

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 167**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2007 E 07795673 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2032151**

54 Título: **Método de terapia combinada y formulación**

30 Prioridad:

**01.06.2006 US 810674 P**

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

**14.04.2014**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
CALIFORNIA (100.0%)  
1111 FRANKLIN STREET 5TH FLOOR  
OAKLAND, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**ALBANI, SALVATORE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 455 167 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**

Método de terapia combinada y formulación

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

- 5 Esta invención se refiere a terapias orientadas a la modulación inmune para el tratamiento de trastornos autoinmunes, y más específicamente, a terapias de tratamiento combinado para mejorar la toxicidad autoinmune en enfermedades mediadas por el sistema inmune.

**Antecedentes**

- 10 La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para la comprensión de la presente invención. No es una aceptación de que tal información sea técnica anterior, o pertinente, para las invenciones reivindicadas en la presente memoria, o que cualquier publicación a la que se haga referencia de forma específica o implícita, sea técnica anterior.

- 15 Terapias recientes para el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes humanas se han basado en la inhibición no específica del sistema inmune. Los regímenes de tratamiento basados en ello se dirigen a rutas inmunológicas inflamatorias que daban como resultado el tener que ocuparse del equilibrio entre la toxicidad causada por la falta de especificidad, y los beneficios percibidos previstos de la remisión de la enfermedad.

- 20 Por ejemplo, con respecto a la artritis reumatoide, agentes biológicos de primera generación han incluido los que interfieren en la cascada inflamatoria bloqueando uno u otro componente, por ejemplo una citocina inflamatoria tal como TNF $\alpha$ . Una interferencia biológica directa de este tipo en las rutas patogénicas, está siendo considerada para una cantidad de moléculas cada vez mayor, principalmente citocinas, para reemplazar la inmunosupresión farmacológica generalizada por una vía de tratamiento más personalizada.

- 25 Dado el conocimiento adicional de que el reconocimiento de lo propio es un fenómeno fisiológico y necesario, y que la "calidad" y la "intensidad" de las respuestas inmunes están reguladas por mecanismos complejos que aseguran que el reconocimiento de lo propio no produzca daños, y que las respuestas inflamatorias necesarias, destinadas a eliminar un "peligro" percibido, tal como una infección, están reguladas a la baja una vez que se elimina el "peligro", existe una necesidad en la técnica de regímenes de tratamiento que tengan en cuenta el conjunto complejo de las rutas complementarias e interactivas que contribuyen a la regulación cualitativa y cuantitativa de las respuestas inmunes, con el fin de evitar una lesión tisular. En este contexto, afectar al sistema inmune frente a la tolerancia, es similar a emplear un regulador de la intensidad; es decir, más que causar un cambio absoluto de activación/desactivación de las rutas, la reactividad se disminuye. Por lo tanto, regímenes de tratamiento adicionales enfocados a las rutas de tolerancia, deben considerar esta complejidad a fin de no provocar una reactividad inmune tóxica.

- 35 Algunos regímenes de tratamiento centrados en la ruta de la tolerancia, como en las terapias de la artritis reumatoide, no son específicos del antígeno. Los datos sugieren que la disminución de la intensidad o la regulación a la baja de las respuestas inmunes de una manera no específica, puede provocar efectos indeseables con respecto a la frecuencia y la gravedad del episodio que, obviamente, varía según la terapia y el régimen individual. Por lo tanto, todavía existe una necesidad en la técnica de un método de tratamiento y de formulaciones y composiciones terapéuticas para hacer avanzar las técnicas de tratamiento inmune.

- 40 Albani et al., (2005, Arthritis and Rheumatism, 52:12, página 4059) describen un ensayo en fase II de inmunoterapia específica de epitopo en artritis reumatoide.

Koffeman et al., (2005, Current Opinion in Rheumatology, 17:5, 600-605) describen avances recientes en péptidos inmunomoduladores en enfermedades reumáticas juveniles.

O'Dell et al., (2002, Arthritis and Rheumatism, 46:5, página 1164) describen el tratamiento de la artritis reumatoide solo con metotrexato, sulfasalazina e hidroxicloroquina o una combinación de las tres medicaciones.

**45 Compendio de la invención**

La invención es tal y como se especifica en las reivindicaciones.

- 50 La presente invención se refiere a trastornos autoinmunes inflamatorios, tales como artritis reumatoide y otras enfermedades y trastornos autoinmunes humanos y al tratamiento de los mismos, que comprende la administración de una combinación de péptido(s) inmunomodulador(es) seleccionada entre una cualquiera de SEQ ID NOs: 1 a 57 y un derivado de cloroquina.

Se describen con fines ilustrativos métodos de tratamiento de trastornos autoinmunes mediante la administración a un paciente que lo requiera de una combinación de una cantidad terapéutica de uno o varios péptidos inmunomodu-

ladores y un derivado de cloroquina, para mejorar la toxicidad autoinmune en el paciente. El péptido inmunomodulador se selecciona entre el grupo de secuencias descritas en la Tabla I.

5 Se describe un método para el tratamiento de trastornos autoinmunes inflamatorios, tales como artritis reumatoide y otras enfermedades y trastornos autoinmunes humanos, incluyendo pero sin limitación artritis reumatoide (AR), artritis idiopática juvenil (AIJ), artritis psoriásica (AP) y psoriasis mediante administración a través de la mucosa de una combinación de péptido(s) inmunomodulador(es) y un derivado de cloroquina.

Se describen métodos de tratamiento de la AR, AIJ, AP y psoriasis que comprenden la administración a través de la mucosa de al menos un péptido inmunomodulador que comprende polipéptidos obtenidos a partir de una proteína de choque térmico o miméticos de los mismos, y al menos un derivado de cloroquina.

10 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que incluye una combinación de al menos un polipéptido inmunomodulador de choque térmico tal y como se ha definido anteriormente y al menos un derivado de cloroquina. La composición puede estar en fase sólida, coloidal, líquida, vapor o gaseosa. En una realización relacionada, la formulación puede incluir, además, sales farmacéuticamente aceptables y/u otras sustancias que son bien conocidas por los expertos normales en la técnica. En otra realización relacionada, la formulación puede comprender una mezcla de fórmulas para administrar a un paciente que lo requiera, o composiciones formuladas distintas, destinadas a ser administradas por separado, secuencial o simultáneamente, o cualquier combinación de las mismas para uso en un régimen de tratamiento para obtener un resultado beneficioso en un paciente.

15 Se describe con fines ilustrativos un régimen de tratamiento para administrar el(los) péptido(s) y el derivado de cloroquina. Generalmente, tanto el(los) péptido(s) como la cloroquina se pueden administrar juntos, en una forma absorbible por la mucosa de un paciente que lo requiera. Alternativamente, el(los) péptido(s) y los componentes de cloroquina se pueden administrar al paciente por separado en cualquier orden también mediante administración a través de la mucosa.

#### Breve descripción de los dibujos

25 Las Figuras 1A-1C son gráficos que muestran niveles de respuesta al tratamiento con péptido inmunomodulador e (hidroxi)cloroquina. Como se muestra en la Figura 1A, los destinatarios de dnaJP1 y HCQ según ACR20 muestran una respuesta sinérgica aparente sorprendente e inesperada. La Figura 1B muestra los resultados de la respuesta ACR 50, mientras que la Figura 1C muestra los resultados de ACR 70.

30 Las Figuras 2A-2C muestran los resultados de todos los pacientes en el estudio de acuerdo con los mismos criterios que en la Figura 1, a saber, la Figura 2A muestra el porcentaje de respuesta ACR20, la Figura 2B muestra los resultados de la respuesta ACR 50 mientras que la Figura 2C muestra los resultados de la respuesta ACR 70.

Las Figuras 3A-3C muestran los resultados para todos los pacientes en el estudio que no recibieron (hidroxi)cloroquina. La Figura 3A muestra el porcentaje de respuesta ACR20, Figura 3B muestra los resultados de la respuesta ACR 50, mientras que la Figura 3C muestra los resultados de la respuesta ACR 70.

35 Las Figuras 4A-4C muestran los resultados para todos los pacientes en el estudio que recibieron solo dnaJP1 o (hidroxi)cloroquina. La Figura 4A muestra el porcentaje de respuesta ACR20, La Figura 4B muestra los resultados de la respuesta ACR 50, mientras que la Figura 4C muestra los resultados de la respuesta ACR 70.

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra la correlación de una disminución de TNF $\alpha$  con la estimulación con dnaJP1, con un menor efecto observado para el placebo.

40 Las Figuras 6A y 6B son gráficos que muestran un cambio hacia un incremento de IL-10 después del tratamiento. Tal y como se ha indicado, los grupos de dnaJP1 se correlacionaban con un aumento, mientras que el grupo placebo no se correlacionaba.

45 Las Figuras 7A-7C muestran la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 a través de linfocitos T, de todos los pacientes tratados en el estudio con placebo (n = 79) y dnaJP1 (n = 81). Los resultados se expresan como la diferencia entre el día 168 y el día 0 en el porcentaje de linfocitos T CD3+ productores de IFN- $\gamma$  (Figura 7A). Las Figuras 7B y 7C muestran la correlación de la producción de IL-10. Tanto IFN- $\gamma$  como IL-10 se incrementaban en el grupo con la combinación HCQ-dnaJP1 el día 168.

Las Figuras 8A-8C muestran la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 de la misma manera que en las Figuras 7A-7C, excepto que los datos son para todos los pacientes que reciben HCQ.

50 Las Figuras 9A-9D son análisis de separación de células que muestran una comparación del número de linfocitos T específicos de dnaJP1 como un porcentaje del total de linfocitos T antes y después de la inducción de tolerancia a través de la mucosa con dnaJP1.

La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra que el tratamiento inmunomodulador está asociado con un aumento de la expresión de Fox P3.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona formulaciones útiles en el tratamiento de una variedad de trastornos autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn y esclerosis múltiple, artritis psoriásica y psoriasis.

- 5 La terminología usada en este documento tiene solo la finalidad de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente en las reivindicaciones adjuntas.

10 Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o varios métodos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento, que serán evidentes para las personas expertas en la técnica al leer esta descripción y demás.

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en la puesta en práctica o el ensayo de la invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora.

20 El término "proteína" o "péptido" tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, el cual incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. Una proteína puede estar compuesta de aminoácidos de origen natural y enlaces peptídicos, o de estructuras peptidomiméticas sintéticas. Por lo tanto "aminoácido" o "residuo peptídico", tal y como se emplea en esta memoria, significan ambos aminoácidos tanto de origen natural como sintético. Por ejemplo, homo-fenilalanina, citrulina y norleucina se consideran aminoácidos para los fines de la invención. "Aminoácido" también incluye residuos de iminoácidos tales como prolina e hidroxiprolina. Las cadenas laterales pueden estar en el la configuración (S) o la (R).

25 El término "citocina" se utiliza ampliamente en el presente documento para referirse a glicoproteínas solubles que son liberadas por células del sistema inmune y actúan de forma no enzimática a través de receptores específicos, para regular las respuestas inmunes. Como tal, el término "citocina" tal y como se usa en el presente documento, incluye quimiocinas, interleucinas, linfocinas, monocinas, interferones, factores estimulantes de colonias, factores de activación de plaquetas, factor de necrosis tumoral alfa y proteínas asociadas a receptores, así como fragmentos funcionales de las mismas.

30 Tal y como se usa en este documento, la expresión "fragmento funcional" se refiere a una porción peptídica o polipeptídica de una proteína que posee la función o la actividad biológica característica de la proteína natural. Por ejemplo, un fragmento funcional de IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$  tiene, por ejemplo, sustancialmente la misma actividad proinflamatoria que el IFN $\gamma$  o el TNF $\alpha$  de origen natural o producido de manera recombinante, respectivamente.

35 El término "anticuerpo" tal y como se usa en esta invención, abarca moléculas intactas de anticuerpos policlonales o monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, Fv y SCA que son capaces de unirse a un determinante epitópico.

40 El término "sujeto" tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier individuo o paciente en el que se lleva a cabo los métodos de la invención. Por ejemplo, un sujeto puede ser uno cualquiera que tiene o tiene riesgo de padecer una infección con citomegalovirus. Generalmente, el sujeto es humano, aunque tal y como será apreciado por los expertos en la técnica, el sujeto puede ser un animal.

45 El término y la expresión "muestra" y "muestra biológica" tal y como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier muestra adecuada para los métodos proporcionados en la presente invención. En una realización, la muestra biológica de la presente invención es una muestra de tejido, por ejemplo, una muestra de biopsia tal como muestras procedentes de una biopsia con aguja. En otras realizaciones, la muestra biológica de la presente invención es una muestra de fluido corporal, por ejemplo, suero, plasma, saliva, orina y eyaculado.

50 Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "condiciones de inmunización" significa que un péptido de la invención se pone en contacto con una célula o se administra a un sujeto de modo que puede efectuar su actividad inmunogénica. Como tal, el péptido, que es un inmunógeno de linfocitos T, se administrará en general en una cantidad inmunogénica, típicamente como una dosis de cebado seguida después de cierto tiempo por una o varias dosis de refuerzo, por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular, y, si se desea, formulado como una composición que incluye un inmunoadyuvante tal como adyuvante completo o incompleto de Freund.

55 Tal y como se usa en este documento, la expresión "condiciones de inducción de tolerancia" significa que un péptido de la invención se pone en contacto con una célula o se administra a un sujeto de tal manera que induce tolerancia hacia la actividad que de otro modo es inmunogénica. Como resultado, un sujeto, por ejemplo, se vuelve tolerante hacia el péptido, de tal manera que es reconocido como "propio" por el sujeto y no puede producir una respuesta inmune. Un péptido se puede administrar en condiciones que inducen tolerancia, administrando una cantidad que

induce la tolerancia hacia el péptido, en general, una pequeña cantidad durante un período de tiempo, por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular o, preferiblemente, por vía mucosa, por ejemplo, a través de un aerosol nasal o con la comida.

5 Tal y como se usa en el presente documento "células normales correspondientes" significa células que proceden del mismo órgano y del mismo tipo de trastorno o enfermedad examinada. En un aspecto, las células normales correspondientes comprenden una muestra de células obtenida a partir de un individuo sano. Tales células normales correspondientes pueden ser, pero no es necesario, de un individuo que tiene la misma edad y/o el mismo sexo que el individuo que proporciona la muestra que contiene las células que se van a examinar.

10 Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "mejorar" o "tratar" significa que los signos y/o los síntomas clínicos asociados con un trastorno autoinmune (p. ej., AR) se reducen como resultado de las acciones realizadas. Los signos o los síntomas que se deben controlar serán característicos de la enfermedad autoinmune y serán bien conocidos por el médico especialista, al igual que los métodos para controlar los signos y las afecciones. Además, los términos "reducir" e "inhibir" se utilizan conjuntamente porque se reconoce que, en algunos casos, una disminución, por ejemplo, en los signos o los síntomas asociados con un trastorno autoinmune se puede reducir por debajo del nivel de detección de un ensayo particular. Por ello, no siempre está claro si la actividad se "ha reducido" por debajo de un nivel de detección de un ensayo, o se "ha inhibido" completamente. No obstante, se podrá determinar claramente, después de un tratamiento de acuerdo con los presentes métodos, si los signos o los síntomas asociados con un trastorno autoinmune se han reducido al menos partiendo del nivel antes del tratamiento.

20 Hasta la fecha, se han empleado tres formas metodológicas independientes del antígeno para la inducción de tolerancia en el tratamiento de trastornos autoinmunes, a saber, intervenciones basadas en células y citocinas, y terapia con células madre.

#### Intervención biológica basada en células en la AR y tolerancia inmune

25 La tolerancia inmune es un proceso activo que no se puede establecer por la mera eliminación de células potencialmente autorreactivas. Esto fue recalado por el fracaso en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) con los primeros intentos de disminuir el número de linfocitos T reactivos. Además de los posibles efectos secundarios graves de esta metodología, las intervenciones terapéuticas que utilizan CAMPATH y un anticuerpo que reduce el número de CD-4, no tuvieron éxito en el control de la inflamación en la AR. Esto ha llevado a un cambio de metodología en las terapias basadas en células que no reducen el número de linfocitos T, sino que pueden modular potencialmente la función de los linfocitos T. De hecho, el recubrimiento de la molécula CD4 en lugar de solo reducir el número de linfocitos CD4, parece más beneficioso que la disminución del número de células.

30 Otras rutas para modular la activación de los linfocitos T incluyen la intervención a nivel de la coestimulación de los linfocitos T. En este contexto, el compuesto más estudiado es un antígeno 4 asociado con los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). Para una activación óptima de los linfocitos T, un linfocito T no solo recibe una señal a través de su receptor de linfocitos T (TCR) (señal 1), sino también a través de la coestimulación no específica del antígeno, en particular, CD28. CD28, expresado constitutivamente en los linfocitos T, interacciona con CD80 y CD86 en células presentadoras de antígeno para generar la señal 2. CTLA-4 se expresa en linfocitos T activados y se une con alta afinidad a CD80 y CD86 en células presentadoras de antígeno. Por lo tanto, anula la transmisión óptima de una señal coestimuladora a través de CD28 y contribuye a una regulación a la baja natural del linfocito T activado. CTLA-4 también puede inhibir directamente la activación de linfocitos T mediante la reducción de la producción de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2 y deteniendo los linfocitos T en la fase G1 del ciclo celular, aunque también se sugieren otros modos de acción.

40 La proteína de fusión del dominio externo de CTLA-4 con la cadena pesada de IgG1 humana (CTLA4-Ig) se une a CD80 y CD86 en células presentadoras de antígeno y por lo tanto bloquea la señal coestimuladora a través de CD28, imitando la regulación a la baja natural de la activación de linfocitos T. Como resultado, los linfocitos T autorreactivos pueden recibir todavía la señal 1, pero no reciben la señal 2 coestimuladora a través de CD28, lo que en consecuencia vuelve a estas células funcionalmente anérgicas. Por lo tanto, regímenes bien considerados, todavía no son adecuados para el uso clínico.

45 Diversos modelos animales de enfermedades autoinmunes también han mostrado una eficacia clínica de CTLA4-Ig para el control de la autoinmunidad. Por otra parte, ensayos testigo con placebo en pacientes con AR que recibían metotrexato, mostraron una mejoría de la actividad de la enfermedad en los pacientes tratados con CTLA4Ig. CTLA-4 Ig está también en estudio para otros ajustes en la AR y otras enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico. Obviamente, ya que el tratamiento está dirigido a bloquear la activación de linfocitos T en general, carece de especificidad. Los riesgos de una intervención a nivel de coestimulación se han destacado muy recientemente por los efectos secundarios drásticos en un ensayo clínico destinado a la intervención a través de CD28.

55 Otras intervenciones basadas en células en la AR incluyen la disminución del número de linfocitos B. Aunque la AR en toda regla se puede desarrollar incluso en ausencia de linfocitos B maduros, está disponible una amplia evidencia de una función de los linfocitos B y los autoanticuerpos en la patogénesis de la AR. Varios estudios han mostrado que de hecho, la disminución del número de linfocitos B empleando un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico

(rituximab) tiene efectos beneficiosos en la AR. El tratamiento con rituximab conduce a una disminución casi completa del número de linfocitos B periféricos que, obviamente, se consigue a costa de un aumento del riesgo de infecciones graves. Parece poco probable que la disminución del número de linfocitos B pueda influir beneficiosamente en la tolerancia de los linfocitos T, pero este tema no se ha abordado en los estudios hasta el momento.

## 5 Intervenciones basadas en citocinas en la AR y tolerancia inmune

Con respecto a intervenciones independientes de antígeno, se han empleado intervenciones basadas en citocinas, especialmente las basadas en el bloqueo de la ruta de TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  es un mediador importante en la inflamación y el daño articular en la AR. El efecto clínico primario del bloqueo de TNF $\alpha$  contribuye a la inhibición directa de los efectos del TNF $\alpha$  y citocinas aguas abajo. Sin embargo, en la AR y la artritis idiopática juvenil los llamados linfocitos T reguladores CD4+CD25+ presentes en la naturaleza, no son muy insuficientes en número sino en la función reguladora. Los células reguladoras CD4+CD25+ en la AR no son capaces de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias en los linfocitos T activados y los monocitos. Por otra parte, son incapaces de inducir un fenotipo regulador en linfocitos T efectoras CD4+CD25-. Después del tratamiento con infliximab, el número de linfocitos T reguladores en la sangre periférica se eleva significativamente. Sorprendentemente, también se restaura la función reguladora de estos linfocitos T reguladores que faltaba previamente. Estos cambios se observaron especialmente en pacientes que respondieron favorablemente a la terapia anti-TNF $\alpha$ , y por lo tanto sugiere que el restablecimiento de la función reguladora de linfocitos T y la tolerancia inmune pueden ser un factor en la eficacia clínica de esta terapia. Si el receptor soluble de TNF $\alpha$ , etanercept, tiene efectos similares sobre funciones reguladoras de linfocitos T está por determinar. Todavía se tiene que determinar si durante una terapia anti-TNF $\alpha$  a largo plazo, este estado de tolerancia se mantiene o se sustituye gradualmente por una inhibición inmune más pronunciada. Por desgracia, el restablecimiento de la función reguladora de los linfocitos T con una terapia anti-TNF $\alpha$  es insuficiente porque la retirada del tratamiento conduce a la reaparición de la enfermedad en cuestión de meses.

Otras intervenciones basadas en citocinas se están desarrollando, incluyendo la intervención a través de IL-1, IL-6, IL-15, IL-17 e IL-18, pero todavía no se ha determinado su lugar en el tratamiento de la AR.

## 25 Trasplante de células madre y tolerancia inmune

Durante aproximadamente una década, el trasplante autólogo de células madre (TACM) se ha utilizado como tratamiento para una enfermedad autoinmune refractaria grave. En la artritis, este tipo de tratamiento ha sido especialmente eficaz en la artritis idiopática juvenil (AIJ). Cabe destacar que una gran proporción de los pacientes que se sometieron a TACM, han tenido una remisión exenta de enfermedad de su grave enfermedad durante años, incluso sin un tratamiento inmunosupresor continuo. Por lo tanto, parece que después de un TACM, se induce tolerancia inmune y se mantiene incluso mucho tiempo después de que han desaparecido los efectos directos del tratamiento.

Un estudio reciente en niños con AIJ que se sometieron a TACM reveló que el restablecimiento de la tolerancia inmune se basa en el restablecimiento del compartimiento de linfocitos T reguladores a través de dos mecanismos distintos. Después del TACM, se observa un restablecimiento de los linfocitos T reguladores CD4+CD25+ que expresan FoxP3, debido a una expansión homeostática preferencial de los linfocitos T reguladores CD4+CD25+ durante la fase linfopénica de reconstitución inmune, y a una timopoyesis renovada de linfocitos T reguladores CD4+CD25+ vírgenes que expresan ARNm de FoxP3. Junto con el restablecimiento de estos linfocitos T reguladores 'naturales', TACM también induce linfocitos T específicos de la proteína de choque térmico propia para apartarse de un fenotipo proinflamatorio hacia un fenotipo más tolerogénico, que expresa IL-10 y GATA-3. Estos cambios profundos en el repertorio de los linfocitos T reguladores y sus aparentes consecuencias para la práctica clínica, acentúan las posibilidades terapéuticas de la inducción de tolerancia en enfermedades autoinmunes humanas. Obviamente, hay que evitar la necesidad de terapias de amplio alcance, como TACM e identificar diferentes metodologías que puedan restablecer igualmente con eficacia el equilibrio inmune.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un polipéptido inmunomodulador seleccionado a partir de una cualquiera entre SEQ ID NOs: 1 a 57 y una molécula de cloroquina para uso en el tratamiento de una afección autoinmune. Las rutas inmunes están afectadas utilizando polipéptidos de la enfermedad pertinentes, o miméticos de los mismos, que tienen propiedades inmunomoduladoras. Por lo tanto, en una realización, la administración de los polipéptidos de la invención provoca una respuesta reguladora del sistema inmune en un sujeto, induciendo cambios tanto en la rama innata como en la adaptativa de la respuesta inmune de una manera sinérgica, en particular induciendo cambios en la función de los linfocitos T reguladores y/o efectoras y el repertorio frente a un fenotipo tolerogénico.

La administración del derivado de cloroquina proporciona un efecto no específico sobre poblaciones de linfocitos T reactivas a través de varios mecanismos posibles, que incluyen, por ejemplo, una posible reducción en el procesamiento de motivos peptídicos pertinentes de la enfermedad, de modo que en última instancia hay menos péptido procesado, es decir, péptido procesado intracelularmente, que se puede unir y activar los receptores de linfocitos T efectoras activos. El mecanismo específico de acción del derivado de cloroquina no se conoce bien, pero se cree que incluye la inducción de un cambio en el pH dentro de liposomas de linfocitos T efectoras, en donde ese cambio disminuye o impide el procesamiento de motivos peptídicos propios causando a su vez, que menos péptido pertinente de la enfermedad tenga una oportunidad de unirse a receptores de linfocitos T. El resultado de una reducción de

## ES 2 455 167 T3

este tipo en el procesamiento peptídico es que linfocitos T/receptores de linfocitos T circulantes pueden ser una diana de motivos peptídicos que no son propios, tales como los péptidos enumerados en la Tabla I.

Tabla I

Fuente de péptido de choque térmico	Secuencia de aminoácidos peptídicos	SEQ ID NO:
20 humano (HSJ1)	KKAYRRKALQWHPDK	1
23 humano (HDJ2)	KKAYRKLALKYHPDK	2
21 humano (HDJ1)	KRAYRRQALRYHPDK	3
HLA S2 humano	KDLLEQKRAAVDTYC	4
HLA S1 humano	QKRAAVDTYCRHNYG	5
dnaJ 22 de E coli	RKAYRKLAMKYHPDR	6
dnaJpV mutante de E. coli	DERAAYDQYGHAAFE	7
dnaJP1 de E. coli	QKRAAYDQYGHAAFE	8
dnaJP 61-75 de E. coli	QKRAAYDQVGHAAFEQ	9
dnaJ 174-188 de E. coli	QGFFAVQQTCPHCQG	10
167 humano (HDJ2)	PGMVQQSVCMECQ	11
dnaJ 242-256 de E. coli	GDLYVQVQVKQHPIF	12
280-294 humano	GEALSTLVNRLKVG	13
269-307 humano	KPLVIAEDVDGEALSTLVNRLKVGGLQWAVKAPGFGD	14
256-270 de E. coli	GEALATLVVNTMRGI	15
Myc 254-268	GEALSTLVVNKIRGT	16
Myc HSP60 243-281	KPLLIAEDVEGEALSTLVVNKIRGTFKSVAVKAPGFD	17
Myc 503-517	IAGLFLTREAVVADK	18
Myc HSP60 494-527	KVTRSALQNAASIAGLFLTTEAVVADK PKEKA	19
510-524 de E. coli	VAGLMITTECMVTDL	20
535-546 humano	VASLLTTAEVVVTEI	21
523-656 humano	KVVRTALLDAAGVASLLTTAEVVVTEIP	22
256 humano (HDJ2)	EDLFMCMDIQLVEAL	23
3 humano (HDJ1)	KDYYQTLGLARGASD	24
5 humano (HDJ2)	TTYVDVLGVKPNATQ	25
2 humano (HSJ1)	ASYEILDVPRSASA	26
dnaJ 4 de E. coli	QDYEILGVSKTAAE	27
50 humano (HDJ2)	QAYEVLSDAKKRELYD	28
51 humano (HSJ1)	EAYEVLSDKHKREIYD	29
212-226 de E. coli	AVELESPFILLADKK	30
218-232 de E. coli	PFILLADKKISNIRE	31
Myc 210-224	EAVLEDPYILLVSSK	32

Fuente de péptido de choque térmico	Secuencia de aminoácidos peptídicos	SEQ ID NO:
Myc 216-230	PYILLVSSKVSTVKD	33
Myc 208-240	RQEAVLEDPYILLVSSKVSTVKDLLPLLE KVIG	34
dnaJ 209 de E. coli	SKTLSVKIPGAVDTG	35
242-256 humano	AYVLLSEKKISSIQS	36
234-266 humano	GQKCEFQDAYVLLSEKKISSIQSIVPALEIANA	37
236-250 humano	KCEFQDAYVLLSEKK	38
410-445 humano	SDVEVNEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLGGGCALL	39
Myc 383-418	TEVELKERKHRIEDAVRNAKAAVEEGIVAGGGVTLL	40
dnaJ 264 de E. coli	YCEVPINFAMAALGG	41
dnaJ 268 de E. coli	PINFAMAALGGEIEV	42
254 (HSJ1) humano	DLQLAMAYSLSEMEA	43
195-226 humano	RKGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKFDRGISP	44
469-502 humano	KRTLKIPAMTIAKNAGVEGSLIVEKIMQSSSE	45
164 humano (HSJ1)	FRSVSTSTTFVQGRR	46
176 humano (HSJ1)	GRRITTRRIMENGQE	47
134 humano (HSJ1)	SGPFFTFSSSFPGHS	48
270 humano (HDJ2)	LCGFQKPISTLDNRT	49
197 humano (HSJ1)	DGQLKSVTINGVPDD	50
283 humano (HDJ2)	RTIVITSHPGQIVKH	51
318 humano (HD J2)	GRLIIEFKVNFPENG	52
105-127 humano	TNEEAGDGTTTATVLARSIAKEG	53
Myc HSP60 80-102	TDDVAGDGTTTATVLAQALVREG	54
Myc HSP60 169-200	NEGVITVEESNTFGLQLELTEGMRFDKGISG	55
Myc HSP60 180-188	TFGLQLELT	56
Myc HSP60 441-478	KVALEAPLKQIAFNSSGLEPGVVAEKVRNLPAG	57

Los péptidos que tienen actividad inmunomoduladora comprenden los que se obtienen a partir de varias familias de proteínas inmunes pertinentes, en particular las proteínas de choque térmico. En una realización, el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. dnaJP1 (SEQ ID NO: 8) es reconocido específicamente en rutas que son pertinentes en la patogénesis de la artritis reumatoide. Otros péptidos que caen dentro de la clase general de péptidos inmunes relevantes procedentes de proteínas de choque térmico, son los que se enumeran en la Tabla I. Se describe un método que incluye la administración de un péptido inmunomodulador, tal como dnaJP1, u otro derivado de proteínas de choque térmico, en combinación con una molécula de cloroquina o un derivado de la misma. Moléculas de cloroquina ejemplares incluyen, pero sin limitación, (hidroxi)cloroquina, sulfato de hidroxicloroquina o una cloroquina sustituida.

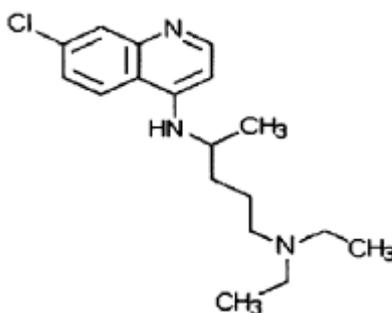
El péptido identificado como dnaJP1 se obtiene a partir de la proteína de choque térmico (hsp) dnaJ. Este péptido es un péptido propio/no propio, ya que se obtuvo a partir de dnaJ bacteriana pero comparte homología con su equivalente humano. Además, dnaJP1 contiene el casete de cinco aminoácidos que está presente en la mayoría de los alelos del HLA de clase II asociados con la AR. En un trabajo preclínico, el epítipo más pertinente se cartografió y se mostró su contribución a las respuestas de linfocitos T proinflamatorias *in vitro*, en pacientes con artritis reumatoide activa (AR). La hipótesis que subyace a este programa clínico es que la inducción de tolerancia a través de la

mucosa hacia dnaJP1 podría determinar una desviación inmune de los linfocitos T efectores proinflamatorios activados, y que tal desviación se podría traducir en un beneficio clínico. Conceptualmente, una diferencia importante con los intentos anteriores de inducción de tolerancia a través de la mucosa, es el hecho de que las respuestas a dnaJP1 parecen actuar sobre la amplificación de la inflamación autoinmune independientemente de su activador y, por lo tanto, es una diana adecuada para la inducción de la tolerancia inmune. De forma simultánea a la administración del péptido, se ha observado que una administración concomitante de un derivado de cloroquina proporciona un efecto sinérgico aparente, completamente inesperado y sorprendente con respecto al resultado clínico.

El derivado de cloroquina es una (hidroxi)cloroquina que puede incluir o no grupos R' que comprenden cualquier cantidad de estructuras moleculares que comprenden cualquier combinación de los siguientes átomos: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, cloro y azufre, ya que son comúnmente conocidos por los expertos en la técnica ordinaria de utilización de derivados de cloroquina para el tratamiento de trastornos del sistema inmune y otros. Más específicamente, la (hidroxi)cloroquina tiene una fórmula:



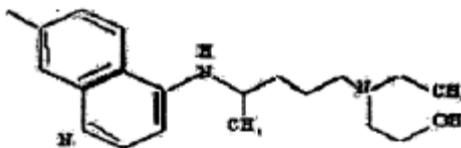
que tiene un peso molecular de 319,877 y la siguiente estructura:



Alternativamente, la (hidroxi)cloroquina puede comprender además un derivado de sulfato que tiene una fórmula molecular:



que tiene un peso molecular de 433,96 y la siguiente estructura:



En otra realización, el derivado de cloroquina puede comprender una cloroquina sustituida en donde un grupo R' que comprende cualquier cantidad de grupos laterales químicos, se puede unir a la molécula de cloroquina central.

El derivado de cloroquina (hidroxi)cloroquina (HCQ), un DMARD, se ha utilizado durante más de medio siglo para tratar la malaria y ciertas enfermedades autoinmunes como la AR, pero los mecanismos por los que logra sus efectos siguen siendo inciertos. Su eficacia relativa como agente antiinflamatorio es menor que la de otros agentes anti-reumáticos disponibles en la actualidad. En consecuencia, HCQ tiende a ser utilizado como un agente antiinflamatorio en pacientes con AR temprana y en pacientes con manifestaciones de la enfermedad menos agresivas. Debido a que los agentes antimaláricos tales como HCQ son lisosomotrópicos, y alteran el pH de los lisosomas, se ha sugerido que pueden afectar a diversas funciones dependientes del lisosoma en las células presentadoras de antígeno, tales como la asimilación y el transporte de moléculas del MHC. Esto a su vez podría tener otros efectos, tales como la alteración de la activación de los linfocitos T. También se ha observado que la HCQ tiene efectos inhibidores directos sobre los linfocitos T. Se ha mostrado que el tratamiento de células mononucleares con HCQ da lugar a una inhibición de la secreción de citocinas inflamatorias. Por lo tanto, los efectos sinérgicos de la presente combinación de péptido/HCQ efectúan una variedad de cambios complejos específicos en la inflamación impulsada por el sistema inmune, como es característico de la AR.

En otra realización, la invención comprende formulaciones farmacéuticas que comprenden una combinación de al menos un péptido inmunomodulador de la invención y un derivado de cloroquina. Alternativamente, las formulaciones de la invención pueden comprender formulaciones distintas del péptido inmunomodulador y el derivado de cloroquina, destinadas a ser administradas en un formato de terapia combinada. Por "formato de terapia combinada" se entiende un régimen terapéutico para administrar el péptido inmunomodulador y el derivado de cloroquina para lograr un resultado beneficioso en un paciente al que se está administrando la combinación de péptido inmunomodulador y derivado de cloroquina.

En los últimos años, la inmunología molecular ha proporcionado herramientas clave para una mejor comprensión de los mecanismos que contribuyen a la patogénesis de trastornos autoinmunes, incluyendo, pero sin limitación, la artritis reumatoide (AR). La naturaleza inflamatoria crónica de esta enfermedad se conoce ahora mejor y muchos de los mediadores y las rutas que amplifican los procesos inflamatorios y conducen a lesiones en los tejidos han sido identificados. Este progreso se ha traducido en la práctica clínica con la introducción de la primera generación de agentes biológicos que interfieren de forma eficaz con la cascada inflamatoria, bloqueando uno de sus componentes clave, por ejemplo una citocina inflamatoria tal como TNF- $\alpha$ .

Los avances en la comprensión de la regulación de las respuestas inmunes han cambiado nuestra percepción de los procesos básicos que subyacen en las enfermedades autoinmunes. Ahora se entiende bien que el reconocimiento de lo propio es un fenómeno fisiológico y necesario. La calidad y la intensidad de las respuestas inmunes están reguladas por mecanismos complejos que aseguran que el reconocimiento de lo propio no conduzca a una lesión, y que las respuestas inflamatorias necesarias, destinadas a la eliminación de un "peligro" percibido, como una infección, están reguladas a la baja una vez que se ha eliminado el "peligro". Por lo tanto, la tolerancia inmune es el conjunto complejo de rutas complementarias e interactivas que contribuye a la regulación cualitativa y cuantitativa de las respuestas inmunes con el fin de evitar la lesión tisular. En este contexto, la tolerancia inmune implica una regulación, en lugar de activar o desactivar completamente una ruta asociada con el sistema inmune específico. De acuerdo con este razonamiento, la autoinmunidad se definiría como una situación en la que estos mecanismos de tolerancia son defectuosos. Conceptualmente, en lugar de intentar controlar la inflamación actuando sobre una sola ruta de citocinas, la presente invención comprende restablecer la modulación fisiológica de la inflamación a través de la inducción de una tolerancia inmune.

Se describen métodos para inducir una tolerancia inmune de los linfocitos T con los péptidos inmunomoduladores de la invención, dependiendo de factores decisivos, tales como la dosis y la vía de administración y la afinidad y la biodisponibilidad del antígeno. Las respuestas de los linfocitos T, después de ponerse en contacto con los antígenos apropiados, comprenden desde ignorar la reactividad hasta la tolerancia/anergia y tales respuestas siguen típicamente una curva en forma de U cuando se compara la intensidad de la respuesta frente al nivel de señal recibida por el linfocito T. La señal, en este contexto, es la suma de estímulos primarios (MHC/péptido) y secundarios (por ejemplo, moléculas coestimuladoras y factores microambientales, incluyendo por ejemplo, la presencia de una molécula antiinflamatoria como por ejemplo un derivado de cloroquina). Con respecto a la administración de péptidos inmunomoduladores, la calidad y la intensidad de las respuestas de linfocitos T específicos de antígeno se ven muy afectadas según la vía de administración, la frecuencia y la concentración del antígeno utilizado. Por ejemplo, concentraciones excesivas de un inmunógeno, tal como un péptido reactivo, pueden conducir a una falta de respuestas debido a una anergia, mientras que concentraciones bajas no son eficaces ya que no se alcanza el umbral de activación. El microentorno también puede influir en el resultado inmunológico ya que la presencia de un agente tolerógeno o un medio proinflamatorio condiciona fuertemente la calidad de la respuesta de los linfocitos T efectores. Este efecto es especialmente evidente cuando se utiliza la mucosa como vía de administración.

Tal y como se usa en este documento, la expresión "inducción de la tolerancia a través de la mucosa" se refiere a la presentación de antígenos en el microentorno peculiar del sistema inmune a través de la mucosa. En el contexto de estímulos tolerogénicos, la inducción de tolerancia a través de la mucosa incluye ambos mediadores solubles, tales como TGF- $\beta$  e IL-10, y un fenotipo "tolerogénico" de las células dendríticas pertinentes (CD). Por lo tanto, la capacidad de reconocimiento de los antígenos a través de linfocitos T específicos permanece intacta, pero la calidad de la respuesta cambia, induciendo frecuentemente una desviación inmune desde una respuesta inflamatoria a una de tipo tolerógeno.

En la autoinmunidad humana, las rutas patogénicas específicas de antígeno son con seguridad múltiples y, por lo tanto, influir sobre una ruta individual puede ser irrelevante terapéuticamente. Sin embargo, en la presente invención, la inducción de tolerancia a través de la mucosa se puede caracterizar como "infecciosa", en la medida que la regulación a través de linfocitos T específicos de antígeno puede afectar a mecanismos efectores con una especificidad diferente. Por lo tanto, la tolerancia a través de la mucosa, específica de antígeno tiene el potencial de afectar a rutas patógenas no relacionadas y, de este modo, tener un impacto terapéutico. A posteriori, en la presente invención, los antígenos seleccionados para la inducción de tolerancia inmune, reflejan los antígenos que participan en la modulación de la inflamación de una forma independiente del agente desencadenante para lograr un potencial terapéutico mejorado. Tales antígenos deben estar disponibles, y posiblemente se deben hiperexpresar en los sitios inflamatorios. Las respuestas inmunes hacia tales antígenos, incluyendo los péptidos expuestos en la Tabla I, se correlacionan con la actividad clínica de la enfermedad. Una correlación entre la inflamación clínica e inmunológica de las respuestas específicas de antígeno indica que el antígeno seleccionado está participando en mecanismos de modulación del reconocimiento y la respuesta inmune.

Por lo tanto, las respuestas inmunes frente a hsp se reconocen como un medio poderoso para que el sistema inmune reaccione frente a la percepción de "peligro". Específicamente, el reconocimiento de hsp indica la presencia de una infección y la necesidad de eliminarla a través de potentes respuestas inflamatorias que a su vez provocan mecanismos de rutas de respuesta inmune innata, junto con una modulación más sofisticada específica del epítipo dependiente de linfocitos T. Las respuestas inmunes frente a hsp se generan en sitios en donde se produce una inflamación y, por lo tanto, pueden tener un efecto amplificador inicial que tiene que ser modulado. La presente invención proporciona tal modulación lo que conduce a una regulación a la baja progresiva de la respuesta inflamato-

ria con el fin de evitar un daño tisular. Los mecanismos para esta regulación implican más probablemente linfocitos T con función reguladora que son específicos de antígenos obtenidos a partir de hsp. Esta función reguladora es un componente a nivel molecular que crea un "atenuador molecular", cuya función fisiológica es modular la inflamación independientemente de su agente desencadenante. En la autoinmunidad, la función moduladora es defectuosa, pero se puede recuperar para fines terapéuticos. Es importante destacar que péptidos inmunomoduladores, tales como los descritos en la Tabla I, proporcionan una respuesta inmune para la modulación requerida.

Se describe un método para identificar un agente útil para el tratamiento de un trastorno autoinmune (por ejemplo, AR) solo con fines ilustrativos. Un agente útil en cualquiera de los métodos descritos puede ser cualquier tipo de molécula, por ejemplo, un polinucleótido, un péptido, un peptidomimético, peptoides tales como peptoides vinillogos, una molécula orgánica pequeña, o similares, y puede actuar en cualquiera entre diversas maneras para mejorar el trastorno autoinmune. El agente se puede administrar en cualquier forma típica de un agente usado para tratar el tipo particular de trastorno autoinmune, o en condiciones que faciliten el contacto del agente con las células diana y, en su caso, entrar en las células. La entrada de un agente polinucleotídico en una célula, por ejemplo, se puede facilitar mediante la incorporación del polinucleótido en un vector vírico que puede infectar las células. Si un vector vírico específico del tipo de célula no está disponible, el vector se puede modificar para expresar un receptor (o ligando) específico de un ligando (o receptor) expresado en la célula diana, o se puede encapsular dentro de un liposoma, que también se puede modificar para incluir un ligando de este tipo (o receptor). Un agente peptídico se puede introducir en una célula a través de varios métodos, incluyendo, por ejemplo, la manipulación genética del péptido para que contenga un dominio de transducción proteica, tal como el dominio de transducción proteica TAT del virus de la inmunodeficiencia humana, que puede facilitar la translocación del péptido en la célula.

Los agentes candidatos abarcan numerosas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños (es decir, moléculas pequeñas) que tienen un peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2500 daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos comprenden frecuentemente estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o varios de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos también se encuentran entre las biomoléculas que incluyen péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los agentes candidatos se pueden obtener a partir de una amplia variedad de fuentes, que incluyen genotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos aleatorios. Alternativamente, genotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Además, las genotecas y los compuestos naturales o producidos sintéticamente se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Agentes farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación para producir análogos estructurales.

Los métodos descritos en esta memoria son útiles para proporcionar un medio para la puesta en práctica de la medicina personalizada, en donde el tratamiento se adapta a un sujeto basándose en las características particulares del trastorno autoinmune (por ejemplo, AR) en el sujeto. El método se puede poner en práctica, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra de células del sujeto con un péptido inmunomodulador de la invención, en combinación con una molécula de cloroquina, en donde una disminución de los signos y/o síntomas asociados con la enfermedad autoinmune en presencia del péptido inmunomodulador y la molécula de cloroquina, en comparación con los signos y/o síntomas asociados con la enfermedad autoinmune en ausencia del péptido inmunomodulador y la molécula de cloroquina, identifica al péptido como útil para el tratamiento de la enfermedad. La muestra de células examinadas de acuerdo con el presente método se puede obtener a partir del sujeto que se va a tratar, o pueden ser células de una línea celular establecida del mismo tipo que la del sujeto. En un aspecto, la línea celular establecida puede ser una de un panel de líneas celulares de este tipo, en donde el panel puede incluir diferentes líneas celulares del mismo tipo de enfermedad y/o diferentes líneas celulares de diferentes trastornos autoinmunes. Tal panel de líneas celulares puede ser útil, por ejemplo, para poner en practicar el presente método, cuando solo se puede obtener un pequeño número de células a partir del sujeto que se va a tratar, proporcionando de este modo una muestra sustituta de las células del sujeto, y también puede ser útil para incluir como testigos, muestras en la puesta en práctica de los presentes métodos.

Una vez que se establece la enfermedad y se inicia un protocolo de tratamiento, los métodos descritos en esta memoria se pueden repetir sobre una base regular para evaluar si el nivel o la intensidad de los síntomas relacionados con el trastorno autoinmune en el sujeto, comienza a aproximarse al que se observa en un sujeto normal. Los resultados obtenidos a partir de ensayos sucesivos se pueden utilizar para mostrar la eficacia del tratamiento durante un período que oscila desde varios días a meses. Por consiguiente, se describen métodos con fines ilustrativos para el seguimiento de un régimen terapéutico para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno autoinmune. Una comparación del nivel de los signos y los síntomas relacionados con el trastorno autoinmune antes y durante la terapia indica la eficacia de la terapia. Por lo tanto, un experto en la técnica será capaz de reconocer y ajustar la metodología terapéutica según sea necesario.

Para la administración a un sujeto, un péptido o un polinucleótido que lo codifica, se formula generalmente como una composición. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición que contiene generalmente, además del péptido o del polinucleótido de la invención, un vehículo en el que el péptido o el polinucleótido se pueden formular convenientemente para la administración. Por ejemplo, el vehículo puede ser una solución acuosa tal como solución salina tamponada fisiológicamente u otro disolvente o vehículo, tal como un glicol, glicerol, un aceite tal como aceite de oliva o un éster orgánico inyectable. Un vehículo también puede incluir un compuesto fisiológicamente aceptable que actúa, por ejemplo, para estabilizar el péptido o el polinucleótido que lo codifica o para incrementar su absorción.

Compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros agentes estabilizadores o excipientes. De manera similar, una célula que se ha tratado en cultivo con el fin de la puesta en práctica de los métodos de la invención, por ejemplo, células mononucleares del líquido sinovial, células dendríticas o similares, también se pueden formular en una composición cuando las células se van a administrar a un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas son bien conocidas en las técnicas médicas y pueden incluir formulaciones en forma sólida tal como un comprimido que se administra por vía oral. Las formulaciones de la invención también pueden incluir formulaciones líquidas, en gel, semisólidas, coloidales, en fase de vapor y gaseosas, adecuadas para la administración oral, nasal, bronquial, intestinal o colonal (anal y perianal). En una realización, las composiciones de la invención se administran a través de la mucosa (es decir, la mucosa del sujeto). Por mucosa se entiende cualquier mucosa del cuerpo, incluyendo la oral, nasal, bronquial, esofágica, intestinal, y anal o perianal.

El médico especialista reconocerá que la elección de un vehículo, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la manera en que se va a administrar el péptido o el polinucleótido que lo codifica, así como de la ruta de administración de la composición. Cuando la composición se administra en condiciones de inmunización, es decir, como una vacuna, por lo general se administra por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea, pero también se puede administrar por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, y se puede administrar mediante inyección, intubación u otro método de este tipo conocido en la técnica. Cuando la modulación deseada del sistema inmune es la inducción de tolerancia, la composición se administra preferiblemente por vía oral, o se puede administrar como se ha descrito anteriormente.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" significa la cantidad de un compuesto o una composición farmacéutica que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que está siendo buscada por el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico clínico. Por lo tanto, la cantidad total de una composición que se va a administrar en la puesta en práctica de un método de la invención, se puede administrar a un sujeto como una dosis única, ya sea como un bolo o por infusión durante un período relativamente corto de tiempo, y puede ser objeto de seguimiento con una o varias dosis de refuerzo durante un período de tiempo. La cantidad de composición necesaria para estimular una respuesta inmune en un sujeto depende de varios factores que incluyen la edad y la salud general del sujeto, así como la vía de administración y el número de tratamientos que se van a administrar. De cara a estos factores, el médico especialista sabrá ajustar la dosificación particular según sea necesario. En general, la formulación de la composición y las vías y la frecuencia de administración se determinan inicialmente, empleando ensayos clínicos de Fase I y Fase II.

La cantidad total de un compuesto o una composición que se va a administrar de acuerdo con la invención se puede administrar a un sujeto en una dosis única, ya sea como un bolo o por infusión durante un período de tiempo relativamente corto, o se puede administrar utilizando un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran dosis múltiples durante un período de tiempo prolongado. Un experto en la técnica sabrá que la cantidad de las composiciones de la invención para tratar un trastorno autoinmune en un sujeto, depende de muchos factores incluyendo la edad y la salud general del sujeto, así como la vía de administración y el número de tratamientos que se van a administrar. En vista de estos factores, el experto en la técnica ajusta la dosis particular según sea necesario. En general, la formulación de la composición farmacéutica y las rutas y la frecuencia de la administración se determinan, en principio, empleando los ensayos clínicos de Fase I y Fase II.

En general, las formulaciones del tratamiento que comprenden tanto los componentes peptídicos como de cloroquina, o formulaciones en las que el componente peptídico está en una formulación distinta de la cloroquina, se pueden administrar en dosis juntas, por separado, en cualquier orden de modo que el resultado clínico se diseña para que afecte al sistema inmune con respecto al estado de la enfermedad. Por ejemplo, un estado de enfermedad crónica puede requerir un régimen de dosificación de cada componente ajustado de manera diferente a un estado de enfermedad incipiente. Generalmente, una dosis única de un péptido de la invención (por ejemplo, dnaJP1) puede ser de 2,5 a 100 miligramos, por lo general entre 10 y 70 mg, e incluso más típicamente entre 20 y 50 mg. En una realización, una dosis única puede comprender 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o incluso 50 mg. Con respecto al derivado de cloroquina, una dosis única puede comprender generalmente entre 150 a 500 mg del derivado de cloroquina, por lo general entre 190 y 450 mg, y aún más típicamente entre 200 y 400 mg. Con respecto a cada uno de los péptidos inmunomoduladores y derivados de cloroquina, en una realización, el componente peptídico está destinado a ser administrado al menos una vez al día, y el componente de cloroquina está destinado a ser administrado al menos dos veces al día. En otra realización, el componente peptídico se puede administrar al menos dos veces al día,

mientras que el componente de cloroquina se puede administrar al menos dos veces al día.

Los términos "administración" o "administrar" se definen para incluir un acto que proporciona un compuesto o una composición farmacéutica de la invención a un sujeto que requiere un tratamiento. Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utilizan en esta memoria, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal. Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" tal y como se utilizan en esta memoria, significan la administración de un compuesto, un fármaco u otro material de una forma que no sea directamente en el sistema nervioso central, de tal manera que entra en el sistema del sujeto y, por lo tanto, está sometido al metabolismo y a otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

La eficacia de un método terapéutico descrito en esta memoria a lo largo del tiempo, se puede identificar por la ausencia de síntomas o signos clínicos de una enfermedad inmunológica en un sujeto predispuesto a la enfermedad, pero que aún no muestra los signos o los síntomas de la enfermedad en el momento del inicio de la terapia. En sujetos con diagnóstico de trastorno inmunológico, u otra afección en la que es deseable modular la respuesta inmune, la eficacia de un método de la invención se puede evaluar midiendo una disminución en la gravedad de los signos o los síntomas del sujeto o por el reporte de un criterio de valoración alternativo para el trastorno. Un experto en la técnica será capaz de reconocer y ajustar la metodología terapéutica según sea necesario. Por consiguiente, se describen en esta memoria métodos con fines ilustrativos para el seguimiento de un régimen terapéutico para tratar un sujeto que tiene un trastorno autoinmune.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente las ventajas y las características de la presente invención, pero no pretenden limitar el alcance de la invención.

**Ejemplo 1**

25 Terapia combinada con HCQ y dnaJP1

Este ejemplo muestra la eficacia de las formulaciones de la invención, y un régimen de administración para el tratamiento de la artritis reumatoide.

Un ensayo ITT a doble ciego, controlado con placebo fue diseñado para someter a ensayo por primera vez si la inducción de tolerancia inmune hacia dnaJP1 observada en el ensayo, se traducía en una mejoría clínica de la enfermedad. dnaJP1 se sometió a ensayo como un inductor de primera línea de la remisión en pacientes con AR temprana. Centrándose en la captura de eventos de inducción de la tolerancia a lo largo del tiempo, en lugar de centrarse estrictamente en el éxito, determinó la elección de un criterio de valoración no convencional (AUC para los puntos temporales 112, 140 y 168 días desde el inicio), en lugar del último valor observado más tradicional. Se encontró que dnaJP1 era seguro y bien tolerado y la tasa de eventos adversos era similar en ambos grupos placebo y dnaJP1. La Tabla II muestra los parámetros generales del estudio.

Tabla II

Métodos del ensayo clínico de Fase II con dnaJP1 en AR	
Fármaco del estudio/comparador	Péptido dnaJP1 25 mg vía oral diaria/placebo 25 mg vía oral diaria
Criterios de selección	> 18 años; CMSPs reactivas a dnaJP 1 <i>in vitro</i> ; AR activa; sin enfermedad interna o cáncer significativos; duración de la enfermedad <5 años; sin embarazo ni lactancia
Medicación permitida	AINEs (dosis estable), hidroxiclороquina, sulfasalazina, prednisona (<7,5 mg/día)
Medicación prohibida (requiere 6 semanas de periodo de reposo)	Metotrexato, agentes anti-TNFa, prednisona (>7,5 mg/día), oro, penicilamina, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina
Instalaciones clínicas y lugares	Clínicas para pacientes ambulatorios de 11 centros importantes en los EE.UU. y Méjico
Método aleatorizado	Diseño de bloques permutados con un tamaño de bloque pequeño, estratificación por centro
enmascaramiento	Doble ciego
duración	168 días + 28 días de seguimiento (FU, del inglés "follow-up")

Métodos del ensayo clínico de Fase II con dnaJP1 en AR	
Fármaco del estudio/comparador	Péptido dnaJP1 25 mg vía oral diaria/placebo 25 mg vía oral diaria
Intervenciones	MHAQ y VAS contestados por el paciente Examen médico del dolor e inflamación en las articulaciones Valoración global de la gravedad de la enfermedad por un médico Registro de cambios en la medicación, cumplimiento de la prescripción, eventos adversos Extracción de sangre*, análisis de orina rutinario y test de embarazo y recogida de saliva
Criterio de valoración primario	Area bajo la curva (AUC) obtenida añadiendo los códigos de respuesta (0= sin respuesta, 1 = respuesta) para visitas los días 112, 140 y 168 (resultado individual 0, 1, 2, 3)
Tamaño de la muestra	160: 79 placebo, 81 dnajP1, basado en una potencia del 80% y respuesta ACR20 del 20% en placebo y 40% en el grupo de dnaJP1 el día 168
Resumen de los métodos utilizados para el ensayo clínico de fase II con dnaJP1 en AR. AINEs= fármacos antiinflamatorios no esteroides, MHAQ=Cuestionario de determinación de la salud modificado, VAS=Escalas visuales análogas para el dolor y la actividad de la enfermedad. *Extracción de sangre para el factor reumatoide, ESR y CRP, CBC con diferencial, ALT, creatinina, albúmina y proteína total y otro estudio inmunológico.	

La (hidroxi)cloroquina mostraba una interacción sinérgica con el tratamiento con dnaJP1 en la medida en que el efecto clínico del tratamiento con dnaJP1 era superior al placebo en los dos grupos de pacientes que utilizaron HCQ (placebo + HCQ n = 46, dnaJP1 n = 45). Estos dos grupos eran homogéneos ya que su actividad de la enfermedad y otras características clínicas y demográficas eran totalmente comparables. No hubo un efecto de medicación concomitante sobre estos resultados. Por lo tanto, la inmunoterapia específica de epítopo se describe por tener un efecto verdaderamente incrementado cuando se toma en combinación con HCQ.

El mecanismo de acción muestra sinergismo. Por encima de todo, dnaJP1 muestra un efecto clínico sostenido que es superior al placebo. El resultado de las ACR a lo largo del tiempo también muestra esta superioridad. El efecto clínico de dnaJP1 es más elevado en los pacientes que utilizaron (hidroxi)cloroquina. El resultado clínico en los grupos de dnaJP1 y placebo fueron evaluados de acuerdo con los criterios de respuesta del Colegio Americano de Reumatología (ACR). Tiene un interés particular, el resultado clínico empleando criterios ACR20, ACR50 y ACR70. Por ACR20, ACR50 y ACR70 se entienden los criterios de respuesta compuestos que han mostrado medir diferencias significativas entre el placebo y los fármacos del ensayo y han alcanzado con los criterios un 20%, 50% o 70% de respuesta al tratamiento, respectivamente. Se aplicó la definición preliminar del ACR de mejoría en artritis reumatoide, es decir, mayor o igual a una mejora del 20, 50 o 70% en el número de articulaciones dolorosas, una mejora del 20, 50 o 70% en el número de articulaciones inflamadas y una mejora del 20, 50 o 70% en 3 de los siguientes 5 índices: 1) Evaluación del dolor efectuada por el paciente; 2) Evaluación global del paciente; 3) Evaluación global del médico; 4) Estado funcional autoevaluado por el paciente (utilizando MHAQ); y 5) Reactantes de fase aguda (ESR o CRP). Una mejora significativa se define por haber cumplido cualquiera de los criterios anteriores en el criterio de valoración. Los pacientes se definen como "que responden" si cumplen con los criterios de respuesta en cualquier momento durante el estudio.

En cada una de las Tablas III, IV, V y VI se aplica lo siguiente: la columna izquierda es día(s) después de la primera administración, es decir, el día 112, 140, 168 y FU ("seguimiento", que significa tiempo de muestreo 1 mes después de la dosis final el día 168); la segunda columna y la tercera, en cada una dos grupos de pacientes, son pacientes que responden con ACR20, número de sujetos y porcentaje de pacientes que responden; y pacientes que responden con ACR50, número de sujetos y porcentaje de pacientes que responden. Se muestran los valores de P para el área bajo la curva (AUC) para los días 112-168 y los días 112-FU. Los datos en cada Tabla (III, IV, V y VI) se corresponden con los datos mostrados en las Figuras 1 a 4, respectivamente. Los datos muestran pacientes que responden con ACR en cada grupo de tratamiento, los diferentes días de visita durante todo el estudio. Los valores de P se marcan para la prueba de la que se han obtenido con: ££ = prueba de Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) (Biochem J. abril 2006, V48(2) págs. 319-326), ♦ = Metodologías de ecuaciones de estimación generalizadas (GEE) (J. Biopharm Stat. 2005 V1 5(6) págs. 993-1007).

Los grupos de tratamiento comprenden: 1) Todos los usuarios de (hidroxi)cloroquina, placebo frente a dnaJP1 (Figuras 1A-C); 2) Todos los pacientes en el estudio, independientemente de recibir o no recibir (hidroxi)cloroquina (Figuras 2A-C); 3) Todos los no usuarios de (hidroxi)cloroquina, placebo frente a dnaJP1 (Figuras 3A-C); y 4) dnaJP1 solo

frente a placebo:(hidroxi)cloroquina sola (Figuras 4A-C).

5 (Nota: Las Figuras 1A-C y 2A-C representan comparaciones de grupos que no mostraron diferencias en las características iniciales indicando que la respuesta de la administración combinada de dnaJP1 y un derivado de cloroquina proporciona resultados sinérgicos sorprendentes e inesperados, inasequibles con la administración de cualquiera de los dos individualmente. Las Figuras 4A-C sin embargo comparan usuarios de (hidroxi)cloroquina en el grupo placebo con no usuarios de (hidroxi)cloroquina en el grupo de dnaJP1. Dado que estos grupos eran diferentes en las características iniciales, una comparación directa es pertinente con respecto al resultado en general.

En la Tabla III se muestran los resultados del estudio con respecto a pacientes que reciben dnaJP1 y derivado de cloroquina.

10 Tabla III

Pacientes que reciben dnaJP1 y derivado de cloroquina				
	Que responden con ACR 20		Que responden con ACR 50	
			número	(porcentaje)
	Placebo (n=46) número (porcentaje)	dnaJP1 (n=45) número (porcentaje)	Placebo (n=46) número (porcentaje)	dnaJP1 (n=45) número (porcentaje)
Día 112	16 (34,8)	20 (44,4)	11 (23,9)	8 (17,8)
Día 140	12 (26,1)	21 (46,7)	9 (19,6)	14 (31,1)
Día 168	9 (19,6)	18 (40,0)	8 (17,4)	13 (28,9)
Día FU	10 (21,7)	22 (48,9)	8 (17,4)	15 (33,3)
AUC 112, 140, 168	CMH p=0,04*		CMH p=0,47	
	GEE p=0,02*		GEE p=0,19	
AUC 112, 140, 168, FU	CMH p=0,02*		CMH p=0,27	
	GEE p=0,002*		GEE p=0,04*	

\* representa valores que son significativos porque son menores que el valor de p 0,05

15 Específicamente, los datos de la Tabla III muestran una clara dicotomía entre el grupo de tratamiento y el grupo placebo para ACR 20 y 50, evidente después del día 140, una posible consecuencia del tiempo que requiere el péptido y/o el péptido combinado y HCQ para ejercer un efecto. Se muestra el porcentaje de pacientes que responden con ACR en los subgrupos, definidos en este documento como placebo y dnaJP1 con ACR 20 y placebo y dnaJP1 con ACR 50, los datos que reflejan el tratamiento con placebo o dnaJP1 y el uso concomitante de (hidroxi)cloroquina, en los diferentes días de visita a lo largo del estudio. Los valores de P se obtienen con la prueba de chi cuadrado.

20 Tal y como se muestra en la Figura 1A, el gráfico indica una sinergia no obvia, de hecho inesperada y sorprendente, entre una dosificación combinada predeterminada, de pacientes que padecen los efectos de artritis reumatoide, tanto con dnaJP1 como con (hidroxi)cloroquina, los pacientes que responden en este ensayo fundamental se aproximan al 50%. Como se muestra en la Figura 1B, los criterios de ACR 50 indican una respuesta mayor del 30% sobre el placebo con menos del 20%. La Figura 1C muestra la respuesta a criterios de ACR70 que indica que incluso para los criterios más estrictos de una mejora del 70% en el estado de la enfermedad, el péptido dnaJP1 mostró un resultado significativo.

25

Los datos procedentes del segundo grupo de pacientes, que incluye todos los pacientes en el ensayo, se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV  
Todos los Pacientes

	Que responden con ACR 20		Que responden con ACR 50	
			número	(porcentaje)
	Placebo (n=79) número (porcentaje)	dnaJP1 (n=81) número (porcentaje)	Placebo (n=79) número (porcentaje)	dnaJP1 (n=81) número (porcentaje)
Día 112	25 (31,5)	31 (38,3)	15 (19,0)	12 (14,8)
Día 140	21 (26,6)	32 (39,5)	13 (16,5)	21 (25,9)
Día 168	19 (24,1)	28 (34,6)	14 (17,7)	19 (23,5)
Día FU	17 (21,5)	33 (40,7)	11 (13,9)	22 (27,2)
AUC 112, 140, 168	CMH p=0,09		CMH p=0,44	
	GEE p=0,02*		GEE p=0,24	
AUC 112, 140, 168, FU	CMH p=0,03*		CMH p=0,20	
	GEE p=0,002*		GEE p=0,02*	
* representa valores que son significativos porque son menores que el valor de p 0,05				

5

En la Tabla IV, el criterio de valoración de eficacia primaria del área bajo la curva (AUC) de las tasas de respuesta ACR20 los días 112, 140 y 168 alcanzaron un valor p de 0,09 alcanzado con CMH y 0,02 con GEE, que tiene en cuenta la variabilidad entre los centros. La AUC de ACR 50 también fue positiva con GEE (p = 0,02). Los análisis posteriores se realizaron teniendo en cuenta los datos que faltaban como fracasos. Comparando la eficacia entre los grupos en puntos temporales individuales, se encontró una significancia estadística para varios puntos temporales, incluyendo el último también para ACR 50. Los efectos placebo fueron inusualmente altos para ACR50 y 70, en comparación con los datos de anamnesis en la bibliografía. Una mejora especialmente significativa en los signos y los síntomas de la AR en la visita de seguimiento el día 196, indica un efecto duradero del fármaco, por lo tanto un resultado beneficioso para el paciente. Incluso incluyendo en los datos pacientes que no utilizan HCQ, se puede observar una sinergia como significativa. Tal y como se muestra en las Figuras 2A-2C correspondientes, para los pacientes que recibieron HCQ y los que no recibieron HCQ de cada grupo de dnaJP1 y del grupo placebo, la respuesta ACR20 es superior al 40% en comparación con una tasa de placebo del 20% que aparece incrementada debido a la presencia de usuarios de HCQ en los datos. Es probable que la tasa de respuesta global tal y como se muestra en la Figura 2<sup>a</sup>, sea menor que en la Figura 1A debido a la influencia de la administración de dnaJP1 solo en los datos. La Figura 2B muestra la respuesta ACR50 mientras que la Figura 2C muestra la respuesta ACR70, siendo ambas similares a los resultados mostrados en las Figuras 1A-C.

20

El tercer grupo que comprende todos los no usuarios de (hidroxi)cloroquina mostraba los datos que se muestran en la Tabla V.

Tabla V

Todos los no usuarios de (hidroxi)cloroquina				
	Que responden con ACR 20		Que responden con ACR 50	
			número	(porcentaje)
	Placebo (n=33) número (porcentaje)	dnaJP1 (n=36) número (porcentaje)	Placebo (n=33) número (porcentaje)	dnaJP1 (n=36) número (porcentaje)
Día 112	9 (27,3)	11 (30,6)	4 (12,1)	4 (11,1)
Día 140	9 (27,3)	11 (30,6)	4(12,1)	7 (19,4)
Día 168	10 (30,3)	10 (27,8)	6 (18,2)	6 (16,7)
Día FU	7 (21,2)	11 (30,6)	3 (9,1)	7 (19,4)
AUC 112, 140, 168	CMH p=0,91		CMH p=0,91	
	GEE p=0,82		GEE p=0,78	
AUC 112,140, 168, FU	CMH p=0,84		CMH p=0,72	
	GEE p=0,58		GEE p,51	

- 5 Tal y como se muestra en las Figuras 3A-3C correspondientes, se comparan cada uno de los grupos de dnaJP1 y el grupo placebo, La respuesta ACR20 de dnaJP1 o del placebo es parecida, pero dnaJP1 proporciona una ventaja. La Figura 2B muestra la respuesta ACR50 mientras que la Figura 2C muestra la respuesta ACR70.

El cuarto grupo que comprende (hidroxi)cloroquina sola frente a dnaJP1 solo mostraba los datos que se muestran en la Tabla VI.

10

Tabla VI

Todos los pacientes con (hidroxi)cloroquina sola frente a dnaJP1 solo				
	Que responden con ACR 20		Que responden con ACR 50	
			número	(porcentaje)
	Placebo (n=46) número (porcentaje)	dnaJP1 (n=36) número (porcentaje)	Placebo (n=46) número (porcentaje)	dnaJP1 (n=36) número (porcentaje)
Día 112	16 (34,8)	11 (30,6)	11 (23,9)	4 (11,1)
Dav 140	12 (26,1)	11 (30,6)	9 (19,6)	7 (19,4)
Día 168	9 (19,6)	10 (27,8)	8 (17,4)	6 (16,7)
Día FU	10 (21,7)	8 (17,4)		
	11 (30,6)	7 (19,4)		
AUC 112, 140, 168	CMH p=0,21		CMH p=0,53	
	GEE p=0,71		GEE p=0,38	
AUC 112,140,168, FU	CMH p=0,14		CMH p=0,36	
	GEE p=0,58		GEE p=0,57	

Tal y como se muestra en las Figuras 4A-4C correspondientes, cada uno de los grupos de dnaJP1 solo e (hidroxi)cloroquina sola, se comparan, La respuesta ACR20 de dnaJP1 muestra que dnaJP1 proporciona una ventaja. La Figura 4B muestra una respuesta ACR50 mientras que la Figura 4C muestra una respuesta ACR70, indicando de forma esporádica, que tienen un efecto a lo largo del tiempo.

- 5 El conjunto de datos que se muestra aquí complementa los resultados clínicos e inmunológicos que se han mostrado anteriormente. Específicamente, los datos preliminares se proporcionan aquí con respecto a nuestro trabajo en: i) la caracterización de los efectos inmunológicos de la terapia combinada con HCQ/dnaJP1; ii) la caracterización de la función Treg en pacientes con AR tratados con dnaJP1, y iii) la detección de linfocitos T específicos de dnaJP1 mediante captura de linfocitos T (TCC).
- 10 La mejora clínica sobre el grueso del tratamiento comprende, entre otras cosas, una disminución acompañante en la producción de TNF $\alpha$  como respuesta a dnaJP1 (disminución del 41,8%), consonante con la predicción original como un criterio de valoración secundario de una disminución del 20% o superior y por un aumento correspondiente de IL-10, con una correlación negativa significativa que sugiere una desviación inmune. Basándose en estas observaciones, se postuló que la desviación inmune se había producido desde un perfil inflamatorio a un perfil funcional regulador. Específicamente, tal y como se muestra en la Figura 5, el porcentaje de linfocitos T CD3+ que producen TNF $\alpha$  como respuesta a dnaJP1, disminuye en el grupo tratado con dnaJP1 el día 168 significativamente más que en el grupo placebo. (El valor de p en el grupo de dnaJP1 es igual a 0,03). Tal y como se muestra además en las Figuras 6A y 6B, esta disminución de TNF $\alpha$  se correlaciona con un aumento de IL-10 en el grupo tratado con dnaJP1 (valor de P en el grupo de dnaJP1 es igual a 0,04).
- 20 El análisis inmunológico de los cambios inducidos por el tratamiento con dnaJP1 muestra claramente una multiplicidad de efectos del tratamiento sobre las células inmunes. Esta diversidad es particularmente evidente en los grupos de terapia combinada con HCQ/dnaJP1. Esto es más probable debido a los efectos sinérgicos de los dos fármacos. Nuestros datos preliminares, referidos a continuación, muestran en efecto que mecanismos de regulación basados en una citotoxicidad directa o una liberación de citocinas tolerogénicas, pueden ser importantes en pacientes tratados con HCQ. Hay dos tendencias que justifican esta hipótesis y se describen a continuación: i) la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 es evidentemente una tendencia al alza en los pacientes tratados con la combinación de HCQ-dnaJP1. Tal y como se muestra en las Figuras 7A-7C y las Figuras 8A-8C, los resultados se expresan como la diferencia entre el día 0 y el 168 en el porcentaje de linfocitos T CD3+ que producen IFN- $\gamma$  e IL-10 por linfocitos T. Los resultados indican una respuesta a la estimulación con dnaJP1 mayor en el grupo de pacientes tratados con HCQ-dnaJP1.
- 25 Estos datos sugieren una o varias de las rutas reguladoras implicadas en la desviación inmune observada, que presumiblemente se basa en linfocitos T CD4+ específicos de péptidos restringidos a la clase II, ya que dnaJP1 es un péptido restringido a la clase II. La hiperexpresión de genes relacionados con la maquinaria citotóxica intracelular sugiere una función adicional de los linfocitos T específicos de dnaJP1 en la eliminación directa de linfocitos T patógenos. El aumento de la expresión de genes implicados en la ruta de secreción de IFN- $\gamma$ , tales como CD244, y un aumento significativo del IFN- $\gamma$  en sí, ofrece un apoyo adicional a esta hipótesis. Este puede ser uno de varios mecanismos complementarios para el control de la inflamación inmune y la mejora de los síntomas clínicos, como se observa en este estudio.

Los resultados se examinaron adicionalmente usando la captura de linfocitos T (TCC) para permitir una mejor caracterización de los linfocitos T específicos de dnaJP1. La persistencia del reconocimiento de linfocitos T de dnaJP1 en los pacientes tratados, como se muestra por la producción de citocinas reguladoras al inicio del tratamiento, sugería que la desviación inmune se llevó a cabo, en lugar de una delección clónica de los linfocitos T específicos de péptido. Para abordar esta cuestión, se enumeraron directamente los linfocitos T específicos de dnaJP1 mediante TCC (véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. n° 7.022.483). Se diseñó genéticamente una APC artificial (aAPC) que consistía en una aAPC marcada con fluorocromo que incorporaba moléculas con HLA DRB1\*0401 cargadas con dnaJP1 o el péptido testigo apropiado (PADRE-). Masas flotantes de aAPC también contenían anticuerpos anti CD28 y anti LFA1. Se utilizó una tinción de tetrámeros como comparación para la caracterización de los linfocitos T CD4 específicos de dnaJP1 medidos por tetrámeros y TCC en un paciente con AR representativo del ensayo. CMSPs procedentes de un paciente con AR HLA-DR4 en tratamiento con péptido dnaJP1, se cultivaron durante 48 h, con 10  $\mu$ g/ml de péptido dnaJP1. Después de una estimulación *in vitro*, las CMSPs teñidas con anticuerpo anti CD4 (PE), se incubaron con tetrámeros (FITC) o aAPC (FITC) cargados con péptido dnaJP1 o péptidos testigos negativos (PADRE-). Tal y como se muestra en las Figuras 9A-9D, se comparó el número de linfocitos T específicos de dnaJP1 como un porcentaje del total de linfocitos T, antes y después de la inducción de tolerancia a través de la mucosa con dnaJP1. Esta figura compara TCC con uso de tetrámero, otro método para la detección de linfocitos T específicos de antígeno, mostrando la superioridad de TCC. La Figura 9A muestra linfocitos T específicos de dnaJP1 y la Figura 9B muestra el ruido de fondo de una tinción no específica con un testigo peptídico negativo. Por lo tanto, los tetrámeros parecen no ser eficaces en la tinción. La Figura 9C muestra la capacidad de TCC para detectar linfocitos T específicos de dnaJP1. La Figura 9D representa los resultados obtenidos con la TCC para un testigo negativo. Por lo tanto, cuando se compara el número total de linfocitos T específicos de antígeno entre el tiempo 0 y el final del tratamiento, el número no cambió significativamente después del tratamiento (antes 6,5%  $\pm$  2,5 frente a 8,0%  $\pm$  2,5 después, P = 0,3, n = 6). Estos experimentos mostraron que aunque el tratamiento con dnaJP1 conducía a una disminución significativa de la capacidad de producción de citocinas proinflamatorias inducidas por antígeno y la capacidad proliferativa de los linfocitos T, esto no era debido a una pérdida en el número total de linfo-

citos T específicos de antígeno.

En un examen adicional se observó que la inducción de tolerancia hacia dnaJP1 está asociada con una producción simultánea de IFN- $\gamma$  e IL-10, y un aumento de la expresión de FOXP3 en los linfocitos T específicos de dnaJP1. Varios mecanismos podrían explicar la persistencia de linfocitos T específicos de dnaJP1 que producen IFN- $\gamma$ . Lo más probable es que diferentes poblaciones de linfocitos T específicos de dnaJP1 estén afectadas por el tratamiento. Entre éstas, los linfocitos Treg, que producen tanto IFN- $\gamma$  como IL-10 pueden tener importancia. Para investigar esta hipótesis, linfocitos T específicos de dnaJP1 (identificados por TCC) se clasificaron a partir de muestras seleccionadas ( $n = 4$ ) en los tiempos 0 y 7. Se extrajo el ARNm y se analizó con Taqman para estudiar la expresión simultánea de IFN- $\gamma$  e IL-10. Se encontró que los linfocitos T específicos de dnaJP1 producen IFN- $\gamma$  e IL-10 al mismo tiempo, al final del período de tratamiento (IFN- $\gamma$ :  $0,081 \pm 0,0054$ , IL-10:  $0,07 \pm 0,0131$ /probando CT\* 100/CT GAPDH,  $n = 4$ ).

Para corroborar adicionalmente la idea de que la inducción de tolerancia hacia dnaJP1 no alteraba el número total sino más bien la función de los linfocitos T específicos de dnaJP1, se estudió la expresión del factor de transcripción "forkhead" FOXP3. La expresión de FOXP3 afecta al desarrollo y la función de Treg. Por tanto, se ha propuesto como un marcador funcional de estas células reguladoras. Hemos sometido a ensayo si la inducción de tolerancia hacia dnaJP1 induciría la expresión de FOXP3 como una indicación del restablecimiento de la función Treg. Se cultivaron muestras antes y después de la inducción de tolerancia procedentes de dos pacientes con dnaJP1. Las células CD25+ se clasificaron y se evaluó la expresión de FOXP3 mediante TaqMan. La expresión de FOXP3 en células CD4+/CD25+ aumentó después de la inducción de tolerancia. Se analizó la expresión del factor de transcripción FOXP3 en pacientes con AR. Las CMSPs se clasificaron en células CD4+/CD25+ antes y después de 48 horas de la estimulación *in vitro* con dnaJP1. El ARN total se extrajo y el perfil de expresión génica se analizó mediante TaqMan. Los resultados se expresan como valores de Ct que se normalizaron según la expresión de GAPDH. El índice de inducción es el resultado del proceso de normalización (AU) y se refiere al número de veces de expresión génica en comparación con la falta de estimulación. Tal y como se muestra en la Figura 10, la expresión de Fox P3 aumentó.

Una de las diversas ventajas de nuestra metodología es su especificidad y seguridad. De hecho, el tratamiento afecta de forma diferencial a las rutas patogénicas proinflamatorias, dejando intacta la capacidad del sistema inmune para reaccionar a las provocaciones, tales como una infección. Esto se evidencia por el hecho de que en los pacientes tratados, la capacidad de los linfocitos T para responder al antígeno recordatorio Toxoide Tetánico, se mantuvo intacta incluso en presencia de una regulación específica de la inflamación autoinmune. Esto indica una seguridad inmunológica y una especificidad del tratamiento (no se muestra). Por lo tanto, tal y como se describe en esta memoria, la *terapia combinada* mediante la administración a través de la mucosa de formulaciones que comprenden un derivado de cloroquina, en este ejemplo, HCQ, y/o una inmunoterapia específica de antígeno utilizando péptidos inmunogénicos en un régimen de dosificación de un paciente con cada componente, ya sea de forma simultánea o por separado, puede facilitar el control de la inflamación autoinmune mediante la generación de mecanismos reguladores que actúan sobre ambas ramas del sistema inmune.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
 ALBANI, Salvatore

5 <120> Método de terapia combinada y formulación

<130> UCSD1940-1WO

<150> US 60/810.674

10 <151> 01-06-2006

<160> 57

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 1

**Lys Lys Ala Tyr Arg Arg Lys Ala Leu Gln Trp His Pro Asp Lys**  
**1 5 10 15**

25 <210> 2  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 2

**Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Tyr His Pro Asp Lys**  
**1 5 10 15**

35 <210> 3  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 3

**Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His Pro Asp Lys**  
**1 5 10 15**

45 <210> 4  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

**Lys Asp Leu Leu Glu Gln Lys Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys**  
**1 5 10 15**

50 <210> 5  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 5

**Gln Lys Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr Gly**  
**1 5 10 15**

60 <210> 6

ES 2 455 167 T3

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

5 <400> 6

**Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Leu Ala Met Lys Tyr His Pro Asp Arg**  
 1 5 10 15

<210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Mutante de E. coli

<400> 7

**Asp Glu Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala Phe Glu**  
 1 5 10 15

20 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

25 <400> 8

**Gln Lys Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala Phe Glu**  
 1 5 10 15

30 <210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

35 <400> 9

**Gln Lys Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala Phe Glu Gln**  
 1 5 10 15

40 <210> 10  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

45 <400> 10

**Gln Gly Phe Phe Ala Val Gln Gln Thr Cys Pro His Cys Gln Gly**  
 1 5 10 15

<210> 11  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 11

**Pro Gly Met Val Gln Gln Ile Gln Ser Val Cys Met Glu Cys Gln**  
 1 5 10 15

55 <210> 12  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

60

ES 2 455 167 T3

<400> 12

**Gly Asp Leu Tyr Val Gln Val Gln Val Lys Gln His Pro Ile Phe**  
**1 5 10 15**

5

<210> 13  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 13

**Gly Glu Ala Leu Ser Thr Leu Val Leu Asn Arg Leu Lys Val Gly**  
**1 5 10 15**

15

<210> 14  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 14

**Lys Pro Leu Val Ile Ile Ala Glu Asp Val Asp Gly Glu Ala Leu Ser**  
**1 5 10 15**

**Thr Leu Val Leu Asn Arg Leu Lys Val Gly Leu Gln Val Val Ala Val**  
**20 25 30**

**Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp**  
**35**

25

<210> 15  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

30

<400> 15

**Gly Glu Ala Leu Ala Thr Leu Val Val Asn Thr Met Arg Gly Ile**  
**1 5 10 15**

35

<210> 16  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium mucogenicum

<400> 16

40

**Gly Glu Ala Leu Ser Thr Leu Val Val Asn Lys Ile Arg Gly Thr**  
**1 5 10 15**

45

<210> 17  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium mucogenicum

<400> 17

ES 2 455 167 T3

Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Val Glu Gly Glu Ala Leu Ser  
 1 5 10 15

Thr Leu Val Val Asn Lys Ile Arg Gly Thr Phe Lys Ser Val Ala Val  
 20 25 30

Lys Ala Pro Gly Phe Asp  
 35

<210> 18

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Mycobacterium mucogenicum

<400> 18

Ile Ala Gly Leu Phe Leu Thr Thr Glu Ala Val Val Ala Asp Lys  
 1 5 10 15

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

15 <213> Mycobacterium mucogenicum

<400> 19

Lys Val Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ser Ile Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

20 Phe Leu Thr Thr Glu Ala Val Val Ala Asp Lys Pro Lys Glu Lys Ala  
 20 25 30

<210> 20

<211> 15

25 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 20

Val Ala Gly Leu Met Ile Thr Thr Glu Cys Met Val Thr Asp Leu  
 1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 21

Val Ala Ser Leu Leu Thr Thr Ala Glu Val Val Val Thr Glu Ile  
 1 5 10 15

40 <210> 22

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 <400> 22

Lys Val Val Arg Thr Ala Leu Leu Asp Ala Ala Gly Val Ala Ser Leu  
 1 5 10 15

Leu Thr Thr Ala Glu Val Val Val Thr Glu Ile Pro  
 20 25

50 <210> 23

<211> 15

ES 2 455 167 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 23

5      **Glu Asp Leu Phe Met Cys Met Asp Ile Gln Leu Val Glu Ala Leu**  
       1                   5                   10                   15

<210> 24  
 <211> 15  
 10    <212> PRT  
       <213> Homo sapiens

<400> 24

15    **Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser Asp**  
       1                   5                   10                   15

<210> 25  
 <211> 15  
 20    <212> PRT  
       <213> Homo sapiens

<400> 25

25    **Thr Thr Tyr Tyr Asp Val Leu Gly Val Lys Pro Asn Ala Thr Gln**  
       1                   5                   10                   15

<210> 26  
 <211> 15  
 30    <212> PRT  
       <213> Homo sapiens

<400> 26

35    **Ala Ser Tyr Tyr Glu Ile Leu Asp Val Pro Arg Ser Ala Ser Ala**  
       1                   5                   10                   15

<210> 27  
 <211> 15  
 40    <212> PRT  
       <213> Escherichia coli

<400> 27

45    **Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile Leu Gly Val Ser Lys Thr Ala Glu Glu**  
       1                   5                   10                   15

<210> 28  
 <211> 16  
 50    <212> PRT  
       <213> Homo sapiens

<400> 28

55    **Gln Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Ala Lys Lys Arg Glu Leu Tyr Asp**  
       1                   5                   10                   15

<210> 29  
 <211> 16  
 60    <212> PRT  
       <213> Homo sapiens

<400> 29

60    **Glu Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Lys His Lys Arg Glu Ile Tyr Asp**  
       1                   5                   10                   15

ES 2 455 167 T3

<210> 30  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 5 <213> Escherichia coli  
  
 <400> 30  
  
**Ala Val Glu Leu Glu Ser Pro Phe Ile Leu Leu Ala Asp Lys Lys**  
**1 5 10 15**  
 10  
 <210> 31  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 15  
 <400> 31  
  
**Pro Phe Ile Leu Leu Ala Asp Lys Lys Ile Ser Asn Ile Arg Glu**  
**1 5 10 15**  
 20  
 <210> 32  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium mucogenicum  
 25  
 <400> 32  
  
**Glu Ala Val Leu Glu Asp Pro Tyr Ile Leu Leu Val Ser Ser Lys**  
**1 5 10 15**  
 30  
 <210> 33  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium mucogenicum  
 35  
 <400> 33  
  
**Pro Tyr Ile Leu Leu Val Ser Ser Lys Val Ser Thr Val Lys Asp**  
**1 5 10 15**  
 40  
 <210> 34  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium mucogenicum  
  
 <400> 34  
  
**Arg Gln Glu Ala Val Leu Glu Asp Pro Tyr Ile Leu Leu Val Ser Ser**  
**1 5 10 15**  
  
**Lys Val Ser Thr Val Lys Asp Leu Leu Pro Leu Leu Glu Lys Val Ile**  
**20 25 30**  
 45 **Gly**  
 <210> 35  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 50 <213> Escherichia coli  
  
 <400> 35  
  
**Ser Lys Thr Leu Ser Val Lys Ile Pro Gly Ala Val Asp Thr Gly**  
**1 5 10 15**  
 55

<210> 36  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 36  
  
**Ala Tyr Val Leu Leu Ser Glu Lys Lys Ile Ser Ser Ile Gln Ser**  
**1 5 10 15**  
 10  
 <210> 37  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15  
 <400> 37  
  
**Gly Gln Lys Cys Glu Phe Gln Asp Ala Tyr Val Leu Leu Ser Glu Lys**  
**1 5 10 15**  
  
**Lys Ile Ser Ser Ile Gln Ser Ile Val Pro Ala Leu Glu Ile Ala Asn**  
**20 25 30**  
  
**Ala**  
 20  
 <210> 38  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 38  
  
**Lys Cys Glu Phe Gln Asp Ala Tyr Val Leu Leu Ser Glu Lys Lys**  
**1 5 10 15**  
 30  
 <210> 39  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 39  
  
**Ser Asp Val Glu Val Asn Glu Lys Lys Asp Arg Val Thr Asp Ala Leu**  
**1 5 10 15**  
**Asn Ala Thr Arg Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Leu Gly Gly Gly**  
**20 25 30**  
  
**Cys Ala Leu Leu**  
**35**  
 40  
 <210> 40  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium mucogenicum  
 45  
 <400> 40  
  
**Thr Glu Val Glu Leu Lys Glu Arg Lys His Arg Ile Glu Asp Ala Val**  
**1 5 10 15**  
  
**Arg Asn Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Ala Gly Gly Gly**  
**20 25 30**  
  
**Val Thr Leu Leu**  
**35**

ES 2 455 167 T3

<210> 41  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 5 <213> Escherichia coli  
  
 <400> 41  
  
**Tyr Cys Glu Val Pro Ile Asn Phe Ala Met Ala Ala Leu Gly Gly**  
**1 5 10 15**  
 10  
 <210> 42  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 15  
 <400> 42  
  
**Pro Ile Asn Phe Ala Met Ala Ala Leu Gly Gly Glu Ile Glu Val**  
**1 5 10 15**  
 20  
 <210> 43  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 43  
  
**Asp Leu Gln Leu Ala Met Ala Tyr Ser Leu Ser Glu Met Glu Ala**  
**1 5 10 15**  
 30  
 <210> 44  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 44  
  
**Arg Lys Gly Val Ile Thr Val Lys Asp Gly Lys Thr Leu Asn Asp Glu**  
**1 5 10 15**  
  
**Leu Glu Ile Ile Glu Gly Met Lys Phe Asp Arg Gly Ile Ser Pro**  
**20 25 30**  
 40  
 <210> 45  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45  
 <400> 45  
  
**Lys Arg Thr Leu Lys Ile Pro Ala Met Thr Ile Ala Lys Asn Ala Gly**  
**1 5 10 15**  
  
**Val Glu Gly Ser Leu Ile Val Glu Lys Ile Met Gln Ser Ser Ser Glu**  
**20 25 30**  
 50  
 <210> 46  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55  
 <400> 46  
  
**Phe Arg Ser Val Ser Thr Ser Thr Thr Phe Val Gln Gly Arg Arg**  
**1 5 10 15**

ES 2 455 167 T3

<210> 47  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 47  
  
**Gly Arg Arg Ile Thr Thr Arg Arg Ile Met Glu Asn Gly Gln Glu**  
**1 5 10 15**  
 10  
 <210> 48  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15  
 <400> 48  
  
**Ser Gly Pro Phe Phe Thr Phe Ser Ser Ser Phe Pro Gly His Ser**  
**1 5 10 15**  
 20  
 <210> 49  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 49  
  
**Leu Cys Gly Phe Gln Lys Pro Ile Ser Thr Leu Asp Asn Arg Thr**  
**1 5 10 15**  
 30  
 <210> 50  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 50  
  
**Asp Gly Gln Leu Lys Ser Val Thr Ile Asn Gly Val Pro Asp Asp**  
**1 5 10 15**  
 40  
 <210> 51  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45  
 <400> 51  
  
**Arg Thr Ile Val Ile Thr Ser His Pro Gly Gln Ile Val Lys His**  
**1 5 10 15**  
 50  
 <210> 52  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55  
 <400> 52  
  
**Gly Arg Leu Ile Ile Glu Phe Lys Val Asn Phe Pro Glu Asn Gly**  
**1 5 10 15**  
 60  
 <210> 53  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 60  
 <400> 53

ES 2 455 167 T3

Thr Asn Glu Glu Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala  
 1 5 10 15

Arg Ser Ile Ala Lys Glu Gly  
 20

<210> 54

<211> 23

5 <212> PRT

<213> Mycobacterium mucogenicum

<400> 54

Thr Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala  
 1 5 10 15

Gln Ala Leu Val Arg Glu Gly  
 20

10

<210> 55

<211> 31

<212> PRT

15 <213> Mycobacterium mucogenicum

<400> 55

Asn Glu Gly Val Ile Thr Val Glu Glu Ser Asn Thr Phe Gly Leu Gln  
 1 5 10 15

Leu Glu Leu Thr Glu Gly Met Arg Phe Asp Lys Gly Ile Ser Gly  
 20 25 30

20

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium mucogenicum

25

<400> 56

Thr Phe Gly Leu Gln Leu Glu Leu Thr  
 1 5

30

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Mycobacterium mucogenicum

35

<400> 57

Lys Val Ala Leu Glu Ala Pro Leu Lys Gln Ile Ala Phe Asn Ser Gly  
 1 5 10 15

Leu Glu Pro Gly Val Val Ala Glu Lys Val Arg Asn Leu Pro Ala Gly  
 20 25 30

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende un polipéptido inmunomodulador seleccionado a partir de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1 a 57 y una molécula de cloroquina.
- 5 2. La composición según la reivindicación 1, en la que el polipéptido tiene una concentración de 10 a 100 mg y la molécula de cloroquina tiene una concentración de 200 a 400 mg.
3. La composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la molécula de cloroquina se selecciona entre el grupo que consiste en hidroxicloroquina, sulfato de hidroxicloroquina y cloroquina.
- 10 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido inmunomodulador y una molécula de cloroquina, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune.
5. La composición según la reivindicación 4, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, que es para uso en el tratamiento de un ser humano o un animal.
- 15 6. La composición según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune que es para administrar a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en administración oral, administración a través de la mucosa, ingestión, administración nasal, administración bronquial y administración colosal.
7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, que comprende de 2,5 a 100 mg, de 10 a 50 mg o 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50 mg del polipéptido inmunomodulador.
- 20 8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, en donde el polipéptido inmunomodulador se administra al menos una vez al día o al menos dos veces al día.
9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, que comprende de 150 a 500 mg, de 190 a 450 mg o de 200 a 400 mg de la molécula de cloroquina.
- 25 10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, en donde la molécula de cloroquina se administra al menos dos veces al día.
11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, en donde el trastorno autoinmune se selecciona entre el grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, artritis psoriásica, psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de Crohn.
- 30 12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4-11, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, en donde el polipéptido inmunomodulador y la molécula de cloroquina se administran de forma simultánea o secuencial.
13. La composición según la reivindicación 12, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, en donde el polipéptido inmunomodulador y la molécula de cloroquina se administran de forma secuencial y en donde el polipéptido inmunomodulador se administra después de la administración de la molécula de cloroquina, o en donde el polipéptido inmunomodulador se administra antes de la administración de la molécula de cloroquina.
- 35 14. Uso de un polipéptido inmunomodulador seleccionado a partir de una cualquiera entre SEQ ID NOs: 1 a 57 y una molécula de cloroquina en la preparación de un medicamento para tratar una afección autoinmune.

40

FIG. 1A

ACR 20

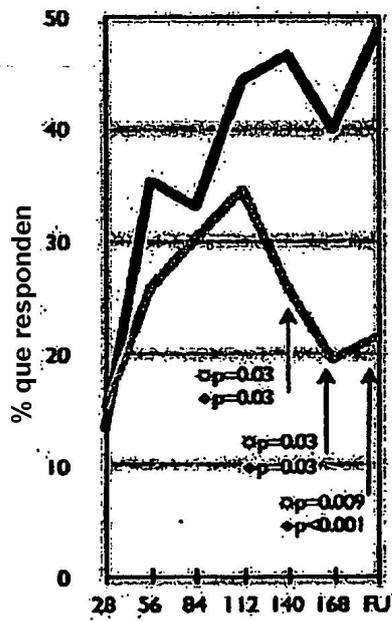


FIG. 1B

ACR 50

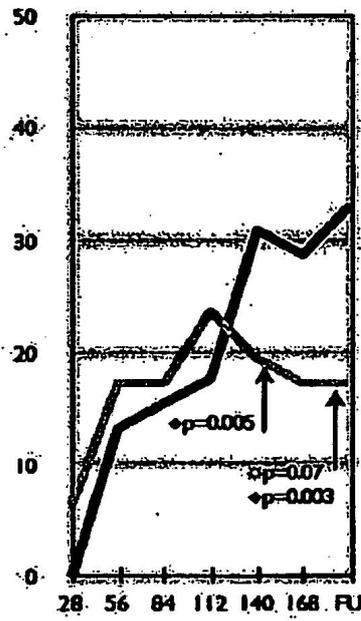
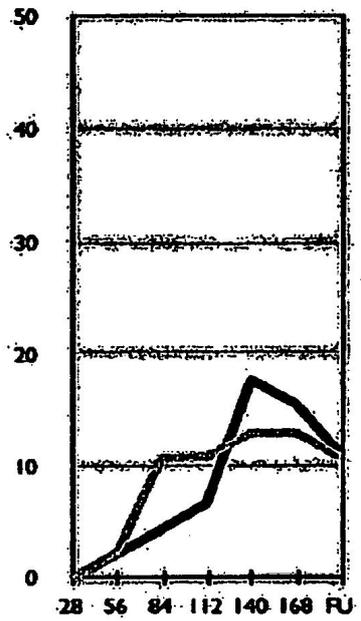


FIG. 1C

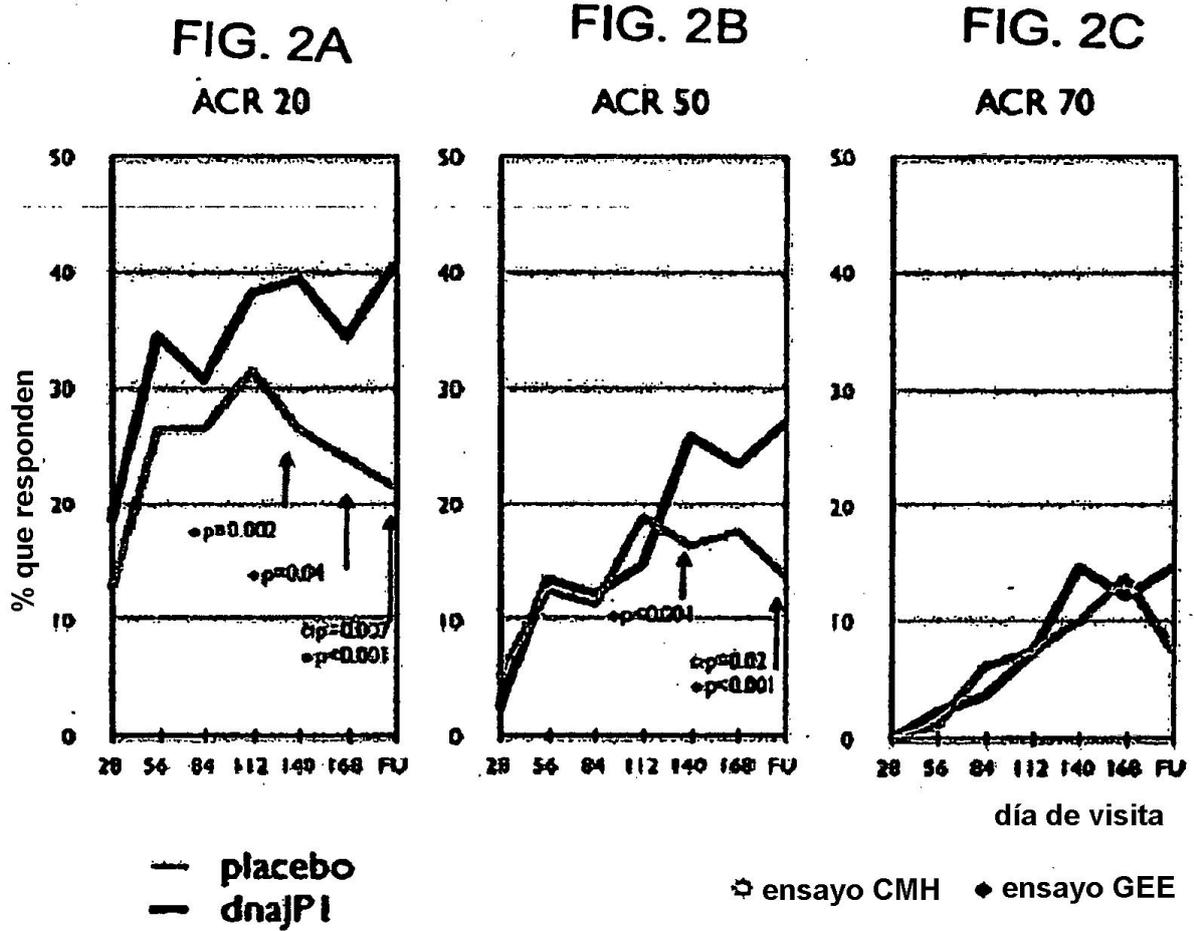
ACR 70

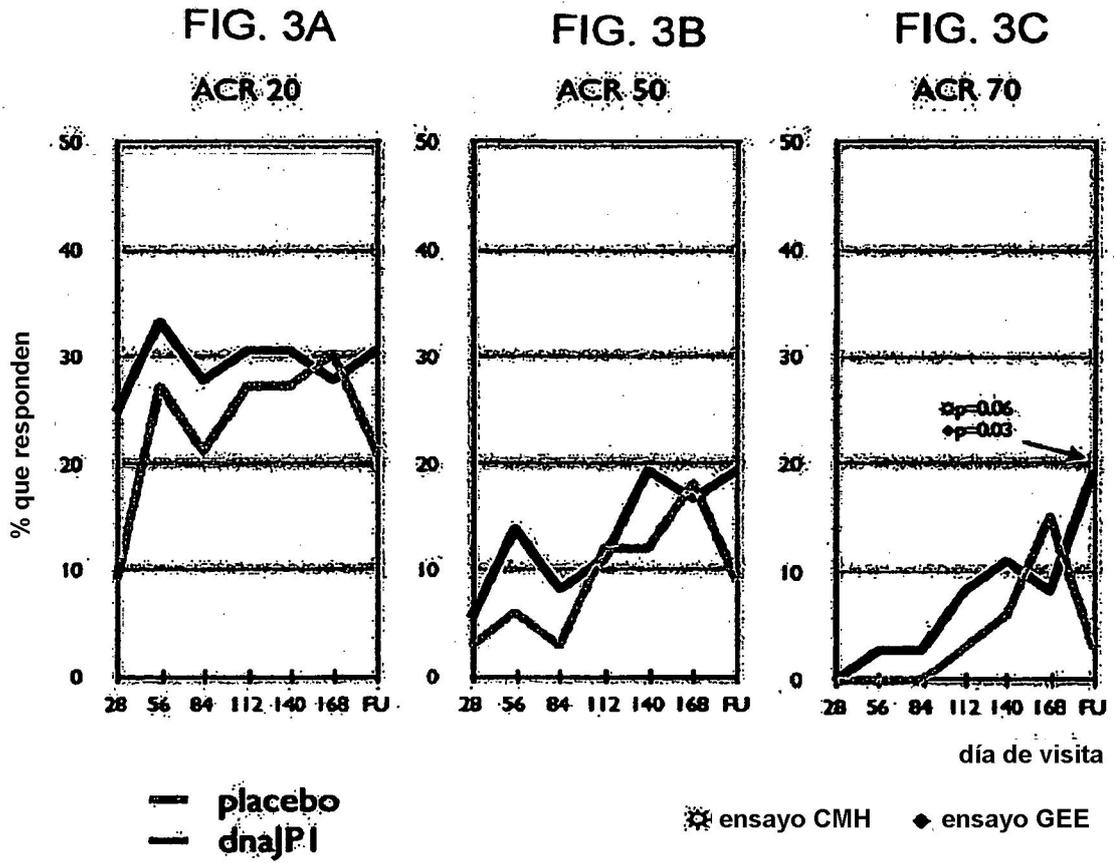


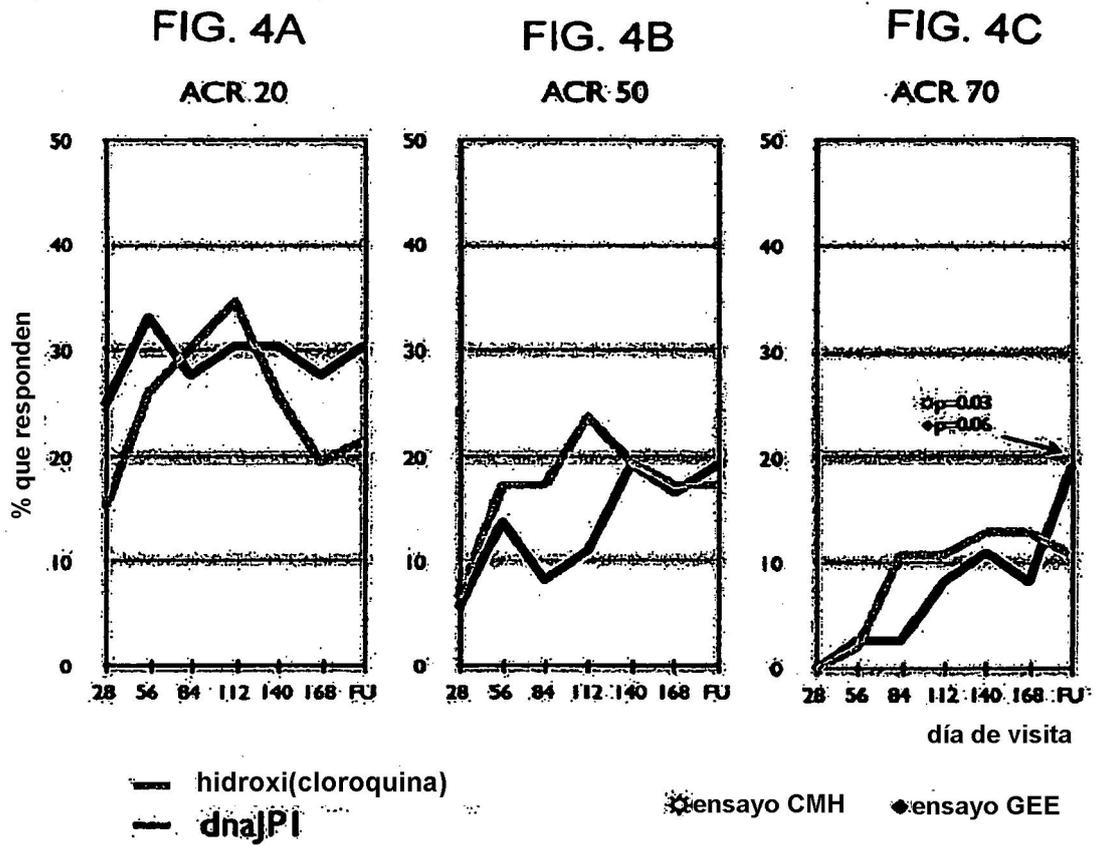
día de visita

— placebo  
- - - dnajP.I

⊠ ensayo CMH    ◆ ensayo GEE







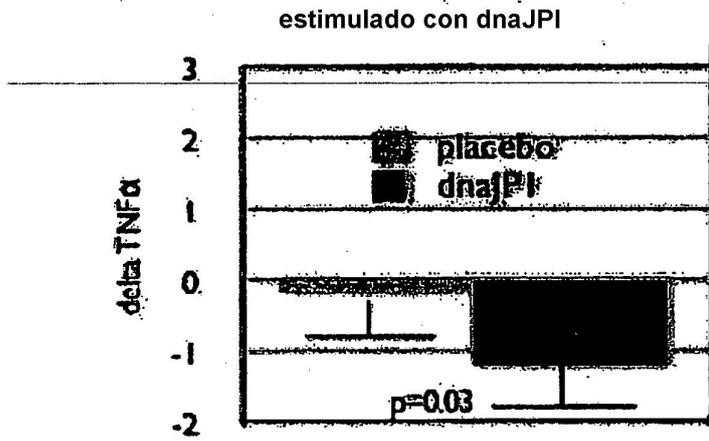


FIG. 5

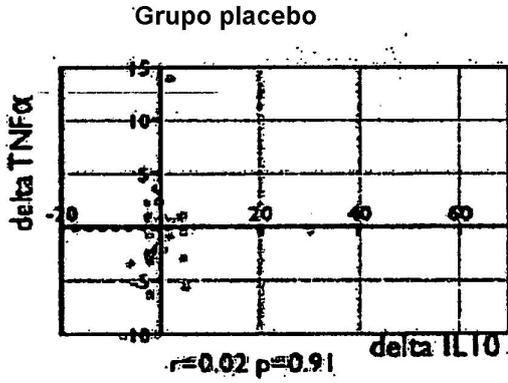


FIG. 6A

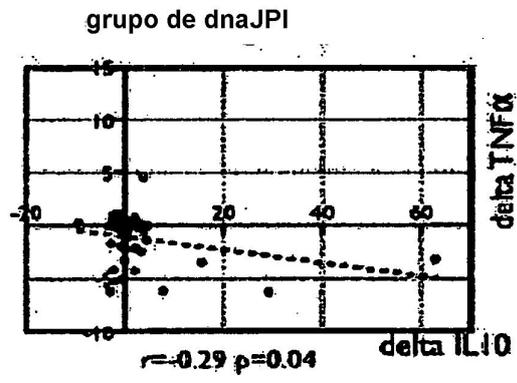


FIG. 6B

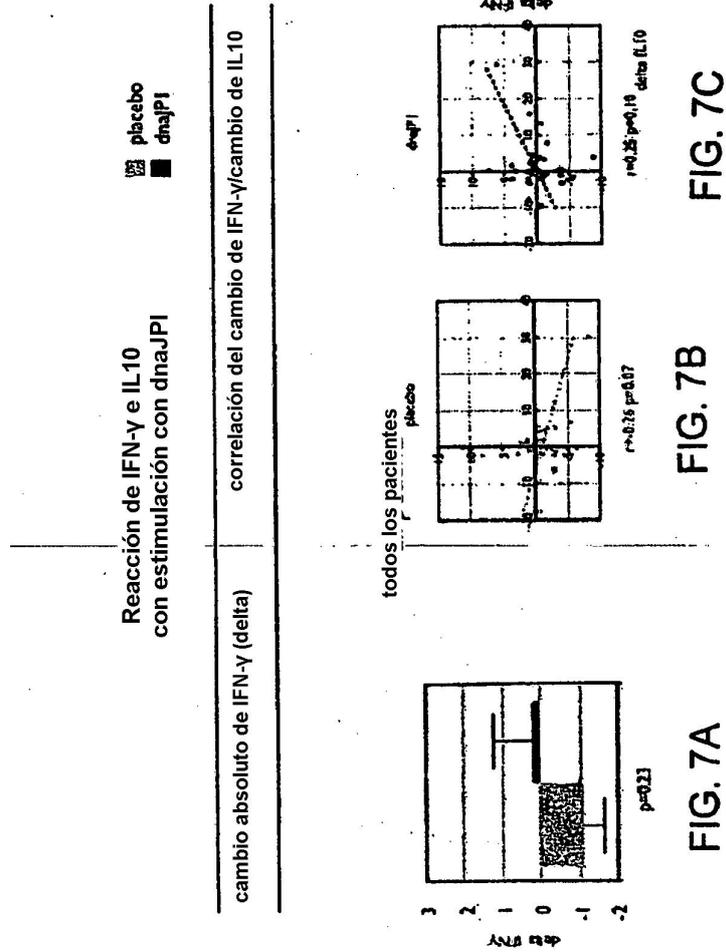


FIG. 7A

FIG. 7B

FIG. 7C

Reacción de IFN- $\gamma$  e IL10  
frente a la estimulación con dna.JP1

placebo  
dna.JP1

cambio absoluto de IFN- $\gamma$  (delta)      correlación del cambio de IFN- $\gamma$ /cambio de IL10

todos los usuarios de (hidroxi)cloroquina

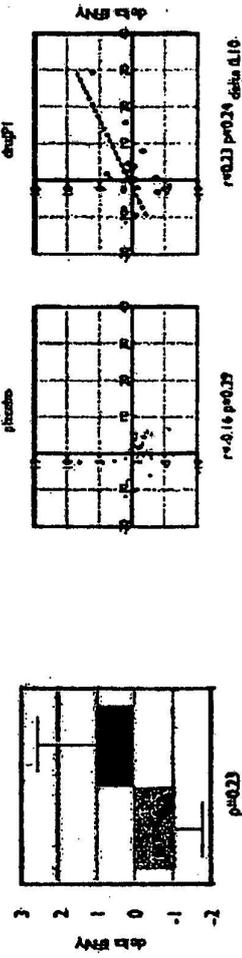


FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 8C

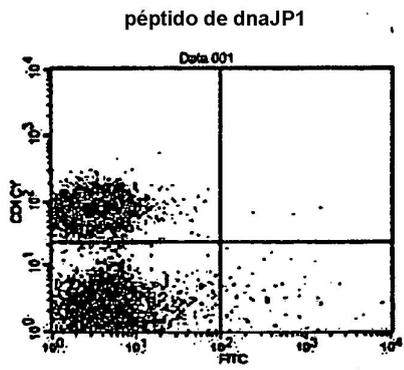


FIG. 9A

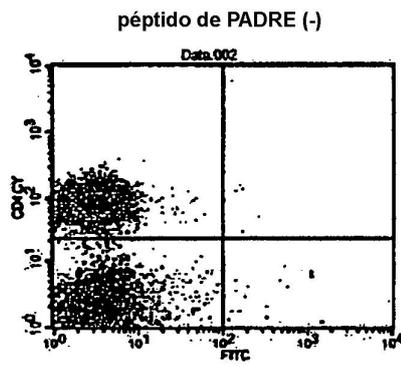


FIG. 9B

TETRÁMERO HLA-DR4

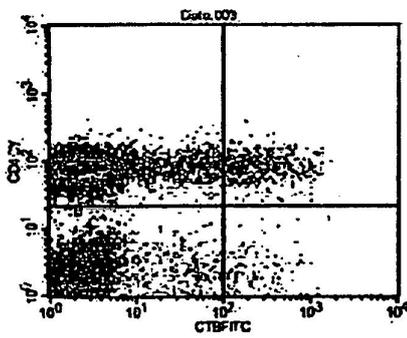


FIG. 9C

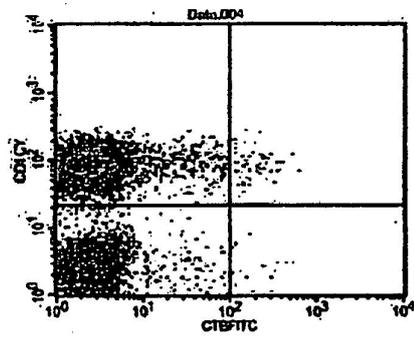


FIG. 9D

aAPC HLA-DR4

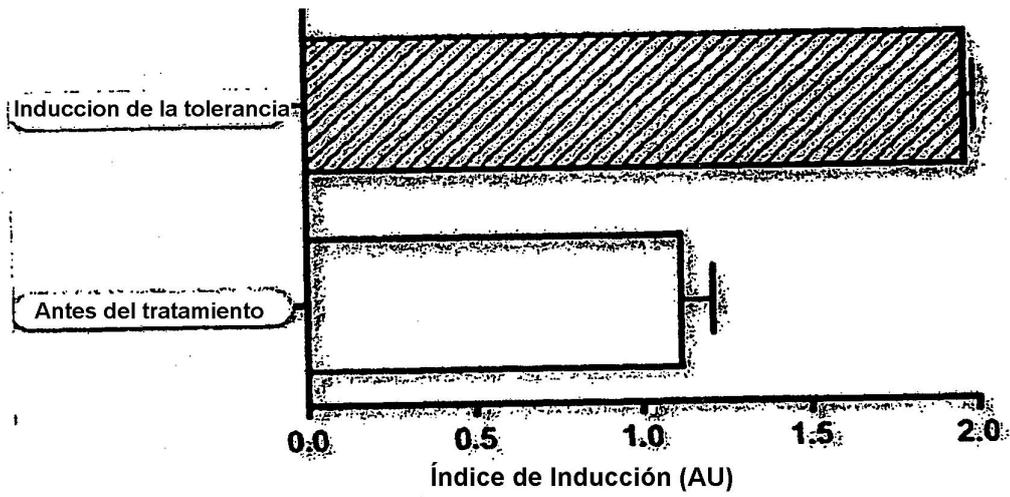


FIG. 10