

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 513 392**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/35** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2009 E 09714217 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2247608**

54 Título: **Materiales biológicos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**25.02.2008 GB 0803369**

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

**27.10.2014**

73 Titular/es:

**PEPTINNOVATE LIMITED (100.0%)  
90 High Holborn  
London WC1V 6XX, GB**

72 Inventor/es:

**COATES, ANTHONY ROBERT MILNES;  
RIFFO-VASQUEZ, YANIRA y  
TORMAY, PETER**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 513 392 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

Materiales biológicos y usos de los mismos

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos que se derivan de la chaperonina 60.1 y sus usos en el tratamiento de enfermedad y como agentes de alivio del dolor.

Los polipéptidos de choque térmico son una familia de moléculas encontradas en todos los organismos, cuya función es ayudar en el procesamiento biológico y estabilidad de moléculas biológicas (Zugel & Kauffman (1999)

- 10 Role of heat shock polypeptides in protection from and pathogenesis of infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. (12)1: 19-39; Ranford y col. (2000) Chaperonins are cell signalling polypeptides: - the unfolding biology of molecular chaperones. Exp. Rev. Mol. Med., 15 de septiembre, www.ermn.cbcu.cam.ac.uk/00002015h.htm).

- 15 Los polipéptidos de choque térmico se localizan en cualquier compartimento celular, y poseen la capacidad de interactuar con una amplia variedad de moléculas biológicas. En particular, los polipéptidos de choque térmico ayudan e influyen en el plegamiento de polipéptidos y la translocalización de polipéptidos en cualquier momento desde el ensamblaje hasta el desensamblaje del polipéptido y cualquier complejo de los mismos. La naturaleza colaboradora de los polipéptidos de choque térmico les ha conducido a que también sean conocidos como chaperonas moleculares (Laskey y col. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic polypeptide, which binds
- 20 histones and transfers them to DNA. Nature (275): 416-420).

- Los polipéptidos de choque térmico se sintetizan por células en respuesta a estrés medioambiental, que incluye, pero no se limita a, cambios de temperatura (tanto aumentos como disminuciones), y señales patofisiológicas tales como citocinas. En respuesta al estrés medioambiental, los polipéptidos de choque térmico usan su capacidad para
- 25 procesar otros polipéptidos para proteger tales polipéptidos de cualquier desnaturalización que pueda producirse debido a la presencia del estrés. Este mecanismo también sirve para proteger células que contienen la proteína.

- Los polipéptidos de chaperonina son un subgrupo de polipéptidos de choque térmico cuya función en el plegamiento de polipéptidos es muy conocida. Hay dos familias del polipéptido de chaperonina, las familias de la chaperonina 60
- 30 (aproximadamente 60 kDa) y de la chaperonina 10 (aproximadamente 10 kDa) (Ranford, 2000). Las chaperoninas mejor caracterizadas son aquellas derivadas de *E. coli*, a partir de las cuales se ha establecido la estructura característica de la chaperonina 60 y la chaperonina 10. Los complejos de chaperonina de la mayoría de los otros organismos también se ajustan sustancialmente a esta estructura característica.

- 35 La estructura característica de las chaperoninas es un complejo formado a partir de dos anillos heptámeros (compuestos de siete monómeros de chaperonina 60) que están orientados el uno hacia el otro y están tapados por un anillo heptámero compuesto de monómeros de la chaperonina 10.

- Convencionalmente, las chaperoninas ayudan en el plegamiento de polipéptidos cuando el polipéptido diana entra
- 40 en el núcleo central de los heptámeros en el anillo, y en la posterior liberación de energía de ATP el polipéptido diana se libera del núcleo central por un cambio conformacional en la estructura de chaperonina (Ranson y col. (1998) Artículo de revisión: Chaperones. Biochem. J (333): 233-242).

- Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) produce la chaperonina 60.1 (cpn 60.1), un polipéptido que se nombra
- 45 basándose en su identidad de secuencias de aminoácidos con otras chaperoninas conocidas. Adicionalmente, los polipéptidos de la chaperonina de *M. tuberculosis* son chaperonina 10 (cpn 10) y chaperonina 60.2 (cpn 60.2). La chaperonina 60.2 presenta el 59,6 % de identidad de secuencias de aminoácidos y el 65,6 % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos con la cpn 60.1.

- 50 La presente invención se refiere al uso de fragmentos de chaperonina 60.1 o moléculas funcionalmente equivalentes de *Mycobacterium tuberculosis* o procariotas relacionados en la prevención y/o tratamiento de afecciones tanto cancerosas como no cancerosas. Ejemplos de afecciones no cancerosas incluyen trastornos autoinmunitarios, osteoporosis, trastornos alérgicos o afecciones de inmovinactivación, particularmente asma, y/o afecciones
- 55 tipificadas por una respuesta inmunitaria tipo linfocitos T colaboradores 2 (Th2) y/o afecciones asociadas a eosinofilia y procedimientos de estimulación de la producción de mediadores de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, citocinas, *in vitro* o *in vivo*.

La autoinmunidad refleja la pérdida de tolerancia a "sí mismo" produciendo destrucción inapropiada de células normales o tejido. En muchas afecciones se encuentran autoanticuerpos, pero pueden reflejar un efecto en vez de

producir una enfermedad. En algunas enfermedades, sin embargo, los autoanticuerpos son la primera anomalía, principal, o solo detectable. Una clase de moléculas que participa a este respecto son las chaperoninas, que son altamente inmunógenas. Las chaperoninas pertenecen a un grupo de proteínas llamadas chaperonas moleculares que se unen a proteínas no nativas y las ayudan, en un procedimiento catalítico dependiente del ATP, a plegarse en la forma tridimensional correcta requerida para una proteína funcional.

Se cree que las chaperoninas estimulan el sistema inmunitario a muchos niveles simultáneamente, que incluyen monocitos, macrófagos, células similares a fibroblastos, quizás otros tipos de células, y linfocitos T. Las defensas inmunitarias en mamíferos pueden dividirse en las defensas “innatas” y “adaptativas”. Aquellos que ya están en su sitio, tales como fagocitos, linfocitos citolíticos espontáneos y complemento, se consideran innatos. En la exposición, la inmunidad adaptativa se activa en forma de linfocitos B y T. Las chaperoninas son conocidas por actuar directamente sobre los mecanismos de defensa innatos, particularmente sobre los fagocitos. También estimulan una poderosa respuesta inmunitaria adaptativa, concretamente la producción de anticuerpo y la estimulación de linfocitos T que en algunos casos puede ser protectora. En particular, inducen la secreción de citocinas que se cree que es importante para las defensas del huésped. En algunos casos, sin embargo, se cree que la presencia de chaperoninas puede ser dañina para el huésped.

La función de las chaperoninas en la enfermedad autoinmunitaria es discutible. Aunque la infección/inmunidad con organismos que contienen chaperoninas es universal, y personas sanas tienen respuestas de linfocitos T a chaperoninas propias, que incluye la producción de anticuerpos específicos de chaperoninas, la enfermedad autoinmunitaria clásica es bastante poco común. Así, la presencia de reacciones inmunitarias a chaperoninas puede ser casual y poco importante.

Sin embargo, la teoría de la imitación molecular sugiere la participación de chaperoninas en enfermedad autoinmunitaria y se basa en el alto nivel de conservación de secuencias de aminoácidos entre chaperoninas de origen microbiano y de mamífero. La teoría propone que durante la infección con una amplia gama de microbios, los epítopes de chaperonina que son compartidos entre microbios y mamíferos estimulan los linfocitos T. Según esta teoría, un alto nivel de presentación de chaperoninas de epítopes de chaperoninas compartidos rompe la tolerancia a chaperoninas propias y se desarrolla enfermedad autoinmunitaria.

Se ha encontrado que las chaperoninas obtenidas de tumores producen efectos necróticos sobre aquellos tumores. Se sugiere que esto puede lograrse mediante el potenciamiento del reconocimiento inmunológico de antígenos tumorales, aunque el mecanismo de esto no se conoce. Por tanto, parece que las chaperoninas inducen inmunidad adaptativa protectora contra infección bacteriana y cáncer.

Las reacciones alérgicas, tales como asma, se refieren a respuestas inmunitarias proporcionalmente inapropiadas o erróneamente dirigidas. La prevalencia del asma, por ejemplo, está aumentando y todavía no se han encontrado terapias eficaces para tratar todos los casos. El actual tratamiento usa frecuentemente glucocorticosteroides inmunosupresores, agonistas beta, cromoglicato, modificadores del leucotrieno, etc., que tienen numerosos efectos secundarios.

En tales reacciones alérgicas se producen altos niveles de IgE y las respuestas inmunitarias de linfocitos T colaboradores 2 (Th2) predominan con respecto a respuestas de Th1 produciendo una respuesta inflamatoria. Se cree que las respuestas de Th1 son principalmente protectoras contra infección microbiana y están promovidas por citocinas, particularmente interleucina-12 (IL-12), IL-2 e interferón- $\gamma$ . A diferencia, las respuestas de Th2, en los trasfondos genéticos apropiados, están asociadas a lesión de tejido alérgica dañina.

Sin embargo, se ha sugerido que en otras afecciones tales como trastornos autoinmunitarios, por ejemplo, artritis adyuvante, las respuestas de Th1 hiperactivas son causales del trastorno. La conversión de respuestas de Th1 en Th2 o Th2 en Th1 puede, por tanto, tener utilidad en el tratamiento de los trastornos anteriormente descritos.

Aunque se sabe que bacterias tales como *L. monocytogenes*, *M. bovis* y *M. tuberculosis* pueden convertir respuestas de Th2 en Th1, no se han identificado las moléculas que son responsables de esta conversión.

Sin embargo, sugerencias en la materia han implicado una proteína de choque térmico, hsp65, de *M. leprae* que puede inducir respuestas de Th1 (Lowrie y col., 1999, Nature, 400, p269-271; Bonato y col., 1998, Infect. Immun., 66, p169-175). El homólogo, hsp65 de *M. tuberculosis*, tiene la capacidad de estimular monocitos humanos para sintetizar citocinas pro-inflamatorias y activar monocitos y células endoteliales vasculares humanas (Friedland y col., 1993, Clin. Exp. Immunol., 91, p5862; Peetermans y col., 1995, Infect. Immun., 63, p3454-3458; Verdegaal, y col.,

1996, J. Immunol., 157, p369-376).

La presente invención también se refiere al uso de fragmentos de la chaperonina 60.1 o moléculas funcionalmente equivalentes de *Mycobacterium tuberculosis* o procariotas relacionados en el alivio del dolor.

5

El alivio del dolor se consigue normalmente por medicación oral o parenteral. El alivio del dolor eficaz puede lograrse en la mayoría de los casos con fármacos de alivio del dolor ampliamente conocidos tales como paracetamol, aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como ibuprofeno, e inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (ISC). Los analgésicos narcóticos actúan sobre receptores específicos en el sistema nervioso central (SNC). La codeína y la dihidrocodeína son analgésicos narcóticos moderadamente potentes y tienen bajas posibilidades de adicción. Otros analgésicos narcóticos más potentes, tales como la morfina y la metadona, pueden usarse para controlar dolor grave.

Existe una variedad de problemas con los agentes de alivio del dolor presentemente conocidos. Los fármacos son de acción relativamente corta y la analgesia solo dura algunas horas. Normalmente son necesarias dosis repetidas del fármaco para controlar el dolor. El alivio del dolor inferior al óptimo es otro problema común, que conduce al paciente a aumentar la dosis, o cambiar la medicación. En el caso de AINE, los desagradables efectos secundarios gastrointestinales tales como dispepsia y úlceras son comunes, y aproximadamente dos tercios de los usuarios cambian marcas de AINE al menos una vez debido a efectos adversos y mala eficacia (Steinfeld S y BJORKE PA. Results from a patient survey to assess gastrointestinal burden of non-steroidal anti-inflammatory drug therapy contrasted with a review of data from EVA to determine satisfaction with rofecoxib. *Rheumatology (Oxford)* 2002, 41(S1), 23-27). Además, los AINE e ISC pueden dar lugar a complicaciones cardiovasculares (Hillis W S, (2000) Areas of emerging interest in analgesia: cardiovascular complications. *Am. J. Ther.* 9 (3) 259-69). La aspirina puede producir síndrome de Reye en una pequeña proporción de niños, y así la aspirina no está disponible para su uso en niños. El paracetamol tiene que usarse con cuidado ya que una sobredosis es hepatotóxica (Cranswick, N., Coghlan D. Paracetamol efficacy and safety in children: the first 40 years (2000) *Am. J. Ther.* 7(2) 135-41). Los analgésicos narcóticos tienen una variedad de efectos secundarios que incluyen somnolencia, estreñimiento, náuseas, cefalea y vértigo. La administración repetida de potentes analgésicos narcóticos tales como morfina puede producir adicción.

Una ventaja de las chaperoninas como agentes de alivio del dolor con respecto a los actuales fármacos de alivio del dolor es que pueden tener menos efectos secundarios adversos. Se ha estimado que dos billones de personas llevan *M. tuberculosis* sin desarrollar tuberculosis. El portar *M. tuberculosis* no se ha asociado a los efectos secundarios que se observan con la medicación de alivio del dolor comúnmente conocida tales como efectos secundarios gastrointestinales, complicaciones cardiovasculares, hepatotoxicidad, síndrome de Reye o adicción.

35

Otra ventaja con respecto a los agentes de alivio del dolor previamente conocidos es que el efecto analgésico de las chaperoninas durará más.

Con estos antecedentes, los presentes inventores han identificado ahora sorprendentemente péptidos y fragmentos de polipéptidos de la proteína chaperonina chaperonina 60.1 (también denominada en el presente documento Cpn60.1) de *Mycobacterium tuberculosis* que pueden tratar tanto condiciones cancerosas como no cancerosas y también proporcionar alivio del dolor *in vivo* e *in vitro*.

Así, en un primer aspecto, la invención proporciona una molécula de péptido aislada o recombinante que tiene la secuencia de polipéptidos.

45

Por "polipéptido" los presentes inventores también incluyen péptidos, proteínas y compuestos peptidomiméticos. El término "peptidomimético" se refiere a un compuesto que imita la conformación y características deseables de un péptido particular como agente terapéutico, pero que evita las características no deseables.

50

La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que consiste en una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de polipéptidos

(viii) DGSWVNVKSELPAHGHLNVNTLSYGDLAAD;

55

Los términos "secuencia de nucleótidos" o "ácido nucleico" o "polinucleótido" o "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a un heteropolímero de nucleótidos o la secuencia de estos nucleótidos. Estos términos también se refieren a ADN o ARN de origen genómico o sintético que pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden representar la hebra codificante o no codificante, con respecto al ácido nucleico peptídico (PNA) o con

respecto a cualquier material similar a ADN o similar a ARN. En las secuencias en el presente documento, A es adenina, C es citosina, T es timina, G es guanina y N es A, C, G o T (U). Se contempla que si el polinucleótido es ARN, la T (timina) en las secuencias en el presente documento se proporciona sustituida con U (uracilo). Generalmente, los segmentos de ácidos nucleicos proporcionados por la presente invención pueden ensamblarse a

- 5 partir de fragmentos del genoma y ligadores de oligonucleótidos cortos, o de una serie de oligonucleótidos, o de nucleótidos individuales, para proporcionar un ácido nucleico sintético que puede expresarse en un unidad transcripcional recombinante que comprende elementos reguladores derivados de un operón microbiano o viral, o un gen eucariota.
- 10 Los polinucleótidos de la invención incluyen ADN que se produce naturalmente o completamente o parcialmente sintético, por ejemplo, ADNc y ADN genómico, y ARN, por ejemplo, ARNm. Los polinucleótidos pueden incluir todos los de la región codificante del ADNc o pueden representar una porción de la región codificante del ADNc.

La presente invención también proporciona genes correspondientes a las secuencias de ADNc desveladas en el

15 presente documento. Los genes correspondientes pueden aislarse según procedimientos conocidos usando la información de secuencias desvelada en el presente documento. Tales procedimientos incluyen la preparación de sondas o cebadores a partir de la información de secuencias desvelada para la identificación y/o amplificación de genes en bibliotecas genómicas apropiadas u otras fuentes de materiales genómicos. Otra secuencia de 5' y 3' puede obtenerse usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede obtenerse ADNc o ADN

20 genómico de longitud completa que se corresponde con cualquiera de los polinucleótidos de la invención seleccionando bibliotecas de ADNc o ADN genómico apropiadas bajo condiciones de hibridación adecuadas usando cualquiera de los polinucleótidos de la invención o una porción de los mismos como sonda. Alternativamente, los polinucleótidos de la invención pueden usarse como base para el (los) cebador(es) adecuado(s) que permiten la identificación y/o amplificación de genes en bibliotecas de ADN genómico o de ADNc apropiadas.

25 Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden ensamblarse a partir de EST y secuencias (incluyendo secuencias de ADNc y genómico) obtenidas de una o más bases de datos públicas, tales como dbEST, gbpi y UniGene. Las secuencias de EST pueden proporcionar identificar información de secuencias, información de fragmentos o segmentos representativos, o información de segmentos novedosa para el gen de longitud completa.

30 La invención proporciona además una molécula de péptido según la invención para su uso en medicina y/o una molécula de ácido nucleico según la invención para su uso en medicina.

Preferentemente, la invención proporciona una molécula de péptido según la invención y/o una molécula de ácido

35 nucleico según la invención para su uso en prevenir y/o tratar una afección no cancerosa o una afección cancerosa.

La invención proporciona además el uso de una molécula de péptido o una molécula de ácido nucleico de la invención en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar una afección no cancerosa o una afección

40 cancerosa.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende o que consiste en una molécula de péptido según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende o que consiste en una

45 molécula de ácido nucleico según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse usando un sistema de administración de fármacos de liberación sostenida inyectable. Éstos se diseñan específicamente para reducir la frecuencia de inyecciones. Un ejemplo de un sistema tal es Nutropin Depot que

50 encapsula hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) en microesferas biodegradables que, una vez inyectadas, liberan rhGH lentamente durante un periodo sostenido. Preferentemente, la administración se realiza intramuscularmente (i.m.) y/o subcutáneamente (s.c.) y/o intravenosamente (i.v.).

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por un

55 dispositivo quirúrgicamente implantado que libera el fármaco directamente al sitio requerido. Por ejemplo, Vitrasert libera ganciclovir directamente al ojo para tratar retinitis por CMV. La administración directa de este agente tóxico al sitio de enfermedad consigue terapia eficaz sin los efectos secundarios sistémicos significativos del fármaco.

Los sistemas de terapia por electroporación (EPT) también pueden emplearse para la administración de los agentes,

medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención. Un dispositivo que administra un campo eléctrico pulsado a células aumenta la permeabilidad de las membranas celulares al fármaco, produciendo un potenciamiento significativo de la administración de fármacos intracelular.

5 Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse por electroincorporación (EI). La EI se produce cuando pequeñas partículas de hasta 30 micrómetros de diámetro sobre la superficie de la piel experimentan pulsos eléctricos idénticos o similares a aquellos usados en la electroporación. En EI, estas partículas son accionadas a través del estrato córneo y en capas más profundas de la piel. Las partículas pueden cargarse o recubrirse con fármacos o genes o pueden simplemente actuar de "balas" que generan  
10 poros en la piel a través de los cuales pueden entrar los fármacos.

Un procedimiento alternativo de administración de las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención es el sistema inyectable ReGel que es termosensible. Por debajo de la temperatura corporal, ReGel es un líquido inyectable mientras que a la temperatura corporal forma inmediatamente un depósito de gel que se  
15 erosiona lentamente y se disuelve en polímeros biodegradables seguros conocidos. La sustancia activa se administra con el tiempo a medida que se disuelven los biopolímeros.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse por vía oral. El procedimiento emplea un procedimiento natural para la captación oral de vitamina B<sub>12</sub> y/o vitamina D en el  
20 cuerpo para co-administrar proteínas y péptidos. Manejando el sistema de captación de vitamina B<sub>12</sub> y/o vitamina D, los ácidos nucleicos, moléculas y formulaciones farmacéuticas de la invención pueden moverse a través de la pared intestinal. Los complejos se sintetizan entre análogos de vitamina B<sub>12</sub> y/o análogos de vitamina D y el fármaco que retienen tanto afinidad significativa por factor intrínseco (SI) en la porción de vitamina B<sub>12</sub> / porción de vitamina D del complejo como bioactividad significativa de la sustancia activa del complejo.  
25

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden introducirse a células por "péptidos troyanos". Estos son una clase de polipéptidos llamados penetratinas que tienen propiedades de translocación y pueden llevar compuestos hidrófilos a través de la membrana plasmática. Este sistema permite la elección directa como diana de oligopéptidos al citoplasma y núcleo, y puede no ser específico de tipo de célula y  
30 altamente eficaz. Véase Derossi y col. (1998), Trends Cell Biol 8, 84-87.

Preferentemente, el medicamento y/o composición farmacéutica de la presente invención es una dosificación unitaria que contiene una dosis o unidad diaria, subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.  
35

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se administrarán normalmente por vía oral o por cualquier vía parenteral, en forma de una composición farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en forma de un ácido, o base, sal de adición no tóxico orgánico, o inorgánico, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y paciente que va a tratarse, además de la vía  
40 de administración, las composiciones pueden administrarse a dosis variables.

En terapia humana, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse solos, pero generalmente se administrarán en mezcla con un excipiente farmacéutico, diluyente o vehículo adecuado seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y práctica farmacéutica  
45 convencional.

Por ejemplo, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por vía oral, bucalmente o sublingualmente en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener aromatizantes o colorantes, para administraciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención también  
50 pueden administrarse mediante inyección intracavernosa.

Tales comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato cálcico, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de la granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.  
55

También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. A este respecto, excipientes preferidos incluyen lactosa, almidón, celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los agentes de la invención pueden combinarse con diversos edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, con emulsionantes y/o agentes de suspensión, y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse parenteralmente, por ejemplo, intravenosamente, intra-arterialmente, intraperitonealmente, intratecalmente, intraventricularmente, intraesternalmente, intracranealmente, intramuscularmente o subcutáneamente, o pueden administrarse por técnicas de infusión. Se usan mejor en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales suficientes o glucosa para hacer la disolución isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas deben estar adecuadamente tamponadas (preferentemente a un pH de de 3 a 9), si fuera necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas bajo condiciones estériles se realiza fácilmente por técnicas farmacéuticas convencionales muy conocidas para aquellos expertos en la materia.

Medicamentos y composiciones farmacéuticas adecuados para administración parenteral incluyen disoluciones para inyecciones estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y espesantes. Los medicamentos y composiciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de uso. Las disoluciones y suspensiones de inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito.

Para administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosificación diario de las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención será normalmente de 0,1 a 100 mg por adulto por día administrado en dosis individuales o divididas.

Así, por ejemplo, los comprimidos o cápsulas de las moléculas de la invención pueden contener de 0,1 mg a 100 mg de agente activo para administración individual o dos o más cada vez, según convenga. El médico en cualquier caso determinará la dosificación actual que será más adecuada para cualquier paciente individual y variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular. Las dosificaciones anteriores son a modo de ejemplo del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se merezcan mayores o menores intervalos de dosificación y tales están dentro del alcance de la presente invención.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse intranasalmente o por inhalación y se administran convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de spray en aerosol de un recipiente presurizado, bomba, spray o nebulizador con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A, o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. El recipiente presurizado, bomba, spray o nebulizador puede contener una disolución o suspensión del agente activo, por ejemplo, usando una mezcla de etanol y el propulsor como disolvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitano. Cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla en polvo de un agente de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las formulaciones en aerosol o polvo seco se disponen preferentemente de manera que cada dosis medida o "descarga" contenga al menos 0,1 mg de una molécula de la invención para la administración al paciente. Se apreciará que la dosis diaria global con un aerosol variará de paciente a paciente, y puede administrarse en una dosis única o, más normalmente, en dosis divididas durante todo el día.

Alternativamente, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en forma de un supositorio o pesario, o pueden aplicarse apicalmente en forma de una loción, disolución, crema, gel, pomada o polvo para espolvorear. Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse transdérmicamente, por ejemplo, por el uso de un parche para la piel. También pueden administrarse por vía ocular, particularmente para tratar enfermedades del ojo.

Para uso oftálmico, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica ajustada al pH o, preferentemente, como disoluciones en solución salina estéril isotónica ajustada al pH, opcionalmente en combinación con un conservante tal como un cloruro de benzalconio. Alternativamente, pueden formularse en una pomada tal como petrolato.

5

Para administración tópica a la piel, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse como una pomada adecuada que contiene el agente activo en suspensión o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina filante, propilenglicol, agente de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, pueden formularse como una loción o crema adecuada, en suspensión o disuelto en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, ésteres cetílicos, cera, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

10

Formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

15

Generalmente, en seres humanos, la administración oral o parenteral de las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de los agentes de la invención de la invención es la vía preferida, que es la más conveniente.

20

Para uso veterinario, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se administran como una formulación adecuadamente aceptable según la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará la pauta de dosificación y vía de administración que será la más apropiada para un animal particular.

25

Convenientemente, la formulación es una formulación farmacéutica. Ventajosamente, la formulación es una formulación veterinaria.

30

Preferentemente, la composición farmacéutica es para su uso en prevenir o tratar una afección no cancerosa. En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para prevenir y/o tratar una afección no cancerosa o una afección cancerosa en un paciente que comprende la etapa de administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una molécula de péptido según la invención o una molécula de ácido nucleico según la invención, o una composición farmacéutica según la invención.

35

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" los presentes inventores indican una cantidad de una molécula de péptido según la invención o una molécula de ácido nucleico según la invención, que cuando se administra al sujeto tanto sola como en combinación con otro agente, mejora un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección.

40

Por "enfermedad autoinmunitaria" los presentes inventores incluyen el significado de casos en los que puede mostrarse que el proceso autoinmunitario contribuye a la patogénesis de una enfermedad. Tales enfermedades están normalmente asociadas a una respuesta inmunitaria tipo linfocitos T colaboradores 1 (Th-1).

45

Por "afecciones alérgicas" los presentes inventores incluyen el significado de afecciones asociadas a una respuesta inmunitaria tipo linfocitos T colaboradores 2 (Th-2). En la reacción alérgica se producen altos niveles de IgE y las respuestas inmunitarias de Th-2 predominan con respecto a las respuestas de Th-1, produciendo respuesta inflamatoria. Ejemplos de afecciones alérgicas incluyen las siguientes: asma, rinitis/fiebre del heno, eccema y anafilaxia.

50

Por "adyuvante" los presentes inventores indican cualquier sustancia que, cuando se incorpora en o se administra simultáneamente con antígeno, potencia la respuesta inmunitaria.

55

Normalmente, la afección no cancerosa está seleccionada del grupo que comprende o que consiste en: trastornos autoinmunitarios tales como anemia hemolítica, trombocitopenia, tiroiditis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes autoinmune, miastenia grave, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, aterosclerosis y encefalitis autoinmune; afecciones alérgicas tales como eccema, dermatitis, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica; enfermedades alérgicas de las vías respiratorias; síndrome hipereosinofílico; dermatitis de contacto, alergia

alimentaria; y enfermedades respiratorias caracterizadas por inflamación eosinófila de las vías respiratorias e hiperreactividad de las vías respiratorias, tales como asma alérgica, asma intrínseca, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía eosinófila, bronquitis alérgica, bronquiectasia, asma ocupacional, síndrome de enfermedad reactiva de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinofílico, enfermedad pulmonar 5 parasítica.

Otros ejemplos de afecciones autoinmunitarias son, por ejemplo, enfermedad del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, inflamación pulmonar autoinmunitaria, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis autoinmune, diabetes mellitus dependiente de insulina, miastenia grave, enfermedad de 10 injerto contra huésped y enfermedad ocular inflamatoria autoinmunitaria. Una proteína tal (o antagonistas de la misma, que incluyen anticuerpos) de la presente invención puede también ser útil en el tratamiento de reacciones y afecciones alérgicas (por ejemplo, anafilaxia, enfermedad del suero, reacciones a fármacos, alergias alimentarias, alergias a venenos de insectos, mastocitosis, rinitis alérgica, neumonitis por hiperreactividad, urticaria, angioedema, eccema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, 15 conjuntivitis alérgica, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis venérea, conjuntivitis papilar gigante y alergias de contacto), tales como asma (particularmente asma alérgica) u otros problemas respiratorios. Otras afecciones en las que se desea supresión inmunitaria (que incluye, por ejemplo, trasplante de órganos) también pueden ser tratables usando una proteína (o antagonistas de la misma) de la presente invención. Los efectos terapéuticos de los polipéptidos o antagonistas de los mismos sobre las reacciones alérgicas pueden evaluarse por modelos animales *in* 20 *vivo* tales como la prueba de potenciamiento del contacto acumulada (Lastbom y col., Toxicology 125: 59-66, 1998), prueba de punción de la piel (Hoffmann y col., Allergy 54: 446-54, 1999), prueba de sensibilización de la piel de cobaya (Vohr y col., Arch. Toxicol. 73: 501-9) y ensayo de los ganglios linfáticos locales murinos (Kimber y col., J. Toxicol. Environ. Health 53: 563-79).

25 Ensayos adecuados para la citotoxicidad de timocitos o esplenocitos incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Current Protocols in Immunology, ed por J. E. Coligan y col., Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann y col., J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa y col., J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai y col., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai y 30 col., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bowman y col., J. Virology 61:1992-1998; Bertagnolli y col., Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Brown y col., J. Immunol. 153:3079-3092, 1994.

Ensayos para respuestas de inmunoglobulinas dependientes de linfocitos T y conmutación de isotipo (que identificará, entre otros, proteínas que modulan respuestas de anticuerpos dependientes de linfocitos T y que 35 afectan perfiles de Th1/Th2) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Maliszewski, J. Immunol. 144:3028-3033, 1990; y Assays for B cell function: *In vitro* antibody production, Mond, J. J. and Brunswick, M. en Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan y col., eds. Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

Ensayos de reacción de linfocitos mixtos (MLR) (que identificarán, entre otros, proteínas que generan 40 predominantemente respuestas de Th1 y CTL) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Current Protocols in Immunology, ed por J. E. Coligan y col., Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Takai y col., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai y col., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnolli y col., J. Immunol. 149:3778-3783, 1992.

45 Ensayos dependientes de células dendríticas (que identificarán, entre otros, proteínas expresadas por células dendríticas que activan linfocitos T sin tratamiento previo) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Guery y col., J. Immunol. 134:536-544, 1995; Inaba y col., J. Experimental Medicine 173:549-559, 1991; Macatonia y col., J. Immunol. 154:5071-5079, 1995; Porgador y col., J. Experimental Medicine 182:255-260, 1995; Nair y col., J. Virology 50 67:4062-4069, 1993; Huang y col., Science 264:961-965, 1994; Macatonia y col., J. Experimental Medicine 169:1255-1264, 1989; Bhardwaj y col., J. Clinical Research 94:797-807, 1994; y Inaba y col., J. Experimental Medicine 172:631-640, 1990.

Ensayos para la supervivencia/apoptosis de linfocitos (que identificarán, entre otros, proteínas que previenen la 55 apoptosis después de la inducción de superantígenos y proteínas que regulan la homeostasia de linfocitos) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Darzynkiewicz y col., Cytometry 13:795-808, 1992; Gorczyca y col., Leukemia 7:659-670, 1993; Gorczyca y col., Cancer Research 53:1945-1951, 1993; Itoh y col., Cell 66:233-243, 1991; Zacharchuk, J. Immunol. 145:4037-4045, 1990; Zamai y col., Cytometry 14:891-897, 1993; Gorczyca y col., Int. J. Oncol. 1:639-648, 1992.

Ensayos para proteínas que influyen en etapas tempranas del compromiso y desarrollo de linfocitos T incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Antica y col., Blood 84:111-117, 1994; Fine y col., Cellular Immunology 155:111-122, 1994; Galy y col., Blood 85:2770-2778, 1995; Toki y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7548-7551, 1991.

- 5 Las composiciones de la presente invención pueden también presentar actividad antiinflamatoria. La actividad antiinflamatoria puede lograrse proporcionando un estímulo a células que participan en la respuesta inflamatoria, inhibiendo o promoviendo las interacciones célula-célula (tales como, por ejemplo, adhesión de células), inhibiendo o promoviendo la quimiotaxia de células que participan en el proceso inflamatorio, inhibiendo o promoviendo la extravasación de células, o estimulando o suprimiendo la producción de otros factores que inhiben o promueven
- 10 más directamente una respuesta inflamatoria. Las composiciones con tales actividades pueden usarse para tratar afecciones inflamatorias que incluyen afecciones crónicas o agudas, que incluyen, sin limitación, indicación asociada a infección (tal como choque séptico, septicemia o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)), lesión por isquemia-reperusión, letalidad por endotoxinas, artritis, rechazo hiperagudo mediado por el complemento, nefritis, lesión pulmonar inducida por citocinas o quimiocinas, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn o
- 15 resultante de la producción en exceso de citocinas tales como TNF o IL-1. Las composiciones de la invención también pueden ser útiles para tratar anafilaxia e hiperreactividad a una sustancia o material antigénico. Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para prevenir o tratar afecciones tales como, pero no se limitan a, septicemia, pancreatitis aguda, choque de endotoxinas, choque inducido por citocinas, artritis reumatoide, artritis inflamatoria crónica, lesión de células pancreáticas de diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de injerto contra
- 20 huésped, enfermedad inflamatoria del intestino, inflamación asociada a enfermedad pulmonar, otra enfermedad autoinmunitaria o enfermedad inflamatoria, un agente antiproliferativo tal como para leucemia mielógena aguda o crónica o en la prevención de parto prematuro secundario a infecciones intrauterinas.

En una realización preferida, la afección no cancerosa es asma; alternativamente, la afección no cancerosa es

25 artritis.

Los efectos inmunosupresores de las composiciones de la invención contra artritis reumatoide se determinan en un sistema de modelo animal experimental. El sistema de modelo experimental es artritis inducida por adyuvante en ratas, y el protocolo se describe por J. Holoshitz y col., 1983, Science, 219:56, o por B. Waksman y col., 1963, Int.

30 Arch. Allergy Appl. Immunol., 23:129. La inducción de la enfermedad puede producirse por una única inyección, generalmente intradérmicamente, de una suspensión de *Mycobacterium tuberculosis* muerto en adyuvante completo de Freund (CFA). La vía de inyección puede variar, pero las ratas pueden inyectarse en la base de la cola con una mezcla de adyuvantes. El polipéptido se administra en disolución tamponada con fosfato (PBS) a una dosis de aproximadamente 1-5 mg/kg. El control consiste en administrar PBS solo.

- 35 El procedimiento para probar los efectos del compuesto de prueba consistiría en inyectar intradérmicamente *Mycobacterium tuberculosis* muerto en CFA seguido de administrar inmediatamente el compuesto de prueba y posterior tratamiento cada dos días hasta el día 24. 14, 15, 18, 20, 22 y 24 días después de la inyección de CFA de *Mycobacterium* puede obtenerse una puntuación de artritis global como se describe por J. Holoshitz anteriormente.
- 40 Un análisis de los datos revelaría que el compuesto de prueba tendría un espectacular efecto sobre la hinchazón de las articulaciones como se mide por una disminución de la puntuación de artritis.

Los tratamientos del cáncer promueven la regresión tumoral inhibiendo la proliferación de células tumorales, inhibiendo la angiogénesis (crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que es necesario para soportar el crecimiento

45 tumoral) y/o prohibiendo la metástasis reduciendo la motilidad o invasividad de células tumorales. Las composiciones terapéuticas de la invención pueden ser eficaces en oncología adulta y pediátrica que incluye en tumores/tumores malignos en fase sólida, tumores localmente avanzados, sarcomas de tejido blando humanos, cáncer metastásico, que incluye metástasis linfáticas, tumores malignos de células sanguíneas que incluyen mieloma múltiple, leucemias agudas y crónicas, y linfomas, cánceres de cabeza y cuello que incluyen cáncer de

50 boca, cáncer de laringe y cáncer de tiroides, cánceres de pulmón que incluyen carcinoma de células pequeñas y cánceres de células no pequeñas, cánceres de mama que incluyen carcinoma de células pequeñas y carcinoma ductal, cánceres gastrointestinales que incluyen cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer colorrectal y pólipos asociados a neoplasia colorrectal, cánceres pancreáticos, cáncer de hígado, cánceres urológicos que incluyen cáncer de vejiga y cáncer de próstata, tumores malignos del aparato genital femenino que

55 incluyen carcinoma de ovarios, cánceres uterinos (que incluyen de endometrio) y tumor sólido en el folículo ovárico, cánceres de riñón que incluyen carcinoma de células renales, cánceres cerebrales que incluyen tumores cerebrales intrínsecos, neuroblastoma, tumores cerebrales astrocíticos, gliomas, invasión de células tumorales metastásicas en el sistema nervioso central, cánceres de huesos que incluyen osteomas, cánceres de piel que incluyen melanoma maligno, progresión tumoral de queratinocitos cutáneos humanos, carcinoma de células escamosas, carcinoma de

células basales, hemangiopericitoma y sarcoma de Kaposi.

Polipéptidos, polinucleótidos o moduladores de polipéptidos de la invención (incluyendo inhibidores y estimulantes de la actividad biológica del polipéptido de la invención) pueden administrarse para tratar cáncer. Las composiciones terapéuticas pueden administrarse en dosificaciones terapéuticamente eficaces solas o en combinación con terapia adyuvante del cáncer tal como cirugía, quimioterapia, radioterapia, termoterapia y terapia láser, y puede proporcionar un efecto beneficioso, por ejemplo, reducir el tamaño del tumor, ralentizar la velocidad de crecimiento tumoral, inhibir la metástasis, o mejorar de otro modo el estado clínico global, sin erradicar necesariamente el cáncer.

10

La composición también puede administrarse en cantidades terapéuticamente eficaces como una porción de una mezcla antineoplásica. Una mezcla antineoplásica es una mezcla del polipéptido o modulador de la invención con uno o más fármacos antineoplásicos, además de un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración. El uso de mezclas antineoplásicas como tratamiento del cáncer es rutinario. Los fármacos antineoplásicos que son muy conocidos en la técnica y pueden usarse como tratamiento en combinación con el polipéptido o modulador de la invención incluyen: actinomicina D, aminoglutetimida, asparaginasa, bleomicina, busulfano, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino (cis-DDP), ciclofosfamida, HCl de citarabina (arabinósido de citosina), dacarbazina, dactinomicina, HCl de daunorubicina, HCl de doxorubicina, fosfato de estramustina sódico, etopósido (V16-213), floxuridina, 5-fluorouracilo (5-Fu), flutamida, hidroxiurea (hidroxicarbamida), ifosfamida, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, acetato de leuprolida (análogo del factor que libera LHRH), lomustina, HCl de mecloretamina (mostaza de nitrógeno), melfalan, mercaptopurina, mesna, metotrexato (MTX), mitomicina, HCl de mitoxantrona, octreotida, plicamicina, HCl de procarbazona, estreptozocina, citrato de tamoxifeno, tioguanina, tiotepa, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, amsacrina, azacitidina, hexametilmelamina, interleucina-2, mitoguazona, pentostatina, semustina, tenipósido y sulfato de vindesina.

25

Además, las composiciones terapéuticas de la invención pueden usarse para el tratamiento profiláctico del cáncer. Hay afecciones hereditarias y/o situaciones medioambientales (por ejemplo, exposición a carcinógenos) conocidas en la técnica que predisponen a un individuo a desarrollar cánceres. Bajo estas circunstancias, puede ser beneficioso tratar estos individuos con dosis terapéuticamente eficaces del polipéptido de la invención para reducir el riesgo de desarrollar cánceres.

30

Pueden usarse modelos *in vitro* para determinar dosis eficaces del polipéptido de la invención como posible tratamiento del cáncer. Estos modelos *in vitro* incluyen ensayos de proliferación de células tumorales cultivadas, crecimiento de células tumorales cultivadas en agar suave (véase Freshney, (1987) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Wiley-Liss, New York, NY Cap. 18 y Cap. 21), sistemas de tumor en ratones sin pelo como se describen en Giovanella y col., J. Natl. Can. Inst., 52: 921-30 (1974), movilidad y potencial invasivo de células tumorales en ensayos en cámara de Boyden como se describen en Pilkington y col., Anticancer Res., 17: 4107-9 (1997), y ensayos de angiogénesis tales como inducción de la vascularización de la membrana corioalantoidea de pollito o inducción de la migración de células endoteliales vasculares como se describe en Ribatta y col., Intl. J. Dev. Biol., 40: 1189-97 (1999) y Li y col., Clin. Exp. Metastasis, 17:423-9 (1999), respectivamente. Están disponibles líneas de células tumorales adecuadas, por ejemplo, de los catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

35

40

Pueden tratarse o prevenirse leucemias y trastornos relacionados por la administración de un terapéutico que promueve o inhibe la función de los polinucleótidos y/o polipéptidos de la invención. Tales leucemias y trastornos relacionados incluyen, pero no se limitan a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica (para una revisión de tales trastornos véase Fishman y col., 1985, Medicine, 2ª ed., J. B. Lippincott Co., Filadelfia).

50

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de péptido según la invención o una molécula de ácido nucleico según la invención para su uso en el alivio de dolor.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que es para su uso en el alivio de dolor. Composiciones farmacéuticas preferidas según la invención se describen anteriormente y en los ejemplos adjuntos.

55

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una molécula de péptido según la invención o una molécula de ácido nucleico según la invención en la fabricación de un medicamento para el alivio del dolor.

Por "uso en el alivio del dolor" los presentes inventores incluyen cualquier tratamiento que influya en el dolor sentido por un individuo, incluyendo tal influencia un retardo en la aparición, una reducción en la gravedad, una reducción de la duración y/o la eliminación de la sensación de dolor (y/o analgesia y/o hiperanalgesia) en un paciente humano o animal. Por "dolor" los presentes inventores también incluyen analgesia y/o hiperanalgesia - por "hiperalgesia" los  
5 presentes inventores indican una aparición más temprana, un aumento en la gravedad, un aumento de la duración, y/o elevada susceptibilidad a la sensación de dolor.

En una realización preferida, el medicamento comprende además al menos un aditivo para ayudar o aumentar la acción de la molécula de péptido o molécula de ácido nucleico. Normalmente, el aditivo está seleccionado de al  
10 menos uno de paracetamol, aspirina, ibuprofeno, otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (ISC), opiáceos.

Por "aditivo" los presentes inventores incluyen un componente que se proporciona, además del medicamento principal, y que es farmacológicamente activo tanto independientemente como en combinación con el medicamento  
15 principal, por lo que su presencia en el medicamento ayuda o aumenta la acción del medicamento principal.

Preferentemente, el medicamento proporciona alivio del dolor prolongado o sostenido.

Ventajosamente, en el uso según la invención, el nivel de dosificación diaria será de 0,0001 a 100.000 mg,  
20 administrado en dosis individuales o divididas; preferentemente, el nivel de dosificación diaria es 0,0001 a 1000 mg.

Formulaciones farmacéuticas preferidas incluyen aquellas en las que el principio activo está presente en al menos 1 % (tal como al menos el 10 %, preferentemente en al menos el 30 % y lo más preferentemente en al menos el 50 %) en peso. Es decir, la relación de principio activo con respecto a los otros componentes (es decir, la adición de  
25 adyuvante, diluyente y vehículo) de la composición farmacéutica es al menos 1:99 (por ejemplo, al menos 10:90, preferentemente al menos 30:70 y lo más preferentemente al menos 50:50) en peso.

Normalmente, el tiempo entre la administración de dosis al paciente es entre seis y doce horas; en una realización preferida, el tiempo entre la administración de dosis al paciente es entre nueve y doce horas después de la dosis  
30 previa; más preferentemente, el tiempo entre la administración de dosis al paciente es entre doce horas y doce días; incluso más preferentemente, el tiempo entre la administración de dosis al paciente es entre doce días y seis meses.

En una realización preferida, la invención proporciona un uso en el que el medicamento de la invención se usa para aliviar el dolor en un paciente humano o animal.  
35

Preferentemente, la composición farmacéutica o el medicamento de la invención se formula para permitir la administración por al menos una vía seleccionada del grupo que comprende o que consiste en: intranasal; oral; parenteral; tópica; oftálmica; supositorio; pesario; o vías por inhalación. Formulaciones adecuadas para tales vías de administración son muy conocidas para aquellos en la materia de la farmacia y medicina y formulaciones a modo de  
40 ejemplo se describen anteriormente y en los ejemplos adjuntos.

Preferentemente, el dolor está seleccionado del grupo que comprende o que consiste en: dolor de espalda; cefalea; dolor de muelas; dolor de oído; artritis; gota; traumatismo de tejido blando; lesión traumática de ligamento y/o tendón; huesos rotos; cáncer; dolor posoperatorio; dolor menstrual; dolor obstétrico; dolor de las vías urinarias; dolor  
45 visceral; quemaduras; abscesos; y otras infecciones.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de alivio del dolor en un paciente que comprende la etapa de administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una molécula de péptido de la invención y/o una molécula de ácido nucleico de la invención y/o composición farmacéutica de la invención.  
50

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una molécula de péptido según la invención y/o una molécula de ácido nucleico según la invención como adyuvante.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema de adyuvantes que comprende (i) una molécula de péptido según la invención y/o una molécula de ácido nucleico según la invención y (ii) un antígeno.  
55

Preferentemente, el antígeno está seleccionado del grupo que comprende o que consiste en: antígeno del carbunco; antígeno del cólera; antígeno diftérico; antígeno de *Haemophilus influenzae* b (Hib); antígeno de la hepatitis A; antígeno de la hepatitis B; antígeno de la gripe; antígeno de la encefalitis japonesa; antígeno del sarampión, paperas

y rubeola (SPR); antígeno meningocócico; antígeno de *Pertussis*; antígeno neumocócico; antígeno de la poliomielititis; antígeno de la rabia; antígeno de la rubeola; antígeno de la viruela y/o de la variolovacuna; antígeno tetánico; antígeno de la encefalitis transmitida por garrapatas; antígeno de la tuberculosis; antígeno tifoideo; antígeno de la varicela/herpes zóster; antígeno de la fiebre amarilla; y antígeno de vacuna veterinaria.

5

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de estimulación de la producción de citocinas en una célula que comprende la etapa de administrar una molécula de péptido según la invención o una molécula de ácido nucleico según la invención.

10 Preferentemente, la producción de citocinas aumenta al menos 10 veces con respecto a niveles normales.

Niveles normales para un tipo de célula particular pueden determinarse fácilmente usando una muestra de control que no se expone al polipéptido o polinucleótido de la invención en cualquiera de los ensayos tratados más adelante o que se describen en los ejemplos.

15

Un polipéptido de la presente invención puede presentar actividad que se refiere a citocina, actividad de proliferación celular (tanto inductora como inhibidora) o de diferenciación celular (tanto inductora como inhibidora), o puede inducir la producción de otras citocinas en ciertas poblaciones de células. Un polinucleótido de la invención puede codificar un polipéptido que presenta tales atributos. Muchos factores de proteína descubiertos hasta la fecha, que

20 incluyen todas las citocinas conocidas, han mostrado actividad en uno o más ensayos de proliferación celular dependiente de factor, y de ahí que los ensayos sirvan de confirmación conveniente de la actividad de citocinas. La actividad de composiciones terapéuticas de la presente invención se demuestra por uno cualquiera de varios ensayos de proliferación celular dependiente de factor rutinarios para líneas celulares que incluyen, sin limitación, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+ (preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1,  
25 Mo7e, CMK, HUVEC y Caco.

Ensayos para la proliferación de linfocitos T o timocitos incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Current Protocols in Immunology, ed por J. E. Coligan y col., Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, In vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Capítulo 7, Immunologic studies in Humans);  
30 Takai y col., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bertagnolli y col., J. Immunol. 145:1706-1712, 1990; Bertagnolli y col., Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Bertagnolli, y col., J. Immunol. 149:3778-3783, 1992; Bowman y col., J. Immunol. 152:1756-1761, 1994.

Ensayos para la producción y/o proliferación de citocinas de células del bazo, células del ganglio linfático o timocitos  
35 incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A. M. y Shevach, E. M. en Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto. 1994; y Measurement of mouse and human interleukin- $\gamma$ , Schreiber, R. D. en Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

Ensayos para la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y linfopoyéticas incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4, Bottomly, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E. en Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; deVries y col., J. Exp. Med. 173:1205-1211, 1991; Moreau y col., Nature 336:690-692, 1988; Greenberger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2931-2938, 1983; Measurement of mouse and human  
45 interleukin 6-Nordan, R. en Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Smith y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:1857-1861, 1986; Measurement of human Interleukin 11--Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S. C. y Turner, K. J. en Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Measurement of mouse and human Interleukin 9-Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S. C. y Turner, K. J. en Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1  
50 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto. 1991.

Ensayos para respuestas de clones de linfocitos T a antígenos (que identificarán, entre otros, proteínas que afectan las interacciones de APC-linfocitos T, además de efectos directos de linfocitos T que miden la proliferación y producción de citocinas) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Current Protocols in Immunology, ed por J. E.  
55 Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, In vitro assays for Mouse Lymphocyte Function; Capítulo 6, Cytokines and their cellular receptors; Capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6091-6095, 1980; Weinberger y col., Eur. J. Immun. 11:405-411, 1981; Takai y col., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai y col., J. Immunol. 140:508-512, 1988.

En una realización preferida, la citocina está seleccionado del grupo que comprende o que consiste en: IL-1 $\beta$ ; IL-2; IL-6; IL-8; IL-10; IL-12; TNF- $\alpha$ ; interferón- $\gamma$ ; GM-CSF.

La invención proporciona además un procedimiento de evaluación de la presencia y/o cantidad en una muestra de una molécula de péptido según la invención o una molécula de ácido nucleico según la invención que comprende o que consiste en las etapas de:

- i) proporcionar una muestra de prueba;
- ii) poner en contacto la muestra de prueba con una célula;
- iii) medir y/o detectar el nivel de producción de una o más citocinas por la célula;
- iv) comparar el nivel de producción de una o más citocinas en (iii) con el nivel de producción de la una o más citocinas en una muestra de control

en el que un mayor nivel de producción de una o más citocinas inducidas por la muestra de prueba en comparación con la muestra de control indica la presencia y/o cantidad en la muestra de prueba de una molécula de péptido según la invención o una molécula de ácido nucleico según la invención.

“MT60.1”, “Mtcpn60.1”, “cpn 60.1”, “60.1” y “chaperonina 60.1” se usan indistintamente en toda la memoria descriptiva para referirse a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 25.

El listado o discusión de un documento aparentemente previamente publicado en esta memoria descriptiva no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento sea parte de los estados de la materia o sea conocimiento general común.

Ejemplos no limitantes preferidos que incorporan ciertos aspectos de la invención se describirán ahora, con referencia a las siguientes figuras:

**Figura 1.** El reclutamiento de eosinófilos a las vías respiratorias 24 h después de la exposición repetida a albúmina de huevo se inhibió en ratones tratados con Cpn60.1, Cpn10, pero no Cpn60.2. Las líneas verticales representan el error estándar de la media (EEM) de 4-12 (Cpn60.1), 3-5 (Cpn60.2), 4-10 (Cpn10) animales por grupo. \*Reducción significativa en el porcentaje de eosinófilos en comparación con albúmina de huevo sola.

**Figura 2.** La hiperreactividad bronquial a metacolina 24 h después de la exposición repetida a albúmina de huevo se redujo en ratones tratados con Cpn60.1, Cpn10, pero no Cpn60.2 (n=16-17). Las líneas verticales representan EEM.

**Figura 3.** Los niveles de citocinas en líquido BAL 24 h después de la exposición repetida a albúmina de huevo se inhibió en ratones tratados con Cpn60.1. Las líneas verticales representan EEM. \*Reducción significativa en los niveles de citocinas en comparación con albúmina de huevo sola (n=8-10).

**Figura 4.** La transferencia de células dendríticas pretratadas con Cpn10 (10  $\mu$ g/ml) in vitro a ratones receptores sensibilizados a OVA inhibió significativamente la migración de eosinófilos al pulmón. Las líneas verticales representan EEM. \*Reducción significativa en el número de eosinófilos en comparación con ratones sensibilizados instilados con CD sin tratar (n=9-15).

**Figura 5.** Células dendríticas pulsadas con Cpn60.1 durante 48 horas produjeron IL-12 de una manera dependiente de la dosis. El pretratamiento de células dendríticas con Cpn10 (10  $\mu$ g/ml) indujo bajos niveles de IL-12. Las células se estimularon con las chaperoninas durante 48 h y se probaron por cuadruplicado y cada columna representa la media de dos experimentos. Las líneas verticales representan la desviación estándar (DE).

**Figura 6.** La preincubación de células dendríticas con Cpn60.1 durante 24 horas inhibe la producción de IL-12 inducida por LPS. Las células se estimularon con las chaperoninas durante 248 h y con LPS durante otras 24 h. Todas las concentraciones se probaron por cuadruplicado y cada columna representa la media de dos experimentos. Las líneas verticales representan la DE.

**Figura 7.** El pretratamiento de células dendríticas con Cpn60.1 o Cpn10 (10  $\mu$ g/ml) suprimió los niveles de IL-4 en un co-cultivo de células dendríticas y linfocitos T RD11.10. IL-5 e IL-10 no se detectaron en este cultivo. Las células dendríticas se estimularon con las chaperoninas durante 24 h antes de co-cultivarlas con células

DO.11. El co-cultivo se mantuvo durante 6 días y las células se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 durante otras 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se probaron por cuadruplicado. Las líneas verticales representan la DE.

- 5 **Figura 8.** El pretratamiento de células del bazo de ratones C57Bl/6 con diversas concentraciones de Cpn60.1 y sus péptidos induce la liberación de IL-12 *in vitro*. El medio contuvo 5 µg/ml de polimixina B. Las células se estimularon con las chaperoninas durante 24 h y los sobrenadantes se probaron por cuadruplicado. Cada línea representa la media de dos experimentos.
- 10 **Figura 9.** Células del bazo recogidas de ratones TLR4 KO presentaron una respuesta reducida a la chaperonina 60.1 y sus péptidos cuando se comparó con sus ratones C57bl/6 homólogos naturales. Los ratones TLR2 KO también presentaron una respuesta inhibida a las chaperoninas. Todas las concentraciones se probaron por cuadruplicado. Las líneas verticales representan la DE.
- 15 **Figura 10.** El reclutamiento de células totales a las vías respiratorias 24 h después de la exposición repetida a albúmina de huevo se inhibió en ratones tratados con Cpn60 y péptido 4 de Cpn60.1. Las líneas verticales representan el EEM de 5-9 animales por grupo. \*Reducción significativa en el número de células totales en comparación con el grupo de referencia. \*\*Reducción significativa en el número de células totales en comparación con albúmina de huevo sola.
- 20 **Figura 11.** El reclutamiento de eosinófilos a las vías respiratorias 24 h después de la exposición repetida a albúmina de huevo se inhibió en ratones tratados con Cpn60 y péptido 4 de Cpn60.1. Las líneas verticales representan el EEM de 5-9 animales por grupo. \*Reducción significativa en el número de eosinófilos en comparación con el grupo de referencia. \*\*Reducción significativa en el número de eosinófilos en comparación con albúmina de huevo sola.
- 25 **Figura 12.** Los niveles de IL-5 en líquido BAL 24 h después de la exposición repetida a albúmina de huevo no se inhibió significativamente en ratones tratados con Cpn60.1 o péptido 4 de Cpn60.1. Las líneas verticales representan el EEM.
- 30 **Figura 13.** Los niveles de IgE total circulante en suero 24 h después de la exposición repetida a albúmina de huevo se inhibió significativamente en ratones tratados con péptido 4 de Cpn60.1 (0,005 µg/ratón). Las líneas verticales representan el EEM. \*\*Aumento significativo en los niveles de IgE total en comparación con albúmina de huevo sola.
- 35 **Figura 14.** Efecto de Cpn60.1 sobre la hiperalgesia mecánica en ratas tratadas con CFA (n=6).
- Figura 15.** Efecto de Cpn60.1 sobre la hiperalgesia térmica en ratas tratadas con CFA (n=6).
- 40 **Figura 16.** Efecto de Cpn60.1 sobre la hiperalgesia mecánica en ratas tratadas con UV (n=6).
- Figura 17.** Efecto de Cpn60.1 sobre la hiperalgesia térmica en ratas tratadas con UV (n=6).
- 45 **Figura 18.** El pretratamiento de monocitos de sangre periférica humana con Cpn60.1 suprime la secreción de TNF-alfa inducida por LPS. Los datos muestran una atenuación de la secreción de TNF-α con concentración creciente de Cpn60.1. Máxima inhibición a 1 ng/ml aunque no significativa. Los datos se representaron como media ± EEM (n=5).
- 50 **Figura 19.** El pretratamiento de monocitos de sangre periférica humana con Cpn60.1 suprime la secreción de TNF-alfa inducida por LPS en presencia de polimixina B. Los datos muestran una atenuación de la secreción de TNF-α con concentración creciente de Cpn60.1. Máxima inhibición a 1 ng/ml. Los datos se representaron como media ± EEM (n=5).
- 55 **Figura 20.** El pretratamiento de monocitos de sangre periférica humana con Cpn10 no suprime la secreción de TNF-alfa inducida por LPS. Cpn10 no tuvo efecto en inhibir la secreción de TNF-α a ninguna concentración cuando se comparó con LPS. Los datos se representaron como media ± EEM (n=5).
- Figura 21.** El pretratamiento de monocitos de sangre periférica humana con Cpn60.1 o péptidos de Cpn60.1 suprimen la liberación de TNF-alfa inducida por LPS. Los datos se expresan como la media de dos

experimentos separados por triplicado expresados como porcentaje de valores de control.

**Figura 22.** Número total de neutrófilos recuperados de lavado de concentración creciente de LPS (1 µg/ml) frente a ratones expuestos a solución salina a 24 horas (n=4).

5

**Figura 23.** Número total de neutrófilos recuperados de lavado de ratones tratados con LPS (1 µg/ml) y ratones tratados con Cpn60.1 a 24 horas (n=4).

**Figura 24.** Número total de neutrófilos recuperados de lavado de concentración creciente de LPS (1 µg/ml) frente a ratones expuestos a solución salina a 24 horas (n=4). Animales tratados con Cpn60.1 redujeron la neutrofilia inducida por LPS. Se inhibió significativamente en comparación con el grupo tratado con LPS (\*p<0,05).

10

**Figura 25.** Péptidos que cubren el dominio ecuatorial de Cpn60.1 de *Mycobacterium tuberculosis*. El dominio ecuatorial está marcado por las líneas negras continuas y recuadros/flechas bajo la secuencia.

15

Los péptidos 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10 están altamente expuestos en la superficie y/o regiones de alta disimilitud entre Cpn60.1 y Cpn60.2 y deben, por tanto, ser los péptidos posiblemente más interesantes. Los péptidos 3 y 9 están expuestos en la superficie, pero hacia la cara interna de una estructura oligomérica putativa, y son altamente interesantes de estudiar. El péptido 4 y 6 están ambos parcialmente enterrados en la estructura y pueden ser de relativamente menor interés posible.

20

## Ejemplos

### 25 Visión general de los ejemplos

Los objetivos de los experimentos de los presentes inventores fueron investigar las propiedades antiinflamatorias de chaperoninas en un modelo de inflamación alérgica. Los resultados extienden los hallazgos previos de los presentes inventores que muestran que tanto Cpn60.1 como Cpn10 inhibieron las respuestas inflamatorias alérgicas *in vivo*, y al nivel celular pudieron inhibir la función de células dendríticas que podría explicar las propiedades antiinflamatorias de estas moléculas *in vivo*.

30

Queda por establecer el determinante estructural de esta propiedad antiinflamatoria de Cpn60.1. Por tanto, se investigaron diversas secuencias de péptidos de Cpn60.1 para posibles propiedades antiinflamatorias *in vitro* e *in vivo*. Pareció que varios de estos péptidos tenían actividad inmunomoduladora *in vitro* y propiedades antiinflamatorias *in vivo*, sugiriendo que los determinantes estructurales de la actividad que residen dentro de las chaperoninas son susceptibles a interrogación en vista de encontrar novedosos agentes antiinflamatorios.

35

### Ejemplo 1 - Efecto de Cpn60.1 y 10 en un modelo murino de inflamación alérgica

40

Enfermedades alérgicas, que incluyen asma, se consideran que se asocian a actividad en exceso de linfocitos Th2, y así las estrategias diseñadas para inducir desviación inmunitaria pueden ser útiles en suprimir la inflamación alérgica en asma. Se ha mostrado que tanto *M. tuberculosis* como la vacuna BCG de *M. bovis*, que es antigénicamente muy similar a *M. tuberculosis* (Harboe M y col. Scand J Immunol. 1979; 9:115-24), pueden suprimir la inflamación pulmonar alérgica. Los datos de Helperby Therapeutics han confirmado que *M. tuberculosis* tiene tres chaperoninas, concretamente 60.1, 60.2 y 10. Además, los presentes inventores han demostrado previamente que Cpn10 y 60.1, pero no 60.2, suprimieron la inflamación pulmonar en un modelo murino de asma (Riffo-Vasquez, Y. y col., Clin. Exp. Allergy, 2004, 34:712-19).

45

La inflamación alérgica en el pulmón se induce por 2 inyecciones intraperitoneales de 10 µg de albúmina de huevo (OVA) en 1 mg de alumbre con intervalo de 7 días entre ellas. Los animales de control reciben alumbre solo. En el día 14, todos los animales se exponen a un aerosol de OVA durante 25 minutos, una vez al día durante 3 días consecutivos. Todas las mediciones se realizan 24 h después de la exposición al último antígeno.

50

Los presentes inventores han mostrado que la administración intratraqueal de 10 µg de Cpn60.1 o Cpn10, 24 h antes de la segunda inyección de OVA y una hora antes de cada exposición a antígeno, puede inhibir significativamente la inflamación de las vías respiratorias (Figura 1), hiperreactividad (Figura 2) y liberación de citocinas en el pulmón (Figura 3). Sin embargo, queda por establecer el mecanismo por el que estas chaperoninas ejercen este efecto *in vivo*.

55

**Ejemplo 2 - Efecto de Cpn10 y Cpn60.1 sobre la función células dendríticas murinas**

Se ha mostrado que las proteínas de choque térmico (hsp) micobacterianas pueden potenciar el procesamiento y presentación de antígenos por células dendríticas (CD) de proteínas exógenas a linfocitos T, sin la necesidad de formación de complejos entre hsp y la proteína (Chen K., y col., J. Leuk. Biol., 2004, 75:1-7).

Con el fin de aclarar el mecanismo por el que Cpn10 y 60.1 regularon la información pulmonar alérgica *in vivo*, los presentes inventores han investigado el efecto de estas chaperoninas sobre la función de células dendríticas de la médula ósea *in vitro*.

10

Se recogieron células de la médula ósea de ratones Balb/c y se cultivaron durante 6 días en medio Eagle modificado por Dulbecco completo que contenía 8 ng/ml de GM-CSF de ratón. En el día 6 de cultivo, las células se recogieron, se volvieron a sembrar durante 1 hora para la eliminación de células adherentes, se lavaron y se sembraron a  $2 \times 10^6$  células/pocillo en placa de 6 pocillos para el análisis de la expresión de marcadores de superficie y experimentos de transferencia y a  $10^5$  células/pocillo en placa de 96 pocillos para las medidas de citocinas. En otros experimentos, las células se incubaron a  $10^6$  células/pocillo durante 24 h con las chaperoninas y luego otras 24 h adicionales con LPS (10 ng/ml).

15

Las CD se pretrataron *in vitro* durante 24 h con Cpn10 (10  $\mu$ g/ml) y luego se administraron tópicamente a los pulmones de ratones receptores sensibilizados a OVA. Este tratamiento inhibió significativamente la migración de eosinófilos al pulmón (Figura 4), reproduciendo el efecto observado *in vivo* con la propia chaperonina.

20

El pretratamiento de CD *in vitro* con Cpn60.1 (0,1-30  $\mu$ g/ml) indujo la liberación de IL-12 de un modo dependiente de la dosis. Sin embargo, el pretratamiento de CD con Cpn10 (10  $\mu$ g/ml) indujo menores niveles de liberación de IL-12 en comparación con LPS y Cpn60.1 (Figura 5).

25

La pre-incubación de Cd con Cpn60.1, pero no Cpn10, durante 24 horas inhibió la producción de IL-12 inducida por LPS (Figura 6).

CD pre-tratadas con Cpn60.1 (10  $\mu$ g/ml) o Cpn10 (10  $\mu$ g/ml) durante 24 h suprimieron la liberación de IL-4 de linfocitos T RD11.10 en un co-cultivo de CD/linfocitos T. Después de 6 días de cultivo, las células se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 durante adicionalmente 24 horas y se recogieron los sobrenadantes. IL-5 y IL-10 no se detectaron en este cultivo (Figura 7).

30

**Ejemplo 3 - El efecto de péptidos de chaperonina 60.1 in vitro**

Con el fin de determinar los determinantes estructurales de la chaperonina 60.1 responsables de las acciones biológicas observadas, los presentes inventores han investigado el efecto de 5 secuencias de péptidos diferentes designados en este estudio como péptido 1, 2, 3, 4 y 6 en diversos ensayos biológicos *in vitro*.

40

Las secuencias específicas se muestran a continuación:

<b>Nombre del péptido</b>	<b>Secuencia de péptidos</b>
Péptido 1 (p60.1_30)	LGPRGRHWLAKAFGGPTVTN
Péptido 2 (p60.1_406)	EEGIVPGGGASLIHQARKALTELASL
Péptido 3 (p60.1_433)	TGDEVLGVDVFSEALAPLFWIAANAGL
Péptido 4 (p60.1_461)	DGSVVVNK/VSELPAGHGLNVNNTLSYGDLAAD
Péptido 6 (p60.1_515)	LTTETVVVDKPAKAEDHDHHHGHHAH
Lote de Cpn60.1 usado en estos experimentos: Cpn60.1 1_04-03/1.	

Los presentes inventores han investigado el efecto de estos péptidos en un cultivo de células del bazo. Se recogieron bazos de ratones C57Bl/6 o ratones TLR4 y TLR2 KO. Los órganos se maceraron en condiciones estériles y la suspensión de células se pasó a través de un filtro de células de 70  $\mu$ m. Los glóbulos rojos se eliminaron por choque osmótico con agua estéril. Las células restantes se lavaron y se sembraron a  $10^6$ /pocillo para mediciones de IL-12. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de los péptidos o chaperonina 60.1 (0,001-30  $\mu$ g/ml). Los sobrenadantes se recogieron 24 h después y se mantuvieron a -20 °C. La IL-12 se midió por ensayo de ELISA convencional.

45

50

Las observaciones experimentales de los presentes inventores demostraron que Cpn60.1 y todos los péptidos

inducen la liberación de IL-12 en un cultivo de esplenocitos. El péptido 4 es más eficaz que Cpn60.1 a menores concentraciones (0,001 - 0,1 µg/ml). Sin embargo, a una mayor concentración (0,1 - 30 µg/ml) este péptido mostró un reducido efecto en comparación con Cpn60.1. El péptido 6 tiene un efecto similar a mayores concentraciones en comparación con Cpn60, pero tiene un efecto menos potente a menores concentraciones (Figura 8). Todos los cultivos se realizaron en presencia de polimixina B para descartar cualquier efecto de la contaminación de LPS sobre las respuestas funcionales que se midieron.

Los presentes inventores examinaron adicionalmente la función de receptores toll (TLR) en la respuesta de células del bazo a estas secuencias de péptidos. Las células del bazo recogidas de ratones TLR4 KO fueron significativamente resistentes al tratamiento en su capacidad para producir IL-12 en respuesta a chaperonina 60.1 y sus péptidos cuando se comparó con sus ratones C57bl/6 homólogos naturales. Las células del bazo de ratones TLR2 KO también fueron resistentes en su capacidad para producir IL-12 en respuesta a la chaperonina y sus péptidos.

Este estudio *in vitro* muestra que la actividad biológica de estos fragmentos de péptido está mediada por la activación de TLR2 y TLR4 (Figura 9).

#### **Ejemplo 4 - El efecto de péptidos de chaperonina in vivo**

Los presentes inventores investigaron a continuación el efecto de bajas concentraciones de Cpn60.1 y péptido 4 de Cpn60.1 sobre la inflamación alérgica de las vías respiratorias en vista de los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* descritos anteriormente.

Con el fin de realizar estos experimentos, los presentes inventores han modificado ligeramente su protocolo de inmunización. La inflamación alérgica en el pulmón se induce por 2 instilaciones intranasales de 10 µg de albúmina de huevo (OVA) en 100 µg de alumbre con intervalos de 7 días entre ellas. Los animales de control reciben alumbre solo. En el día 14, todos los animales se exponen a un aerosol de OVA durante 25 minutos, una vez al día durante 3 días consecutivos. Todas las mediciones se realizan 24 h después de la última exposición a antígeno.

Los presentes inventores han mostrado que la administración intranasal de Cpn60.1 (1 µg) inhibió significativamente el número total de células reclutadas a los pulmones tras la exposición aguda a antígeno (Figura 10). El efecto de Cpn60.1 y el péptido 4 sobre el reclutamiento de eosinófilos a las vías respiratorias fue más profundo (Figura 11). Tanto Cpn60.1 de baja dosis (0,1 y 1 µg) como el péptido 4 (0,005 µg) provocaron una reducción significativa en el reclutamiento de eosinófilos que no fue producida por una interferencia con la producción de IL-5 de células inflamatorias (Figura 12). De forma interesante, dosis baja del péptido 4 afectó la producción de IgE total en este modelo alérgico (Figura 13).

#### **Ejemplo 5 - Cpn60.1 en modelos de dolor**

El efecto de Cpn60.1 se ha investigado en 2 modelos de dolor, hiperalgesia inducida por adyuvante completo de Freund (CFA) e hiperalgesia inducida por quemaduras por ultravioleta. La hiperalgesia mecánica se midió usando filamentos de von Frey aplicados con fuerza creciente a la pata trasera. La hiperalgesia térmica se midió usando el tiempo necesario para retirar la pata trasera de una fuente de calor. Cpn60.1 (50 y 500 µg/kg) se administró crónicamente a ratas Wistar macho (200 g) subcutáneamente durante 7 días. Cada día alterno se registraron las respuestas conductuales a alodinia mecánica y térmica. Después de los registros del nivel inicial, el CFA se inyectó a la pata trasera para inducir hiperalgesia y se realizaron pruebas conductuales. Ninguna dosis de Cpn60.1 redujo la hiperalgesia inducida por CFA en comparación con el control, ibuprofeno (100 mg/kg) (Figuras 14 y 15). Se probó otro modelo de hiperalgesia, esta vez usando quemadura por UV para inducir alodinia. De nuevo, Cpn60.1 tuvo poco efecto en inhibir la hiperalgesia en comparación con el grupo tratado con ibuprofeno (Figuras 16 y 17).

#### **Ejemplo 6 - Estudios in vitro sobre células inflamatorias humanas**

Los presentes inventores han establecido un ensayo de monocitos humanos para comparar la eficacia de Cpn60.1 y diversas secuencias de péptidos de esta proteína. Se obtuvieron monocitos humanos por centrifugación dependiente de densidad de sangre venosa periférica de voluntarios sanos. Entonces, los monocitos se aislaron y se purificaron con células ajustadas a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml que se incubaron durante 1 hora 30 minutos. Entonces, las placas se lavaron dos veces con disolución de Hank. Luego se añadieron 0,9 ml de medio RPMI a cada pocillo, seguido de polimixina B (5 µg/ml). 30 minutos después se añadieron 0,1 ml de Cpn a 0,0001-1000 ng/ml o péptidos a los pocillos. Entonces, las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> durante 1 hora. El medio se eliminó y las

células se lavaron. Se añadieron 0,9 ml de medio a cada pocillo seguido de 0,1 ml de LPS (1ng/ml) y se dejaron incubar durante 24 horas. Se tomó el sobrenadante de cada pocillo y se congeló para ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA).

- 5 Los presentes inventores han demostrado que Cpn60.1 sola puede estimular monocitos humanos para inducir la secreción de TNF-alfa, pero cuando se añade a un estímulo inflamatorio ya establecido (es decir, en presencia de LPS), Cpn60.1 inhibió la secreción de TNF-alfa a bajas dosis (1 ng/ml) (Figura 18). A diferencia, Cpn10 dejó de inhibir la secreción de TNF-alfa de monocitos humanos (Figura 20). Sin embargo, la proteína parece tener un grado de contaminación de LPS y en presencia de polimixina B esta contaminación se reduce (Figura 19). Esta posible frustración con la contaminación de LPS se evita si se usan las secuencias de péptidos de Cpn60.1. Los péptidos también parecieron inhibir la secreción de TNF-alfa a bajas concentraciones (Figura 21).

**Ejemplos 7 - Cpn60.1 en modelos de inflamación no alérgica**

- 15 Debido al efecto inhibitor en células inflamatorias humanas, los presentes inventores investigaron si Cpn60.1 puede inhibir o no el reclutamiento de neutrófilos en un sistema *in vivo*. Para soportar esto, además, Riffo-Vasquez y col. han mostrado recientemente que las chaperonas de *M. tuberculosis* pueden suprimir el reclutamiento de eosinófilos e hiperreactividad bronquial en un modelo murino de inflamación alérgica (Riffo-Vasquez Y, Spina D, Page C y col., Effect of Mycobacterium tuberculosis chaperonins on bronchial eosinophilia and hyper-responsiveness in a murine model of allergic inflammation. Clin. Exp Allergy, 2004; 34(5); 712-719).

Ratones BALB/c hembra se pretrataron intranasalmente con Cpn60.1 (1 µg/ml) durante 3 días en ausencia o tras el pretratamiento con polimixina B (5 µg/ml) para descartar cualquier efecto de la contaminación de LPS. 30 minutos después de la última dosis de Cpn60.1, los ratones se trataron con LPS (1 µg/ml). La entrada de neutrófilos y la liberación de TNF-alfa en los pulmones se determinaron por lavado broncoalveolar 24 horas después. LPS indujo un aumento dependiente de la dosis en la neutrofilia en comparación con el control (Figura 22). De forma interesante, el grupo pretratado con Cpn60.1 mostró supresión en la neutrofilia, pero la secreción de TNF-alfa no se atenuó significativamente (Figura 24). El tratamiento de ratones con polimixina B marca una diferencia a la capacidad de Cpn60.1 para suprimir el reclutamiento de neutrófilos que indica que este efecto no puede explicarse por contaminación con LPS. No se observó reclutamiento de neutrófilos en ratones tratados con Cpn60.1 sola que permitiera adicionalmente que cualquier contaminación con LPS dejara de producir neutrofilia (Figura 23).

**Ejemplo 8 - Formulaciones farmacéuticas a modo de ejemplo**

35 Aunque es posible que una molécula de la invención se administre sola, es preferible presentarla como una formulación farmacéutica, junto con uno o más vehículos aceptables. El (Los) vehículo(s) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatibles con el agente de la invención y no perjudiciales para los receptores de las mismas. Normalmente, los vehículos serán agua o solución salina que será estéril y libre de pirógenos.

40 Los siguientes ejemplos ilustran medicamentos y composiciones farmacéuticas según la invención en los que el principio activo es una molécula de la invención.

Preferentemente, la molécula de la invención se proporciona en una cantidad de 10 µg a 500 mg. Se apreciará que pueden prepararse los siguientes medicamentos y composiciones farmacéuticas a modo de ejemplo que contienen una cantidad de la molécula de la invención de 10 µg a 500 mg. Por ejemplo, la molécula de la invención puede estar presente en un 10<sup>o</sup> o 100<sup>o</sup> o 200<sup>o</sup> o 500<sup>o</sup> de la cantidad mostrada en los siguientes medicamentos y composiciones farmacéuticas a modo de ejemplo con las cantidades de los restantes componentes cambiadas por consiguiente.

50 **Ejemplo A: Comprimido**

Principio activo	1 mg
Lactosa	200 mg
Almidón	50 mg
Polivinilpirrolidona	5 mg
Estearato de magnesio	4 mg

Los comprimidos se preparan a partir de los anteriores componentes por granulación en húmedo seguido de compresión.

**Ejemplo B: Disolución oftálmica**

Principio activo	1 mg
Cloruro sódico, calidad analítica	0,9 g
Tiomersal	0,001 g
Agua purificada hasta	100 ml
pH ajustado a	7,5

**Ejemplo C: Formulaciones de comprimidos**

5

Las siguientes formulaciones A y B se preparan por granulación en húmedo de los componentes con una disolución de povidona, seguido de la adición de estearato de magnesio y compresión.

Formulaciones A

10

	mg/comprimido	mg/comprimido
(a) Principio activo	1	1
(b) Lactosa B.P.	210	26
(c) Povidona B.P.	15	9
(d) Glicolato sódico de almidón	20	12
(e) Estearato de magnesio	5	3
	<hr/> 251	<hr/> 51

Formulación B

	mg/comprimido	mg/comprimido
(a) Principio activo	1	1
(b) Lactosa	150	-
(c) Avicel PH 101 <sup>®</sup>	60	26
(d) Povidona B.P.	15	9
(e) Glicolato sódico de almidón	20	12
(f) Estearato de magnesio	5	3
	<hr/> 251	<hr/> 51

15 Formulación C

	mg/comprimido
Principio activo	1
Lactosa	200
Almidón	50
Povidona	5
Estearato de magnesio	4
	<hr/> 260

Las siguientes formulaciones, D y E, se preparan por compresión directa de los componentes mezclados. La lactosa usada en formulación E es del tipo de compresión directa.

20

Formulación D

	mg/cápsula
Principio activo	1
Almidón pregelatinizado NF15	150
	<hr/> 151

Formulación E

25

	mg/cápsula
Principio activo	1
Lactosa	150

Avicel <sup>®</sup>	100
	251

Formulación F (formulación de liberación controlada)

La formulación se prepara por granulación en húmedo de los componentes (a continuación) con una disolución de povidona, seguido de la adición de estearato de magnesio y compresión.

	mg/comprimido
(a) Principio activo	1
(b) Hidroxipropilmetilcelulosa (Methocel K4M Premium) <sup>®</sup>	112
(c) Lactosa B.P.	53
(d) Povidona B.P.C.	28
(e) Estearato de magnesio	7
	201

La liberación del fármaco tiene lugar durante un periodo de aproximadamente 6-8 horas y se completó después de 12 horas.

**Ejemplo D: Formulaciones de cápsula**

Formulación A

Una formulación de cápsula se prepara mezclando los componentes de la formulación D en el Ejemplo C anterior y envasando en una cápsula de gelatina dura de dos partes. La formulación B (infra continuación) se prepara de una manera similar.

Formulación B

	mg/cápsula
(a) Principio activo	1
(b) Lactosa B.P.	143
(c) Glicolato sódico de almidón	25
(d) Estearato de magnesio	2
	171

Formulación C

	mg/cápsula
(a) Principio activo	1
(b) Macrogol 4000 BP	350
	351

Se preparan cápsulas fundiendo Macrogol 4000 BP, dispersando el principio activo en el fundido y envasando el fundido en una cápsula de gelatina dura de dos partes.

Formulación D	mg/cápsula
Principio activo	1
Lecitina	100
Aceite de cacahuete	100
	201

Se preparan cápsulas dispersando el principio activo en la lecitina y aceite de cacahuete y envasando la dispersión en cápsulas de gelatina elástica blanda.

Formulación E (cápsula de liberación controlada)

La siguiente formulación de cápsulas de liberación controlada se prepara extruyendo los componentes a, b, y c usando una prensa extrusora, seguido de esferonización del extruido y secando. Entonces, las pellas secadas se recubren con membrana de control de la liberación (d) y se envasan en una cápsula de gelatina dura de dos partes.

	mg/cápsula
(a) Principio activo	1
(b) Celulosa microcristalina	125
(c) Lactosa BP	125
(d) Etilcelulosa	13
	264

**Ejemplo E: Formulación inyectable**

Principio activo	1 mg
Tampón fosfato libre de pirógenos estéril (pH 7,0) hasta	10 ml

5

El principio activo se disuelve en la mayoría del tampón fosfato (35-40 °C), luego se enrasa y se filtra a través de un filtro de microporos estéril en un vial de vidrio ámbar de 10 ml estéril (tipo 1) y se sella con cierres estériles y sellos.

**Ejemplo F: Inyección intramuscular**

10

Principio activo	1 mg
Alcohol bencílico	0,10 g
Glucofurol 75 <sup>®</sup>	1,45 g
Agua para inyección c.s.p. hasta	3,00 ml

El principio activo se disuelve en el glucofurol. Entonces se añade el alcohol bencílico y se disuelve, y se añade agua a 3 ml. Entonces, la mezcla se filtra a través de un filtro de microporos estéril y se sella en viales de vidrio de 3 ml estériles (tipo 1).

15

**Ejemplo G: Suspensión de jarabe**

Principio activo	1 mg
Disolución de sorbitol	1,5000 g
Glicerol	2,0000 g
Celulosa dispersable	0,0750 g
Benzoato de sodio	0,0050 g
Aroma, melocotón 17.42.3169	0,0125 ml
Agua purificada c.s.p. hasta	5,0000 ml

20 El benzoato de sodio se disuelve en una porción de agua purificada y se añade la disolución de sorbitol. Se añade el principio activo y se dispersa. En el glicerol se dispersa el espesante (celulosa dispersable). Las dos dispersiones se mezclan y se enrasan al volumen requerido con el agua purificada. Se consigue más espesamiento según se requiera cizallando adicionalmente la suspensión.

**Ejemplo H: Supositorio**

25

	mg/supositorio
Principio activo (63 µm)*	1
Grasa dura, BP (Witepsol H15 - Dynamit Nobel)	1770
	1771

\*El principio activo se usa como un polvo en el que al menos el 90 % de las partículas tienen 63 µm de diámetro o menos.

30 Un quinto de Witepsol H15 se funde en un platillo con camisa de vapor a 45 °C como máximo. El principio activo se tamiza a través de un tamiz de 200 µm y se añade a la base fundida con mezcla, usando un Silverson acoplado a un cabezal de corte, hasta que se logra una dispersión suave. Manteniendo la mezcla a 45 °C se añade el Witepsol H15 restante a la suspensión y se agita para garantizar una mezcla homogénea. La suspensión entera se pasa a través de un tamiz de acero inoxidable de 250 µm y, con agitación continua, se deja enfriar a 40 °C. A una temperatura de 38 °C a 40 °C 2,02 g de la mezcla se envasan en moldes de plástico adecuados. Los supositorios se dejan enfriar a temperatura ambiente.

**Ejemplo I: Pesarios**

	mg/pesario
Principio activo	1
Dextrosa anhidra	380
Almidón de patata	363
Estearato de magnesio	7
	751

Los componentes anteriores se mezclan directamente y se preparan pesarios por compresión directa de la mezcla  
5 resultante.

**Ejemplo 9 - Tratamiento de un trastorno no canceroso usando una molécula de la invención**

A un paciente con artritis se administra 1 mg de un agente de la invención por día intramuscularmente o una  
10 preparación de liberación prolongada que administra esta dosis según los procedimientos de la invención.

**Ejemplo 10 - Procedimientos de alivio del dolor**

Las moléculas de la invención proporcionarán alivio del dolor eficaz en las siguiente incidencias de dolor: dolor de  
15 espalda, cefalea, dolor de muelas, dolor de oído, artritis, gota, traumatismo de tejido blando, lesión traumática de  
ligamento/tendón, huesos rotos, cáncer, dolor posoperatorio, dolor menstrual, dolor obstétrico, dolor de las vías  
urinarias, dolor visceral, quemaduras, abscesos y otras infecciones.

La vía de tratamiento sugerida y la pauta para el tratamiento de cualquiera de estas afecciones es la administración  
20 de 0,1 mg a 1 gramo una vez cada 12 horas por inhalación administrada mediante un inhalador. Sin embargo, el  
experto sabría que la pauta de tratamiento más apropiada sería dependiente de la gravedad del individuo y del dolor  
que siente.

**REIVINDICACIONES**

1.-Una molécula de péptido aislada o recombinante que consiste en la secuencia:

5 (i) DGSVVVNVKSELPAHGHLNVNTLSYGDLAAD;

2.-Una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que consiste en una secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de polipéptidos:

10 (i) DGSVVVNVKSELPAHGHLNVNTLSYGDLAAD.

3.-Una molécula de péptido como se define en la reivindicación 1 para su uso en medicina.

4.-Una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 2 para su uso en medicina.

15

5.-Una molécula de péptido como se define en la reivindicación 1 para su uso en prevenir y/o tratar una afección no cancerosa o una afección cancerosa.

6.-Una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 2 para su uso en prevenir y/o tratar una afección no cancerosa o una afección cancerosa.

20

7.-Una composición farmacéutica que comprende o que consiste en una molécula de péptido como se define en la reivindicación 1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 8.-Una composición farmacéutica que comprende o que consiste en una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 2, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

9.-Una molécula de péptido según la reivindicación 5 para su uso según la reivindicación 5 o una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 para su uso según la reivindicación 6, en las que la afección no cancerosa está seleccionada del grupo que comprende o que consiste en: trastornos autoinmunitarios tales como anemia hemolítica, trombocitopenia, tiroiditis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes autoinmune, miastenia grave, artritis, preferentemente artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, aterosclerosis y encefalitis autoinmune; afecciones alérgicas tales como eccema, dermatitis, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica; enfermedades alérgicas de las vías respiratorias; síndrome hipereosinófilico; dermatitis de contacto, alergia alimentaria; y enfermedades respiratorias **caracterizadas por** inflamación eosinófila de las vías respiratorias e hiperreactividad de las vías respiratorias, tales como asma alérgica, asma intrínseca, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía eosinófila, bronquitis alérgica, bronquiectasia, asma ocupacional, síndrome de enfermedad reactiva de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinófilico, enfermedad pulmonar parasítica.

30

35

10.-Una molécula de péptido según la reivindicación 5 para su uso según la reivindicación 5 o una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 para su uso según la reivindicación 6, en las que la afección cancerosa está seleccionada del grupo que comprende o que consiste en: tumores/tumores malignos en fase sólida, tumores localmente avanzados, sarcomas de tejido blando humanos, cáncer metastásico, que incluye metástasis linfáticas, tumores malignos de células sanguíneas que incluyen mieloma múltiple, leucemias agudas y crónicas, y linfomas, cánceres de cabeza y cuello que incluyen cáncer de boca, cáncer de laringe y cáncer de tiroides, cánceres de pulmón que incluyen carcinoma de células pequeñas y cánceres de células no pequeñas, cánceres de mama que incluyen carcinoma de células pequeñas y carcinoma ductal, cánceres gastrointestinales que incluyen cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer colorrectal y pólipos asociados a neoplasia colorrectal, cánceres pancreáticos, cáncer de hígado, cánceres urológicos que incluyen cáncer de vejiga y cáncer de próstata, tumores malignos del aparato genital femenino que incluyen carcinoma de ovarios, cánceres uterinos (que incluyen de endometrio), y tumor sólido en el folículo ovárico, cánceres de riñón que incluyen carcinoma de células renales, cánceres cerebrales que incluyen tumores cerebrales intrínsecos, neuroblastoma, tumores cerebrales astrocíticos, gliomas, invasión de células tumorales metastásicas en el sistema nervioso central, cánceres de huesos que incluyen osteomas, cánceres de piel que incluyen melanoma maligno, progresión tumoral de queratinocitos cutáneos humanos, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, hemangiopericitoma y sarcoma de Kaposi.

45

50

55

11.-Una molécula de péptido como se define en la reivindicación 1 para su uso en el alivio de dolor.

12.-Una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 2 para su uso en el alivio de dolor.

13.-Una molécula de péptido o de ácido nucleico según la reivindicación 11 o la reivindicación 12 para su uso según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en las que el medicamento comprende además al menos un aditivo para 5 ayudar o aumentar la acción de la molécula de péptido o molécula de ácido nucleico.

14.-Una molécula de péptido o de ácido nucleico según la reivindicación 13 para su uso según la reivindicación 13, en las que el aditivo está seleccionado de al menos uno de paracetamol, aspirina, ibuprofeno, otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (ISC), opiáceos.

10

15.-Una molécula de péptido o de ácido nucleico según la reivindicación 11 o la reivindicación 12 para su uso según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en las que el dolor está seleccionado del grupo que comprende o que consiste en: dolor de espalda; cefalea; dolor de muelas; dolor de oído; artritis; gota; traumatismo de tejido blando; lesión traumática de ligamento y/o tendón; huesos rotos; cáncer; dolor posoperatorio; dolor menstrual; dolor 15 obstétrico; dolor de las vías urinarias; dolor visceral; quemaduras; abscesos; y otras infecciones.

16.-Una molécula de péptido según la reivindicación 5 para su uso según la reivindicación 5 o una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 para su uso según la reivindicación 6, en las que la afección no cancerosa es una afección inflamatoria.

20

17.-Una molécula de péptido o de ácido nucleico según la reivindicación 16 para su uso según la reivindicación 16, en la que la afección inflamatoria es una afección inflamatoria aguda.

18. Una molécula de péptido o molécula de ácido nucleico según la reivindicación 17 para su uso según la 25 reivindicación 17, en las que la afección inflamatoria está seleccionada del grupo que consiste en: indicación asociada a infección (tal como choque séptico, septicemia o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)), lesión por isquemia-reperfusión, letalidad por endotoxinas, artritis, rechazo hiperagudo mediado por el complemento, nefritis, lesión pulmonar inducida por citocinas o quimiocinas, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn o resultante de la producción en exceso de citocinas tales como TNF o IL-1.

30

19.-Una molécula de péptido como se define en la reivindicación 1 para su uso o una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 2 para su uso como un adyuvante.

20.-Un sistema de adyuvante que comprende (i) una molécula de péptido como se define en la reivindicación 1 o 35 una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 2 y (ii) un antígeno.

21.-El sistema de adyuvante según la reivindicación 20, en el que el antígeno está seleccionado del grupo que comprende o que consiste en: antígeno del carbunco; antígeno del cólera; antígeno diftérico; antígeno de *Haemophilus influenzae* b (Hib); antígeno de la hepatitis A; antígeno de la hepatitis B; antígeno de la gripe; antígeno de la encefalitis japonesa; antígeno del sarampión, paperas y rubeola (SPR); antígeno meningocócico; antígeno de *Pertussis*; antígeno neumocócico; antígeno de la poliomielitis; antígeno de la rabia; antígeno de la rubeola; antígeno de la viruela y/o de la variolovacuna; antígeno tetánico; antígeno de la encefalitis transmitida por garrapatas; antígeno de la tuberculosis; antígeno tifoideo; antígeno de la varicela/herpes zóster; antígeno de la fiebre amarilla; y antígeno de vacuna veterinaria.

Figura 1

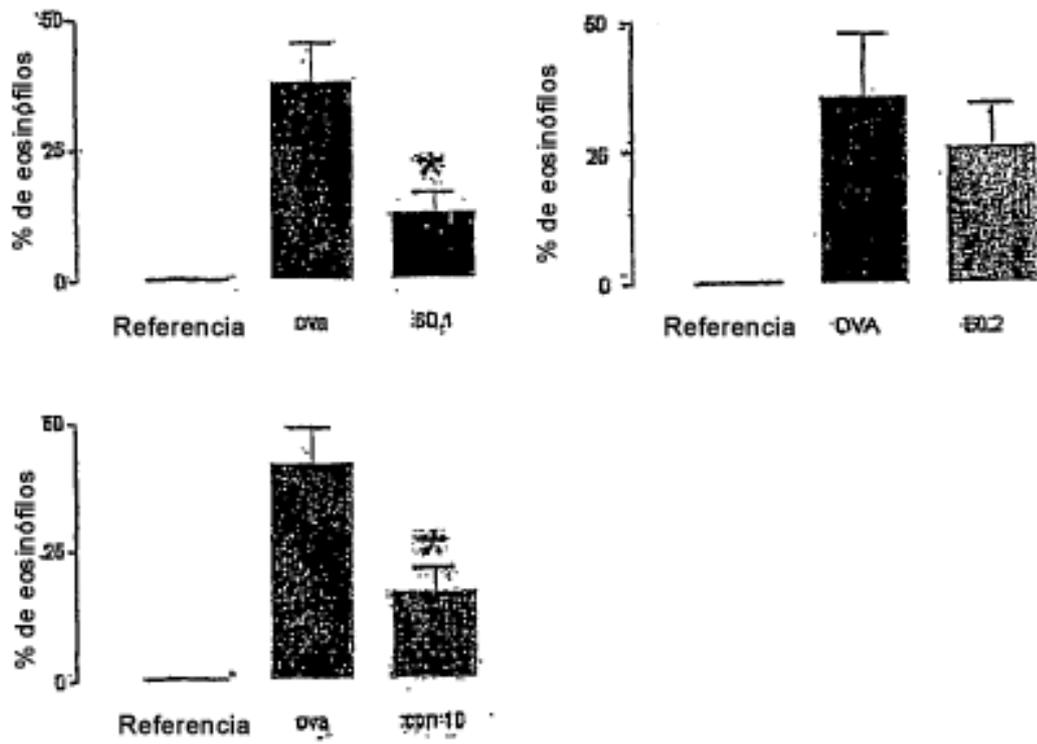


Figura 2

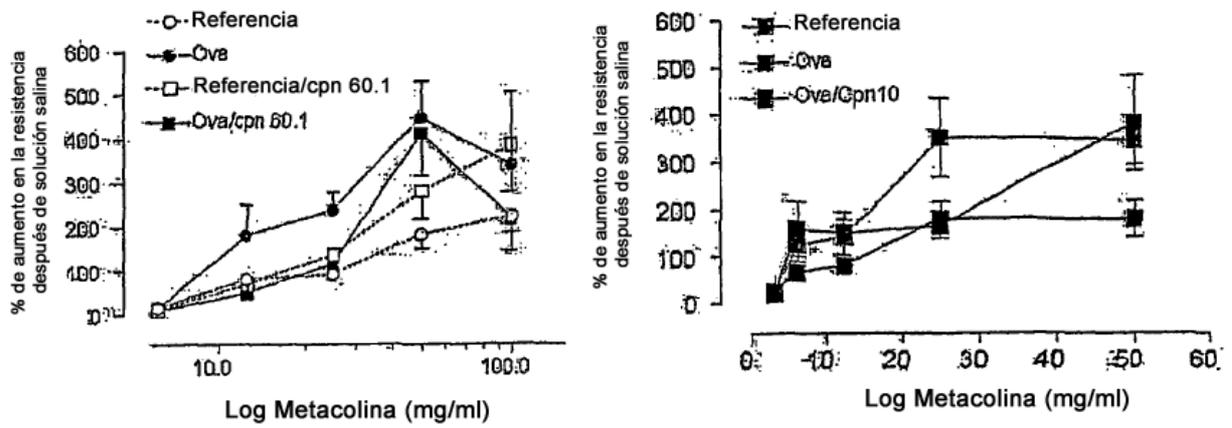


Figura 3

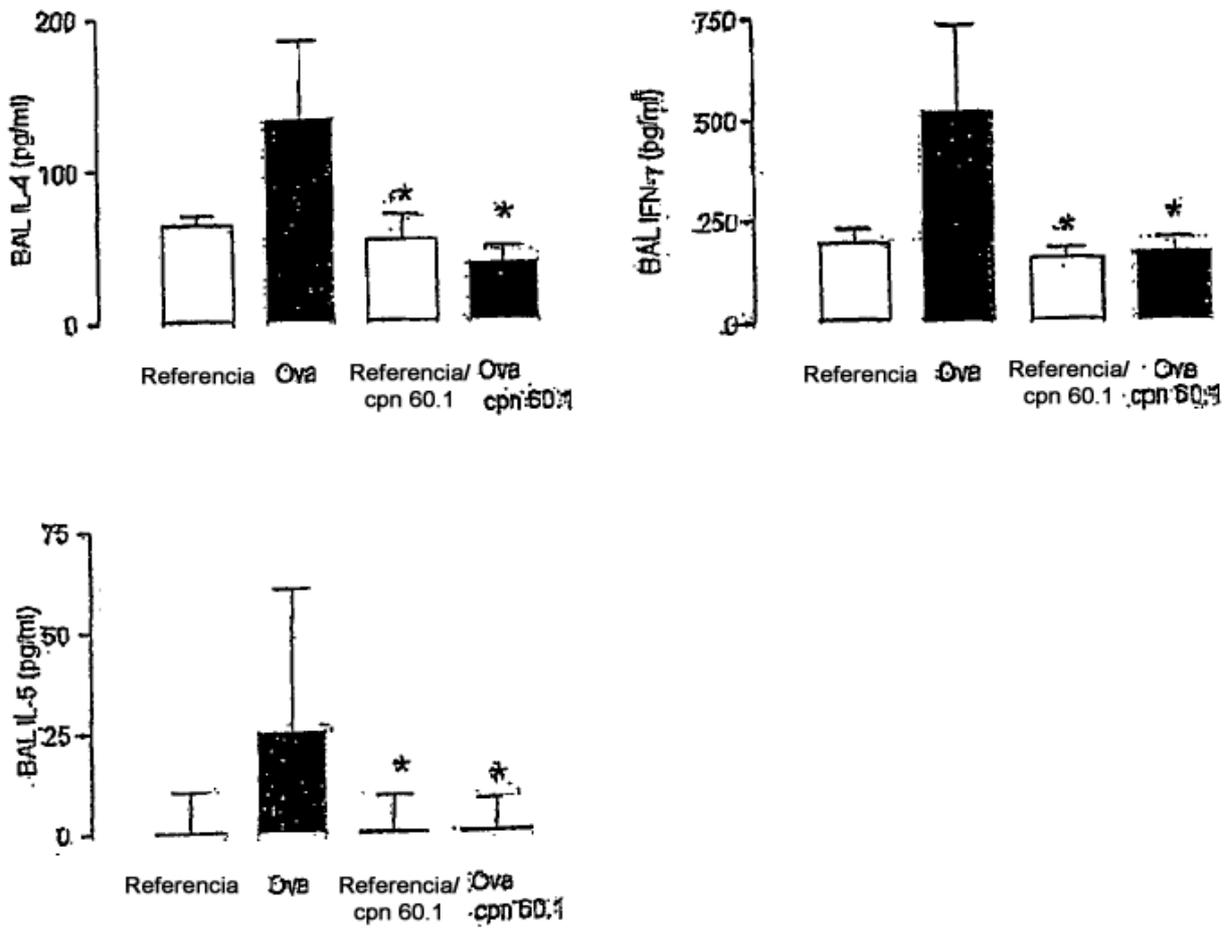


Figura 4

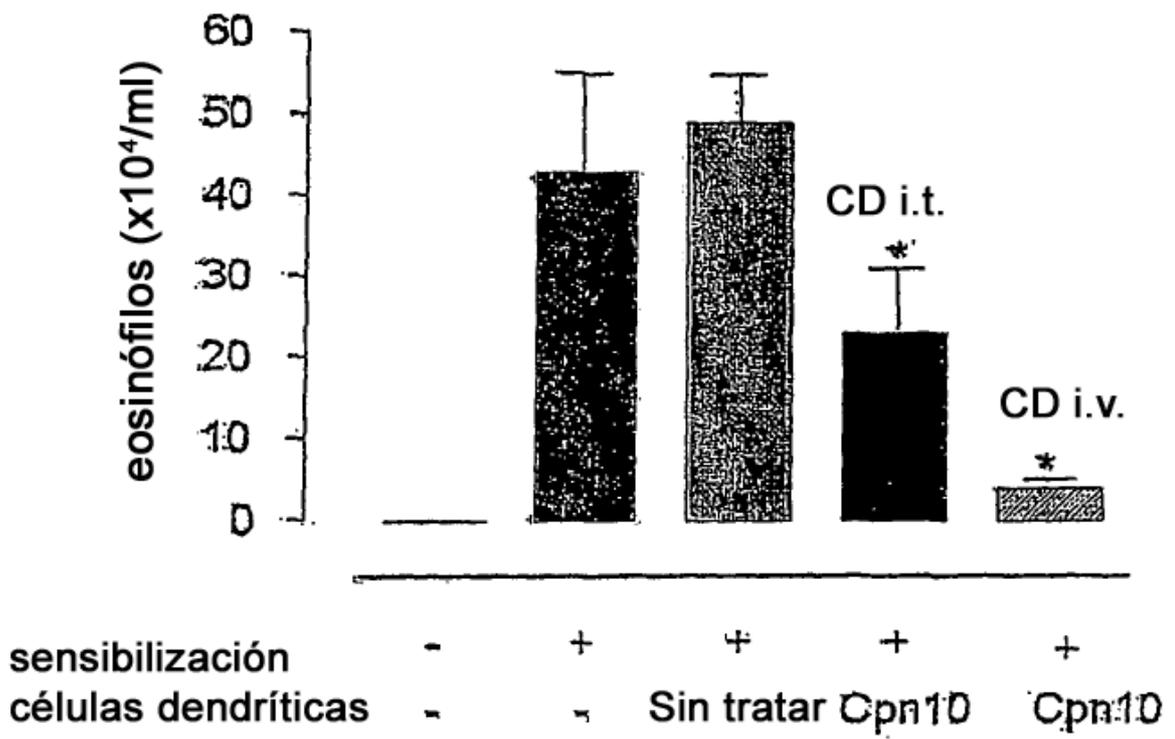


Figura 5

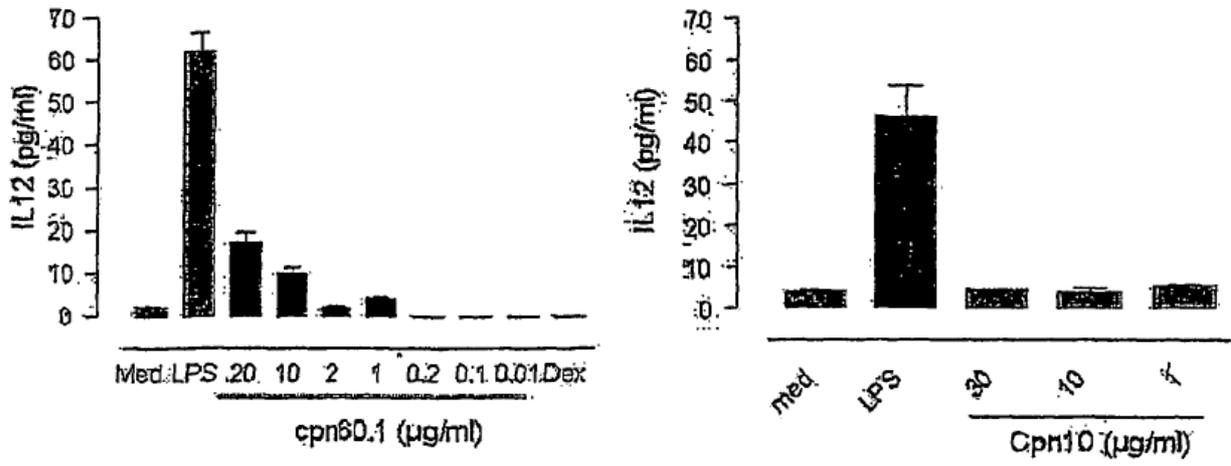


Figura 6

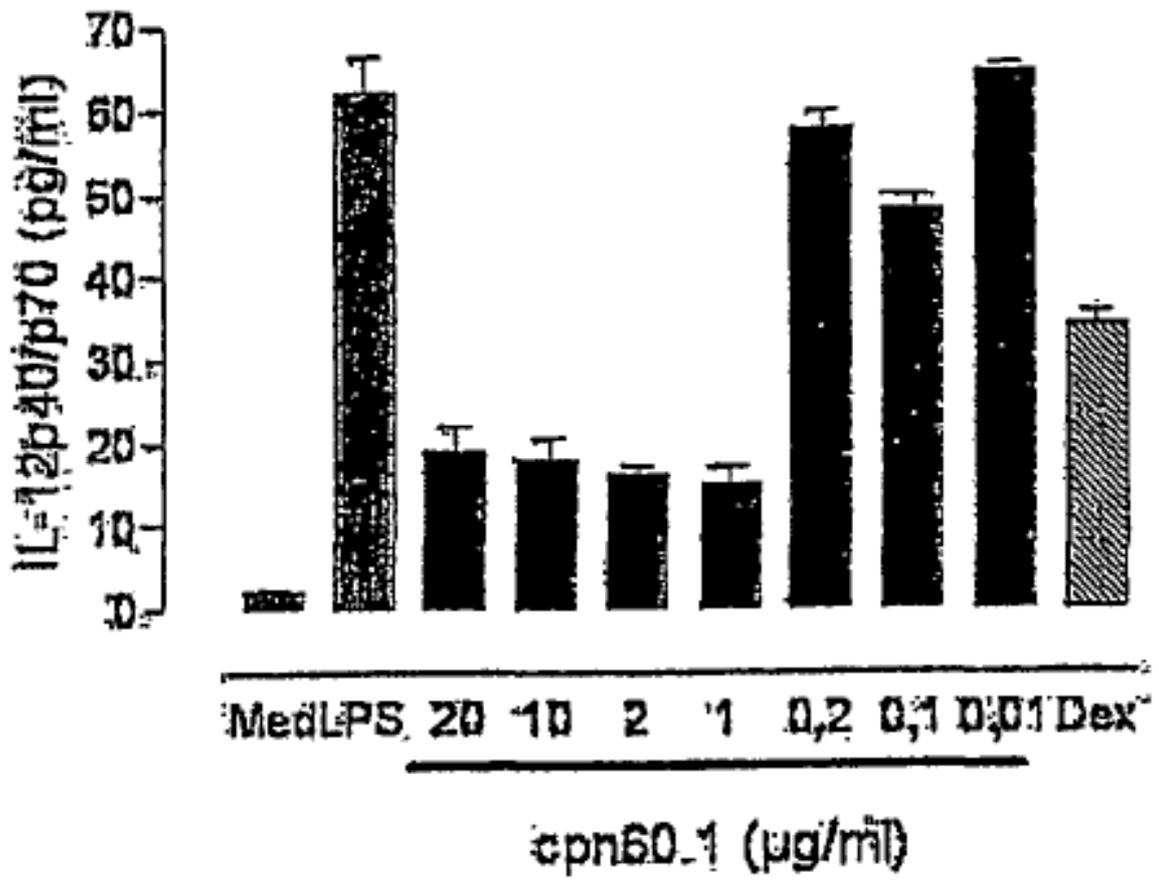


Figura 7

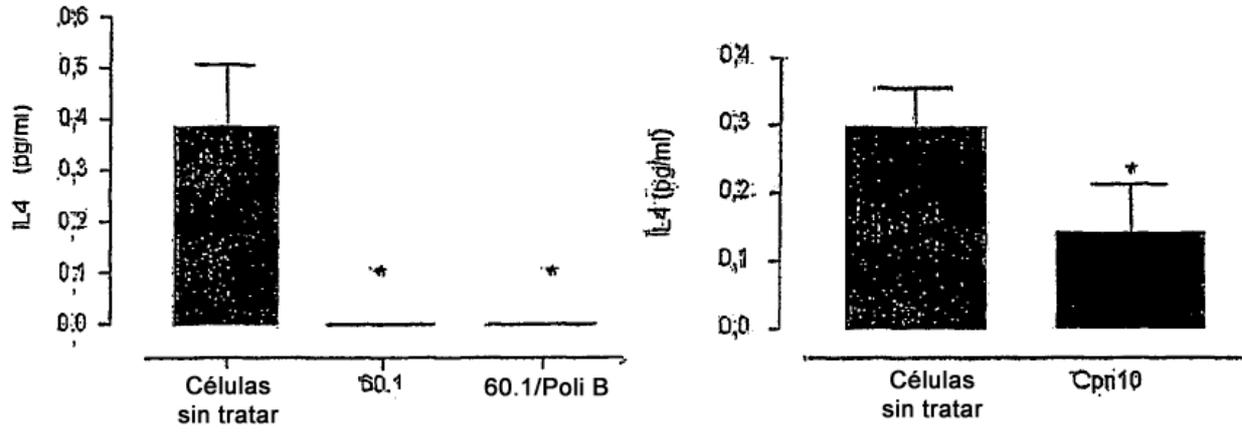


Figura 8

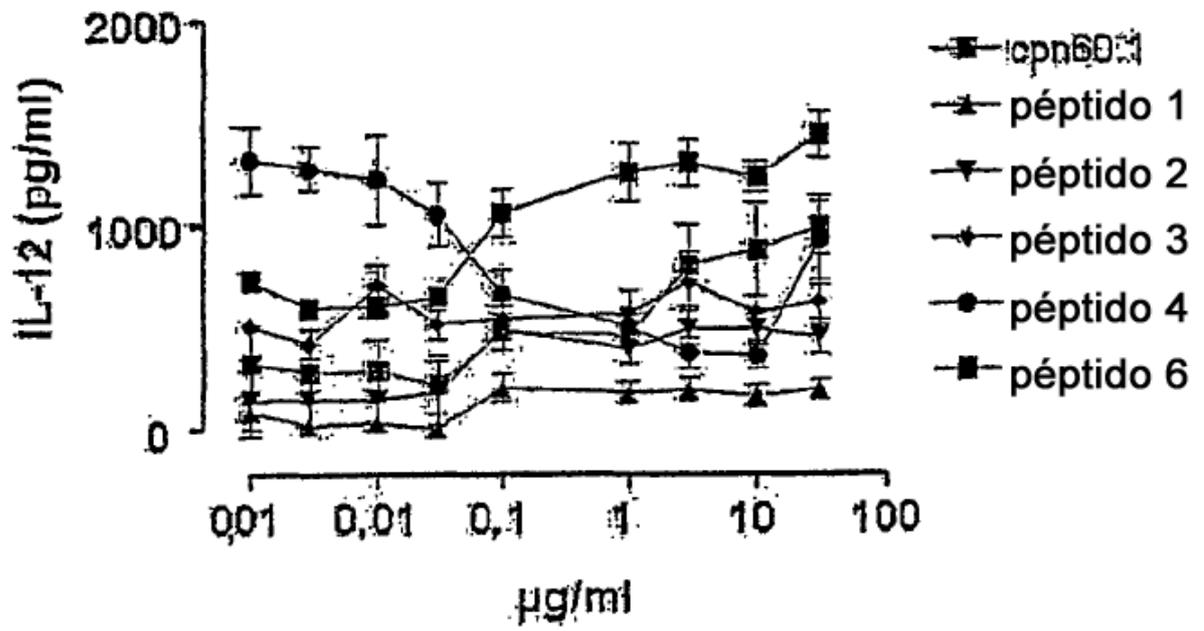


Figura 9

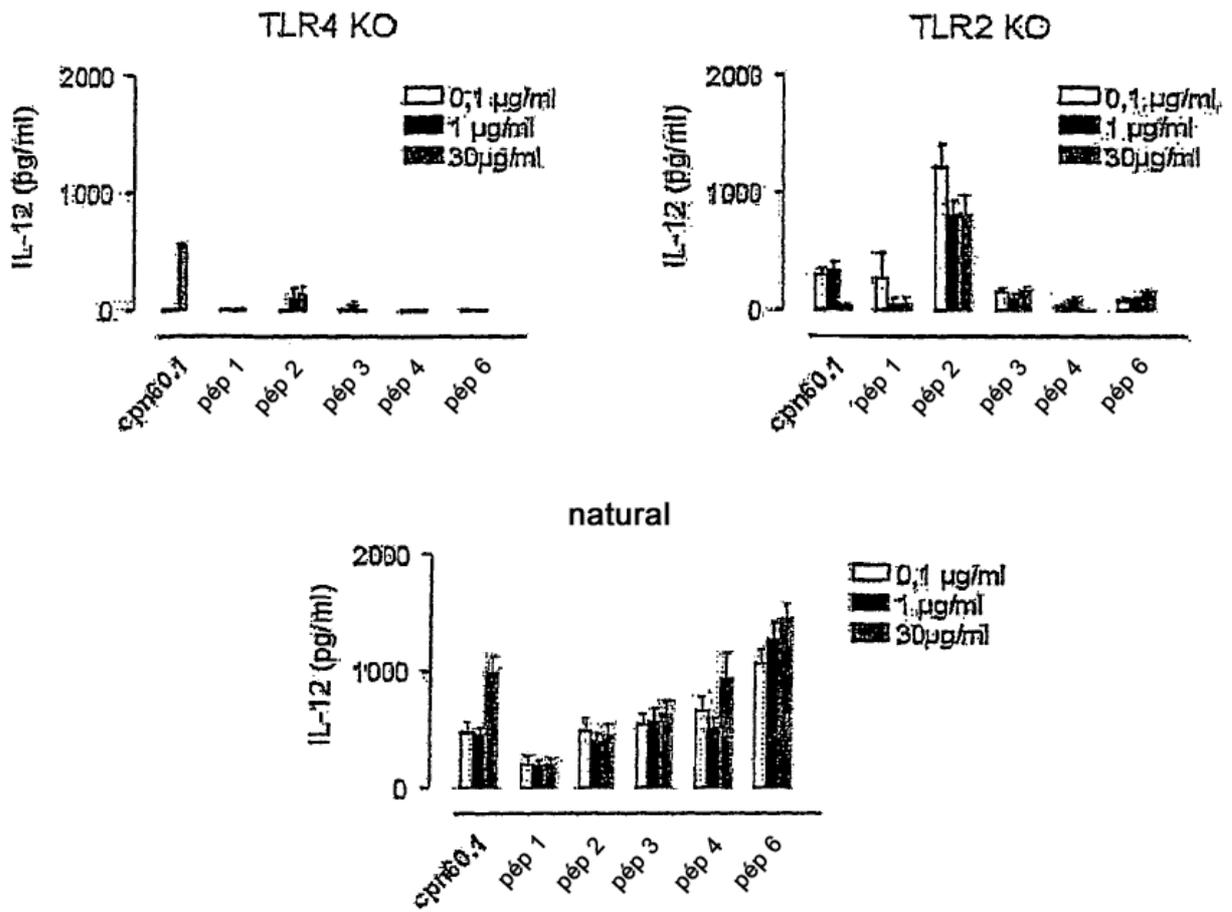


Figura 10

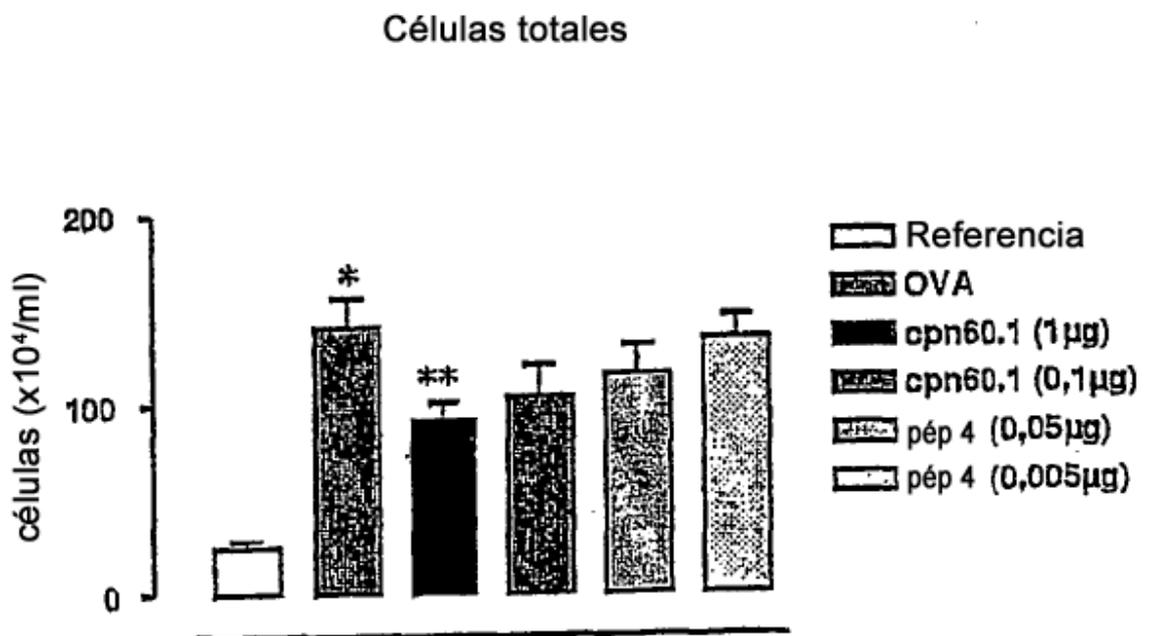


Figura 11

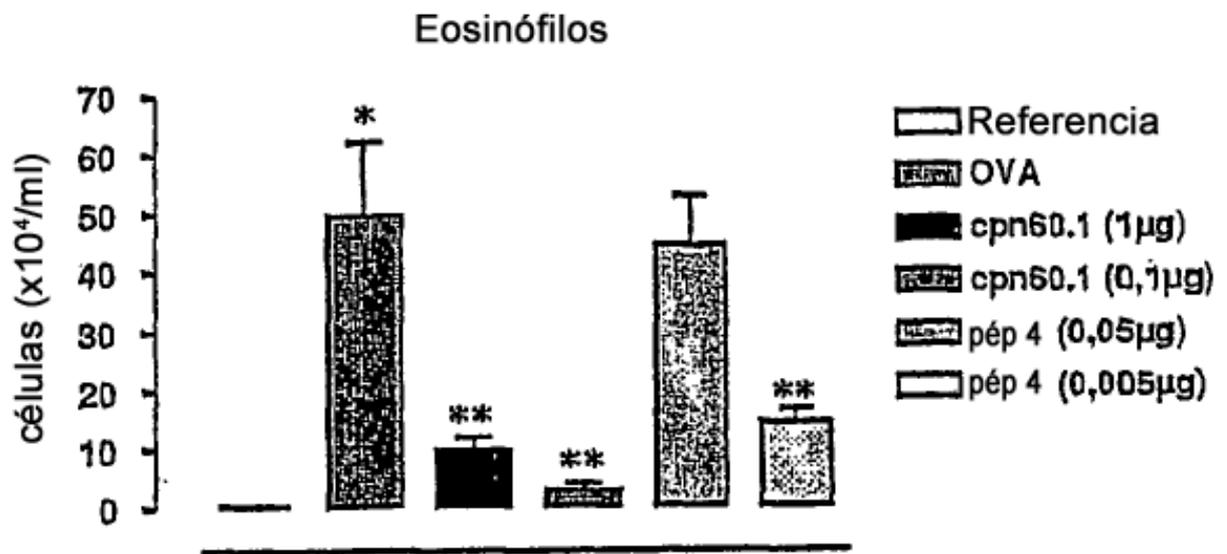


Figura 12

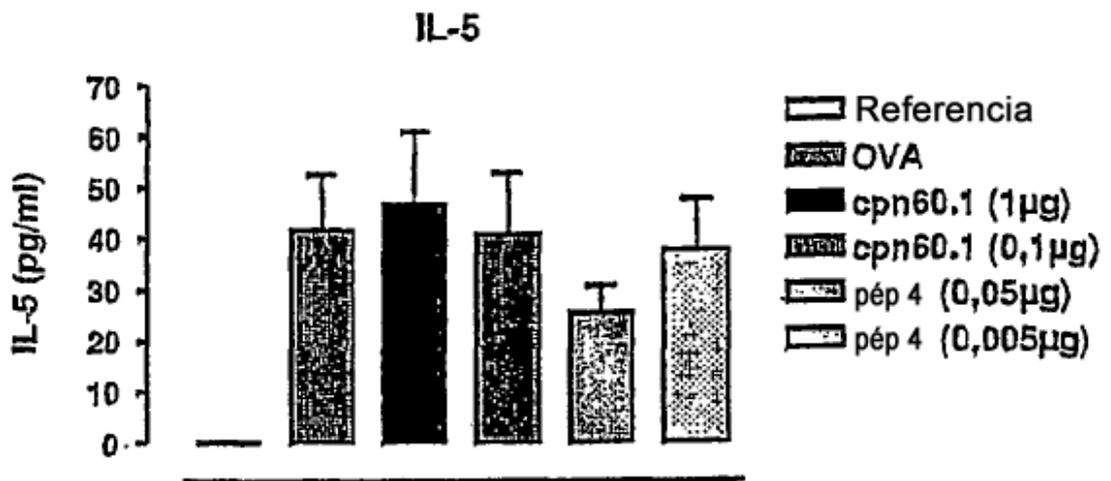


Figura 13

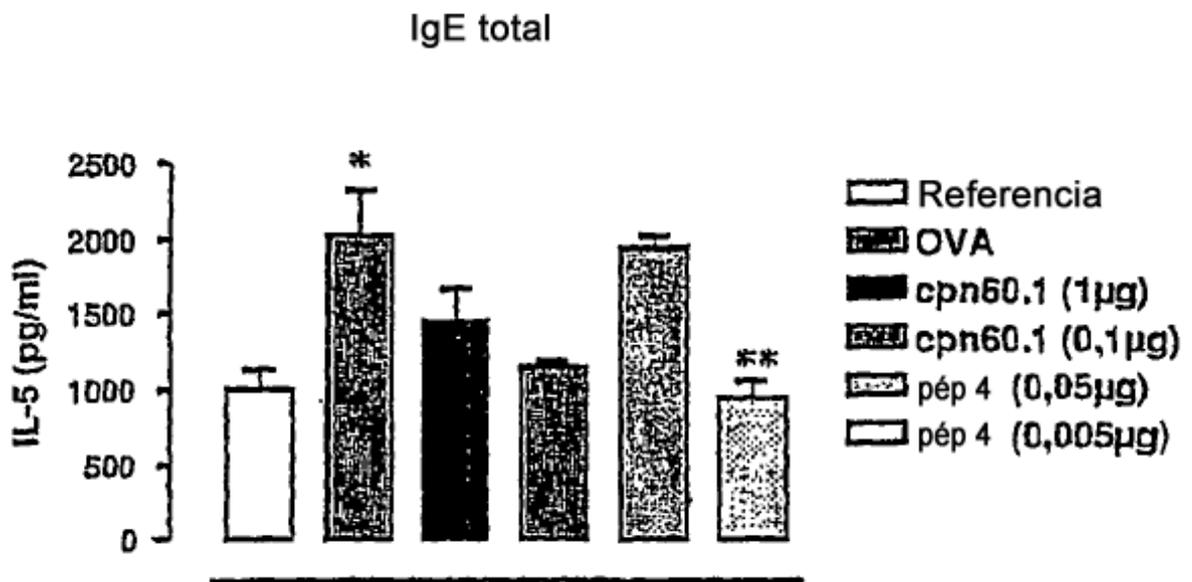


Figura 14

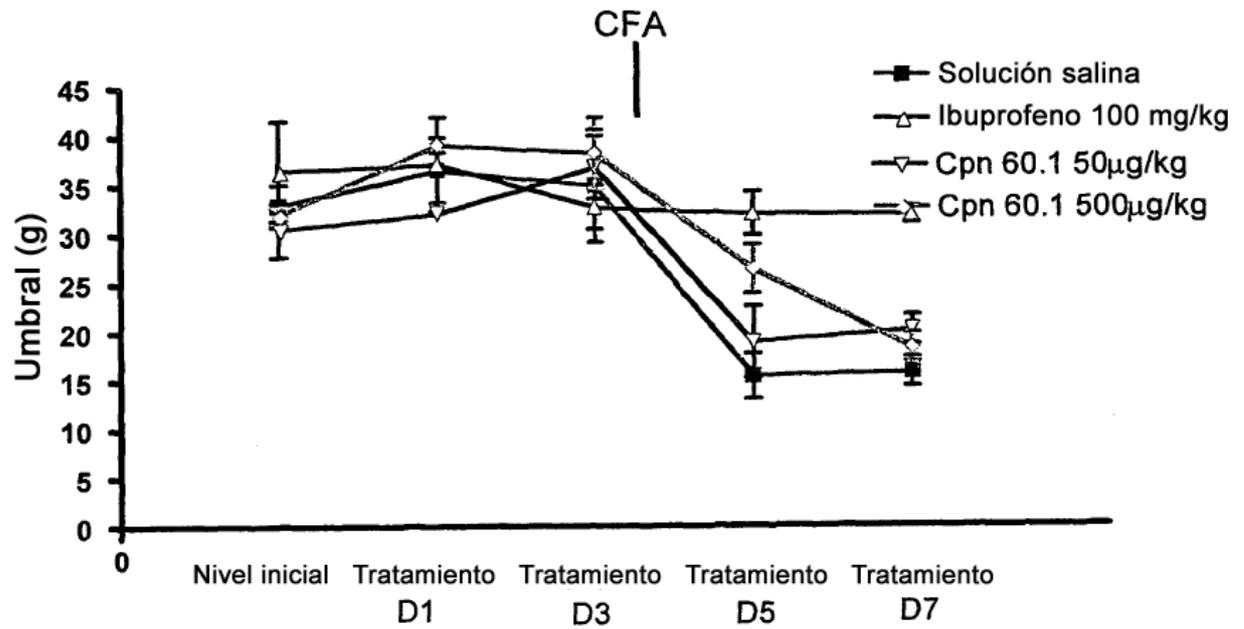


Figura 15

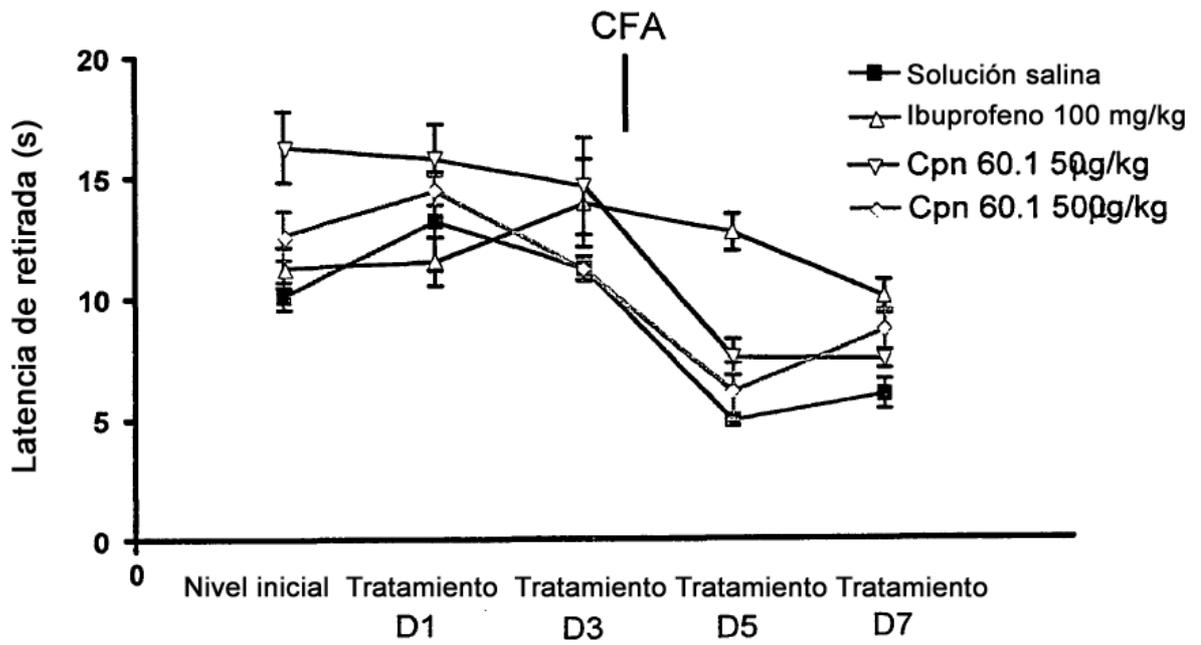


Figura 16

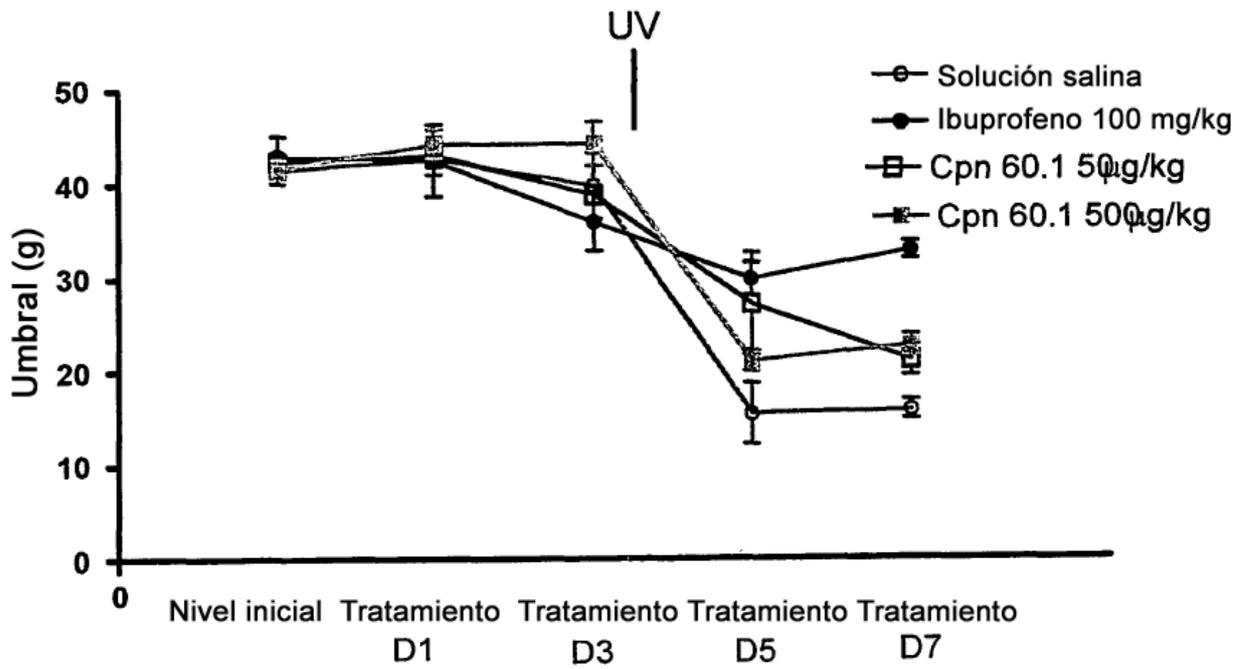


Figura 17

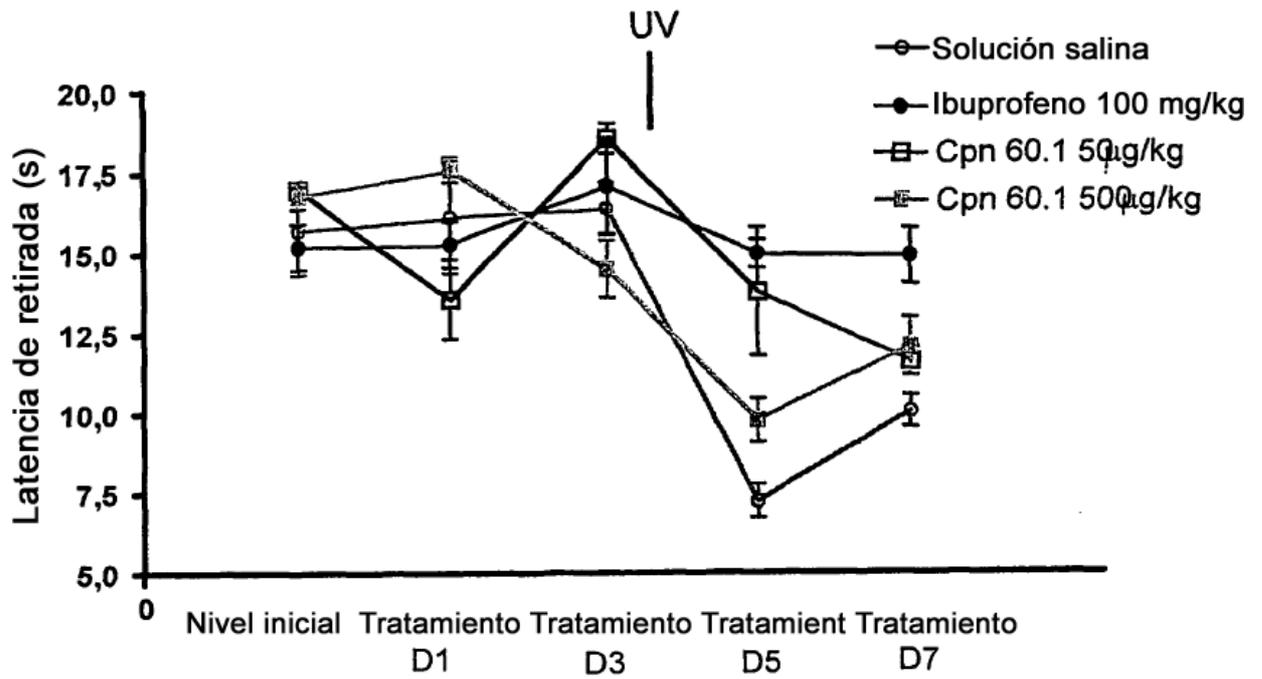


Figura 18

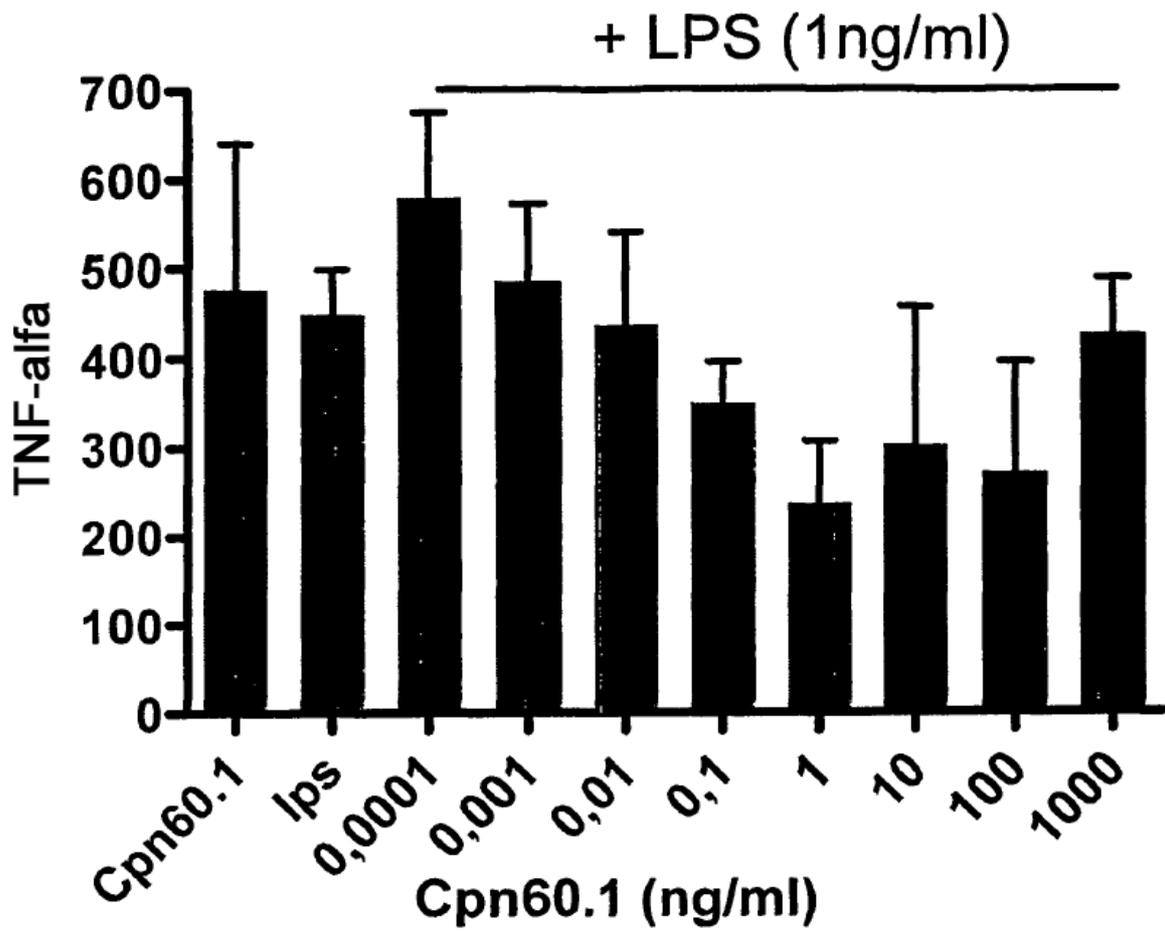


Figura 19

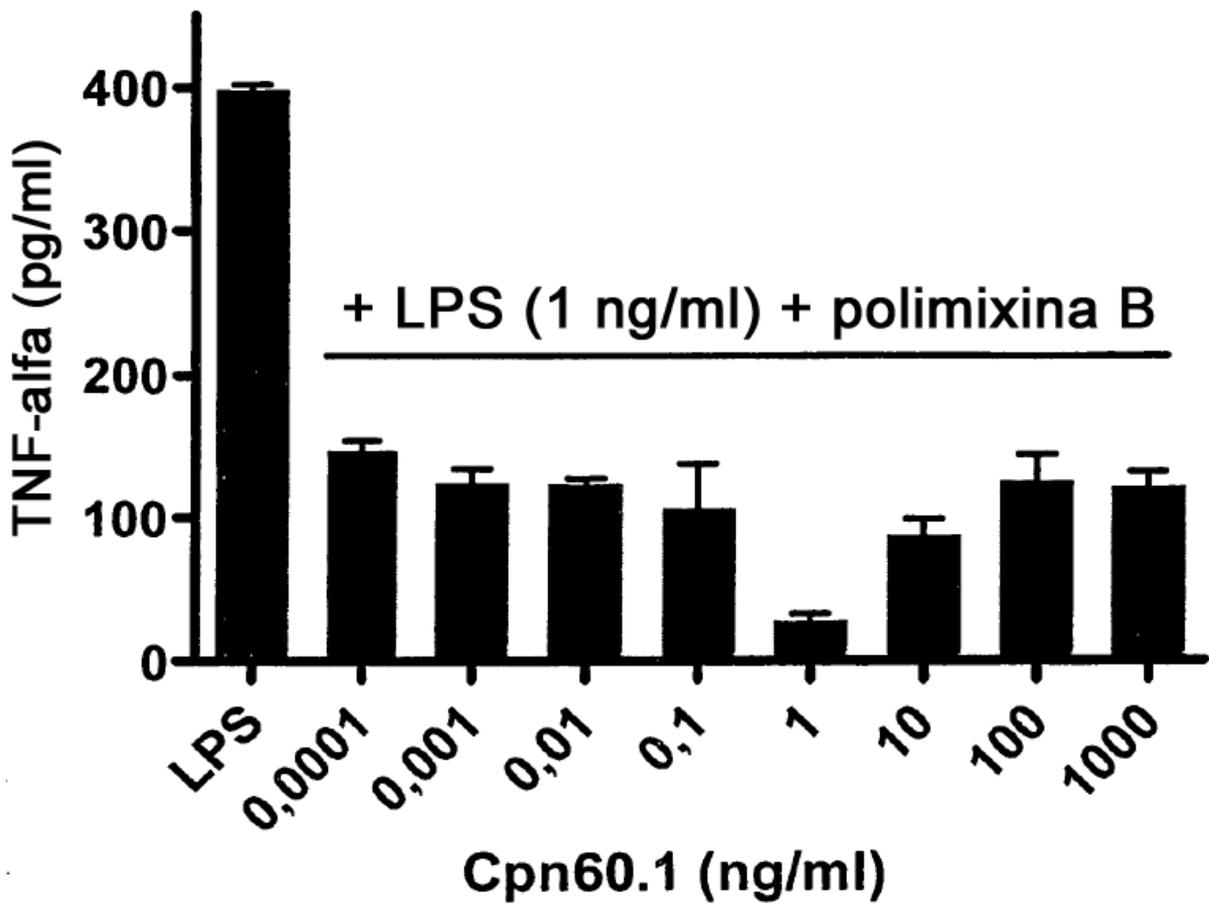


Figura 20

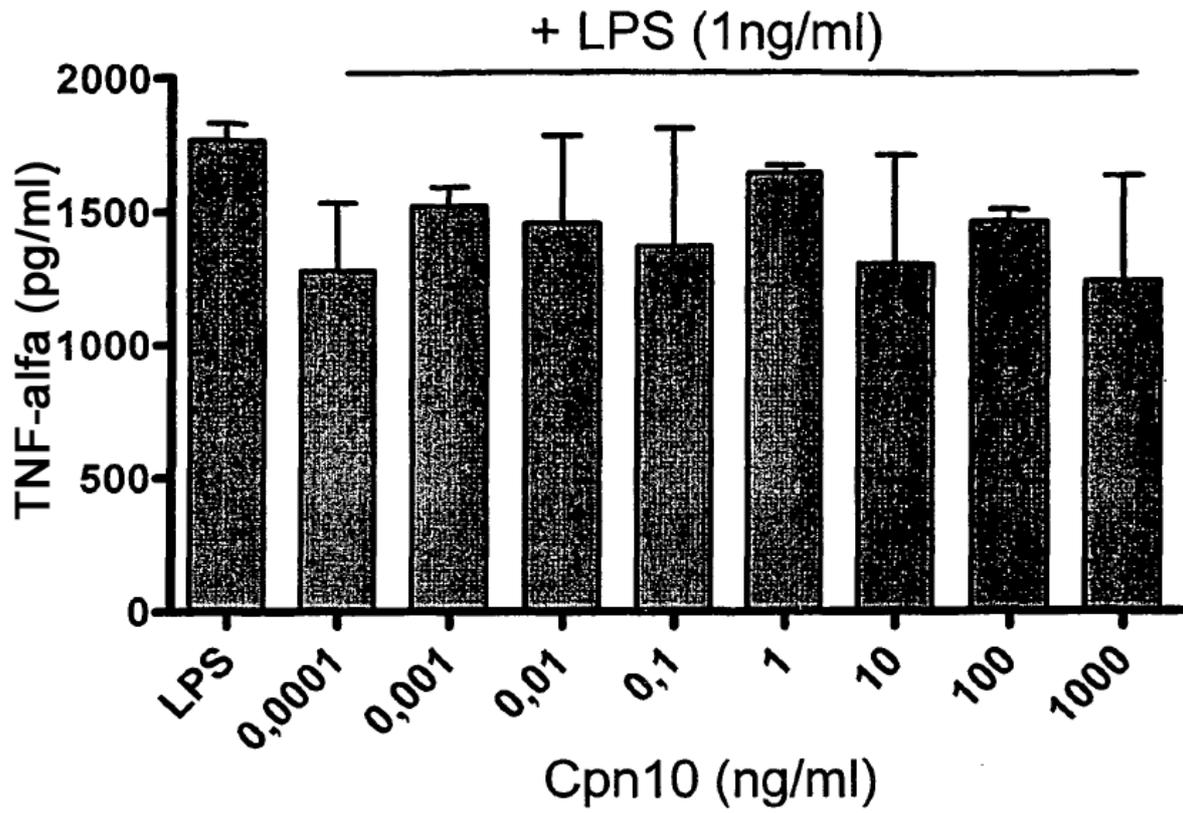


Figura 21

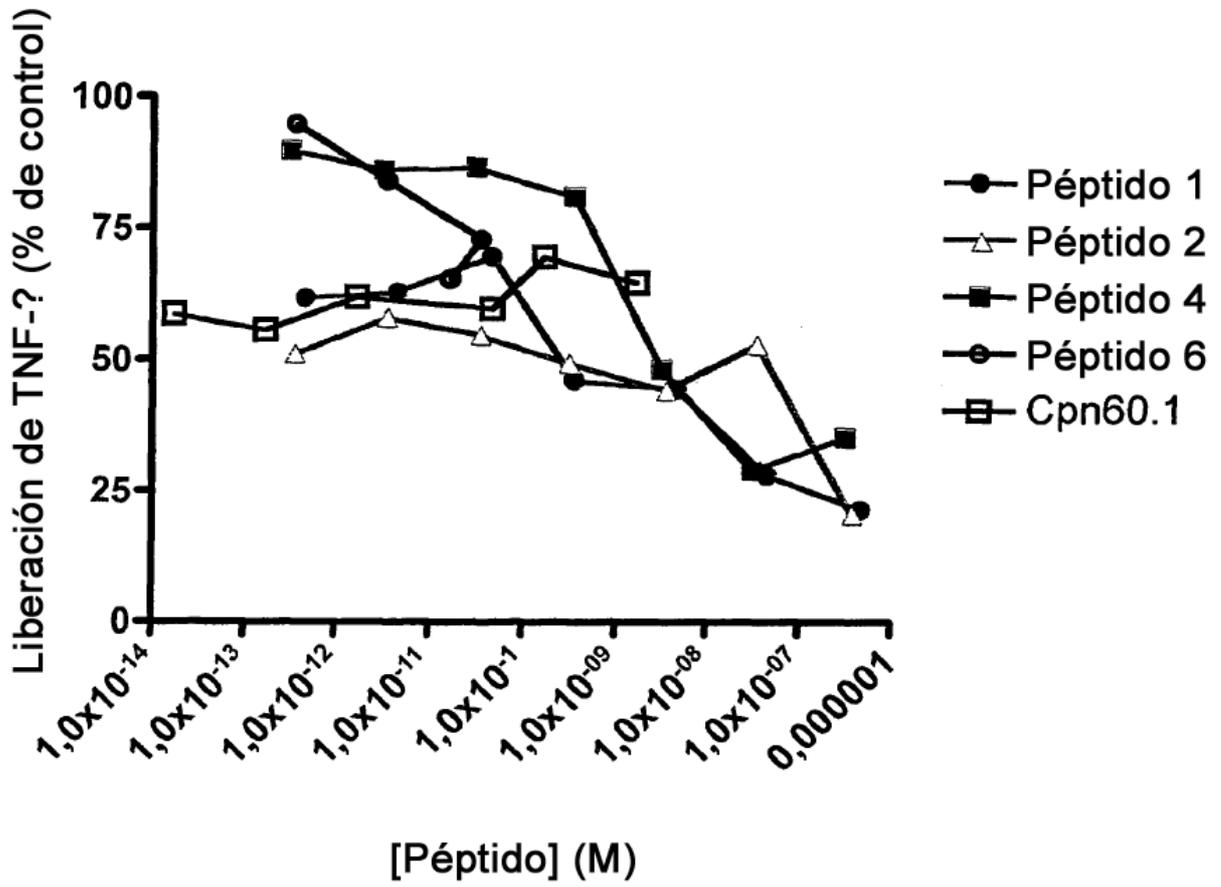


Figura 22

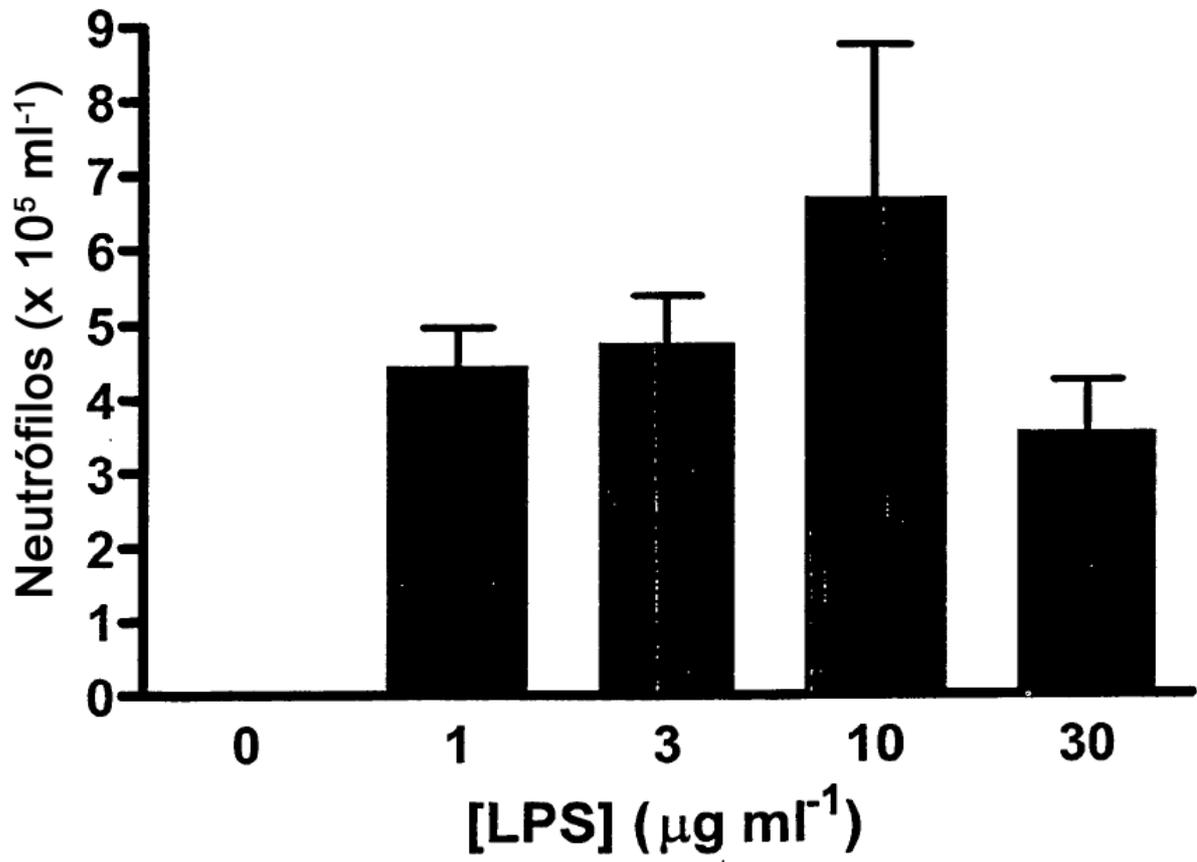


Figura 23

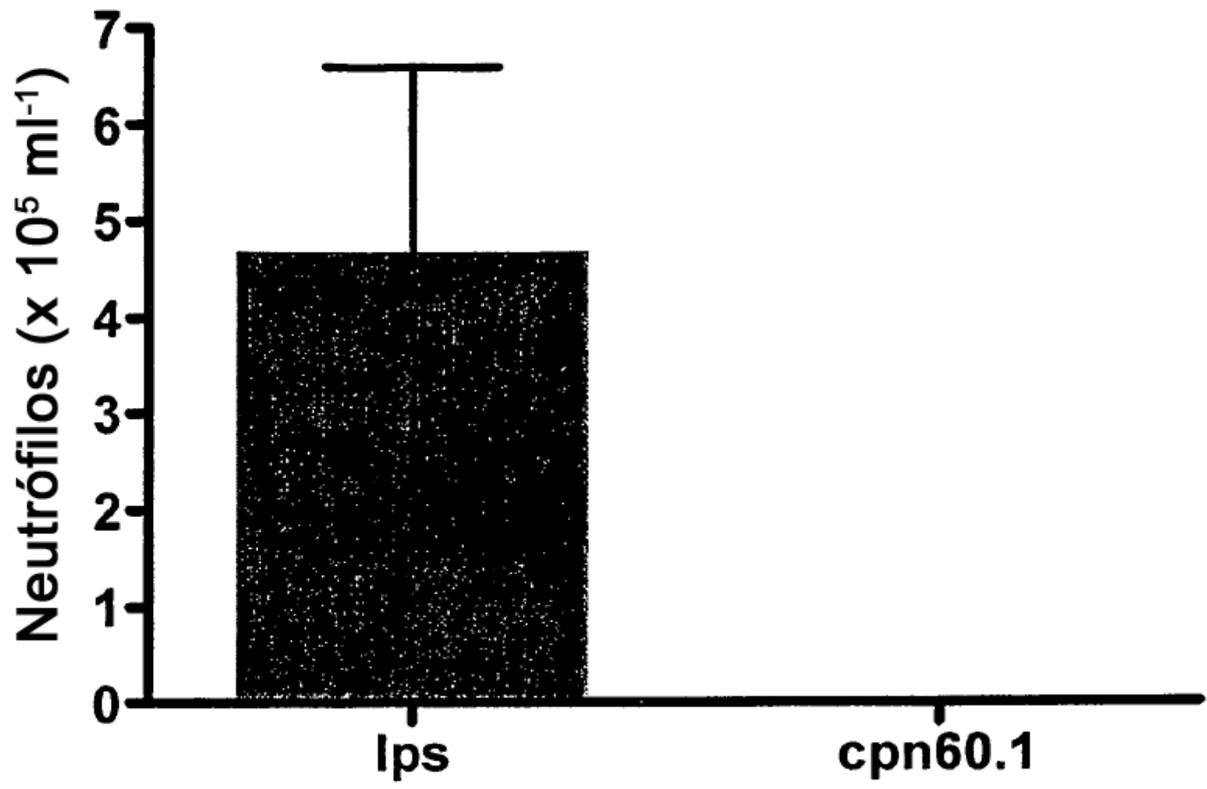


Figura 24

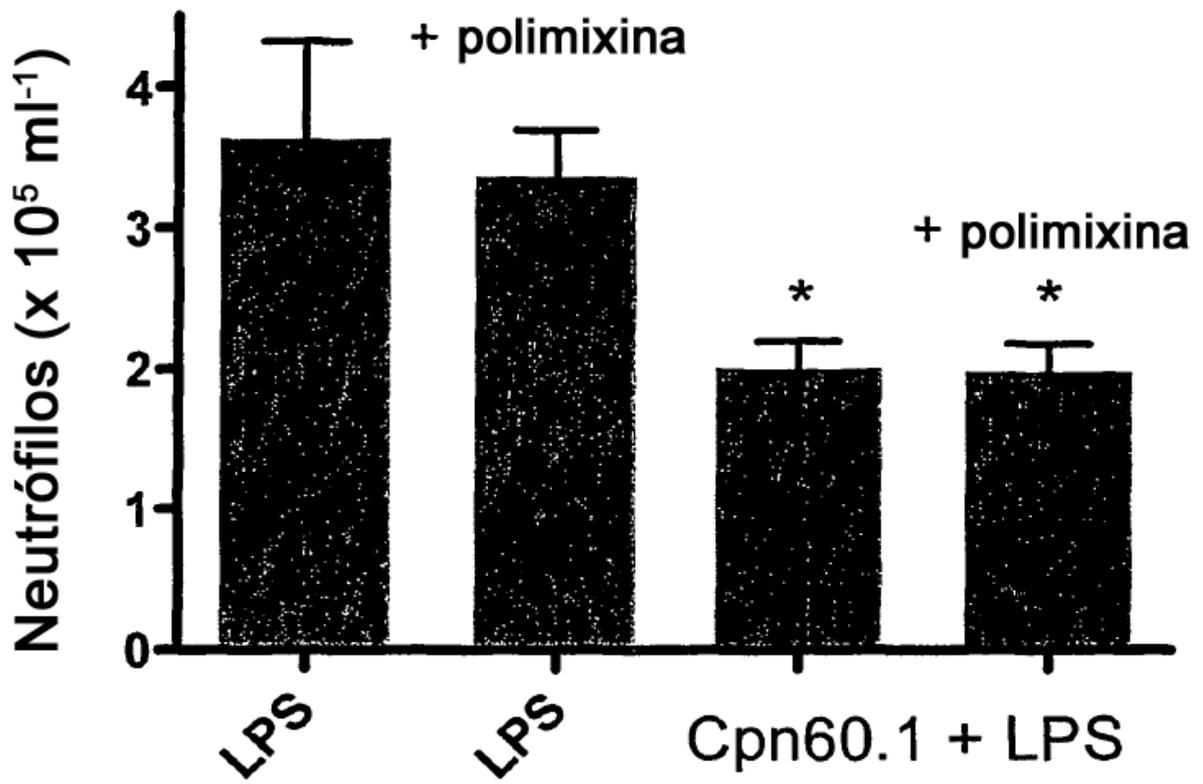




Figura 25 continuación

	Péptido	Posición (con respecto a la proteína de longitud completa)	Comentario
1	MSKLIYDETARRAMEVGMKLDTRVRT	1-29	Primeros 30 aminoácidos de la proteína. Contiene la mitad de una hoja $\beta$ y una hélice alfa. Superficie altamente expuesta
2	LGPRGRHWLAKAFGGPTVTN	30-50	Comprende una hoja $\beta$ en la estructura. Superficie altamente expuesta
3	DGVTVAREIELEDPFEDLGAQLVKSVA <del>TK</del> TNDV	51-83	Comprende 2 hélices alfa dentro de la estructura. Expuesto al "lado interno de una estructura oligomérica putativa" (se des conoce si existe la estructura oligomérica)
4	AGDGTTTATILAQAALIKGGLRLVAAGVN	84-110	Comprende una única hélice alfa. Expuesto solo parcialmente. Pasa por el centro del dominio
5	PIALGVGIGKAADAVSEALLASATP	111-136	Comprende una única hélice alfa. Superficie altamente expuesta
6	EEGIVPGGGASLIHQARKALTELRASL	406-432	Comprende la mitad de una hoja $\beta$ , una hélice alfa y una región de ligador. (Hoja $\beta$ ) Parcialmente enterrada en la estructura
7	TGDEVLGVDVFSEALAAPLFWIAANAGL	433-460	Comprende dos hélices alfa. Superficie altamente expuesta
8	DGSVWVNK/SELPAHGHLNVTLSYGDLAAD	461-491	Este área es una de las regiones con alta diferencia con Cpn60.2
9	GVIDPVKVTRSAVLNASSVARMVLTETVWV	492-522	Comprende una hélice alfa, una hoja $\beta$ y otra hélice alfa. Superficie altamente expuesta
10	LTTETVVVDKPAKAEDHDDHHHGHAAH	515-539	<b>Superficie altamente expuesta hacia la cara interna de una estructura oligomérica putativa. Contiene la mitad de una hoja <math>\beta</math>. Últimos 25 aa. No visible en la estructura putativa. Parece ser flexible y podría, por tanto, no resolverse en la estructura de E. coli. Esta es otra área de alta diferencia con Cpn60.2</b>

Figura 25 continuación

Ejemplos de péptidos y pureza de la fabricación

Secuencia	Nombre	Código	Pureza	Número de la lista
LGPRGRHWLAKAFGGPTVTN	p60.1_30	M1429-A1	96 %	2
EEGIVPGGGASLIHQARKALTELRASL	p60.1_406	M1429-A2	99 %	6
TGDEVLGVDVVFSEALAAPLFWIAANAGL	p60.1_433	M1429-A3	96 %	7
DGSVVNKKVSELPAGHGLNVNTLSYGDLAAD	p60.1_461	M1429-A4	96 %	8
GVIDPVKVTRSVAVLNASSVARMVLTETVW	p60.1_492	M1429_A5		9
LTETVWVDKPAKAEDHDDHHGHAH	p60.1_515	M1429-A6	98,5 %	10