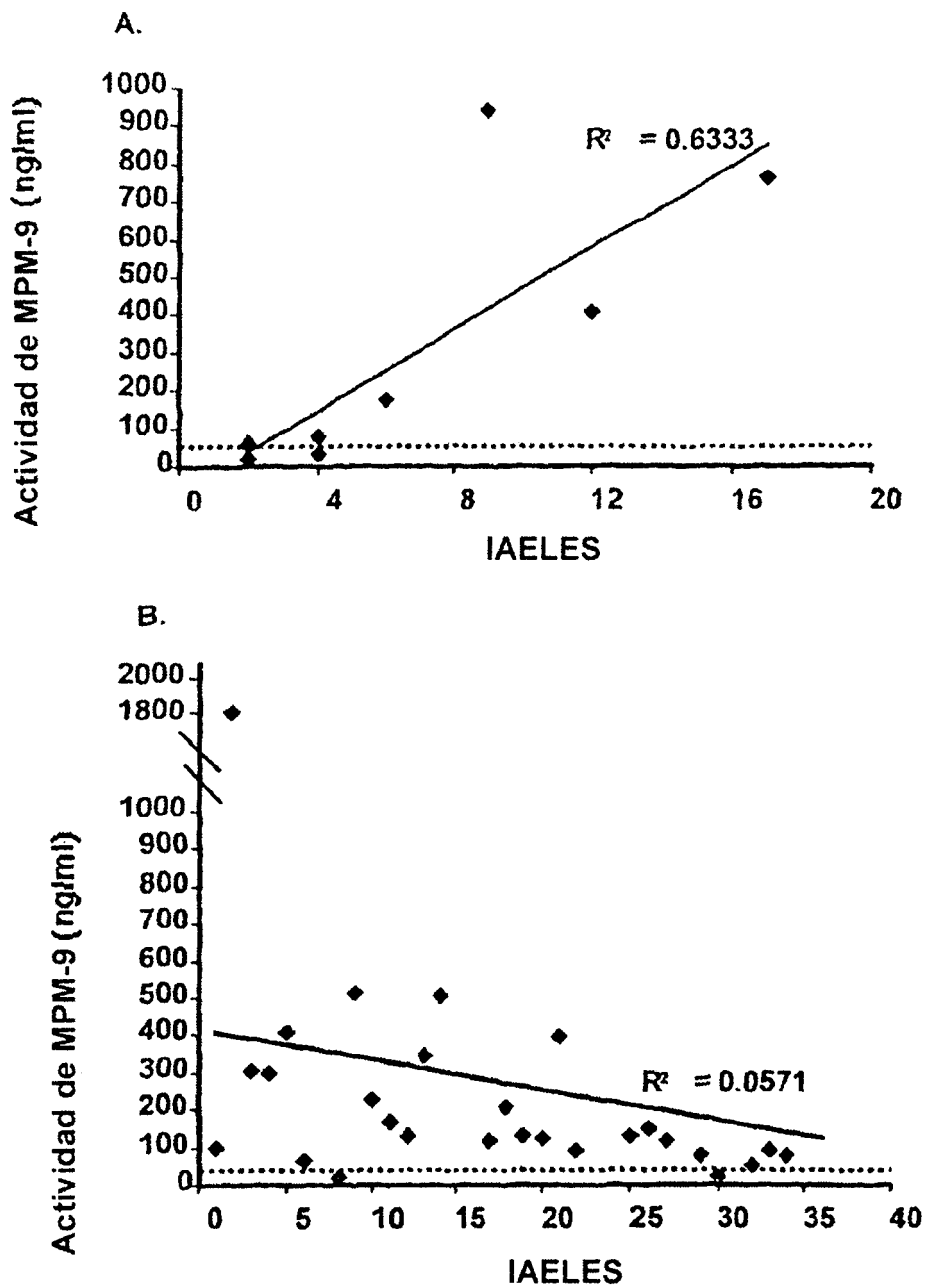


Fig. 26

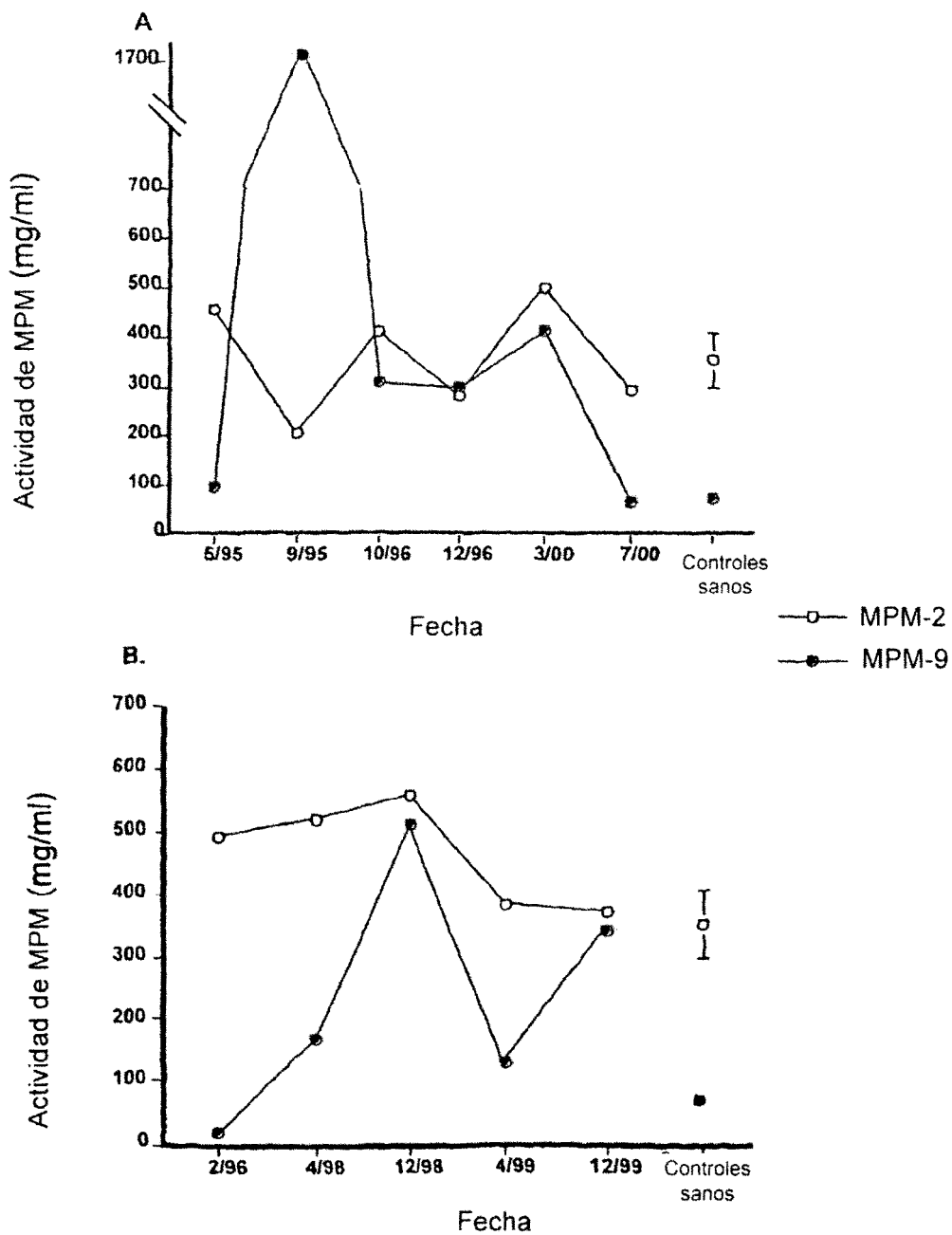


Fig. 27

ES 2 275 832 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> YEDA Research and Development Co. Ltd
- 5 <120> PÉPTIDOS DEL ANTICUERPO 16/6id PARA TRATAR LES
<130> TEVA-003 EP
<140> Documento EP 02 70 0553.7
<141> 26-02-2006
- 10 <150> IL 141647
<151> 26-02-2001
<150> Documento PCT/IL02/00148
<151> 26-02-2002
- 15 <160> 30
<170> PatentIn versión 3.
- 20 <210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> Murino
- 25 <400> 1
- 30 Thr Gly Tyr Tyr Met Gln Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Lys Ser Leu
 1 5 10 15
 Glu Trp Ile Gly
 20
- 35 <210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> Murino
- 40 <400> 2
- 45 Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ala Lys Ala Thr
 20
- 50 <210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> Murino
- 55 <400> 3
- 60 Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Leu Trp Glu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 1 5 10 15
 Gly Gln Gly Ser
 20
- 65 <210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Murino

ES 2 275 832 T3

<400> 4

1 Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu
5 Trp Ile Gly

<210> 5

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Murino

15 <400> 5

1 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Arg Tyr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Thr
20 Leu

<210> 6

25 <211> 19

<212> PRT

<213> Humano

30 <400> 6

1 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu
35 Trp Ile Gly

<210> 7

40 <211> 22

<212> PRT

<213> Humano

45 <400> 7

1 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp
50 Tyr Tyr Gly Met Asp Val

<210> 8

<211> 7

55 <212> PRT

<213> Humano

<400> 8

60 Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser

65 <210> 9

<211> 16

<212> PRT

ES 2 275 832 T3

<213> Humano

<400> 9

5 Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Lys Thr Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 10

10 <211> 18

<212> PRT

<213> Humano

15 <400> 10

 Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15
20 Asp Val

<210> 11

25 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético basado en la CDR1 de la cadena pesada del Acm 16/6id humano. Nota: Thr (posición 1) podría faltar."

35 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

40 <223> Xaa en la posición 9 es Arg o Lys; Xaa en la posición 11 es Pro o Ser; Xaa en la posición 13 es Gly o Glu; Xaa en la posición 14 es Lys o Asp; Xaa en la posición 16 es Glu, Leu o Ser.

<400> 11

45 Thr Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Xaa Gln Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa
 1 5 10 15
 Glu Trp Ile Gly
 20

50 <210> 12

<211> 19

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

60 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 11 en el que falta Thr (posición 1), Xaa(9) es Arg, Xaa(11) es Pro, Xaa(13) es Gly, Xaa (14) es Lys, y Xaa(16) es Leu."

<400> 12

65 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 1 5 10 15
 Trp Ile Gly

ES 2 275 832 T3

<210> 13
<211> 19
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 11 en el que falta Thr (posición 1), Xaa(9) es Arg, Xaa(11) es Pro, Xaa(13) es Gly, Xaa(14) es Lys, y Xaa(16) es Ser."

<400> 13
15 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Ser Glu
1 5 10 15
Trp Ile Gly

20
<210> 14
<211> 19
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
30 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 11 en el que falta Thr (posición 1), Xaa(9) es Arg, Xaa(11) es Pro, Xaa(13) es Gly, Xaa(14) es Asp, y Xaa(16) es Glu."

<400> 14
35 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Asp Gly Glu Glu
1 5 10 15
Trp Ile Gly

40
<210> 15
<211> 19
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 11 en el que falta Thr (posición 1), Xaa(9) es Lys, Xaa(11) es Pro, Xaa(13) es Gly, Xaa(14) es Lys, y Xaa(16) es Glu."

<400> 15
55 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Lys Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu
1 5 10 15
Trp Ile Gly

60
<210> 16
<211> 19
<212> PRT
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 275 832 T3

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 11 en el que falta Thr (posición 1), Xaa(9) es Arg, Xaa(11) es Ser, Xaa(13) es Gly, Xaa(14) es Lys, y Xaa(16) es Glu."

<400> 16

10 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Glu Glu
1 5 10 15
Trp Ile Gly

15 <210> 17

<211> 19

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintético. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 11 en el que falta Thr (posición 1), Xaa(9) es Arg, Xaa(11) es Pro, Xaa(13) es Glu, Xaa (14) es Lys, y Xaa(16) es Glu."

<400> 17

30 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Glu Lys Gly Glu Glu
1 5 10 15
Trp Ile Gly

35 <210> 18

<211> 20

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

45 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 11 en el que Xaa(9) es Arg, Xaa(11) es Pro, Xaa(13) es Gly, Xaa(14) es Lys, y Xaa(16) es Glu."

<400> 18

50 Thr Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu
1 5 10 15
Glu Trp Ile Gly
20

55

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

65 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético basado en la CDR3 de la cadena pesada del Acm 16/6id humano."

ES 2 275 832 T3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(22)
5 <223> Xaa en la posición 6 es Gly o Phe; Xaa en la posición 9 es Arg o Ala; Xaa en la posición 10 es Gly o Ala; Xaa en la posición 11 es Gly o Ala; Xaa en la posición 12 es Trp o Ala; Xaa en la posición 13 es Asn o Ala; Xaa en la posición 18 es Tyr o Trp; Xaa en la posición 20 es Met o Gln.

10 <400> 19

Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Leu Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Val Asp

15 **Tyr Xaa Gly Xaa Asp Val**
20

<210> 20
20 <211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 19 en el que Xaa(6) es Gly, Xaa(9) es Arg, Xaa(10) es Gly, Xaa(11) es Gly, Xaa(12) es Trp, Xaa(13) es Ala, Xaa(18) es Tyr, y Xaa (20) es Met."
30

<400> 20

35 Tyr Tyr Xys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Ala Asp Val Asp
1 5 10 15
Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

40 <210> 21
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
50 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 19 en el que Xaa(6) es Gly, Xaa(9) es Arg, Xaa(10) es Gly, Xaa(11) es Gly, Xaa(12) es Ala, Xaa(13) es Asn, Xaa(18) es Tyr, y Xaa (20) es Met."
55

<400> 21

60 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Ala Asn Asp Val Asp
1 5 10 15
Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

65 <210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 275 832 T3

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 19 en el que Xaa(6) es Gly, Xaa(9) es Arg, Xaa(10) es Gly, Xaa(11) es Ala, Xaa(12) es Trp, Xaa(13) es Asn, Xaa(18) es Tyr, y Xaa(20) es Met."

<400> 22

10 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Ala Trp Asn Asp Val Asp
1 5 10 15
Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

15

<210> 23

<211> 22

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 19 en el que Xaa(6) es Gly, Xaa(9) es Arg, Xaa(10) es Ala, Xaa(11) es Gly, Xaa(12) es Trp, Xaa(13) es Asn, Xaa(18) es Tyr, y Xaa(20) es Met."

30 <400> 23

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Ala Gly Trp Asn Asp Val Asp
1 5 10 15
Tyr Tyr Gly Met Asp Val
35 20

<210> 24

40 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 19 en el que Xaa(6) es Gly, Xaa(9) es Ala, Xaa(10) es Gly, Xaa(11) es Gly, Xaa(12) es Trp, Xaa(13) es Asn, Xaa(18) es Tyr, y Xaa(20) es Met."

50

<400> 24

55 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Ala Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp
1 5 10 15
Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

60 <210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<221> fuente

ES 2 275 832 T3

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 19 en el que Xaa(6) es Phe, Xaa(9) es Arg, Xaa(10) es Gly, Xaa(11) es Gly, Xaa(12) es Trp, Xaa(13) es Asn, Xaa(18) es Tyr, y Xaa(20) es Met."

5 <400> 25

Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp
1 5 10 15

10 Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 26

15 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 19 en el que Xaa(6) es Gly, Xaa(9) es Arg, Xaa(10) es Gly, Xaa(11) es Gly, Xaa(12) es Trp, Xaa(13) es Asn, Xaa(18) es Tyr, y Xaa(20) es Gln."

25 <400> 26

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp
1 5 10 15

30 Tyr Tyr Gly Gln Asp Val
20

35 <210> 27

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<221> fuente

45 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Sintética. Nota: un péptido de SEQ ID NO: 19 en el que Xaa(6) es Gly, Xaa(9) es Arg, Xaa(10) es Gly, Xaa(11) es Gly, Xaa(12) es Trp, Xaa(13) es Asn, Xaa(18) es Trp, y Xaa(20) es Met."

<400> 27

50 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp
1 5 10 15

Tyr Trp Gly Met Asp Val
20

55 <210> 28

<211> 20

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético preparado en el orden inverso de la SEQ ID NO: 1."

ES 2 275 832 T3

<400> 28

5 Gly Ile Trp Glu Leu Ser Lys Glu Pro Ser Gln Lys Val Trp Gln Met
1 5 10 15
Tyr Tyr Gly Thr
20

<210> 29

10 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

20 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético preparado en el orden inverso de la SEQ ID
NO: 3."

<400> 29

25 Ser Gly Gln Gly Trp Tyr Asp Met Ala Tyr Pro Glu Trp Leu Phe Arg
1 5 10 15
Ala Cys Tyr Tyr
20

30 <210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

40 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético preparado en el orden inverso de la SEQ ID
NO: 6."

<400> 30

45 Gly Ile Trp Glu Glu Gly Lys Gly Pro Pro Gln Arg Ile Trp Ser Trp
1 5 10 15
Tyr Tyr Gly

50

55

60

65