

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 301**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03723033 .1**  
96 Fecha de presentación: **21.05.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1575526**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Vacunas de ADN que codifican proteínas de choque térmico**

30 Prioridad:  
**21.05.2002 US 381821 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.10.2012**

73 Titular/es:  
**COHEN, IRUN R. (25.0%)**  
**11 Hankin Street**  
**76354 Rehovot, IL;**  
**QUINTANA, FRANCISCO JAVIER (25.0%);**  
**CARMI, PNINA (25.0%) y**  
**MOR, FELIX (25.0%)**

72 Inventor/es:  
**COHEN, IRUN R.;**  
**QUINTANA, FRANCISCO JAVIER;**  
**CARMI, PNINA y**  
**MOR, FELIX**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 389 301 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

Vacunas de ADN que codifican proteínas de choque térmico.

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T. En particular, la presente invención se refiere a una vacuna de ADN que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de choque térmico 70 (HSP70) de mamíferos, una composición farmacéutica que comprende una HSP70 codificadora de construcción recombinante y un método in vitro para tratar células obtenidas de un individuo con una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Aunque el sistema inmunitario normal está estrechamente regulado, las anomalías en las respuestas inmunitarias no son raras. En algunos casos, el sistema inmunitario actúa de manera inapropiada y reacciona a un componente del huésped como si fuera, de hecho, extraño. Tal respuesta da como resultado una enfermedad autoinmunitaria, en que el sistema inmunitario del huésped ataca al propio tejido del huésped. Las células T, como reguladores primarios del sistema inmunitario, efectúan directamente o indirectamente tales patologías autoinmunitarias. Enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T se refiere a cualquier afección en que una respuesta inapropiada de las células T es un componente de la enfermedad. Esto incluye tanto enfermedades mediadas directamente por células T como también enfermedades en que una respuesta inapropiada de las células T contribuye a la producción de anticuerpos anormales.

25 Se cree que numerosas enfermedades resultan de mecanismos autoinmunitarios. Destacan entre éstas artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, diabetes de tipo I, miastenia grave y pénfigo vulgar. Las enfermedades autoinmunitarias afectan a millones de individuos en el mundo y el coste de estas enfermedades, en términos de gastos de tratamiento reales y pérdida de productividad, se mide en billones de dólares al año.

30 La artritis adyuvante (AA) es una enfermedad autoinmunitaria experimental que modela diversas características de la artritis reumatoide humana (1). La AA está inducida en ratas de Lewis por inmunización con *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) muerta por el calor suspendida en Adyuvante de Freund Incompleto (IFA) (1). La reactividad de las células T frente a la proteína de choque térmico de 65 kDa (HSP65) micobacteriana está implicada en la evolución de AA. Las células T específicas de HSP65 dirigidas contra un epítipo formado por aa 180-188 (2) experimentan reacción cruzada con un auto-antígeno presente en el cartilago (3) y pueden transferir adoptivamente AA (4, 5). Sin embargo, la vacunación con péptidos HSP65 o HSP65 también puede evitar el desarrollo de AA (6-11). Se piensa que las propiedades reguladoras de HSP65 en AA implican la activación de células-T que experimentan reacciones cruzadas con la proteína de choque térmico de 60 kDa (HSP60) endógena (12). Esta hipótesis se soporta por el hallazgo de que la inmunización con un virus de vaccinia recombinante que codifica HSP60 humana (aproximadamente 95% homólogo a HSP60 de rata) evita (13) o trata (14) la AA. El autor de la presente invención ha informado recientemente que la vacunación de ADN con HSP60 humana evita la AA (15). La protección de AA estaba asociada con la activación de células-T que responde a HSP60 (15). La molécula de hsp60 humana se designaba antiguamente HSP65, pero ahora se designa HSP60 en vista de información más precisa de peso molecular; por cualquier denominación, la proteína es la misma.

45 Un método preferible para tratar enfermedades autoinmunitarias incluye modular el sistema inmunitario de un paciente para ayudar a los mecanismos de defensa naturales del paciente. Los reactivos y métodos tradicionales usados para intentar regular una respuesta inmunitaria en un paciente también dan como resultado efectos secundarios no deseados y presentan una eficacia limitada. Por ejemplo, los reactivos inmunodepresores (por ejemplo, ciclosporina A, azatioprina y prednisona) usados para tratar pacientes con enfermedades autoinmunitarias también suprimen la respuesta inmunitaria completa del paciente, aumentando de ese modo el riesgo de infección. Además, los reactivos inmunofarmacológicos usados para tratar el cáncer (por ejemplo, interleucinas) son efímeros en la circulación de un paciente y son ineficaces salvo a grandes dosis. Debido a la importancia médica de la regulación inmunitaria y las insuficiencias de los reactivos inmunofarmacológicos existentes, los reactivos y métodos para regular partes específicas del sistema inmunitario han sido el objeto de estudio durante muchos años.

50 La patente europea EP 262710 de Cohen et al. desvela el uso de HSP65 o fragmentos de la misma para la preparación de composiciones para el alivio, tratamiento y diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias, especialmente afecciones artríticas. La patente europea EP 322990 de Cohen et al. desvela que un polipéptido con secuencia de aminoácidos 172-192 de HSP65 es capaz de inducir resistencia a artritis autoinmunitaria y enfermedades autoinmunitarias similares. La patente internacional WO 92/04049 de Boog et al. desvela péptidos procedentes de proteína HSP-65 de *Mycobacterium tuberculosis* que contienen al menos 7 restos de aminoácidos y presenta reconocimiento de antígenos por linfocitos T en el tratamiento de la artritis y el rechazo de órganos.

65 La patente internacional WO 01/57056 de Karin desvela un método para tratar la artritis reumatoide. El método que comprende la etapa de expresión dentro del individuo de al menos una porción inmunológicamente reconocible de

una citocina a partir de un polinucleótido exógeno que codifica al menos una porción de la citocina, en el que un nivel de expresión de al menos una porción de la citocina es suficiente para inducir la formación de inmunoglobulinas de anti-citocina que sirven para neutralizar o mejorar la actividad de una citocina endógena respectiva y/o capaz de experimentar reacciones cruzadas, para tratar de ese modo la artritis reumatoide. La patente de EE.UU. 6.316.420 para Karin y colaboradores desvela además vacunas de citocina de ADN y uso de las mismas para inmunidad protectora contra la esclerosis múltiple.

La patente internacional WO 02/16549 de Cohen et al., cedida al cesionario de la presente invención, se refiere a vacunas de ADN útiles para la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias en marcha. Las composiciones y los métodos de la invención caracterizan el oligonucleótido CpG, preferiblemente en un motivo flanqueado por dos purinas 5' y dos pirimidinas 3'. Las vacunas comprenden opcionalmente además ADN que codifica un péptido o un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en variantes Hsp60, p277 o p277. Esa descripción se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento mejorado de la enfermedad autoinmunitaria en marcha en general y Diabetes Sacarina Dependiente de Insulina (IDDM, por sus siglas en inglés) en particular.

La patente de EE.UU. 5.993.803 desvela que cuando HSP60 o péptidos y análogos de los mismos, se administran a un individuo receptor antes de implante de un órgano o tejido, la autoinmunidad para HSP60 es regulada hacia abajo, dando como resultado la prevención o supresión de rechazo del injerto del órgano o tejido trasplantado.

La patente internacional WO 00/27870 de Naparstek y colegas desvela una serie de péptidos relacionados procedentes de proteínas de choque térmico HSP65 y HSP60, sus secuencias, anticuerpos y uso como vacunas para conferir inmunidad frente a trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios tales como la artritis. Se pretende por los autores que estos péptidos representen la secuencia más corta o epítipo que esté implicado en la protección de cepas de rata susceptibles contra la artritis inducida por adyuvante. Estas secuencias desvelan además lo que los autores identifican como el "motivo protector" común.

Ragno S. et al. ("Protection of rats from adjuvant arthritis by immunization with naked DNA encoding for mycobacterial heat shock protein 65"; Arthritis and Rheumatism, Vol. 40, Nº 2; Feb. 1.997; pág. 277-283) informan sobre la protección de ratas de artritis adyuvante. Esto se realiza por administración intramuscular de una vacuna de ADN que codifica una proteína de choque térmico micobacteriana (hsp65).

Lopez-Guerrero J. A. et al. ("Therapeutic effect of recombinant vaccinia virus expressing the 60 kd heat shock protein on adjuvant arthritis"; Arthritis and Rheumatism, Vol. 37, Nº 10; 1.994; pág. 1.462-1.467) informan sobre la protección de ratas de artritis adyuvante por administración de un virus de vaccinia recombinante que codifica la secuencia codificadora completa de HSP60 humano.

La patente internacional WO 01/23421 desvela el tratamiento de tumores por medio de vacunación de péptidos de HSP70 humana y sugiere además el uso de formatos de vacuna alternativos, tales como una vacuna de ADN.

Existe una necesidad desde hace mucho tiempo de un medio eficaz de curación o mejora de enfermedades autoinmunitarias inflamatorias mediadas por células T. Ninguna de las técnicas anteriores describe vacunas de ADN que codifican proteínas de choque térmico para tratar enfermedades autoinmunitarias inflamatorias mediadas por células T. Tal tratamiento debería controlar idealmente la respuesta inapropiada de las células T, más bien que simplemente reducir los síntomas.

### **SUMARIO DE LA INVENCION**

La vacunación de ADN representa un medio nuevo e inesperadamente eficaz de expresar antígeno in vivo para la generación de respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares. La presente invención usa esta tecnología para provocar inmunidad protectora contra enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T. Las composiciones y los métodos de la presente invención son eficaces en cualquier enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T, incluyendo pero no limitándose a: artritis reumatoide, artritis de colágeno II, esclerosis múltiple, neuritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, soriasis, diabetes de comienzo juvenil, enfermedad de Sjogren, enfermedad tiroidea, sarcoidosis, uveitis autoinmune, enfermedad del intestino inflamado (de Crohn y colitis ulcerosa) o hepatitis autoinmune.

Según un primer aspecto la presente invención proporciona una vacuna de ADN para tratar una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T. La vacuna comprende una construcción recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de choque térmico 70 (HSP70) de mamífero. Dicha secuencia de ácidos nucleicos está unida de manera operativa a una o más secuencias de control de la transcripción en un sistema de expresión adecuado, permitiendo la expresión in vivo de la proteína codificada en un huésped humano.

Según una realización la proteína de choque térmico de mamífero es HSP70 humana.

Según otra realización las secuencias de control de la transcripción son secuencias de control CMV.

5 Según una realización más la enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T se selecciona de: artritis reumatoide, artritis de colágeno II, esclerosis múltiple, neuritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, soriasis, diabetes de comienzo juvenil, enfermedad de Sjogren, enfermedad tiroidea, sarcoidosis, uveitis autoinmune, enfermedad del intestino inflamado (Crohn y colitis ulcerosa) o hepatitis autoinmune, preferiblemente la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.

10 Según otra realización más la construcción recombinante se incorpora en un vector de expresión de eucariotas, que es pcADN3.

15 Según un segundo aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar enfermedades autoinmunitarias inflamatorias mediadas por células T. La composición comprende (a) una construcción recombinante, comprendiendo la construcción recombinante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de choque térmico 70 (HSP70) de mamífero; en la que la secuencia de ácidos nucleicos está unida de manera operativa a una o más secuencias de control de la transcripción y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

20 Según una realización el portador comprende un vehículo de suministro que suministra las secuencias de ácidos nucleicos a un individuo, vehículo de suministro que es un liposoma.

25 Según otra realización la composición es para administración a un individuo previamente a la aparición de los síntomas de la enfermedad.

Según una realización más la composición es adecuada para inyección intramuscular.

30 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición para preparar un medicamento para tratar una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T en un individuo, en el que dicha enfermedad inflamatoria mediada por células T es artritis reumatoide.

35 En una realización, el individuo que se tiene que tratar se selecciona del grupo que consiste en mamíferos humanos y no humanos.

Según una realización más la composición se administra a dicho individuo previamente a la aparición de síntomas de la enfermedad.

Según una realización preferida la composición es adecuada para inyección intramuscular.

40 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método in vitro para tratar células obtenidas de un individuo con enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T. El método comprende la etapa de transfectar células obtenidas de un individuo con una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T in vitro con una construcción recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica una proteína de choque térmico 70 (HSP70) de mamífero. La secuencia de ácidos nucleicos está unida de manera operativa a una o más secuencias de control de la transcripción.

45 Según una realización dicha HSP70 de mamífero es HSP70 humana.

50 Según otra realización la enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T se selecciona de: artritis reumatoide, artritis de colágeno II, esclerosis múltiple, neuritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, soriasis, diabetes de comienzo juvenil, enfermedad de Sjogren, enfermedad tiroidea, sarcoidosis, uveitis autoinmune, enfermedad del intestino inflamado (Crohn y colitis ulcerosa) o hepatitis autoinmune.

55 Según una realización más, la enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T es artritis reumatoide. Según una realización preferida el individuo se selecciona del grupo que consiste en mamíferos humanos y no humanos.

Estas y otras realizaciones serán evidentes a partir de la descripción detallada y los ejemplos que siguen.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

60 **Figura 1:** Prevención de AA por vacunación con pl y pll. A. Tiempo evolución de AA. Se vacunaron ratas en los cuádriceps tres veces (los días -40, -26 -12 en relación con inducción de AA) con 150 µg de pcADN3, pl, pll, plll, pIV o pV. El día 0, se indujo AA inyectando 1 mg de Mt suspendido en 100 µl de IFA y se evaluaron puntuaciones de artritis cada dos o tres días empezando el día 10. las barras muestran la valoración de media ± SEM de importancia de la enfermedad. B. Se midió la hinchazón de la pierna el día 26 después de inducción de AA.

65 **Figura 2:** La vacunación de pHSP60 y pl activa respuestas de células T a Hu3. A. Respuestas proliferativas (Índice

de Estimulación, IE) a péptidos solapados correspondiendo a los primeros 260 aa de HSP60. Se mataron las ratas vacunadas y se recogió LNC el día 26 después de inducción de AA. B. Respuesta a la dosis para Hu3 de ratas vacunadas con pHSP60, pHSP65 y pcADN3-40. Se mataron las ratas vacunadas y se recogió LNC el día 26 después de inducción de AA. C. Respuesta a la dosis para Hu3 de ratas vacunadas con pl, pll y pcADN3. Se mataron las ratas vacunadas y se recogió LNC el día 26 después de inducción de AA.

**Figura 3:** Prevención de AA por vacunación con Hu3. A. Tiempo evolución de AA. Se vacunaron las ratas una vez (el día -7 en relación con inducción de AA) con 100 µg de Hu3, Hu12, Mt3 o PBS en 100 µl de IFA o se dejaron sin vacunar (AA) y se indujo AA el día 0 y se valoraron puntuaciones de artritis. B. Se midió hinchazón de la pierna el día 26 después de Inducción de AA.

**Figura 4:** Prevención de AA por transferencia de esplenocitos activados con Con A de ratas vacunadas con Hu3. Tiempo evolución de AA. Se vacunaron las ratas una vez (el día -7 en relación con inducción de AA) con 100 µg de Hu3 o Mt3 en 100 µl de IFA y se indujo AA el día 0. Se recogieron esplenocitos el día 26 después de inducción de AA, se activaron durante 48 h con Con A y se transfirieron iv a ratas no pretratadas. Tres días más tarde, se indujo AA en los receptores y se valoraron puntuaciones de artritis. B. Se midió hinchazón de la pierna el día 26 después de inducción de AA.

**Figura 5:** respuestas de células T después de vacunación de ADN. Se vacunaron ratas de Lewis con pl, pll o pcADN3 y se indujo AA. Veintiséis días más tarde, se recogieron LNC y se estudiaron las respuestas proliferativas a (A) PPD, (B) HSP65, Mt176-190, Mt3, HSP60 y Hu3.

**Figura 6:** Secreción de citocina después de vacunación de ADN. Se vacunaron ratas de Lewis con pl, pll o pcADN3 y se indujo AA. Veintiséis días más tarde, se recogieron LNC, se estimularon in vitro con PPD, (B) HSP65, Mt176-190, Mt3, HSP60 y Hu3 y se ensayaron en los sobrenadantes después de 72 h las cantidades de (A) INF $\gamma$ , (B) IL-10 o (C) TGF $\beta$ 1, segregadas.

**Figura 7:** Respuestas de células T después de vacunación de ADN. Se vacunaron ratas de Lewis con Hu3, Mt3, Hu12 o PBS y se indujo AA. Veintiséis días más tarde, se recogieron LNC y se estudiaron las respuestas proliferativas a (A) PPD, (B) HSP65, Mt176-190, Mt3, HSP60 y Hu3.

**Figura 8:** Secreción de citocina después de vacunación de ADN. Se vacunaron ratas de Lewis con Hu3, Mt3, Hu12 o PBS y se indujo AA. Veintiséis días más tarde, se recogieron LNC, se estimularon in vitro con PPD, (B) HSP65, Mt176-190, Mt3, HSP60 y Hu3 y se ensayaron en los sobrenadantes después de 72 h las cantidades de (A) INF $\gamma$ , (B) IL-10 o (C) TGF $\beta$ 1.

**Figura 9:** Modulación de AA por preinmunización con pHSP60 o pHSP65. A. Tiempo de evolución de AA. Se vacunaron ratas en los cuádriceps tres veces (los días -40, -26 -12 en relación con la inducción de AA) con 150 µg de pcADN3, pMBP, pHSP60 o pHSP65 o se dejaron sin tratar como controles (AA). El día 0 se indujo AA por inyección de 1 mg de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) suspendido en 100 µl de IFA y se valoraron puntuaciones de artritis cada dos o tres días empezando el día 8 después de inyección de Mt. B. Se midió la hinchazón de la pierna el día 26 después de inducción de AA.

**Figura 10:** Respuestas proliferativas a HSP60, HSP65 y PPD en animales vacunados con pHSP60-, pMBP y pcADN3. Se vacunaron ratas de Lewis hembras en los cuádriceps tres veces (los días -40, -26 -12 en relación con inducción de AA) con 150 µg de pHSP60, pMBP o pcADN3, empezando 5 días después de inyección i.m. de 200 µl de cardiotoxina 10 µM. Se dejó sin tratar un grupo como control. Se mataron los animales y se recogieron LNC el día 1 previamente a la inducción de AA.

**Figura 11:** Respuestas de células T en ratas con AA vacunadas con pcADN3. se mataron los animales vacunados con pcADN3 el día 26 después de inducción de AA y se recogieron sus LNC y se estimularon in vitro durante 72 h en presencia de diferentes concentraciones de antígeno. Se estudió la liberación de IFN $\gamma$  e IL-10.

**Figura 12:** Efecto de vacunación sobre la secreción de citocina. Se mataron los animales vacunados con pHSP60, pHSP65 o Hu3 el día 26 después de inducción de AA y se recogieron sus LNC. Se estimularon las células durante 72 h en presencia de diferentes antígenos y se estudió la proliferación (a) o la liberación de IFN $\gamma$ (b), IL-10 (c) y TGF $\beta$ 1 (d).

**Figura 13:** Inhibición de AA por preinmunización con pHSP70 o pHSP90. A. Tiempo de evolución de AA. B. Puntuación de artritis máxima. C. Día de comienzo. D. Diferencia en hinchazón de la pierna medida el día 26 después de inducción de AA.

**Figura 14:** Respuesta humoral en ratas vacunadas con ADN. A. Anticuerpos a HSP70 en ratas inmunizadas con pHSP70. B. Anticuerpos a HSP90 en ratas inmunizadas con pHSP90. El día de inducción de AA se consideró día 0.

**Figura 15:** Respuesta de células T al antígeno de inmunización en ratas a las que se han administrado vacunas de ADN. A. Respuesta proliferativa a HSP70 40 en ratas inmunizadas con pHSP70. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SD del índice de estimulación (IE) en cultivos por cuadruplicado. B. Respuesta proliferativa a HSP90 en ratas inmunizadas con pHSP90. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SD del IE en cultivos por cuadruplicado.

**Figura 16.** Secreción de citocinas en respuesta a estimulación con el antígeno de inmunización en ratas a las que se han administrado vacunas de ADN. Se estimularon células de nódulos linfáticos drenantes durante 72 h en presencia de HSP70 o HSP90 y se determinó el contenido de IFN $\gamma$  (A) o IL-10 (B) en los sobrenadantes por ELISA de captura.

**Figura 17:** Efecto de la vacunación de ADN sobre la proliferación de células T seguido por inducción de AA. Los resultados se expresan como el cambio de porcentaje en la proliferación en relación con las respuestas de ratas no tratadas, 26 después de la inducción de AA.

**Figura 18:** Efecto de la vacunación de ADN sobre la secreción de citocinas siguiendo a inducción de AA. Se estimularon células DLN durante 72 h en presencia de HSP70 o HSP90 y se determinó el contenido de IFN $\gamma$  (A), IL-10 (B) o TGF $\beta$ 1 (C) en los sobrenadantes por ELISA de captura.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Según la presente invención ahora se desvela que es posible tratar o prevenir enfermedades autoinmunitarias inflamatorias mediadas por células T usando vacunas de ADN que codifican una proteína de choque térmico o fragmentos activos de la misma. Las composiciones y los métodos de la presente invención son eficaces en cualquier enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T incluyendo pero no limitándose a: artritis reumatoide, artritis de colágeno II, esclerosis múltiple, neuritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, soriasis, diabetes de comienzo juvenil, enfermedad de Sjogren, enfermedad tiroidea, sarcoidosis, uveitis autoinmune, enfermedad del intestino inflamado (Crohn y colitis ulcerosa) o hepatitis autoinmune.

La presente invención se basa en parte en estudios del papel de las vacunas de ADN que codifican una proteína de choque térmico o fragmentos de la misma en artritis inducida por adyuvantes en ratas experimentales. Específicamente, la presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que ciertas proteínas de choque térmico específicas codificadoras de construcciones de ADN, tales como HSP60, HSP70 o HSP90 o fragmentos activos de las mismas son útiles en la reducción de los síntomas asociados con la artritis. El efecto protector de estas construcciones de ADN se reflejó por ejemplo por una reducción significativa en la hinchazón de los tobillos.

Ahora se desvela que es posible tratar o prevenir enfermedades mediadas por células T usando vacunas de ADN codificadoras de proteínas de choque térmico de mamíferos o fragmentos activos de las mismas. La presente invención se basa en parte en estudios del papel de la respuesta inmunitaria a HSP60 en artritis inducida por adyuvantes en ratas experimentales, usando vacunas de ADN codificadoras de HSP60 humana, HSP70 humana, HSP90 humana o fragmentos activos de las mismas. Los resultados condujeron a la identificación de nuevas construcciones codificando al menos parte de la secuencia de HSP60 que pudiera suprimir AA de manera eficaz. Además, se encontró que los fragmentos de HSP60 específicos eran eficaces en la supresión de AA. Los efectos inmunitarios asociados con ADN específico o supresión peptídica de AA eran complejos y incluían proliferación de células T aumentada para una variedad de antígenos asociados a la enfermedad. La vacunación eficaz con fragmentos de ADN HSP60 o el péptido de HSP60 condujo a regulación hacia arriba de secreción de IFN $\gamma$  para HSP60 y, concomitantemente a regulación hacia abajo de secreción de IFN $\gamma$  para apítomos de HSP65 micobacteriana. También hubo cambios de variables en los perfiles de secreción de IL-10 para esos antígenos. La producción de TGF $\beta$ 1, sin embargo, aumentó para los epítomos tanto HSP60 como HSP65. La regulación de AA podía deberse a la inducción de células T reguladoras dirigidas a HSP60, segregando citocinas tanto Th1 como Th2 que desplazó la respuesta inmunitaria hacia antígenos micobacterianos a una respuesta no patógena de Th2.

La presente descripción proporciona un método de vacunación de ADN eficaz para enfermedades autoinmunitarias inflamatorias mediadas por células T, que evita muchos de los problemas asociados con los métodos de tratamiento sugeridos previamente. Por vacunación, más bien que administración de manera pasiva de anticuerpos heterólogos, el propio sistema inmunitario del huésped se moviliza a suprimir las células T autoagresivas. Así, la supresión es persistente y puede implicar cualquiera y todos los mecanismos inmunológicos al efectuar esa supresión. Esta respuesta multi-facetada es más eficaz que la supresión unidimensional conseguida por administración pasiva de anticuerpos monoclonales o clones de células T reguladores procedentes de existentes.

También se desvelan construcciones recombinantes que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que corresponde a proteínas de choque térmico de mamíferos, estando unida de manera operativa la secuencia de ácidos nucleicos a al menos un elemento de control de la transcripción. Las construcciones recombinantes corresponden a proteínas de choque térmico humanas. Sin embargo, las construcciones recombinantes que corresponden a las proteínas de choque térmico de rata o ratón también se pueden usar en la presente invención.

La secuencia de ácidos nucleicos que corresponde a proteínas de choque térmico de mamíferos puede incluir ADN, ARN o derivados de ADN o ARN. Se puede obtener una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica proteínas de choque térmico de su fuente natural, como un gen entero (es decir, completo) o una porción del mismo. También se puede producir una molécula de ácido nucleico usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, clonación, multiplicación de reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)) o síntesis química. Las secuencias de ácidos nucleicos incluyen secuencias de ácidos nucleicos naturales y homólogos de las mismas, incluyendo, pero no limitándose a, variantes alélicas naturales y secuencias de ácidos nucleicos modificadas en que se han insertado, eliminado, sustituido y/o invertido nucleótidos, de tal manera que tales modificaciones no interfieren sustancialmente con la capacidad de la molécula de ácido nucleico para codificar una proteína de choque térmico funcional o un fragmento activo de la misma.

Una secuencia de ácidos nucleicos homóloga puede ser producida usando una serie de métodos conocidos para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Pres, 1.989). Por ejemplo, se pueden modificar secuencias de ácidos nucleicos usando una variedad de técnicas incluyendo, pero no limitándose a, técnicas clásicas de mutagénesis y ADN recombinante, tal como mutagénesis dirigida al sitio, tratamiento químico de una molécula de ácido nucleico para inducir mutaciones, escisión de enzimas de restricción de un fragmento de ácido nucleico, ligadura de fragmentos de ácido nucleico, multiplicación de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y/o mutagénesis de regiones seleccionadas de una secuencia ácidos nucleicos, síntesis de mezclas de oligonucleótidos y ligadura de grupos de mezcla para "construir" una mezcla de moléculas de ácido nucleico y combinaciones de las mismas. Se pueden seleccionar homólogos de moléculas de ácidos nucleicos de una mezcla de ácidos nucleicos modificados por cribado por la función de la proteína codificada por el ácido nucleico.

La presente descripción proporciona una secuencia de ácidos nucleicos unida de manera operativa a una o más secuencias de control de la transcripción para formar una molécula recombinante. La expresión "unida de manera operativa" se refiere a enlazar una secuencia de ácidos nucleicos a una secuencia de control de la transcripción de una manera tal que la molécula puede ser expresada cuando se transfecta (es decir, se transforma, se transluce o transfecta) en una célula del huésped. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan la iniciación, elongación y terminación de la transcripción. Secuencias de control de la transcripción importantes en especial son esas que controlan la iniciación de la transcripción, tal como secuencias de activador, potenciador, operador y represor. Secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda actuar en al menos una de las células recombinantes de la presente invención. Una variedad de tales secuencias de control de la transcripción es conocida para los expertos en la materia. Secuencias de control de la transcripción preferidas incluyen aquellas que actúan en células de animales, bacterias, helmintos, insectos y preferiblemente en células de animales. Las secuencias de control de la transcripción más preferidas incluyen, pero no se limitan a secuencias de control de RSV, secuencias de control de CMV, secuencias de LTR retrovirales, secuencias de control de SV-40 y secuencias de control de  $\beta$ -actina así como otras secuencias capaces de controlar la expresión de los genes en células eucariotas. Secuencias de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen activadores y potenciadores específicos del tejido (por ejemplo, potenciadores y activadores específicos de células T). Las secuencias de control de la transcripción de la presente invención también pueden incluir secuencias de control de la transcripción que se encuentran en la naturaleza asociadas de manera natural a un gen que codifica una proteína de choque térmico de la presente invención.

Se desvela además un vector de expresión que comprende construcciones recombinantes. Es un vector de expresión de eucariotas adecuado por ejemplo: pcADN3, pcADN3.1 (+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pCI, pBK-RSV, pBK-CMV, pTRES o sus derivados.

Una célula de huésped se puede transfectar in vivo (es decir, en un animal) o ex vivo (es decir, fuera de un animal). La transfección de una molécula de ácido nucleico en una célula huésped se puede realizar por cualquier método por el que se puede insertar una molécula de ácido nucleico en la célula. Las técnicas de transfección incluyen, pero no se limitan a, transfección, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción y fusión de protoplastos. Los métodos preferidos para transfectar células del huésped in vivo incluyen lipofección y adsorción.

Se puede apreciar por un experto en la materia que el uso de tecnologías de AND recombinante puede mejorar la expresión de las moléculas de ácidos nucleicos transfectadas por manipulación, por ejemplo, del número de copias de las moléculas de ácidos nucleicos dentro de una célula del huésped, la eficacia con que se transcriben esas moléculas de ácidos nucleicos, la eficacia con que se traducen las transcripciones resultantes y la eficacia de modificaciones post-traduccionales. Las técnicas recombinantes útiles para aumentar la expresión de moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enlazar de manera operativa moléculas de ácidos nucleicos a plásmidos con alto número de copias, integración de las moléculas de ácidos nucleicos en uno o más cromosomas de células de huésped, adición de secuencias de estabilidad de vectores a plásmidos, sustituciones o modificaciones de señales de control de la transcripción (por ejemplo, activadores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de las señales de control de traducción (por ejemplo, sitios de unión de ribosomas, secuencias Shine-Dalgarno), modificación de moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención para corresponder al uso de codón de la célula del huésped y delección de secuencias que desestabilicen las

transcripciones.

Según otro aspecto más de la presente descripción se proporciona una composición farmacéutica adecuada para efectuar los métodos anteriores de la presente invención. La composición incluye una construcción recombinante incluyendo una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica una proteína de choque térmico o un fragmento de la misma, estando unida de manera operativa la secuencia de ácidos nucleicos a una o más secuencias de control de la transcripción y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición de la invención es para tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T tal como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis de colágeno II, neuritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, soriasis, diabetes de comienzo juvenil, enfermedad de Sjogren, enfermedad tiroidea, sarcoidosis, uveítis autoinmune, enfermedad del intestino inflamado (Crohn y colitis ulcerosa) o hepatitis autoinmune.

La composición terapéutica de la invención se administra a un individuo con necesidad de dicho tratamiento. Según más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el individuo se selecciona del grupo que consiste en seres humanos, perros, gatos, ovejas, ganado, caballos y cerdos.

En otra realización de la presente invención, una composición terapéutica comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente memoria, un "portador" se refiere a cualquier sustancia adecuada como vehículo para suministrar una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención a un sitio in vivo adecuado. Como tal, los portadores pueden actuar como un excipiente farmacéuticamente aceptable de una composición terapéutica que contiene una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Los portadores preferidos son capaces de mantener una molécula de ácido nucleico de la presente invención en una forma que, a la llegada de la molécula de ácido nucleico a una célula, la molécula de ácido nucleico es capaz de entrar en la célula y ser expresada por la célula. Los portadores de la presente invención incluyen: (1) excipientes o formularios que transportan pero no fijan como objetivo de manera específica una molécula de ácido nucleico a una célula (referido en la presente memoria como portadores no diana) y (2) excipientes o formularios que suministran una molécula de ácido nucleico a un sitio específico en un animal o una célula específica (es decir, portadores diana). Los ejemplos de portadores no diana incluyen, pero no se limitan a agua, disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, disoluciones que contienen suero, disolución de Hank, otras disoluciones equilibradas fisiológicamente acuosas, aceites, ésteres y glicoles. Los portadores acuosos pueden contener sustancias auxiliares adecuadas requeridas para aproximar las condiciones fisiológicas del receptor, por ejemplo, aumentando la estabilidad química y la isotonicidad.

Las sustancias auxiliares adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, lactato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y otras sustancias usadas para producir tampón de fosfato, tampón Tris y tampón de bicarbonato. Las sustancias auxiliares también pueden incluir conservantes, tales como timerosal, m- y o-cresol, formalina y alcohol benzol. Las sustancias auxiliares preferidas para suministro en aerosol incluyen sustancias tensioactivas no tóxicas para un animal, por ejemplo, ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de aproximadamente seis a aproximadamente veintidós átomos de carbono. Ejemplos de ésteres incluyen, ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linoléico, olestérico y oleicos. Otros portadores pueden incluir partículas de metal (por ejemplo, partículas de oro) para uso con, por ejemplo, una pistola de biobalística a través de la piel. Las composiciones terapéuticas de la presente invención se pueden esterilizar por métodos convencionales.

Los portadores diana se refieren en la presente memoria como "vehículos de suministro". Los vehículos de suministro de la presente invención pueden suministrar una composición terapéutica de la presente invención a un sitio diana en un animal. Un "sitio diana" se refiere a un sitio en un animal al que se desea suministrar una composición terapéutica. Por ejemplo, un sitio diana puede ser una célula cancerosa, un tumor o una lesión causada por un agente infeccioso o un área alrededor de dicha célula, tumor o lesión, que se fija como objetivo mediante inyección directa o suministro usando liposomas u otros vehículos de suministro. Ejemplos de los vehículos de suministro incluyen, pero no se limitan a, vehículos de suministro que contienen lípidos artificiales y naturales. Los vehículos de suministro que contienen lípidos naturales incluyen células y membranas celulares. Los vehículos de suministro que contienen lípidos artificiales incluyen liposomas y micelas. Un vehículo de suministro de la presente invención se puede modificar para fijar como objetivo un sitio particular en un animal, fijando como objetivo de ese modo y haciendo uso de una molécula de ácido nucleico de la presente invención en ese sitio. Modificaciones adecuadas incluyen manipular la fórmula química de la porción lipídica del vehículo de suministro y/o introducir en el vehículo un compuesto capaz de fijar como objetivo de manera específica un vehículo de suministro a un sitio preferido, por ejemplo, un tipo de célula preferido. Fijar como objetivo de manera específica se refiere a producir que un vehículo de suministro se una a una célula particular por la interacción del compuesto en el vehículo para una molécula en la superficie de la célula. Compuestos diana adecuados incluyen ligandos capaces de unir de manera selectiva (es decir, de manera específica) otra molécula en un sitio particular. Ejemplos de tales ligandos incluyen anticuerpos, antígenos, receptores y ligandos de los receptores. Por ejemplo, se puede introducir un anticuerpo específico para un antígeno encontrado en la superficie de una célula cancerosa en la superficie externa de un vehículo de suministro de liposomas de manera que se fije como objetivo el vehículo de suministro para la célula

cancerosa. Ligandos de células tumorales incluyen ligandos capaces de unión a una molécula en la superficie de una célula tumoral. La manipulación de la fórmula química de la porción lipídica del vehículo de suministro puede modular la fijación como objetivo extracelular o intracelular del vehículo de suministro. Por ejemplo, se puede añadir una sustancia química a la fórmula lipídica de un liposoma que modifique la carga de la bicapa lipídica del liposoma a fin de que el liposoma se fusione con células particulares con características de carga particulares.

Según una realización, se pueden usar emulsiones grasas como un vehículo para vacunas de ADN. Dos ejemplos de tales emulsiones son las emulsiones grasas comerciales disponibles conocidas como Intralipid y Lipofundin. "Intralipid" es una marca registrada de Kabi Pharmacia, Suecia, para una emulsión grasa para nutrición intravenosa, descrita en la patente de EE.UU. N° 3.169.094. "Lipofundin" es una marca registrada de B. Braun Melsungen, Alemania. Ambas contienen aceite de soja como grasa (100 ó 200 g en 1.000 ml de agua destilada: 10% o 20%, respectivamente). Se usan fosfolípidos de yema de huevo como emulsionantes en Intralipid (12 g/l de agua destilada) y lecitina de yema de huevo en Lipofundin (12 g/l de agua destilada). La isotonicidad resulta de la adición de glicerol (25 g/l) tanto en Intralipid como en Lipofundin.

Según otra realización, el vehículo de suministro de la presente invención puede ser un liposoma. Un liposoma puede mantenerse estable en un animal durante una cantidad de tiempo suficiente para suministrar una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención a un sitio preferido en el animal. Un liposoma de la presente invención es preferiblemente estable en el animal al que se ha administrado durante al menos aproximadamente 30 minutos, más preferiblemente durante al menos aproximadamente 1 hora e incluso más preferiblemente durante al menos aproximadamente 24 horas.

Un liposoma de la presente invención comprende una composición lipídica esto es capaz de fundirse con la membrana del plasma de la célula diana para suministrar una molécula de ácido nucleico a una célula. Preferiblemente, la eficacia de transfección de un liposoma de la presente invención es aproximadamente 0,5 microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de ADN por 16 nanomoles (nmol) de liposoma suministrados a aproximadamente  $10^6$  células, más preferiblemente aproximadamente 1,0  $\mu\text{g}$  de ADN por 16 nmol de liposoma suministrados a aproximadamente  $10^6$  células e incluso más preferiblemente aproximadamente 2,0  $\mu\text{g}$  de ADN por 16 nmol de liposoma suministrados a aproximadamente  $10^6$  células.

Un liposoma preferido de la presente invención está entre aproximadamente 100 y 500 nanómetros (nm), más preferiblemente entre aproximadamente 150 y 450 nm e incluso más preferiblemente entre aproximadamente 200 y 400 nm de diámetro.

Liposomas adecuados para uso con la presente invención incluyen cualquier liposoma. Liposomas preferidos de la presente invención incluyen los liposomas usados de manera estándar, por ejemplo, en métodos de suministro de genes conocidos para los expertos en la materia. Liposomas más preferidos comprenden liposomas que tienen una composición lipídica polieciónica y/o liposomas que tienen una cadena principal de colesterol conjugada a polietilenglicol.

Complejar un liposoma con una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención se puede conseguir usando métodos estándar en la técnica. Una concentración adecuada de una molécula de ácido nucleico de la presente invención para añadir a un liposoma incluye una concentración eficaz para suministrar una cantidad suficiente de molécula de ácido nucleico a una célula tal que la célula pueda producir proteína de choque térmico para regular la inmunidad de la célula efectora de una manera deseada. Preferiblemente, se combina de aproximadamente 0,1  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  de secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención con aproximadamente 8 nmoles de liposomas, más preferiblemente de aproximadamente 0,5  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  de molécula de ácido nucleico se combina con aproximadamente 8 nmoles de liposomas e incluso más preferiblemente aproximadamente 1,0  $\mu\text{g}$  de molécula de ácido nucleico se combina con aproximadamente 8 nmoles de liposomas.

Según otra realización de la descripción, el vehículo de suministro comprende una vacuna de células recombinantes. Las vacunas de células recombinantes preferidas de la presente invención incluyen vacunas de células, en que las células alogénicas (es decir, células procedentes de una fuente distinta de un paciente, pero que son histiotipo compatible con el paciente) o autólogas (es decir, células aisladas de un paciente) se transfectan con moléculas recombinantes contenidas en una composición terapéutica, irradiada y administrada a un paciente, por ejemplo, por inyección intradérmica, intravenosa o subcutánea. Las composiciones terapéuticas que se tienen que administrar mediante vacuna de células, incluyen moléculas recombinantes de la presente invención sin portador.

Para tratar un animal con enfermedad, se administra una composición terapéutica de la presente invención al animal de una manera eficaz para que la composición pueda tratar la enfermedad de ese animal. Por ejemplo, una molécula recombinante, cuando se administra a un animal de una manera eficaz, puede estimular la inmunidad de la célula efectora de una manera que sea suficiente para aliviar la enfermedad que aflige al animal. Según la presente invención, tratamiento de una enfermedad se refiere a aliviar una enfermedad y/o prevenir el desarrollo de una enfermedad secundaria que resulta de la presencia de una enfermedad principal. Un protocolo de administración

eficaz (es decir, administración de una composición terapéutica de una manera eficaz) comprende parámetros de dosis adecuados y modos de administración que resultan del tratamiento de una enfermedad. Los parámetros de dosis adecuados y modos de administración se pueden determinar usando métodos estándar en la técnica para una enfermedad particular. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la determinación de razones de supervivencia, efectos secundarios (es decir, toxicidad) y progresión o regresión de la enfermedad. En particular, la eficacia de los parámetros de dosis y modos de administración de una composición terapéutica de la presente invención cuando se trata cáncer se pueden determinar evaluando proporciones de respuesta. Tales proporciones de respuesta se refieren al porcentaje de pacientes tratados en una población de pacientes que responden a la remisión parcial o completa.

Según la presente invención, un tamaño de dosis única adecuado es una dosis que es capaz de tratar a un animal con enfermedad cuando se administra una o más veces durante un periodo de tiempo adecuado. Las dosis pueden variar dependiendo de la enfermedad que se esté tratando. Las dosis de una composición terapéutica de la presente invención adecuadas para uso con técnicas de inyección directa se pueden usar por un experto en la materia para determinar tamaños de dosis únicas apropiados para administración sistémica basada en el tamaño de un animal. Una dosis única adecuada de una composición terapéutica es una cantidad suficiente de secuencia recombinante codificadora de proteína de choque térmico para reducir, y preferiblemente eliminar, la enfermedad autoinmunitaria mediada por células T siguiendo a transfección de las moléculas recombinantes en células. Una dosis única preferida de molécula recombinante codificadora de proteína de choque térmico es una cantidad que, cuando se transfecta en una población de células diana conduce a la producción de aproximadamente 250 femtogramos (fg) a aproximadamente 1 µg, preferiblemente de aproximadamente 500 fg a aproximadamente 500 picogramos (pg) y más preferiblemente de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 100 pg de una proteína de choque térmico o fragmento de la misma por célula transfectada.

Una dosis única preferida de molécula recombinante codificadora de proteína de choque térmico complejada con liposomas, es de aproximadamente 100 µg de ADN total por 800 nmoles de liposoma a aproximadamente 2 mg de moléculas recombinantes totales por 16 micromoles (µmol) de liposoma, más preferiblemente de aproximadamente 150 µg por 1,2 µmoles de liposoma a aproximadamente 1 mg de moléculas recombinantes totales por 8 µmoles de liposoma e incluso más preferiblemente de aproximadamente 200 µg por 2 µmoles de liposoma a aproximadamente 400 µg de moléculas recombinantes totales por 3,2 µmoles de liposoma.

Una dosis única preferida de molécula recombinante codificadora de proteína de choque térmico en un portador no diana para administrar a un animal, es de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 4 mg de moléculas recombinantes totales, más preferiblemente de aproximadamente 150 µg a aproximadamente 3 mg de moléculas recombinantes totales e incluso más preferiblemente de aproximadamente 200 µg a aproximadamente 2 mg de moléculas recombinantes totales.

Será obvio para un experto en la materia que el número de dosis administradas a un animal depende de la extensión de la enfermedad y la respuesta de un paciente individual al tratamiento. Así, está dentro del alcance de la presente invención que un número adecuado de dosis incluya cualquier número requerido para causar la regresión de una enfermedad. Un protocolo preferido es administraciones mensuales de dosis únicas (como se describió anteriormente) durante hasta aproximadamente 1 año. Un número de dosis preferido de una composición terapéutica que comprende molécula recombinante codificadora de proteína de choque térmico en un portador no diana o complejada con liposomas es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 administraciones por paciente, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 administraciones por paciente e incluso más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 administraciones por persona. Preferiblemente, tales administraciones se dan una vez cada 2 semanas hasta que aparecen signos de remisión, entonces una vez al mes hasta que desaparece la enfermedad.

Una composición terapéutica se administra a un animal de una manera que permita la expresión de la molécula recombinante administrada de la presente invención en una proteína curativa en el animal que se tiene que tratar por enfermedad. Se puede administrar una composición terapéutica a un animal en una variedad de métodos incluyendo, pero no limitándose a, administración local de la composición en un sitio en un animal y administración sistémica.

Las composiciones terapéuticas que se tienen que suministrar por administración local incluyen: (a) moléculas recombinantes de la presente invención en un portador no diana (por ejemplo, como moléculas de ADN "desnudas", tal como se explica, por ejemplo en Wolff et al., 1.990, Science 247, 1.465-1.468) y (b) moléculas recombinantes de la presente invención complejadas a un vehículo de suministro de la presente invención. Los vehículos de suministro adecuados para administración local comprenden liposomas o emulsiones. Los vehículos de suministro para administración local pueden comprender además ligandos para fijar como objetivo el vehículo en un sitio particular.

Composiciones terapéuticas útiles en administración sistémica, incluyen moléculas recombinantes de la presente invención complejadas a un vehículo de suministro diana de la presente invención. Los vehículos de suministro adecuados para uso con administración sistémica comprenden liposomas que comprenden ligandos para fijar como

objetivo el vehículo a un sitio particular. La administración sistémica es ventajosa en particular cuando órganos, en particular órganos difíciles de alcanzar (por ejemplo, corazón, bazo, pulmón o hígado) son los sitios diana de tratamiento.

5 Los métodos preferidos de administración sistémica, incluyen inyección intravenosa, aerosol, suministro oral y percutáneo (tópico). Se pueden realizar inyecciones intravenosas usando métodos estándar en la técnica. También se puede realizar suministro en aerosol usando métodos estándar en la técnica (véase, por ejemplo, Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189: 11.277-11.281, 1.992). Se puede realizar suministro oral por complejación de una composición terapéutica de la presente invención a un portador capaz de resistir la degradación por enzimas  
10 digestivas en el intestino de un animal. Ejemplos de tales portadores, incluyen cápsulas de plástico o comprimidos, tales como los conocidos en la técnica. Se puede realizar suministro tópico por mezcla de una composición terapéutica de la presente invención con un reactivo lipófilo (por ejemplo, DMSO) que sea capaz de pasar a la piel.

15 Las realizaciones adecuadas, los tamaños de dosis única, el número de dosis y modos de administración de una composición terapéutica de la presente invención útiles en un método de tratamiento de la presente invención se desvelan con detalle en la presente memoria.

20 Una composición terapéutica de la presente invención también es ventajosa para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias por que la composición suprime la estimulación perjudicial de células T por autoantígenos (es decir, un "auto", más bien que un antígeno extraño). Las moléculas recombinantes codificadoras de proteína de choque térmico, en la transfección en una célula, producen una proteína de choque térmico o un fragmento de la misma que reduce la actividad perjudicial de las células T implicadas en una enfermedad autoinmunitaria. Una composición terapéutica preferida para uso en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria comprende molécula recombinante codificadora de proteína de choque térmico de la presente invención. Una composición terapéutica más preferida  
25 para uso en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria comprende molécula recombinante codificadora de proteína de choque térmico combinada con un portador no diana de la presente invención, preferiblemente disolución salina o disolución salina tamponada con fosfato.

30 Una dosis única de molécula de ácido nucleico codificadora de proteína de choque térmico en un portador no diana para administrar a un animal para tratar una enfermedad autoinmunitaria es de aproximadamente 0,1  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{g}$  de moléculas recombinantes totales por kilogramo (kg) de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 0,5  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{g}$  de moléculas recombinantes totales por kg de peso corporal e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  de moléculas recombinantes totales por kg de peso corporal.

35 El número de dosis de molécula recombinante codificadora de proteína de choque térmico en un portador que se tiene que administrar a un animal para tratar una enfermedad autoinmunitaria es una inyección aproximadamente una vez cada 6 meses, más preferiblemente aproximadamente una vez cada 3 meses e incluso más preferiblemente aproximadamente una vez al mes.

40 Un método preferido para administrar una composición terapéutica de la presente invención para tratar una enfermedad autoinmunitaria es por inyección directa. Las técnicas de inyección directa son importantes en particular en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. Preferiblemente, se inyecta una composición terapéutica directamente en células musculares en un paciente, que da como resultado la expresión prolongada (por ejemplo, semanas a meses) de una molécula recombinante de la presente invención. Preferiblemente, una molécula recombinante de la presente invención en forma de "ADN desnudo" se administra por inyección directa en células musculares en un paciente.

45 Se tiene que observar que las composiciones y los métodos de la presente invención no incluyen la presencia obligatoria del motivo CpG desvelado en la patente internacional WO 02/16549, en vacunas de ADN adecuadas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias en marcha.

50 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente ciertas realizaciones de la invención. No deberían interpretarse, sin embargo, de ningún modo que limiten el amplio alcance de la invención.

## 55 Ejemplos

### Materiales y Métodos

#### 60 *Animales*

Se criaron ratas de Lewis hembras y se mantuvieron en condiciones sin patógenos en el Centro de Cría de Animales del Instituto de Ciencias Weizmann. Se usaron ratas de uno a dos meses para experimentos de vacunación de ADN y vacunación de péptidos. Los experimentos se realizaron bajo la supervisión y las directrices de la Comisión para el  
65 Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

*Antígenos y adyuvantes*

Se sintetizaron péptidos como se describió previamente (15). Los péptidos HSP60 usados en estos estudios se enumeran en la Tabla I. también se usaron dos péptidos de HSP65: Mt176-190, EESNTFGLQLELTEG (16) y Mt3, AYDEEARGLERGLNALADA. Se proporcionó generosamente HSP65 recombinante purificado por Prof. Ruurd van der Zee (Instituto de Enfermedades Infecciosas e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, Utrecht, Países Bajos). Se preparó HSP60 recombinante en nuestro laboratorio como se describe (11). Se adquirieron Cepa H37Ra de *M. tuberculosis* y adyuvante de Freund incompleto (IFA) de Difco (Detroit, MI, USA). Se proporcionó derivado de proteína purificado de tuberculina (PPD) por el Statens Seruminstitut (Copenhague, Dinamarca). Se adquirieron ovalbúmina (OVA) y Concanavalina A (Con A) de Sigma (Rehovot, Israel).

*Plásmidos de ADN*

Se ha descrito el vector que contiene el gen *hsp60* humano (pHSP60) (17). La construcción que codifica *Mycobacterium leprae* HSP65 (pHSP65) fue proporcionado amablemente por el Dr. Douglas Lowrie (Medical Research Council, Londres, UK). Se multiplicaron cinco fragmentos del gen *hsp60* humano por PCR de *hsp60* ADNc en pGEM (Promega, Madison, Wisconsin, USA) usando sitios de restricción que contienen oligonucleótidos específicos para las enzimas BamHI (oligonucleótido 5') o HindI II (oligonucleótido 3') y se clonaron en el vector pcADN3 (Invitrogen, NV, Leek, Países Bajos) usando técnicas de biología molecular estándar (Tabla II). El oligonucleótido 5' también incluía una secuencia ATG necesaria para traducción de proteínas. Se secuenciaron los plásmidos para confirmar la correcta inserción del ADNc y se transcribieron *in vitro* para comprobar que eran funcionales (datos no mostrados).

Se preparó ADN de plásmido a gran escala y se inyectó después de pretratamiento con cardiotoxina (Sigma, Rehovot, Israel). En pocas palabras, se vacunaron ratas en los cuádriceps tres veces (los días -40, -26 -12 en relación con la inducción de AA) con 150 µg de pcADN3, pl, pll, plll, pIV o pV. Se comprobaron los niveles de endotoxina por *Limulus Amoebocyte Lysate* y se encontró siempre que estaban bajo niveles aceptables para uso *in vivo* (menor que 0,02 EU / µg de ADN). Se indujo AA 12 días después de la última inyección de ADN. Se usó el vector pcADN3 vacío como un control de la vacunación de ADN.

*Inducción de AA y Valoración*

Se indujo AA usando 1 mg por rata de cepa H37Ra Mt matada por calor (Difco). El día de inducción de AA se designó como día 0 y la importancia de la enfermedad se valoró por observación directa de las 4 extremidades en cada animal. Se cedió una puntuación relativa entre 0 y 4 a cada extremidad, basada en el grado de inflamación de la articulación, enrojecimiento y deformidad; así la puntuación máxima posible para un animal individual fue 16. También se cuantificó la artritis por medición del diámetro de la extremidad posterior con un soporte. Se realizaron mediciones el día de la inducción de AA y 26 días más tarde y se presentaron como la media ± SEM de la diferencia entre los dos valores. La persona que puntuó la enfermedad no podía ver la identidad de los grupos.

*Proliferación de células T*

Se cultivaron células de nódulos linfáticos popliteal e inguinal (LNC) tomadas 26 días después de la inducción de AA por cuadruplicado en pozos de microtitulo de fondo redondo de 200 µl (Costar Corp., Cambridge, USA) a  $2 \times 10^5$  células por pozo con o sin antígeno. Se usó la Concanavalina A (Con A) como mitógeno de células T como un control positivo para proliferación de células T. Se incubaron cultivos durante 96 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%. Se detectaron respuestas de células T por la incorporación de [metil-<sup>3</sup>H]-timidina (Amersham, Buckinghamshire, UK; 1 µCi/pozo), que se añadió a los pozos durante las últimas 18 horas. El índice de estimulación (IE) se computó como la relación de la media c.p.m. de pozos que contienen antígeno o mitógeno a pozos de control cultivados con medio sólo.

*Transferencia de células*

Se prepararon células de bazo de ratas vacunadas con péptidos 26 días después de la inducción de AA. Los esplenocitos ( $10^7$  células por ml) se activaron con 2,5 µg/ml de Con A durante 48 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se lavaron con PBS estéril y se inyectaron iv a ratas no pretratadas ( $5 \times 10^7$  células por rata). Tres días después de la transferencia de los esplenocitos, se indujo AA.

*Ensayos de citocina*

Se recogieron los sobrenadantes después de 72 h de estimulación con cada uno de los antígenos ensayados. Se cuantificaron IL-10 e IFN<sub>γ</sub> de rata en sobrenadantes de cultivo por ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) usando estuche OPTeia de Pharmingen (Pharmingen, San Diego, USA). Se cuantificó TGFβ1 de rata usando el Sistema de InmunoEnsayo Emax® de TGFβ1 (Promega, Madison, USA) según las instrucciones del fabricante. Los niveles de citosina en los sobrenadantes se expresan como pg/ml basados en curvas de calibración construidas

usando citocinas recombinantes como estándar. Los límites de detección inferiores para los experimentos descritos en esta memoria descriptiva fueron 15 pg/ml para TGFβ1, IL-10 e IFNγ.

*Significación estadística*

- 5 Se usó el programa InStat 2.01 para análisis estadístico. Se realizaron ensayo de la t de Student y el ensayo de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

**Ejemplo 1: Fragmentos de ADN de HSP60 Inhiben AA**

- 10 Para determinar si los fragmentos de ADN de HSP60 podían inhibir AA, el ADNc que corresponde al gen *hsp60* humano se dividió en cinco fragmentos, cada uno con una superposición de 30 pb y cada uno se clonó en el vector pcADN3 (Tabla II). De esta manera, se generaron cinco construcciones correspondiendo a fragmentos procedentes de HSP60 solapándose por 10 aa: pI, aa 1-140; pII, aa 130-260; pIII, aa 250-410, pIV, aa 400-470 y pV, aa 460-540 (Tabla II). Se vacunaron ratas de Lewis con una de las construcciones de los fragmentos de HSP60 o con pcADN3 como un control y se indujo AA. La figura 1A muestra que las ratas vacunadas con pI o pII manifestaron artritis significativamente reducida comparado con ratas vacunadas con las construcciones pIII, pIV o pV o con pcADN3 de control. El efecto protector de la vacunación con las construcciones pI y pII también se reflejaba por una reducción significativa en la hinchazón de los tobillos (figura 1B) y por una reducción de la puntuación máxima media, que fue inferior en las ratas vacunadas con pI y pII ( $p=0,0007$  y  $p=0,0003$ , respectivamente, comparado con ratas vacunadas con pcADN3).

**Ejemplo 2: Proliferación in vitro de LNC aislado de ratas vacunadas con pHSP60 o PI en respuesta a diversos péptidos de HSP60.**

- 25 Para determinar si la supresión de AA por vacunación de ADN con pHSP60, se asoció pI o pII con la reactividad de las células T para un epítipo de HSP60 específico, se estudió la proliferación (Índice de Estimulación, IE) de LNC aislado de ratas vacunadas con pHSP60 en respuesta a un panel de péptidos superpuestos que expansionan la región de HSP60 humano codificado por pI y pII (aa 1-275; Tabla I). Se prepararon controles con LNC de ratas vacunadas con pcADN3 o pHSP65 y se estimularon con Mt suspendido en IFA para inducir AA. La figura 2A muestra que sólo el péptido Hu3 (aa 31 - 50 de HSP60 humana) indujo una respuesta significativa en LNC tomada de ratas vacunadas con pHSP60; las células preparadas a partir de ratas vacunadas con pHSP65 o pcADN no respondieron a Hu3. Obsérvese que la secuencia de la proteína HSP60 en la región 31 - 50 es idéntica en HSP60 de rata y humana; así Hu3 es un auto-péptido (Tabla III). La figura 2B muestra una respuesta proliferativa dependiente de la dosis para Hu3 usando LNC aislada de ratas vacunadas con pHSP60. No se detectaron respuestas significativas para el péptido de control Hu12 (aa 166-185 de HSP60 humana). Para confirmar estos resultados, se estudiaron respuestas proliferativas de células T en LNC tomadas 26 días después de la inducción de AA de ratas vacunadas con pI, pII o pcADN3. La figura 2C muestra que Hu3, pero no su Mt3 homólogo micobacteriano, provocó una proliferación significativa de LNC tomada de ratas inmunizadas con pI, pero no por LNC de ratas vacunadas con pII o pcADN3. No se reconoció de manera específica ninguno de los péptidos de HSP60 por LNC tomadas de ratas inmunizadas con pII. En resumen, estos resultados muestran que las ratas vacunadas con pHSP60 y pI manifestaron respuestas de las células T reguladas hacia arriba para el péptido Hu3 de HSP60.

**Ejemplo 3: El péptido Hu3 inhibe AA**

- 45 Para establecer un enlace entre la respuesta inmunitaria a Hu3 y la prevención de AA, se vacunaron ratas con Hu3 o con su Mt3 de contrapartida micobacteriana (Tabla III) o con Hu12 (Tabla I) como controles. Cada rata recibió una única dosis i. p. de 100 µg de péptido en IFA siete días (día -7) antes de la inducción de AA (día 0). La figura 3A muestra que las ratas vacunadas con Hu3 desarrollaron una enfermedad disminuida de manera significativa comparado con ratas no inmunizadas o ratas vacunadas con PBS, Hu12 o Mt3. Esta reducción en AA también se reflejó por una reducción significativa en la hinchazón de los tobillos ( $14,2\pm 4,7$  en ratas vacunadas con Hu3 frente a  $32,2\pm 3,5$  en ratas vacunadas con PBS/IFA,  $p=0,02$ ; Figura 3B). Por lo tanto, la vacunación con Hu3 previene la AA.

**Ejemplo 4: Transferencia adoptiva de regulación inducida por péptidos**

- 55 Para determinar si la protección provocada por vacunación con Hu3 se podía transferir de manera adoptiva por células T, se estimularon *in vitro* esplenocitos preparados a partir de ratas vacunadas con Hu3, durante 2 días con la Con A de mitógeno de células T, se lavaron y se inyectaron iv ( $5 \times 10^7$  células por rata) en ratas no pretratadas. Sólo los receptores de células tomadas de ratas vacunadas con Hu3 se protegieron contra la inducción posterior de AA (Figuras 4A y 4B). No se observó protección en ratas que habían recibido células activadas con Con A de ratas a las que se había inyectado Mt3. Así, la inhibición de AA por vacunación con Hu3 se podía transferir de manera adoptiva por células T activadas.

**Ejemplo 5: Proliferación in vitro de LNC aisladas de ratas vacunadas con PI o PII en respuesta a diversos antígenos micobacterianos, HSP60 o su péptido de Hu3.**

- 65 Para estudiar el mecanismo asociado a la inhibición de AA por vacunación de ADN con pI o pII, se analizaron las

respuestas de las células T de ratas inmunizadas 26 días después de la inducción de AA. Las LNC se estimularon *in vitro* con un colectivo de antígenos micobacterianos que se sabe que están asociados con AA: HSP65, PPD, Mt176-90 (que contiene el epítipo 180-188 de HSP65). Se estudió también la respuesta inmunitaria dirigida a HSP60 de mamíferos, su péptido regulador Hu3 y el péptido Hu12 procedente de HSP60 como un control. Se incluyó OVA como un antígeno de control. Ninguno de los grupos experimentales mostró respuestas significativas a OVA o Hu12 y no difirieron en su respuesta a Con A (datos no mostrados). Sin embargo, la inhibición de AA por vacunación de ADN con las construcciones pl o pll se asoció con la regulación hacia arriba de las respuestas proliferativas de las células T dirigidas contra el panel de antígenos micobacterianos (PPD, HSP65 y Mt176-190) (Figura 5A). La figura 5B representa las respuestas proliferativas a HSP60 y su péptido Hu3. Se puede observar que tanto pl como pll indujeron respuestas de las células T significativas a HSP60, sin embargo, sólo LNC de ratas vacunadas con pl manifestaron reactividad para Hu3.

#### **Ejemplo 6: Secreción de citocinas por LNC tomadas de ratas vacunadas con pl, pll o pcADN3**

Se determinó la secreción de citocinas por LNC tomadas de ratas vacunadas con pl, pll o pcADN3. La inhibición de AA por vacunación de ADN con pl se asoció con una disminución en la secreción de IFN $\gamma$  (Figura 6A) y un aumento en la secreción de IL-10 y TGF $\beta$ 1 con estimulación con PPD, HSP65 o Mt176-190 (Figuras 6B y 6C).

Las LNC de ratas vacunadas con pll también mostraron una disminución en la secreción de IFN $\gamma$  con estimulación con PPD, HSP65 y Mt176-190 (Figura 6A), sin embargo sólo se detectó secreción de IL-10 después de activación con HSP65 mientras que sólo se detectó secreción de TGF $\beta$ 1 después de activación con Mt176-190 o PPD (Figuras 6B y 6C). Obsérvese que las células de las ratas inmunizadas con pl o pll segregaron cantidades detectables de TGF $\beta$ 1 en la activación con Mt3. Así, la protección de AA por vacunación de ADN con pl o pll se asoció con una secreción de IFN $\gamma$  disminuida y un aumento concomitante en la secreción de IL-10 y/o TGF $\beta$ 1 con estimulación con los antígenos micobacterianos PPD, HSP65 o Mt176-190 (Figuras 6A, 6B y 6C).

Además de las respuestas a antígenos micobacterianos, se estudiaron los efectos de la vacunación de ADN con fragmentos de HSP60 en respuesta a HSP60 y Hu3. No se segregó IFN $\gamma$  en respuesta a HSP60 o Hu3 por las LNC de las ratas inmunizadas con pl o pll (Figura 6A). Las LNC tomadas de ratas inmunizadas con pl segregaron tanto IL-10 como TGF $\beta$ 1 en respuesta a HSP60 o Hu3 (Figuras 6B y 6C). Las células LNC tomadas de ratas vacunadas con pll, por contraste, segregaron TGF $\beta$ 1 con la activación con HSP60, pero no se detectó IL-10. Por lo tanto, la vacunación con pl o pll indujo la secreción de TGF $\beta$ 1 en respuesta a HSP60. Sin embargo, sólo pl provocó la secreción de IL-10.

#### **Ejemplo 7: Proliferación *in vitro* de LNC aisladas de ratas vacunadas con Hu3 en respuesta a diversos antígenos micobacterianos o HSP60.**

Se examinaron las respuestas de las células T después de inducción de AA en ratas que se habían vacunado con péptidos Hu3, Hu12 o Mt3. Los tres péptidos eran inmunógenos; se pudieron detectar respuestas de las células T significativas y específicas en las ratas inmunizadas para cada inmunógeno (Figura 7A). Sin embargo, sólo las LNC tomadas de ratas vacunadas con Hu3 mostraron respuestas proliferativas de las células T reguladas hacia arriba a los antígenos micobacterianos PPD, HSP65 y Mt176-190 (Figura 7B). Además, la vacunación con Hu3 condujo a la inducción de una respuesta específica a HSP60 (Figura 7B). Ninguno de los grupos experimentales mostró respuestas significativas a OVA y no difirieron en su respuesta a Con A (datos no mostrados).

#### **Ejemplo 8: secreción de citocinas por LNC tomadas de ratas vacunadas con Hu3**

La vacunación con Hu3 condujo a una reducción en la secreción de IFN $\gamma$  (Figura 8A) y a un aumento concomitante en la secreción de IL-10 (Figura 8B) y TGF $\beta$ 1 (Figura 8C) con la estimulación con PPD, HSP65 o Mt176-190. La vacunación con Hu3 también condujo a la inducción de células T que segregaban IFN $\gamma$ , IL-10 y TGF $\beta$ 1 en respuesta a Hu3. La respuesta a HSP60 completa fue predominantemente TGF $\beta$ 1.

#### **Ejemplo 9: pHSP60 humana es más eficaz que pHSP65 micobacteriana en la inhibición de AA**

Se examinaron los efectos sobre AA de la vacunación con ADN que codifica pHSP60 humana comparado con HSP65 micobacteriana. La construcción que codifica la HSP60 humana de longitud completa (pHSP60) tiene más del 97% por ciento de identidad al nivel de aminoácidos con su contrapartida de rata. Se usó también una construcción que codifica la HSP65 de longitud completa de *Mycobacterium*. Se usaron dos construcciones de control: un vector vacío (pcADN3) y una construcción que codifica Proteína Básica de Mielina de murina (pMBP). La figura 9a muestra que la vacunación con pcADN3 o pMBP no producía ningún efecto sobre la AA. Por contraste, las ratas inmunizadas con pHSP60 o pHSP65 manifestaron una artritis significativamente más suave. La inhibición de AA también se reflejó como una hinchazón disminuida del tobillo, como se muestra en la Figura 9b. Se puede observar que la pHSP60 era más eficaz que la pHSP65 en la modulación del proceso autoinmunitario. La diferencia entre pHSP60 y pHSP65 fue estadísticamente significativa con respecto al índice máximo de AA ( $2,25 \pm 0,65$  frente a  $7,67 \pm 1,83$ ,  $p=0,02$ ) y la hinchazón de la pierna ( $10,64 \pm 3,43$  frente a  $27,5 \pm 6,35$ ,  $p=0,03$ ).

**Ejemplo 10: proliferación *in vitro* de LNC aisladas de ratas después de vacunación de ADN con pHSP60**

Se estudió la respuesta inmunitaria inducida por vacunación con pHSP60 sola antes de inducción de la enfermedad. Se prepararon células de bazo 10 días después de la administración de la tercera dosis de la vacuna de ADN y se estudió la respuesta proliferativa con la estimulación *in vitro* con diferentes antígenos. La figura 10 muestra que la vacunación con pHSP60 indujo una respuesta proliferativa significativa a HSP60, pero no a HSP65, MBP o PPD, mientras que las células de ratas tratadas con pMBP sólo proliferaron en respuesta a MBP. Estas células T específicas de HSP60 segregaron bajas cantidades de tanto IL-10 ( $22 \pm 5$  pg/ml) como  $\text{IFN}\gamma$  ( $80 \pm 15$  pg/ml) con la estimulación *in vitro* con HSP60 (datos no mostrados). No se detectó liberación de citocinas cuando esplenocitos de animales tratados con pcADN3 se estimularon con HSP60. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales diferentes ni en proliferación de células T ni en liberación de citocinas en respuesta a la estimulación con Con A (datos no mostrados). Así, la vacunación con pHSP60 indujo una respuesta de las células T baja pero específica a HSP60; la respuesta inmunitaria provocada por vacunación con pHsp60 puede afectar a las reacciones inmunitarias que caracterizan AA.

**Ejemplo 11: secreción de citocinas en ratas con AA vacunadas con pHSP60 pHSP65 o Hu3/IFA**

Veintiséis días después de la inducción de AA, se prepararon LNC de ratas no tratadas o animales que habían sido tratados con pcADN3 o PBS/IFA. Se estimularon LNC *in vitro* con un colectivo de antígenos conocidos previamente por ser diana o estar asociados con AA: HSP60, HSP65, PPD, P176-90 (que contiene el epítipo 180-188 de HSP65 (3)) y Hu3 descrito en la presente memoria. Se incluyeron Hu12 y OVA como antígenos de control. Los resultados fueron esencialmente los mismos si se inducía AA en ratas no tratadas o en ratas pretratadas con inyecciones de PBS/IFA o pcADN3. La figura 11 representa los resultados obtenidos con LNC aisladas de animales tratados con pcADN3, mostrando las citocinas liberadas al medio de cultivo. Las LNC de animales tratados con pcADN3 mostraron una respuesta proliferativa fuerte a PPD y bajas pero respuestas significativas a HSP65 y P176-90, mientras que no se detectó proliferación después de estimulación con HSP60, Hu3 o Hu12. Aunque la respuesta proliferativa a P176-90 fue bastante baja, la estimulación con este péptido condujo a la liberación de  $\text{IFN}\gamma$  a al menos los mismos niveles que los conseguidos por estimulación con PPD. Se segregó  $\text{IFN}\gamma$  hasta una menor extensión en respuesta a HSP65, mientras que no se detectó secreción con la estimulación con HSP60, Hu3 o Hu12. Se detectaron sólo IL-10 y  $\text{TGF}\beta 1$  con la activación con PPD. Así, la inducción de AA activa las células-T que segregan casi exclusivamente  $\text{IFN}\gamma$  en respuesta a activación con antígenos micobacterianos y que no parecen reconocer HSP60 o sus péptidos Hu3 y Hu12.

La figura 12A representa la respuesta proliferativa y la secreción de citocinas de células aisladas de animales tratados con pHSP60, pHSP65 o Hu3/IFA expresada como el porcentaje de cambio en la reactividad en relación con la proliferación observada usando células de sus respectivos controles (animales tratados con pcADN3 o PBS/IFA). Los animales protegidos de AA mostraron respuestas proliferativas aumentadas a antígenos micobacterianos (PPD, HSP65 y P176-90). El aumento en la proliferación para HSP65 y PPD fue más fuerte en animales tratados con pHSP60. También se reguló hacia arriba la respuesta a HSP60 de mamíferos en todos los grupos, pero este efecto estuvo más marcado en animales vacunados con pHSP60. Por otra parte, el día 26 después de inducción de AA, la respuesta a HSP60 fue significativamente mayor que la detectada al final del protocolo de inmunización (Índice de Estimulación,  $\text{IE} = 2,4 \pm 0,39$  frente a  $\text{IE} = 4,44 \pm 0,37$  respectivamente,  $p < 0,05$ ). Además, Hu3 sólo fue reconocido por animales inmunizados con pHSP60 o con Hu3 sólo, mientras que no hubo respuestas dirigidas Hu12. Las células de ratas tratadas con HU12/IFA proliferaron con la estimulación con HU12 (datos no mostrados). Ninguno de los grupos experimentales mostró respuestas significativas a OVA y no difirieron en su respuesta a Con A (datos no mostrados). Así, la modulación de AA por vacunación con pHSP60, pHSP65 o Hu3 va acompañada por la regulación hacia arriba de respuestas proliferativas de las células T a tanto auto-antígenos como antígenos micobacterianos. El fenotipo de estas respuestas celulares aumentadas se ha caracterizado por términos de perfiles de liberación de citocinas.

Como se muestra en la Figura 12B, la secreción de  $\text{IFN}\gamma$  aumentó en LNC de: A, ratas tratadas con pHSP60 estimuladas con HSP60, Hu3 o Hu12; B, ratas tratadas con pHSP65 estimuladas con HSP60 y C, en ratas tratadas con Hu3 estimuladas con Hu3. Así, la modulación de AA está asociada con una reducción en la liberación de  $\text{IFN}\gamma$  a P176-90 y un aumento en la liberación de  $\text{IFN}\gamma$  para HSP60. Como se muestra en la Figura 12C, el estudio de secreción de IL-10 reveló que las LNC de animales protegidos de AA (por vacunación de ADN o de péptidos) mostró secreción aumentada de IL-10 en respuesta a estimulación *in vitro* con antígenos micobacterianos. En células de todos los grupos protegidos se encontró secreción de IL-10 en respuesta a la estimulación con PPD, HSP65 (animales tratados con pHSP60 y pHSP65) o P176-90 (ratas tratadas con pHSP60 y Hu3). La liberación de IL-10 con la estimulación con HSP60 y sus péptidos no fue uniforme y sólo se encontró en células de animales vacunados con pHSP60 o pHSP65. Por lo tanto, la protección se asoció con la inducción de secretores de IL-10 responsables para antígenos micobacterianos (PPD o P180-90) y, en animales vacunados de ADN, una HSP60 de mamíferos. El análisis de liberación de  $\text{TGF}\beta 1$  de LNC tomadas de todos los grupos protegidos de AA, (por vacunación de ADN o de péptidos), mostró un aumento en la secreción de  $\text{TGF}\beta 1$  en respuesta a estimulación con antígenos micobacterianos y HSP60 o sus péptidos (Figura 12D). Sin embargo, este efecto fue más fuerte en ratas tratadas de AND.

En total, los resultados sugieren que la modulación de AA por tratamiento con ADN o péptido específico se asocia con tres observaciones. A, secreción disminuida de  $IFN\gamma$  con la estimulación con el péptido P178-190 de HSP65. B, la inducción de células T específicas de HSP60 que segregan  $IFN\gamma$ . C, el aspecto de los secretores de IL-10 y  $TGF\beta 1$  específicos para antígenos micobacterianos y HSP60.

**Ejemplo 12: Inhibición de AA por vacunas de ADN que codifican HSP70 humana y HSP90 humana**

El ADNc de longitud completa de HSP70 humana (pHSP70) o HSP90 humana (pHSP90) se clonó en el vector pcADN3. Se encontró que las construcciones de los genes eran funcionales en un sistema de transcripción/traducción in vitro (datos no mostrados). Se inmunizaron ratas con pHSP90 y pHSP70 después del mismo esquema de vacunación usado para pHSP60 y 12 días después de la última inyección de ADN, se indujo AA. La figura 13A muestra que en ratas vacunadas con pHSP70 o pHSP90 hubo una inhibición significativa de AA. La inhibición de AA también se observó como una reducción en la puntuación máxima (Figura 13B), hinchazón de la pierna (Figura 13C) y un retraso significativo en el día medio de comienzo de la enfermedad (Figura 13D).

Para ganar alguna percepción en el mecanismo que media la prevención de AA por tratamiento con pHSP70 o pHSP90, se estudió la inducción de anticuerpos del isotipo IgG al antígeno codificado por el vector. La figuras 14A y 14B representan los resultados obtenidos para ratas tratadas con pHSP70 y pHSP90, respectivamente. Vacunación con los anticuerpos específicos inducidos por las construcciones de ADN, que indica que las dos construcciones son inmunógenas y la respuesta humoral inducida se regula hacia arriba en la inducción de AA.

**Ejemplo 13: secreción de citocinas y proliferación in vitro de LNC aisladas de ratas con AA vacunadas con pHSP70 o pHSP90**

Las figuras 15A y 15B muestran que las células DLN de nódulos linfáticos drenantes de animales inmunizados mostraron una proliferación de la respuesta a la dosis con la activación con la proteína codificada por el vector inmunizante. Además, el análisis de las citocinas liberadas en respuesta a estimulación específica de antígenos reveló que las células tomadas de animales inmunizados con pHSP90 segregaron tanto IL-10 como  $IFN\gamma$  en respuesta a la activación con HSP90 (Figuras 16A y 16B). No hubo secreción de  $IFN\gamma$  o IL-10 cuando se estimularon células de animales tratados con pHSP70 con HSP70 (datos no mostrados).

La respuesta inmunitaria a un panel de antígenos en células DLN aisladas de ratas tratadas con pcADN3-, pHSP70- o pHSP90 se detectó 26 días después de la inducción de AA. Los resultados se muestran en la Figura 17 como el porcentaje de la proliferación observada en ratas no tratadas. La vacunación con pHSP70 o pHSP90 condujo a una regulación hacia arriba significativa en la respuesta proliferativa a HSP65, HSP71 y PPD y este aumento en la respuesta inmunitaria fue más fuerte en ratas vacunadas con pHSP70. Para caracterizar además la naturaleza de la respuesta inmunitaria regulada hacia arriba en vacunadas con pHSP70- y pHSP90, se detectó secreción de citocinas en respuesta a estimulación in vitro con los mismos antígenos relacionados con AA. La secreción de  $IFN\gamma$  en respuesta a estimulación con HSP65, su epítipo P176-188 o PPD se reguló hacia abajo en animales tratados con pHSP70 o pHSP90 (Figura 18A). Además, la secreción de IL-10 se reguló hacia arriba con la activación in vitro con PPD, HSP71, HSP65 o HSP60, en animales vacunados tanto con pHSP70- como con pHSP90 (Figura 18B). Finalmente, la liberación de  $TGF\beta 1$  con la estimulación con HSP65 y su péptido P176-80 aumentó en células tomadas de animales vacunados con pHSP90 y hubo una liberación ligera pero significativa en respuesta a la estimulación con PPD en células de animales tratados con pHSP70 (Figura 18C). Obsérvese que la disminución en la secreción de  $IFN\gamma$  y el aumento concomitante en liberación de IL-10 y  $TGF\beta 1$  fue más fuerte en el grupo tratado con pHSP90; en este grupo se inhibió AA incluso más eficazmente que en ratas inmunizadas con pHSP70.

**Tabla I: Péptidos superpuestos de HSP60 humana, región 1-275**

Péptido	Posición	Secuencia
Hu1	1-20	MLRLPTVFRQMRPVSRVLAP
Hu2	16-35	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD
Hu3	31-50 (SEC ID N°:3)	KFGADARALM LQG VDLLADA
Hu4	46-65	LLADAVAVTMGKG RTVIIIE
Hu5	61-80	TVIIIEQSWGSPKVTKDGVTV
Hu6	76-95	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA
Hu7	91-110	KNIGAKLVQDVANNTNEEAG
Hu8	106-125	NEEAGKGTATATVLARSIK
Hu9	121-140	RSIAKEGFEKISKGANPVEI
Hu10	136-155	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL
Hu11	151-170	VIAELKKQSKPVTTPEEIAQ
Hu12	166-185	EEIAQVATISANGDKEIGNI
Hu13	181-199	EIGNIISDAMKKVGRKGI
Hu14	195-214	RKGVITVKDGKTLNDELEII
Hu15	210-229	ELEIIIEGMKFDRGYISPYFI
Hu16	225-244	SPYFINTSKGQKCEFQDAYV
Hu17	240-259	QDAYVLLSEKKISIQSIVP
Hu18	255-275	QSIVPALEIANHRKPLVIA

**Tabla II: Plásmidos contruidos que contienen fragmentos solapados del gen hsp60**

Plásmido	Posición	Péptidos Correspondientes incluidos
pI	1-140	Hu1-Hu9 (a.k.a. P1- P9; SEC ID N°:1)
pII	130-260	Hu10-Hu18 (a.k.a. P10- P18; SEC ID N°:2)
pIII	250-410	NS
pIV	400-470	NS
pV	460-540	NS

5 La posición se expresa como números de restos de aminoácido.

NS = No sintetizado como péptidos individuales.

10 **Tabla III: Comparación de HSP60 humana, HSP60 de rata y HSP65 micobacteriana en la región correspondiente a la secuencia<sup>a,b</sup> de Hu3.**

H.	<i>sapiens</i>	31	<b>KFGADARALMLQGVDLLAD</b>	50
			<b>A</b>	
R.	<i>norvergicus</i>	31	<b>KFGADARALMLQGVDLLAD</b>	50
			<b>A</b>	
M	<i>tuberculosis</i>	5	<b>AYDEEARRGLERGLNALADA</b>	24

<sup>a</sup>*H. sapiens*, *Homo sapiens*; *R. norvergicus*, *Rattus norvergicus*; *M tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*.

<sup>b</sup>Los restos que comparten identidad con la correspondiente secuencia de HSP60 humana se muestran en negrita y las sustituciones conservadas se muestran como restos subrayados.

**Referencias:**

- 15 1. Wauben, M. H. M., J. P. A. Wagenaar-Hilbers y W. van Eden. 1.994. Adjuvant Arthritis. In Autoimmune Disease Models. I. R. Cohen, y A. Miller, eds. Academic Pres, Inc., California, USA.
2. van Eden, W., J. E. Thole, R. van der Zee, A. Noordzij, J. D. van Embden, E. J. Hensen, y I. R. Cohen. 1.988. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331:171.
- 20 3. van Eden, W., J. Holoshitz, Z. Nevo, A. Frenkel, A. Klajman y I. R. Cohen. 1.984. Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 5.117.
4. Holoshitz, J., A. Matitau, y I. R. Cohen. 1.984. Arthritis induced in rats by cloned T lymphocytes responsive to

mycobacteria but not to collagen type II. *J Clin Invest* 73: 211.

5 5. Holoshitz, J., Y. Naparstek, A. Ben-Nun, y I. R. Cohen. 1.983. Lines of T lymphocytes induce or vaccinate against autoimmune arthritis. *Science* 219: 56.

6. Billingham, M. E., S. Carney, R. Butler, y M. J. Colston. 1.990. A mycobacterial 65-kD heat shock protein induces antigen-specific suppression of adjuvant arthritis, but is not itself arthritogenic. *J Exp Med* 171: 339.

10 7. Hogervorst, E. J., L. Schouls, J. P. Wagenaar, C. J. Boog, W. J. Spaan, J. D. van Embden, y W. van Eden. 1.991. Modulation of experimental autoimmunity: treatment of adjuvant arthritis by immunization with a recombinant vaccinia virus. *Infect Immun* 59: 2.029.

15 8. Ragno, S., M. J. Colston, D. B. Lowrie, V. R. Winrow, D. R. Blake, y R. Tascon. 1.997. Protection of rats from adjuvant arthritis by immunization with naked DNA encoding for mycobacterial heat shock protein 65. *Arthritis Rheum* 40: 277.

9. Moudgil, K. D., T. T. Chang, H. Eradat, A. M. Chen, R. S. Gupta, E. Brahn, y E. E. Sercarz. 1.997. Diversification of T cell responses to carboxy-terminal determinants within the 65-kD heat-shock protein is involved in regulation of autoimmune arthritis. *J Exp Med* 185: 1.307.

20 10. Anderton, S. M., R. van der Zee, B. Prakken, A. Noordzij y W. van Eden. 1.995. Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis. *J Exp Med* 181: 943.

11. Yang, X. D., J. Gasser, and U. Feige. 1.992. Prevention of adjuvant arthritis in rats by a nonapeptide from the 65-kD mycobacterial heat shock protein: specificity and mechanism. *Clin Exp Immunol* 87: 99.

25 12. van Eden, W., U. Wendling, L. Paul, B. Prakken, P. van Kooten, y R. van der Zee. 2.000. Arthritis protective regulatory potential of self-heat shock protein cross-reactive T cells. *Cell Stress Chaperones* 5: 452.

30 13. Lopez-Guerrero, J. A., J. P. Lopez-Bote, M. A. Ortiz, R. S. Gupta, E. Paez, y C. Bernabeu. 1.993. Modulation of adjuvant arthritis in Lewis rats by recombinant vaccinia virus expressing the human 60-kilodalton heat shock protein. *Infect Immun* 61: 4.225.

14. Lopez-Guerrero, J. A., M. A. Ortiz, E. Paez, C. Bernabeu, y J. P. Lopez-Bote. 1.994. Therapeutic effect of recombinant vaccinia virus expressing the 60-kd heat-shock protein on adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 37:1.462.

35 15. Quintana, F. J., P. Carmi, F. Mor, y I. R. Cohen. 2.002. Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60. *J Immunol* 169: 3.422.

40 16. Anderton, S. M., R. van der Zee, A. Noordzij, y W. van Eden. 1.994. Differential mycobacterial 65-kDa heat shock protein T cell epitope recognition after adjuvant arthritis-inducing or protective immunization protocols. *J Immunol* 152: 3.656.

45 17. Quintana, F. J., A. Rotem, P. Carmi, e I. R. Cohen. 2.000. Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity. *J Immunol* 165: 6.148.

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd.

50 <120> VACUNAS DE ADN QUE CODIFICAN PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO PARA

<130> Yeda/009/1/PCT

<160>3

55 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211>140

60 <212> PRT

<213> Homo sapiens

65 <400> 1

ES 2 389 301 T3

Met Leu Arg Leu Pro Thr Val Phe Arg Gln Met Arg Pro Val Ser Arg  
1 5 10 15

Val Leu Ala Pro His Leu Thr Arg Ala Tyr Ala Lys Asp Val Lys Phe  
20 25 30

Gly Ala Asp Ala Arg Ala Leu Met Leu Gln Gly Val Asp Leu Leu Ala  
35 40 45

Asp Ala Val Ala Val Thr Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile  
50 55 60

Glu Gln Gly Trp Gly Ser Pro Lys Val Thr Lys Asp Gly Val Thr Val  
65 70 75 80

Ala Lys Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys  
85 90 95

Leu Val Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala Gly Asp Gly  
100 105 110

Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Arg Ser Ile Ala Lys Glu Gly Phe  
115 120 125

Glu Lys Ile Ser Lys Gly Ala Asn Pro Val Glu Ile  
130 135 140

<210>2

5 <211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 2

Lys Ile Ser Lys Gly Ala Asn Pro Val Glu Ile Arg Arg Gly Val Met



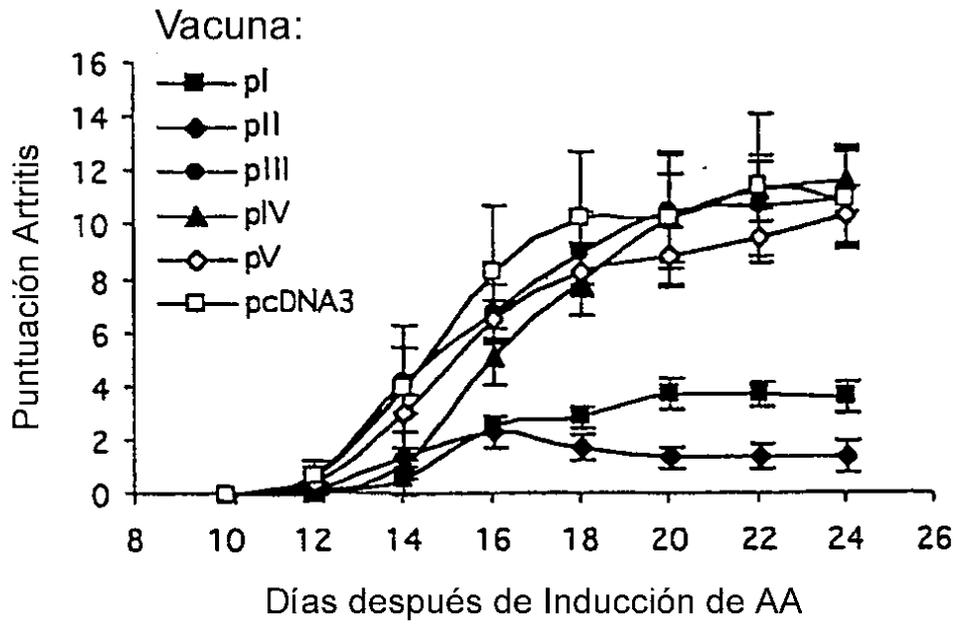
**REIVINDICACIONES**

1. Una vacuna de ADN para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T que comprende una construcción recombinante, comprendiendo la construcción recombinante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de choque térmico 70 (HSP70) de mamífero; en la que la secuencia de ácidos nucleicos que está unida de manera operativa a una o más secuencias de control de la transcripción, en un sistema de expresión adecuado, que permite la expresión in vivo de la proteína codificada en un huésped humano.
2. La vacuna de ADN para uso según la reivindicación 1, en la que dicha proteína de choque térmico de mamífero es HSP70 humana.
3. La vacuna de ADN para uso según la reivindicación 1, en la que dichas secuencias de control de la transcripción son secuencias de control de CMV.
4. La vacuna de ADN para uso según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T se selecciona de: artritis reumatoide, artritis de colágeno II, esclerosis múltiple, neuritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, soriasis, diabetes de comienzo juvenil, enfermedad de Sjogren, enfermedad tiroidea, sarcoidosis, uveítis autoinmune, enfermedad del intestino inflamado (Crohn y colitis ulcerosa) o hepatitis autoinmune.
5. La vacuna de ADN para uso según la reivindicación 4, en la que dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.
6. La vacuna de ADN para uso según la reivindicación 1, en la que dicha construcción recombinante se incorpora en un vector de expresión eucariota, que es pcADN3.
7. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias inflamatorias mediadas por células T, comprendiendo la composición:
  - (a) una construcción recombinante, comprendiendo la construcción recombinante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de choque térmico 70 (HSP70) de mamífero; en la que la secuencia de ácidos nucleicos que está unida de manera operativa a una o más secuencias de control de la transcripción;
  - (b) un portador farmacéuticamente aceptable.
8. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicho portador comprende un vehículo de suministro que suministra las secuencias de ácidos nucleicos a un individuo, vehículo de suministro que es un liposoma.
9. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicha composición es para administrar a un individuo previamente a la aparición de síntomas de la enfermedad.
10. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicha composición es adecuada para inyección intramuscular.
11. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, para preparar un medicamento para tratar una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T en un individuo, en el que dicha enfermedad inflamatoria mediada por células T es artritis reumatoide.
12. El uso según la reivindicación 11, en el que dicho individuo se selecciona del grupo que consiste en mamíferos humanos y no humanos.
13. El uso según la reivindicación 11 ó 12, en el que dicha composición se administra a dicho individuo previamente a la aparición de síntomas de la enfermedad.
14. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha composición es adecuada para inyección intramuscular.
15. Un método in vitro para tratar células obtenidas de un individuo con una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T que comprende la etapa de transinfectar células obtenidas de un individuo con una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T in vitro con una construcción recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica una proteína de choque térmico 70 (HSP70) de mamífero; estando dicha secuencia de ácidos nucleicos unida de manera operativa a una o más secuencias de control de la transcripción.
16. El método según la reivindicación 15, en el que dicha HSP70 de mamífero es HSP70 humana.

- 5 17. El método según la reivindicación 15, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T se selecciona de: artritis reumatoide, artritis de colágeno II, esclerosis múltiple, neuritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, soriasis, diabetes de comienzo juvenil, enfermedad de Sjogren, enfermedad tiroidea, sarcoidosis, uveitis autoinmune, enfermedad del intestino inflamado (Crohn y colitis ulcerosa) o hepatitis autoinmune.
18. El método según la reivindicación 17, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria inflamatoria mediada por células T es artritis reumatoide.
- 10 19. El método según la reivindicación 15, en el que dicho individuo se selecciona del grupo que consiste en mamíferos humanos y no humanos.

Figura 1

**A**



**B**

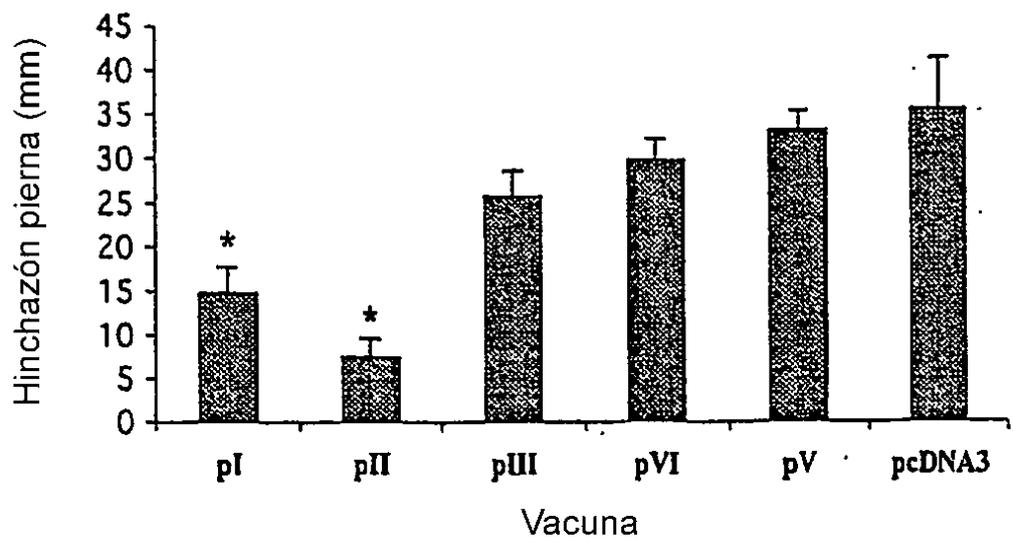
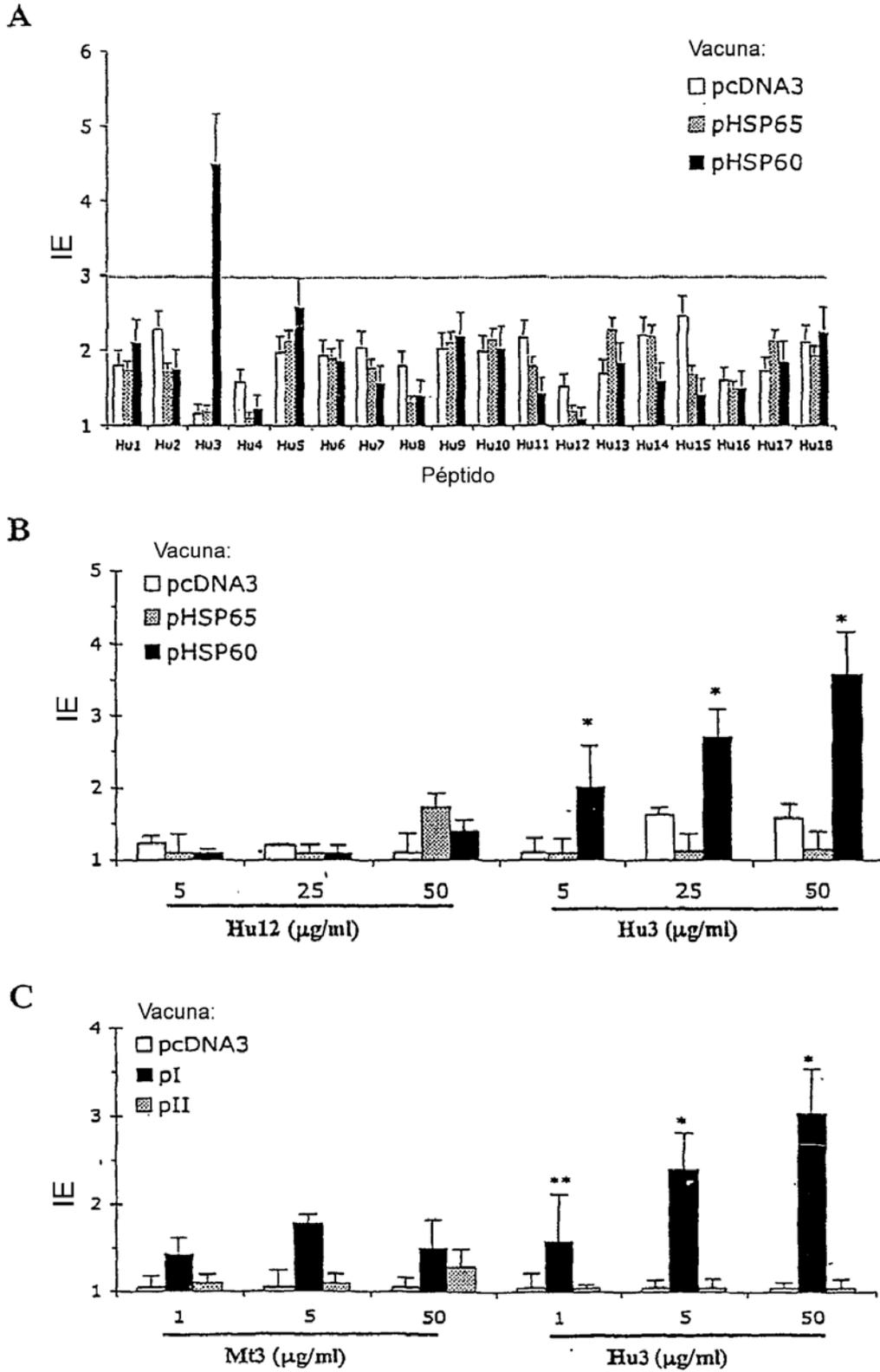


Figura 2



**Figura 3**

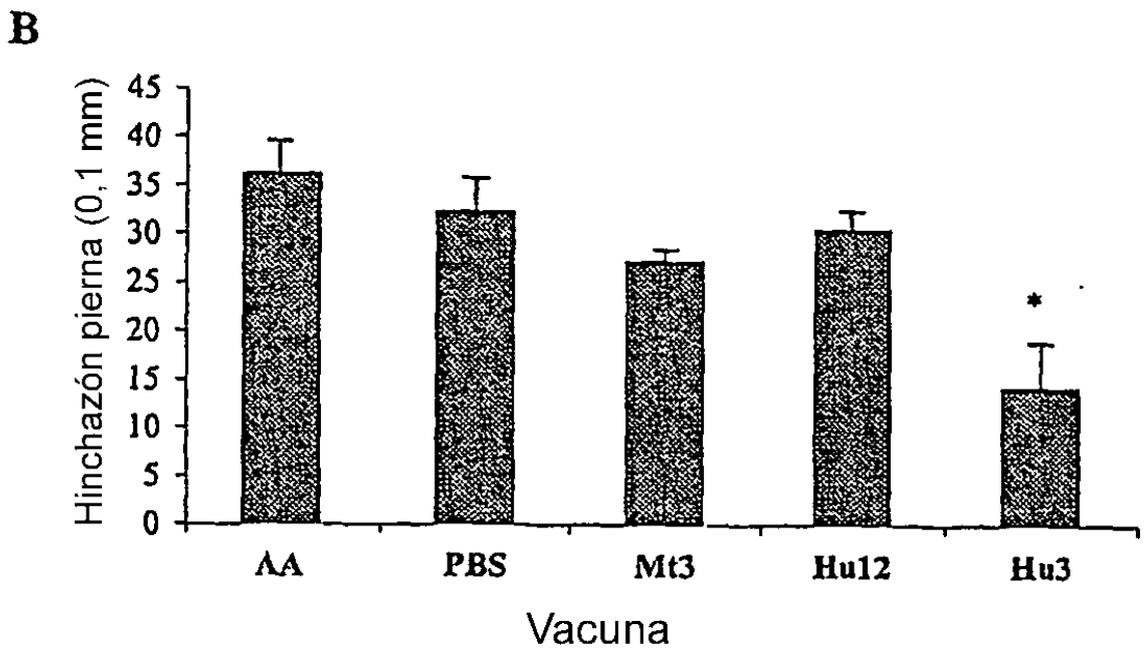
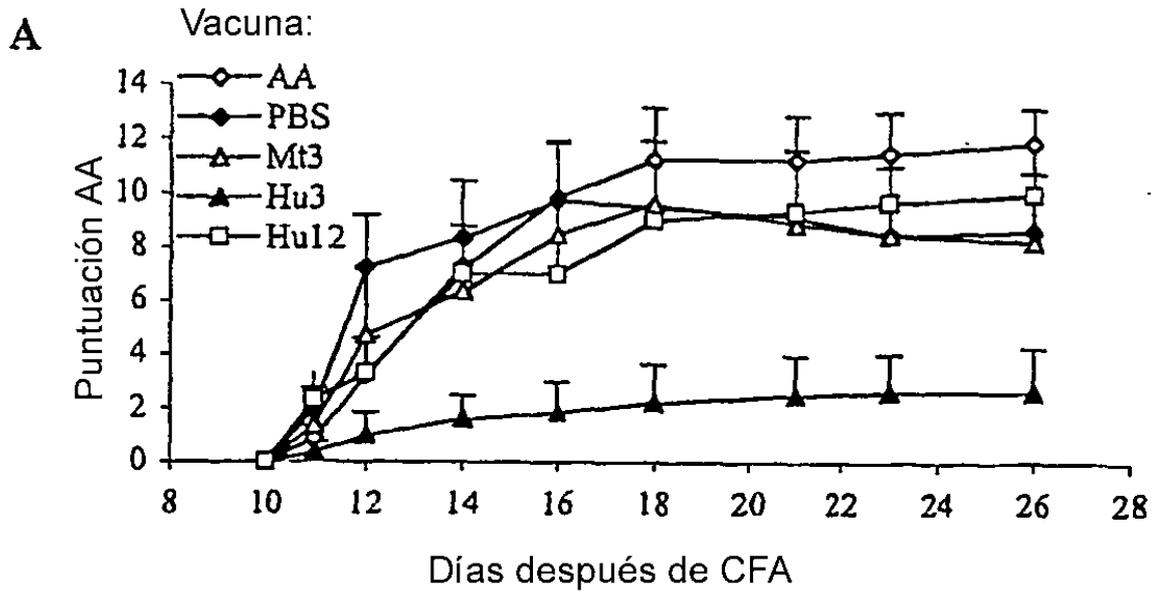


Figura 4

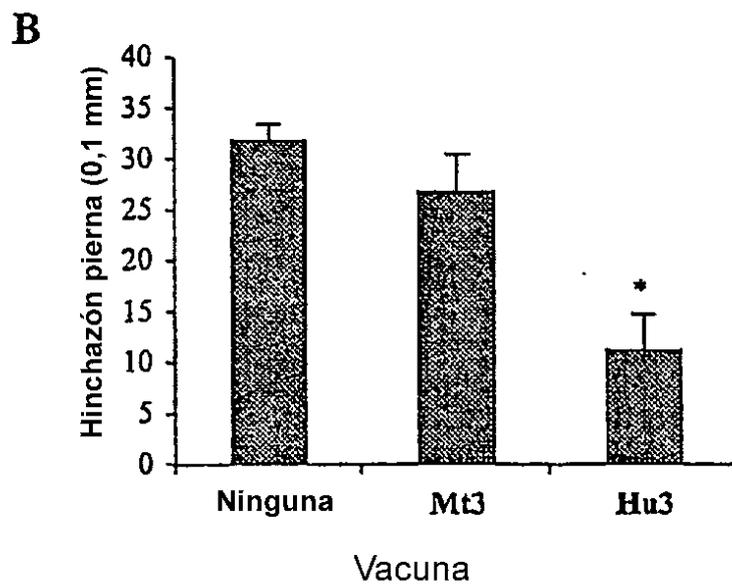
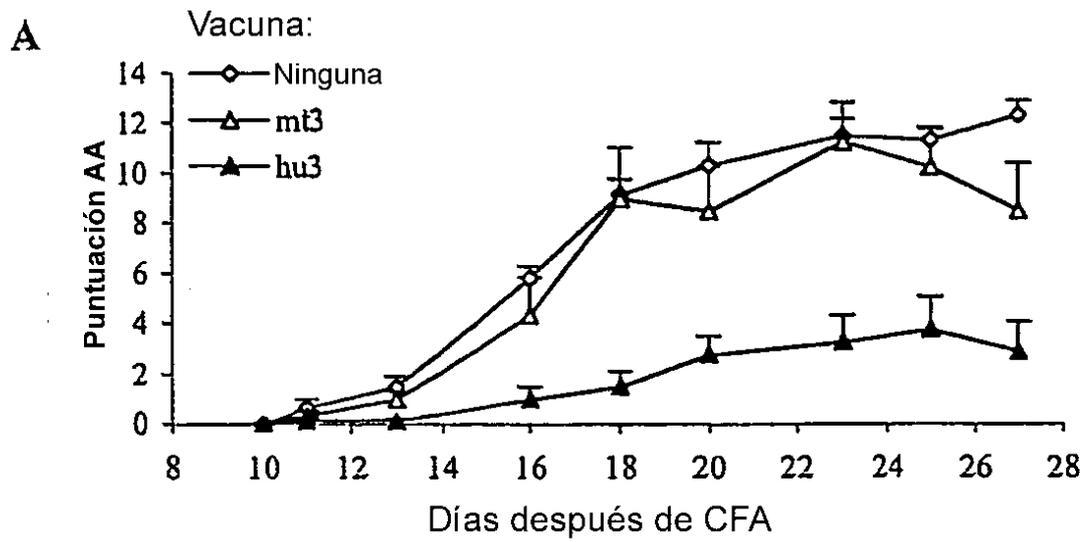


Figura 5

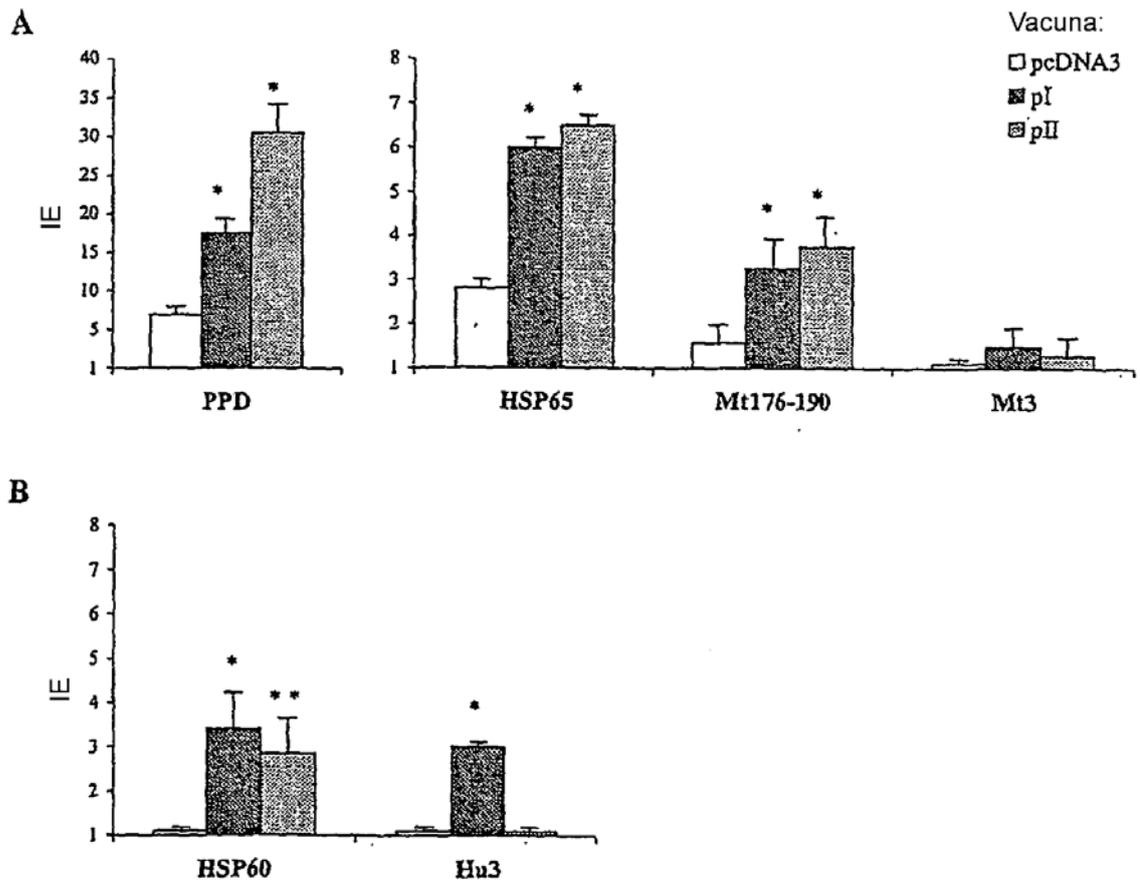
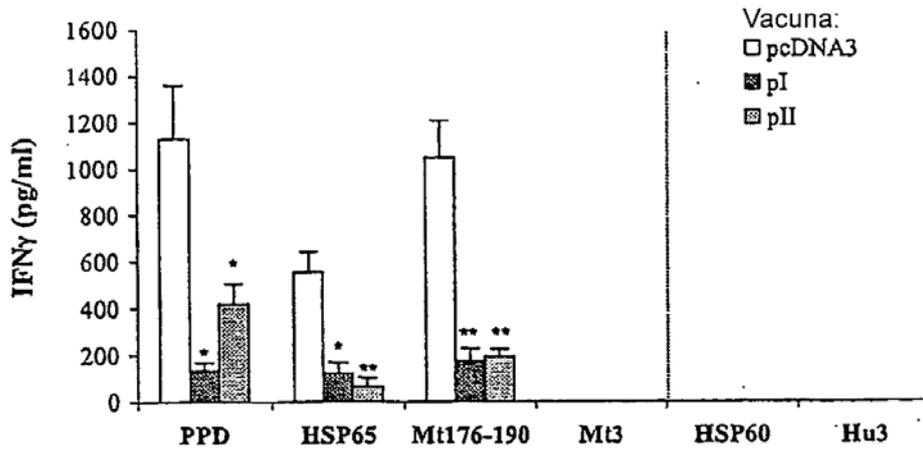
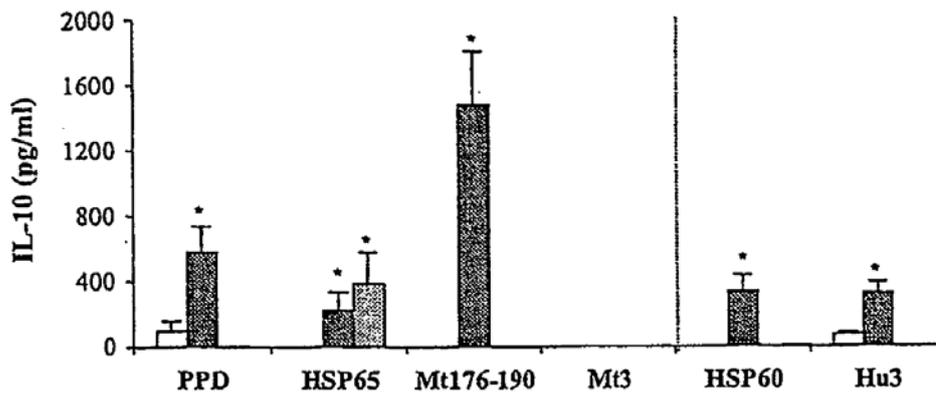


Figura 6

A



B



C

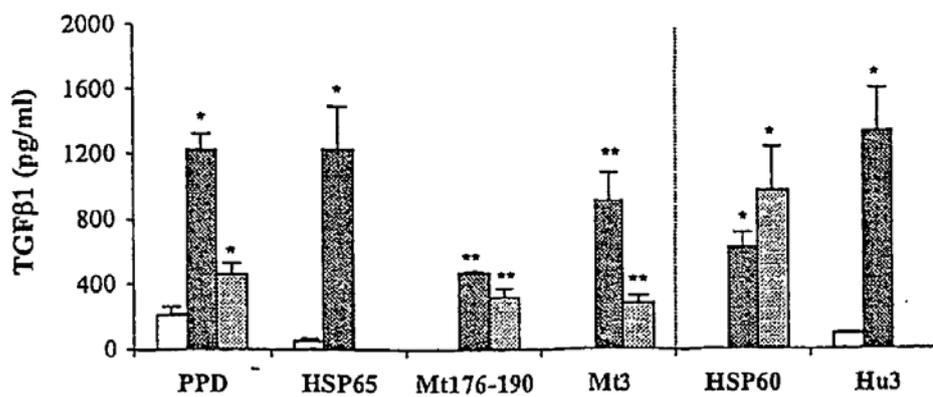


Figura 7

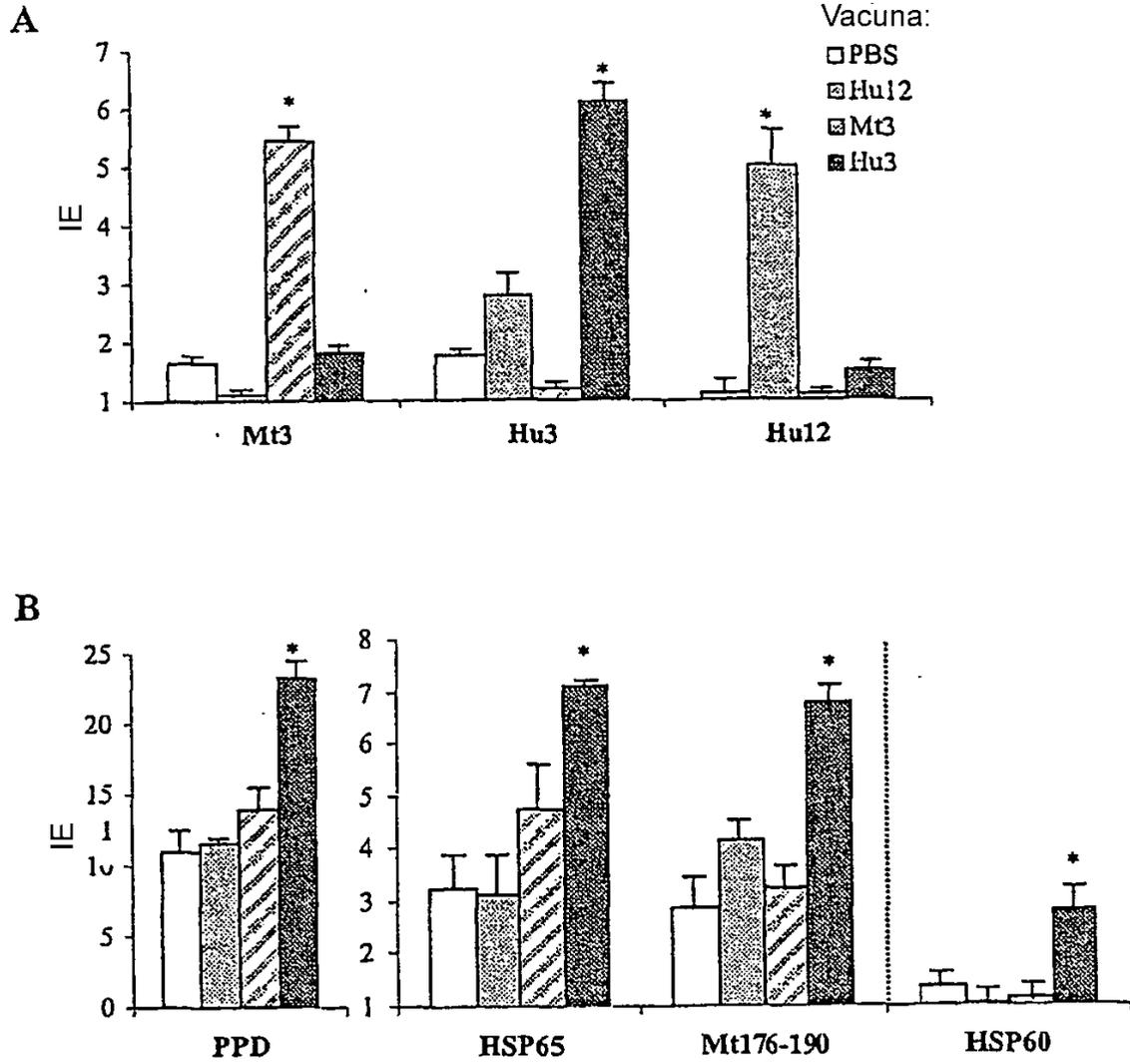
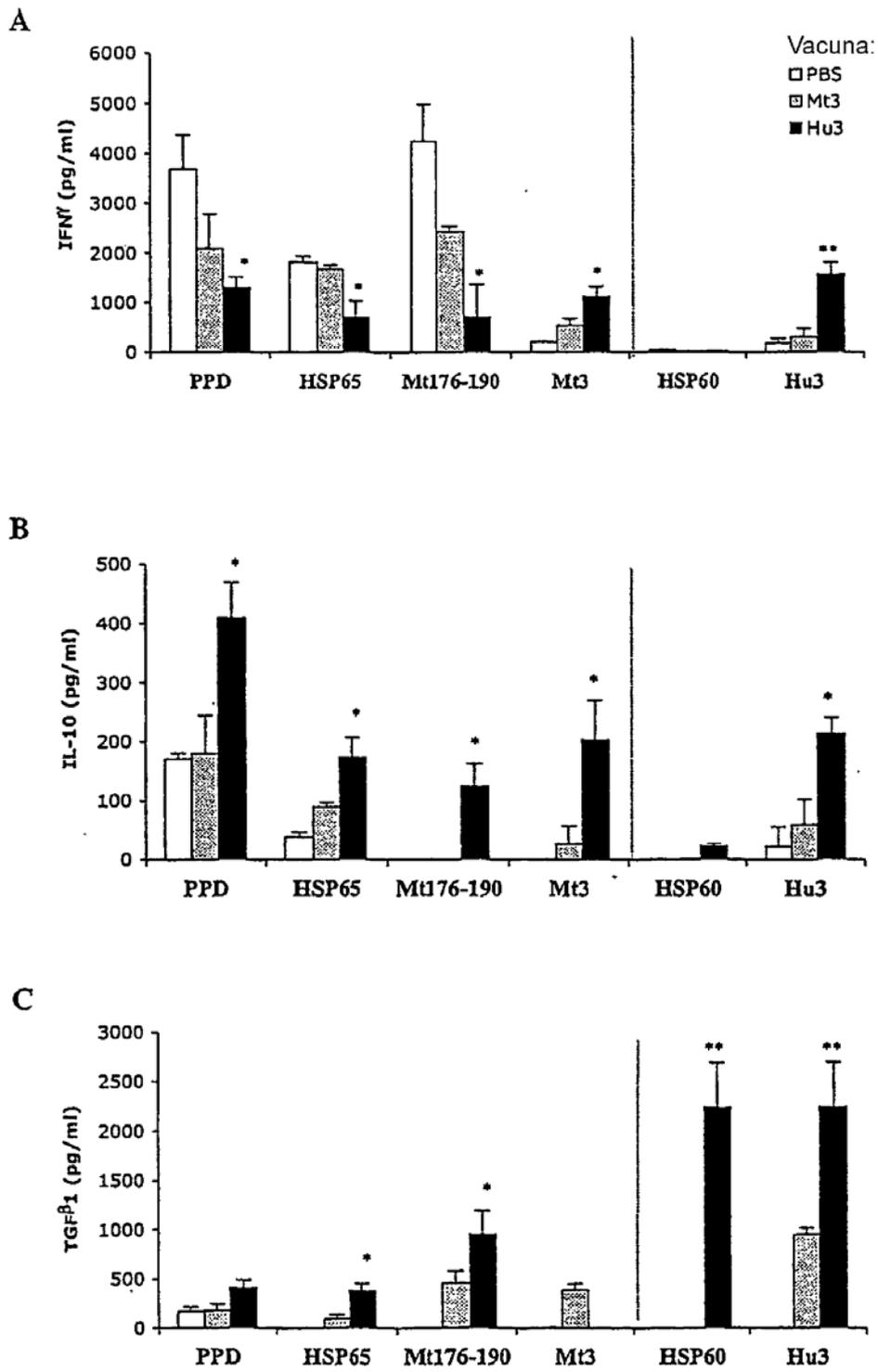
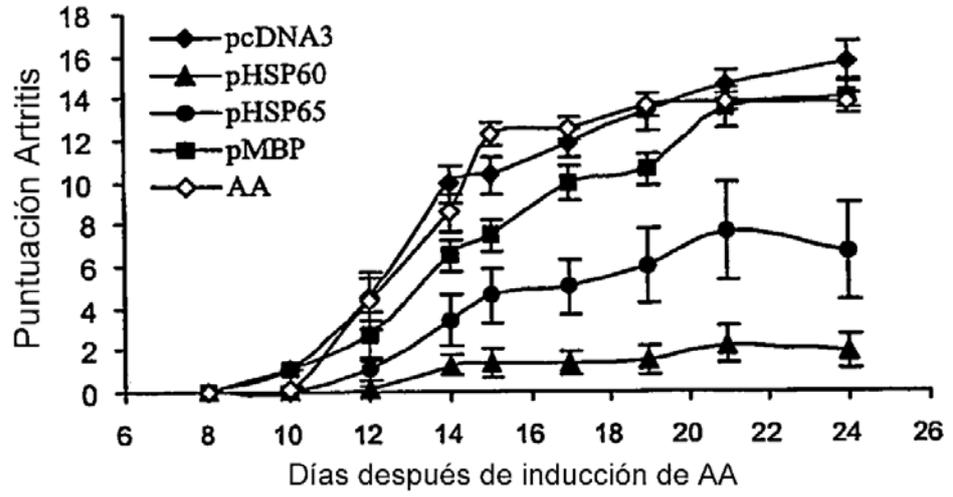


Figura 8



**Figura 9**

**A**



**B**

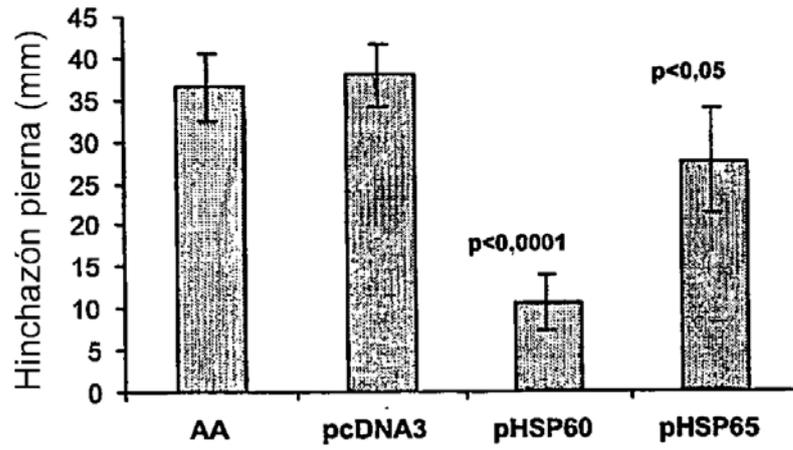


Figura 10

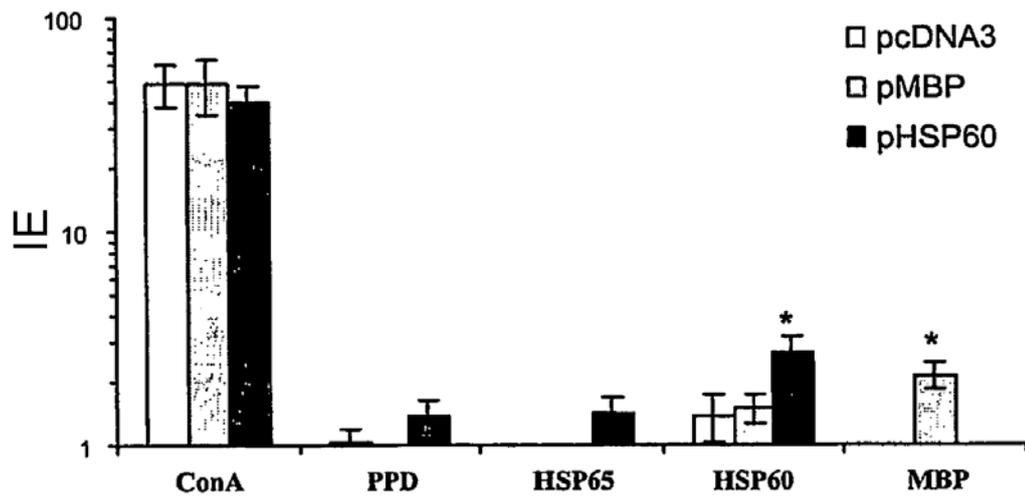


Figura 11

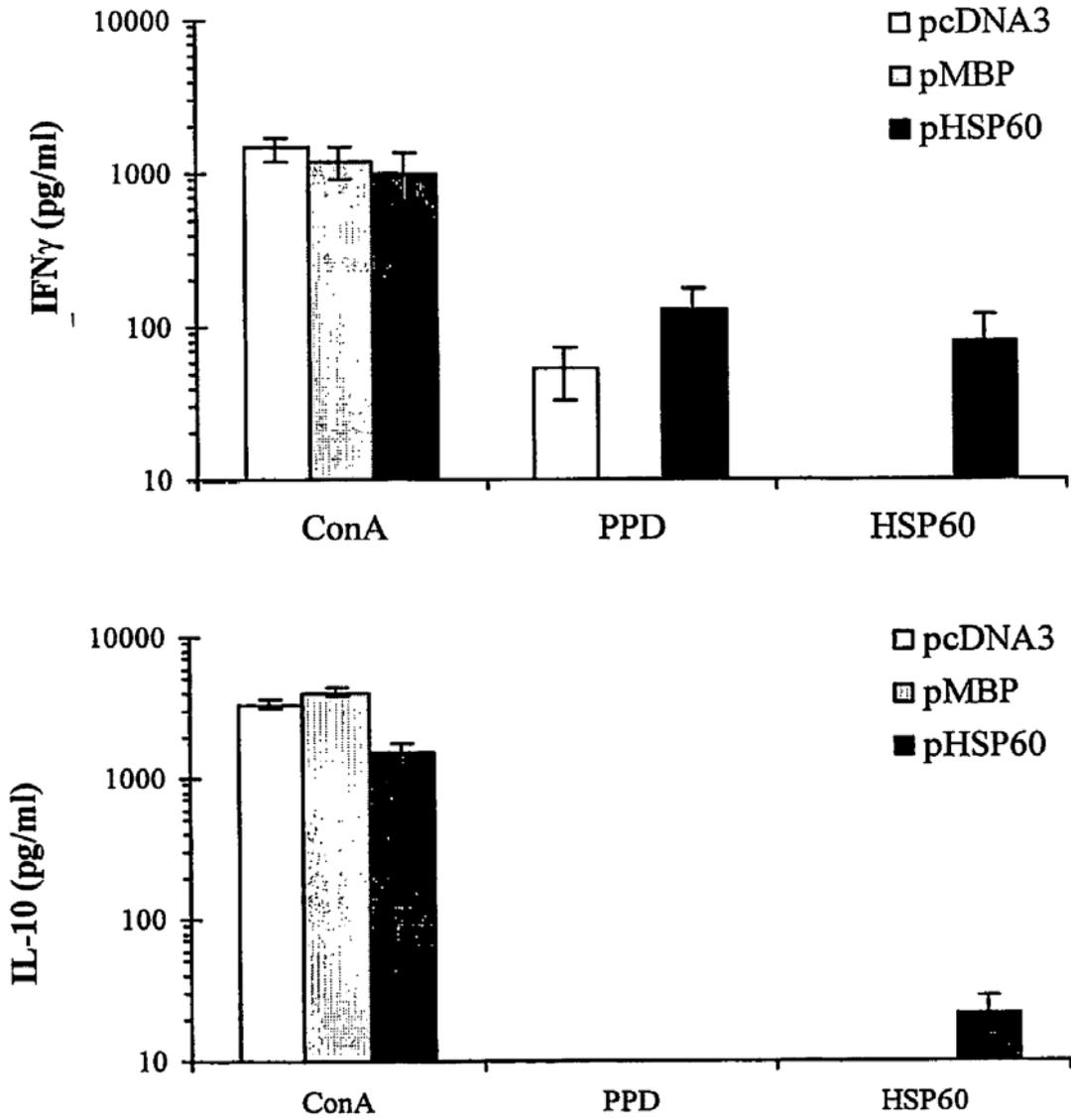


Figura 12A

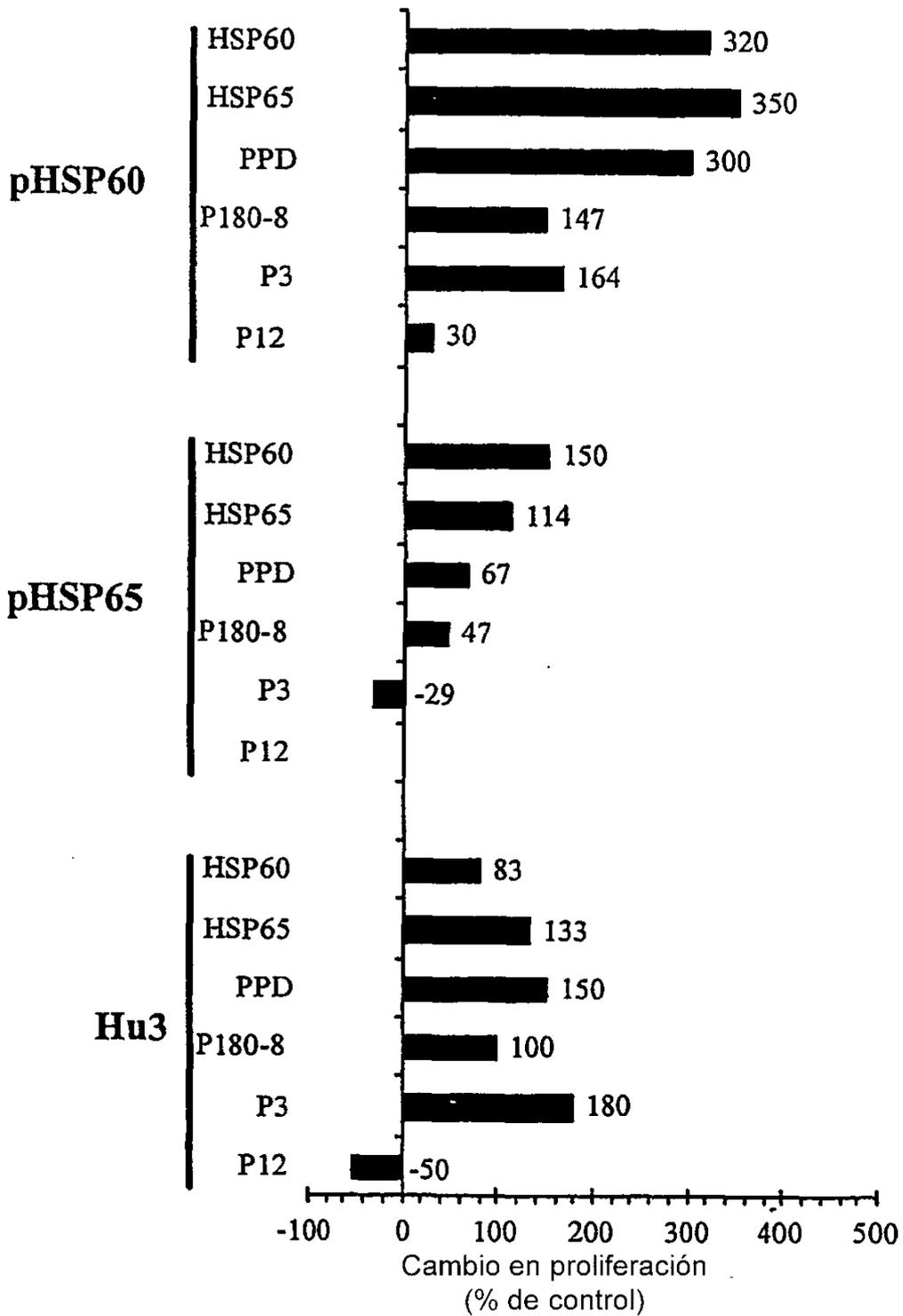


Figura 12B

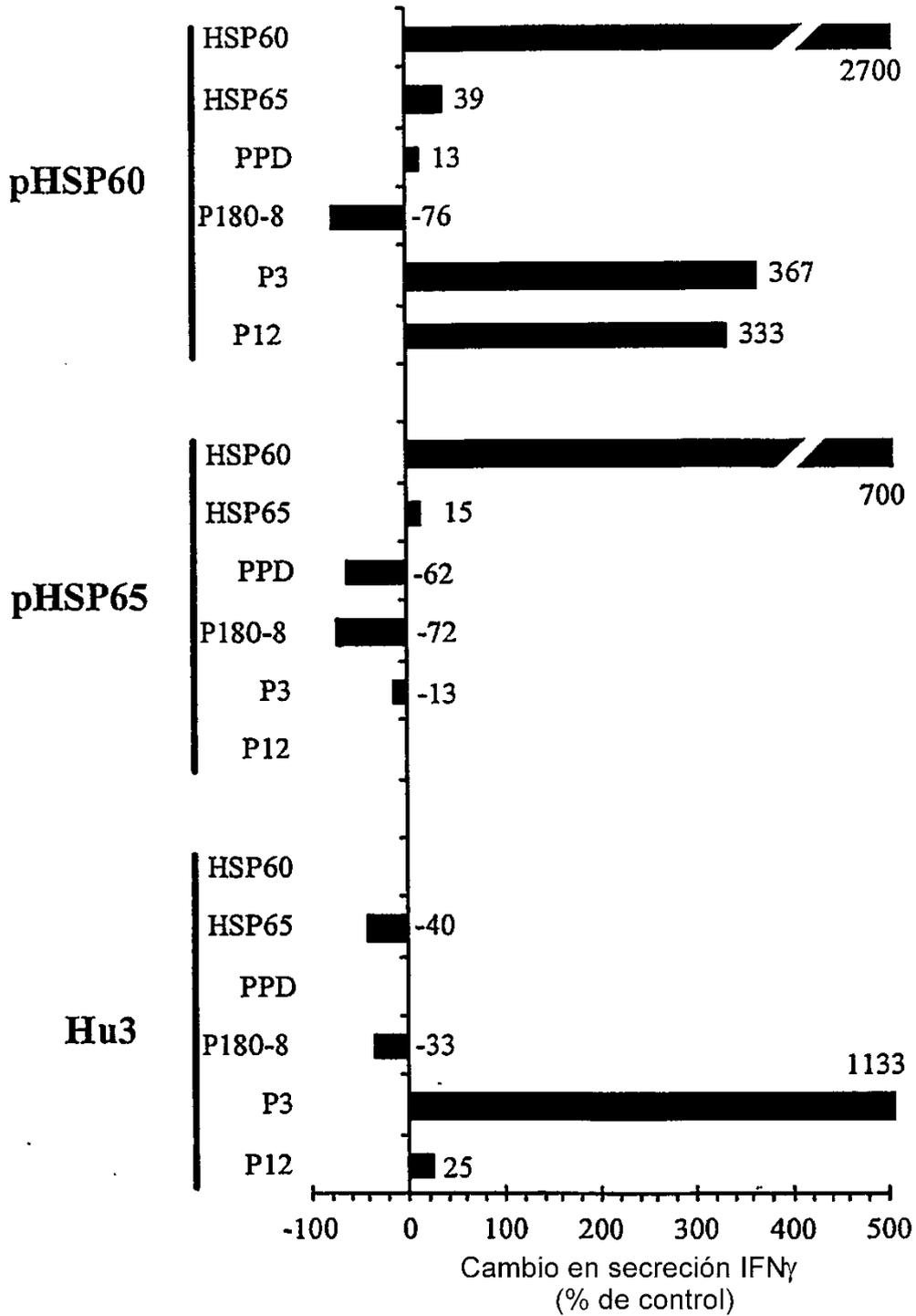
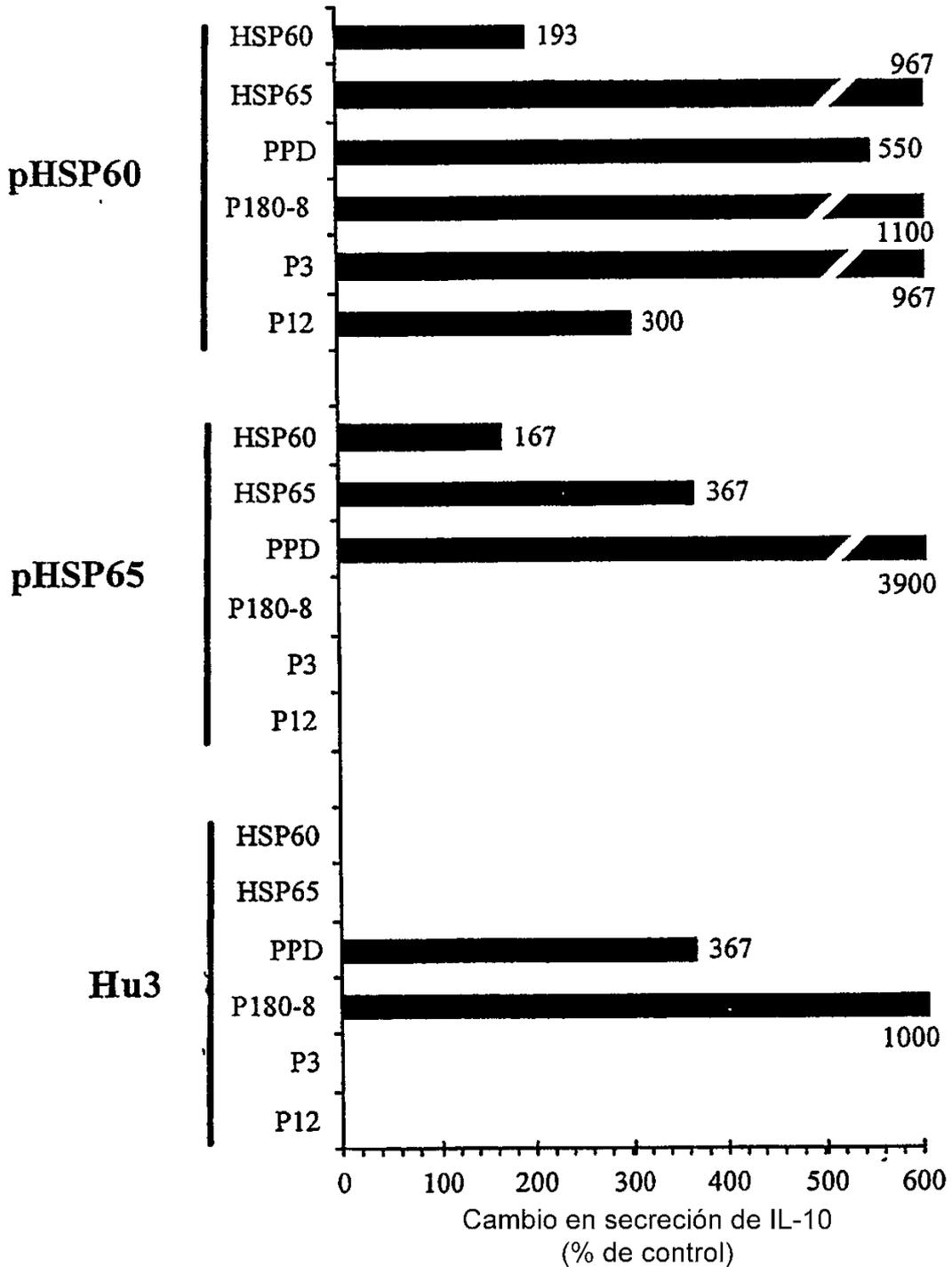


Figura 12C



**Figura 12D**

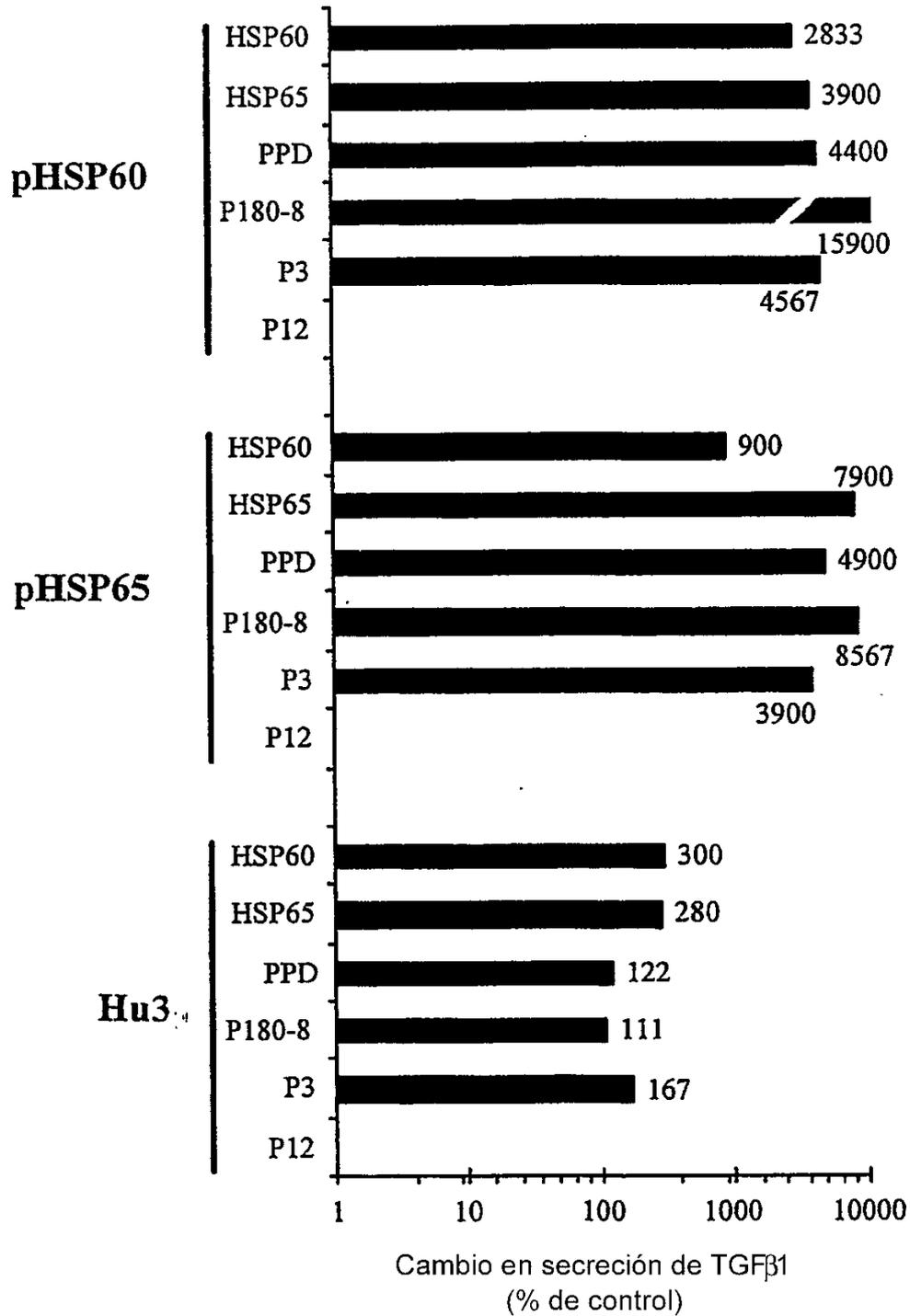


Figura 13

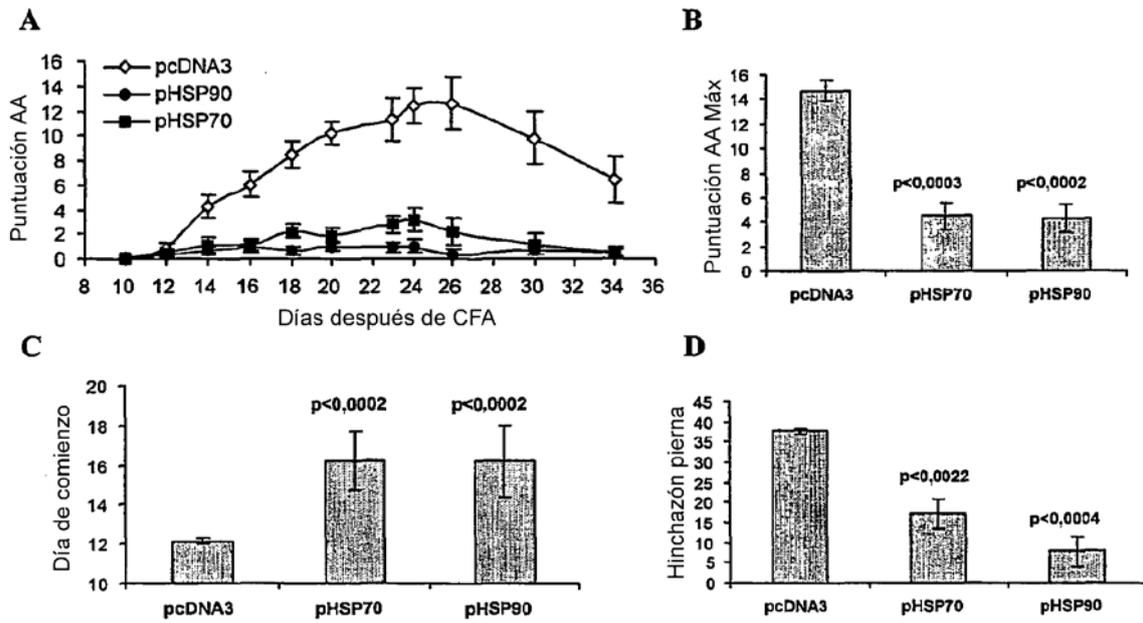
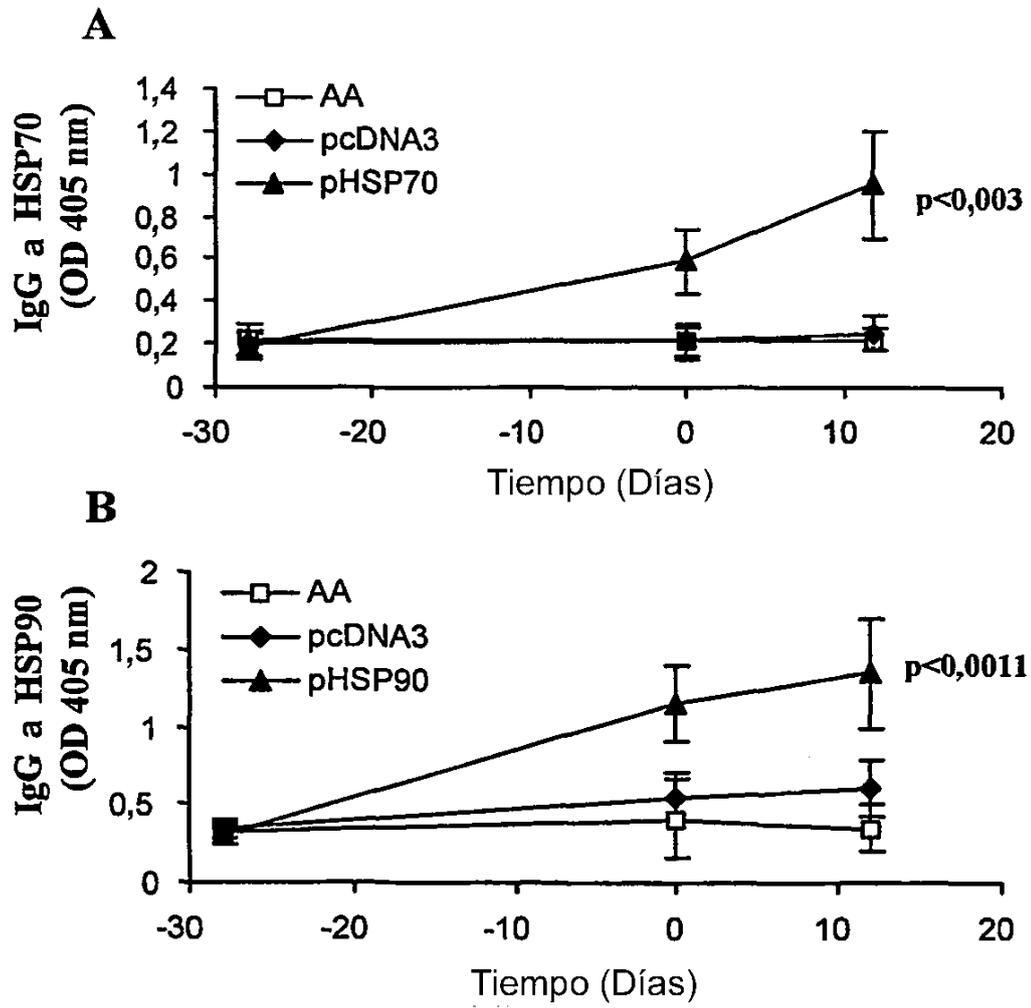


Figura 14



**Figura 15**

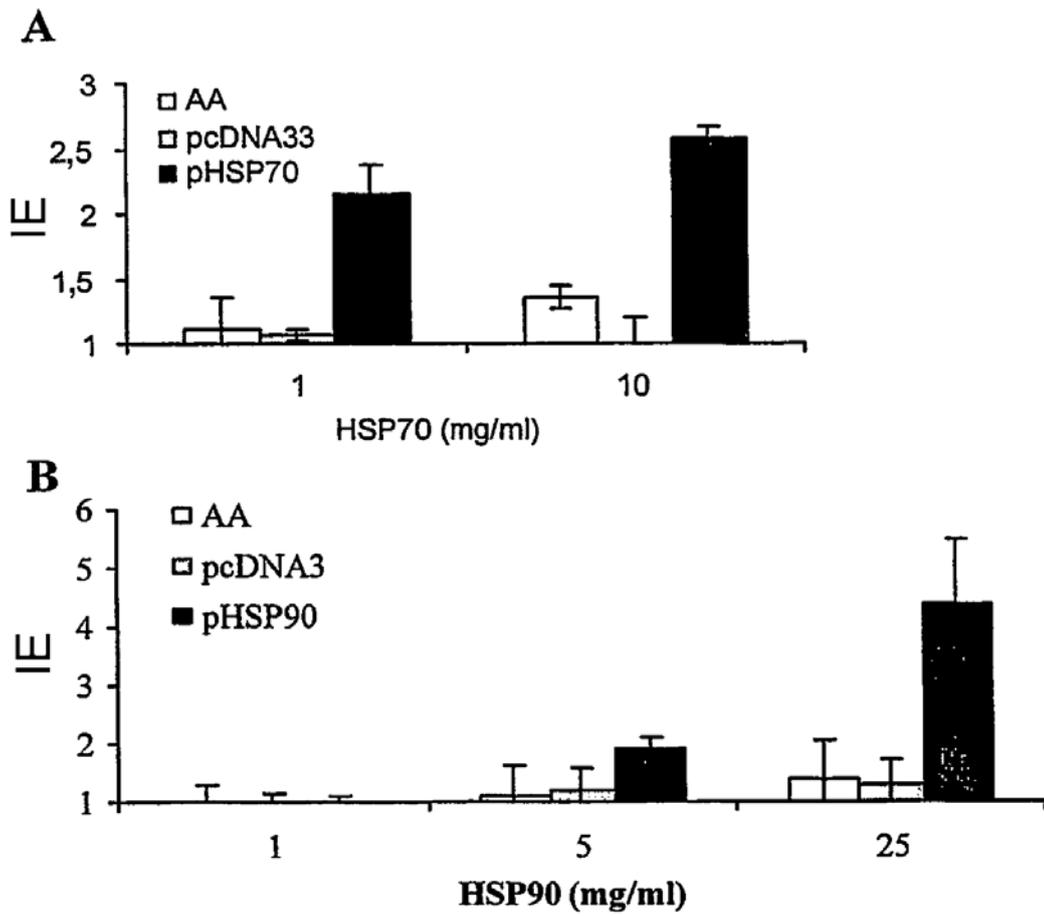


Figura 16

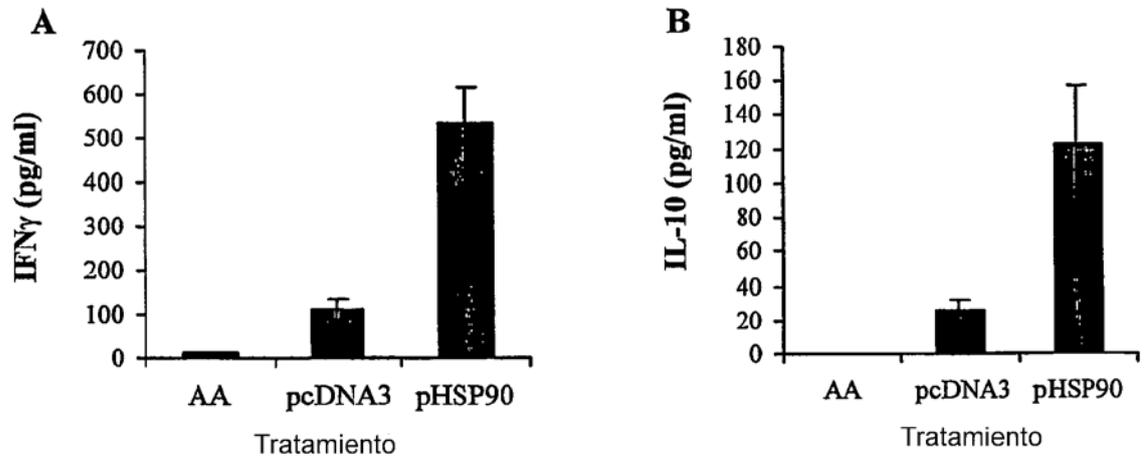


Figura 17

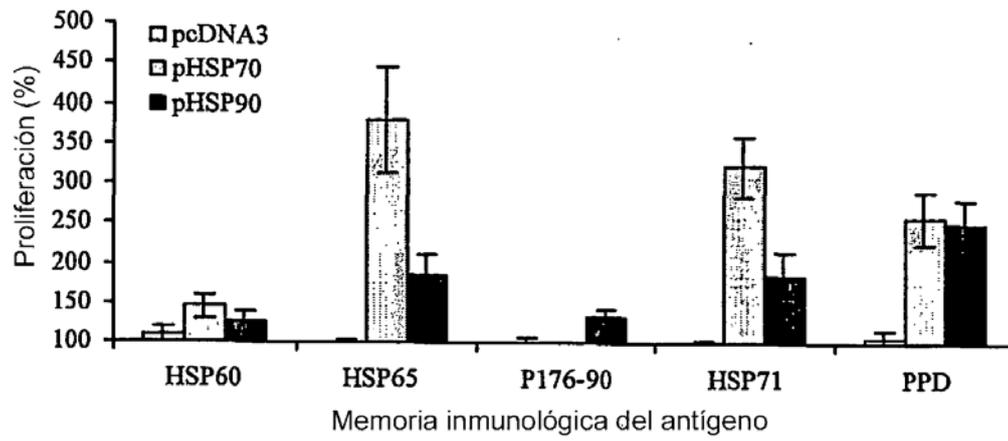


Figura 18

