

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 724**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09774914 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2384339**

54 Título: **Tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria por modulación de anexina-1 (lipocortina 1)**

30 Prioridad:

02.12.2008 GB 0822011

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

14.05.2015

73 Titular/es:

**QUEEN MARY AND WESTFIELD COLLEGE
(100.0%)
Mile End Road
London E1 4NS , GB**

72 Inventor/es:

**PERRETTI, MAURO;
D'ACQUISTO, FULVIO y
FLOWER, RODERICK, JOHN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 535 724 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

Tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria por modulación de anexina-1 (lipocortina 1)

La presente invención se refiere a métodos para tratar una enfermedad mediada por linfocitos T modulando la actividad de anexina-1.

5 Las enfermedades autoinmunitarias son patologías discapacitantes crónicas causadas por el mal funcionamiento del sistema inmunitario. En la mayoría de los casos son iniciadas por una respuesta incontrolada de linfocitos T a auto-antígenos presentados en el contexto de moléculas del MHC de las células presentadoras de antígenos (APC). Se ha descrito que diversos factores están implicados en la patogénesis de enfermedades autoinmunitarias que incluyen factores ambientales, genéticos y virales, con una característica general: la hiperreactividad de los linfocitos T.

10 Los glucocorticoides (GC) se utilizan con frecuencia para la terapia de una variedad de enfermedades autoinmunitarias crónicas debido a su capacidad para bloquear simultáneamente tanto la respuesta inmunitaria innata como la adaptativa. Los estudios realizados durante más o menos los 10 últimos años por los autores de la presente invención y otros grupos de investigación han demostrado que algunos de los efectos inflamatorios de los GC sobre la respuesta inmunitaria innata están mediados por una proteína llamada anexina-1 (Anx-A1). Se ha demostrado que
15 esta proteína ejerce un control homeostático sobre varios tipos de células incluyendo neutrófilos, macrófagos y células endoteliales. Sin embargo, un aspecto que siempre ha sido descuidado es el papel de la Anx-A1 en la respuesta inmunitaria adaptativa. Esto es sorprendente considerando que Anx-A1 ha sido propuesta como uno de los segundos mensajeros de los efectos farmacológicos de los GC.

20 Los autores de la presente invención han demostrado previamente que Anx-A1 desempeña un papel homeostático en los linfocitos T modulando la fuerza de señalización del receptor de linfocitos T (TCR) (D'Acquisto *et al.*, *Blood* 109: 1095-1102, 2007).

25 Además, los autores de la invención han demostrado que altos niveles de Anx-A1 disminuyen el umbral de activación de los linfocitos T y favorecen la diferenciación en linfocitos Th1, mientras que ratones deficientes en Anx-A1 muestran una activación de los linfocitos T deteriorada y un aumento de la diferenciación en linfocitos Th2 (D'Acquisto *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 37: 3131-3142, 2007).

30 El documento WO 2005/027965 describe el hallazgo de un mecanismo por el que los neutrófilos apoptóticos suministran señales anti-inflamatorias a las células dendríticas e identifica un anticuerpo que interfiere con este proceso. En particular, el documento WO 2005/027965 describe la identificación de Anx-1 como una molécula de señalización que se dice que es expresada por neutrófilos apoptóticos para inhibir la activación y maduración de las células dendríticas. El documento WO 2005/027965 propone que un anticuerpo denominado detector de células apoptóticas 5 (DAC5, por la expresión inglesa Detector of Apoptotic Cells Nor. 5) reconoce y bloquea los efectos anti-inflamatorios de la Anx-1 presentada en la superficie de los neutrófilos apoptóticos en la fagocitosis por las células dendríticas. El documento WO 2005/027965 se refiere por lo tanto a la posibilidad de tratamiento de diversas enfermedades haciendo actuar dichas células apoptóticas como dianas y eliminándolas provocando una respuesta inflamatoria, pero
35 no analiza el papel de Anx-1 en la activación de los linfocitos T.

40 El documento WO 2005/027965 reivindica que las anexinas se expresan en células que experimentan apoptosis (véase, por ejemplo, la página 8, líneas 6-7 y 29-30) y que estas anexinas están presentadas en la superficie de estas células (véase, por ejemplo, la página 6, líneas 10-11 y la página 8, líneas 16-17). Sin embargo, dos estudios separados (Madera *et al.*, *J. Immunol.*, 174: 3727-3733, 2005; Scannell *et al.*, *J. Immunol.*, 178: 4595-4605, 2007) han demostrado que las células apoptóticas, incluyendo los neutrófilos, liberan anexina-1, en lugar de expresar la proteína y presentarla en la superficie celular. Puesto que la anexina-1 es liberada de la célula, no se puede reivindicar que el DAC5 identificaría sólo las células apoptóticas que expresan la proteína en la superficie, puesto que el anticuerpo también identificaría la anexina-1 liberada.

45 Además, el documento WO 2005/027965 reivindica que la co-incubación de neutrófilos apoptóticos que expresan la anexina-1 en su membrana celular con células dendríticas activadas con LPS provoca la inhibición de la secreción de TNF- α y la sobre-regulación de los marcadores de activación CD83, CD86 y HLA-DR, y que la adición de DAC5 a este cultivo revierte los efectos inhibidores de los neutrófilos apoptóticos que expresan la anexina-1 (página 5, línea 31 a página 6, línea 8). Los datos de los autores de la presente invención (Huggins *et al.*, *FASEB J.* 2008, en prensa) demuestran que las células dendríticas liberan Anx-1 por estimulación con LPS y por lo tanto el DAC5 descrito en el documento WO 2005/027965 se uniría a la Anx-1 exteriorizada en los neutrófilos, así como a la anexina-1 liberada por las células dendríticas. Además, los autores de la presente invención han encontrado que la ausencia de anexina-1 en las células dendríticas provoca un aumento de la expresión de los marcadores de maduración/activación y la producción de citoquinas inflamatorias, tales como TNF- α e IL-1 β e IL-12. Por lo tanto, el anticuerpo DAC5 descrito en el documento WO 2005/027965 debe afectar a la maduración y activación de las células dendríticas y por lo tanto
50 a la subsiguiente modulación de la respuesta inmunitaria.
55

En apoyo de lo anterior, los autores de la presente invención han demostrado que el co-cultivo de células dendríticas Anx-A1^{-/-} con linfocitos T vírgenes en una reacción linfocitaria mixta (MLR) mostró una capacidad significativamente reducida para inducir la proliferación de linfocitos T o la producción de IL-2 e IFN- γ . Por lo tanto, los agentes que

bloquean la función de Anx-A1 en las células dendríticas deben reducir su capacidad para estimular una fuerte respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T. Los anticuerpos citados en el documento WO 2005/027965 no serían por tanto adecuados para tratar las enfermedades citadas en dicha solicitud de patente.

5 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-anexina-1 (Anx-A1) o uno de sus fragmentos que se une a Anx-A1 para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

Los autores de la presente invención han demostrado previamente que Anx-A1 modula la fuerza de señalización del receptor de linfocitos T (TCR) y que altos niveles de Anx-A1 disminuyen el umbral de activación de los linfocitos T y favorecen la diferenciación en linfocitos Th1. Los autores de la presente invención han identificado ahora la vía de la anexina, y la señal resultante, como diana para el bloqueo con el fin de tratar las enfermedades mediadas por linfocitos T. Dichas enfermedades incluyen aquellas en las que se produce una activación anómala de linfocitos T, por ejemplo, muchas enfermedades autoinmunitarias, y aquellas en las que es deseable desviar la diferenciación de los linfocitos T a favor de los linfocitos Th1 en lugar de los Th2.

La presente invención utiliza una molécula de unión específica que se une a la anexina-1 (Anx-A1).

15 Las anexinas son un grupo de proteínas celulares que se unen al calcio y a fosfolípidos, y también son conocidas como lipocortinas. La familia de las anexinas tiene 13 miembros, incluyendo anexina A1, anexina A2 y anexina A5. La anexina-A1 también se conoce como anexina-1 y se denomina en la presente memoria "Anx-A1". La anexina-1 (Anx-A1) es una proteína de 37 kDa y fue descrita originalmente como un mediador de las acciones de los glucocorticoides. En los últimos años se ha demostrado que Anx-A1 desempeña un papel homeostático en el sistema inmunitario adaptativo, en particular en los linfocitos T, modulando la fuerza de señalización del receptor de linfocitos T (TCR). La Anx-A1 actúa como un sub-regulador endógeno de la inflamación en células del sistema inmunitario innato *in vivo*. La Figura 1A es un diagrama de cintas que muestra la estructura tridimensional de Anx-A1.

Hay ocho secuencias de nucleótidos humanas que codifican Anx-A1. De éstas, sólo cuatro son traducidas y por lo tanto hay cuatro isoformas de Anx-A1, denominadas ANXA1-002, ANXA1-003, ANXA1-004 y ANXA1-006. Estas secuencias están disponibles en el sitio web Ensembl (www.ensembl.org) y se denominan OTTHUMT00000052664 (ANXA1-002), OTTHUMT00000052665 (ANXA1-003), OTTHUMT00000052666 (ANXA1-004) y OTTHUMT00000052668 (ANXA1-006). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de una isoforma de anexina-1 (Anx-A1) humana, ANXA1-003, se muestran en la Figura 2a. Las secuencias de aminoácidos de las isoformas ANXA1-002, ANXA1-004 y ANXA1-006 se muestran en las Figuras 2b, 2c y 2d, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 2, las isoformas ANXA1-002, ANXA1-004 y ANXA1-006 son variantes cortas por empalme de ANXA1-003 o variantes de ANXA1-003 con un pequeño número de cambios de aminoácidos.

Varios estudios han demostrado que un péptido N-terminal de Anx-A1 denominado Ac.2-26 actúa como sustituto bioactivo de la proteína completa (véase, por ejemplo, Lim *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14535-9, 1998).

La Figura 1B es una representación esquemática de las repeticiones de anexina y la localización de esta secuencia bioactiva. El péptido Ac.2-26 es un péptido acetilado que tiene la secuencia de residuos de aminoácidos 2-26 de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de Anx-A1 mostrada en la Figura 2. La secuencia del péptido Ac.2-26 se muestra en la Figura 1C y es como sigue:



La Anx-A1 y sus péptidos N-terminales bioactivos derivados median sus efectos biológicos a través de los miembros de la familia del receptor de formil-péptido (FPR). La Anx-A1 ejerce sus acciones contrarreguladoras sobre la extravasación de neutrófilos y la inmunidad innata por unión directa y activación de un miembro de esta familia, el receptor de tipo 1 de formil-péptido (FPRL-1). Los autores de la presente invención han encontrado previamente que la estimulación de linfocitos T en presencia de hrAnx-A1 aumenta la activación de linfocitos T por la estimulación de FPRL-1 (D'Acquisto *et al.*, *Blood* 109: 1095-1102, 2007).

La presente invención utiliza una molécula de unión específica que se une a la anexina-1 (Anx-A1). La Anx-A1 a la que se une la molécula de unión específica es típicamente Anx-A1 humana que tiene la secuencia polipeptídica mostrada en la Figura 2a, o uno de sus variantes o fragmentos, tal como una de las isoformas de Anx-A1 humana que tienen la secuencia polipeptídica mostrada en la Figura 2b, Figura 2c o Figura 2d. El fragmento de Anx-A1 humana a la que se une la molécula de unión específica es típicamente el polipéptido que tiene la secuencia mostrada en la Figura 1C. La Anx-A1 a la que se une la molécula de unión específica está típicamente codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 2a.

Como se usa en la presente memoria, el término "variante" se refiere a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos similar y/o que retienen la misma función. Por ejemplo, el término "variante" abarca proteínas o polipéptidos que incluyen una o más adiciones, deleciones, sustituciones o similares de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos son sustituciones típicamente conservadoras, es decir, la sustitución de un aminoácido por otro con propiedades generalmente similares, de manera que el funcionamiento global es probable que no resulte afectado seriamente.

Así, cualquier aminoácido puede ser con frecuencia sustituido por los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina (aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas). De estas posibles sustituciones, se prefiere usar la glicina y alanina para sustituir unos aminoácidos (puesto que tienen cadenas laterales relativamente cortas) y la valina, leucina e isoleucina para sustituir otros (puesto que tienen cadenas laterales alifáticas más largas que son hidrófobas). Otros aminoácidos que con frecuencia pueden sustituir a otros aminoácidos incluyen: fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas); lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas); aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas); asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales amida); y cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Usando los códigos de tres letras y de una letra, los aminoácidos se pueden denominar como sigue: glicina (G o Gly), alanina (A o Ala), valina (V o Val), leucina (L o Leu), isoleucina (I o Ile), prolina (P o Pro), fenilalanina (F o Phe), tirosina (Y o Tyr), triptófano (W o Trp), lisina (K o Lys), arginina (R o Arg), histidina (H o His), ácido aspártico (D o Asp), ácido glutámico (E o Glu), asparagina (N o Asn), glutamina (Q o Gln), cisteína (C o Cys), metionina (M o Met), serina (S o Ser) y treonina (T o Thr). Cuando un residuo puede ser ácido aspártico o asparagina, se pueden usar los símbolos Asx o B. Cuando un residuo puede ser ácido glutámico o glutamina, se pueden usar los símbolos Glx o Z. Las referencias al ácido aspártico incluyen el aspartato y las referencias al ácido glutámico incluyen el glutamato, a menos que el contexto especifique lo contrario.

También se pueden realizar deleciones o inserciones de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos de la proteína antes mencionada. Así, por ejemplo, pueden ser deleccionados los aminoácidos que no tienen un efecto sustancial sobre la actividad del polipéptido o al menos que no eliminan dicha actividad. Dichas deleciones pueden ser ventajosas puesto que se pueden reducir la longitud total y el peso molecular de un polipéptido, mientras que aún retiene la actividad. Esto puede permitir que se reduzca la cantidad de polipéptido requerida para un fin particular - por ejemplo, se pueden reducir los niveles de dosificación.

También se pueden realizar inserciones de aminoácidos con relación a la secuencia de la proteína de fusión anterior. Esto se puede hacer para alterar las propiedades de una sustancia (por ejemplo, para ayudar a la identificación, purificación o expresión).

Los cambios de aminoácidos con relación a la secuencia dada anteriormente se pueden llevar a cabo usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo usando mutagénesis dirigida al sitio o síntesis en estado sólido.

Debe apreciarse que las sustituciones o inserciones de aminoácidos se pueden realizar usando aminoácidos de origen natural o no natural. Tanto si se usan o no aminoácidos naturales o sintéticos, se prefiere que estén presentes sólo los L-aminoácidos.

Se puede usar un programa, tal como el programa CLUSTAL, para comparar secuencias de aminoácidos. Este programa compara secuencias de aminoácidos y encuentra el alineamiento óptimo insertando espacios en cualquier secuencia cuando sea apropiado. Es posible calcular la identidad o similitud de los aminoácidos (identidad más conservación del tipo de aminoácido) para un alineamiento óptimo. Un programa, como BLASTx, alineará el tramo más largo de secuencias similares y asignará un valor al ajuste. Por tanto, es posible obtener una comparación cuando se encuentran varias regiones de similitud, cada una con una puntuación diferente. En la presente descripción se contemplan ambos tipos de análisis de la identidad.

Las variantes de las proteínas y polipéptidos descritas en la presente invención deben retener la función de la proteína o polipéptido original. Alternativamente o además de retener la función de la proteína o polipéptido original, las variantes de las proteínas y polipéptidos descritas en la presente invención tienen típicamente al menos una identidad del 60% (como se expuso anteriormente) con las proteínas o polipéptidos descritos en la presente memoria, en particular las secuencias de polipéptido mostradas en la Figura 1C o Figura 2. Típicamente, las variantes tienen una identidad de al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% con las proteínas o polipéptidos descritos en la presente memoria, en particular las secuencias de polipéptidos mostradas en la Figura 1C o Figura 2.

El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos se determina alineando las secuencias para una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la primera secuencia para mejor alineamiento con la secuencia) y comparando los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones correspondientes. El "mejor alineamiento" es un alineamiento de dos secuencias que dé como resultado el mayor porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad se determina por el número de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos en las secuencias que se comparan (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede realizar utilizando un algoritmo matemático conocido por los expertos en la técnica. Un ejemplo de un algoritmo matemático para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modificado como en Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 han incorporado dicho algoritmo. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST

- se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácidos nucleicos. Las búsquedas de proteínas por BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas. Para obtener alineamientos con huecos para comparación, se puede utilizar Gapped BLAST, como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Alternativamente, se puede utilizar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterativa que detecte las relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers and Miller, CABIOS (1989). El programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete informático de alineamiento de secuencias CGC ha incorporado dicho algoritmo. Otros algoritmos para el análisis de secuencias conocidos en la técnica incluyen ADVANCE y ADAM, como se describe en Torellis and Robotti (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y velocidad de la búsqueda.
- En una propuesta alternativa, las variantes pueden ser proteínas de fusión, que incorporan restos que facilitan la purificación, por ejemplo etiquetando eficazmente la proteína o polipéptido deseado. Puede ser necesario retirar la "etiqueta" o puede ser el caso en el que la proteína de fusión retenga por sí misma suficiente funcionalidad para ser útil.
- Una "molécula de unión específica que se une a Anx-A1" como se utiliza en la presente memoria es una molécula que se une con mayor afinidad a Anx-A1 que a otras moléculas, es decir, que se une específicamente a Anx-A1. Las moléculas de unión específica que se unen a Anx-A1 incluyen anticuerpos anti-Anx-A1 y aptámeros. Los anticuerpos anti-Anx-A1 para uso en la presente invención actúan bloqueando la activación de los linfocitos T y por lo tanto, cuando se administran, se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos T, que generalmente son causadas por la activación anómala de los linfocitos T.
- Los anticuerpos anti-Anx-A1 se pueden producir, por ejemplo, contra Anx-A1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en la Figura 2, típicamente la secuencia de aminoácidos recogida en la Figura 2a. Alternativamente, los anticuerpos anti-Anx-A1 pueden ser dirigidos a un epítipo o epítopos particulares de Anx-A1 humana que tienen la secuencia de aminoácidos recogida en la Figura 2, típicamente la secuencia de aminoácidos recogida en la Figura 2a. Por ejemplo, los anticuerpos anti-Anx-A1 pueden ser dirigidos contra un fragmento N-terminal de Anx-A1, por ejemplo, un fragmento N-terminal de al menos 188, 100, 50 o 25 residuos de aminoácidos del extremo N de la secuencia de aminoácidos recogida en la Figura 2a. Típicamente, el anticuerpo anti-Anx-A1 para su uso en la invención es un anticuerpo contra el fragmento N-terminal de Anx-A1 denominado Ac.2-26 y que tiene la secuencia mostrada en la Figura 1C, o contra un fragmento de al menos 6 de sus aminoácidos. Las moléculas de unión específica que se unen a Anx-A1, por tanto, incluyen anticuerpos anti-Anx-A1, que son anticuerpos contra el fragmento Ac.2-26 de Anx-A1 que tienen la secuencia mostrada en la Figura 1C o un fragmento de al menos 6 de sus aminoácidos. En esta realización, el anticuerpo anti-Anx-A1 se produce contra un fragmento de la secuencia mostrada en la Figura 1C, que es antigénico y capaz de estimular la producción de anticuerpos que, cuando se administran, se puede utilizar en el tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos T, que típicamente son causadas por la activación anómala de los linfocitos T.
- Como se ha establecido anteriormente, un subfragmento activo de la secuencia especificada se puede utilizar tal como se ha definido. Subfragmentos activos pueden consistir o incluir un fragmento de al menos 6 residuos de aminoácidos continuos (un hexapéptido) del fragmento N-terminal de Anx-A1 denominada Ac.2-26 que tiene la secuencia recogida en la Figura 1C, incluyendo uno o más de:

5
 10
 15
 20
 25

AMVSEF
 MVSEFL
 VSEFLK
 SEFLKQ
 EFLKQA
 FLKQAW
 LKQAWF
 KQAWFI
 QAWFIE
 AWFIEF
 WFIENE
 FIENEE
 IENEEQ
 ENEEQE
 NEEQEY
 EEQEYV
 EQEYVQ
 QEYVQT
 EYVQTV
 YVQTVK

Los subfragmentos activos pueden consistir o incluir un fragmento de más de 6 residuos de aminoácidos continuos del fragmento N-terminal de Anx-A1 denominado Ac.2-26 que tiene la secuencia recogida en la Figura 1C, por ejemplo, un fragmento de al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23 o al menos 24 aminoácidos de la secuencia recogida en la Figura 1C.

Los anticuerpos anti-Anx-A1 incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales. Típicamente, el anticuerpo anti-Anx-A1 es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-Anx-A1 puede ser un anticuerpo comercialmente disponible, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de conejo o un anticuerpo monoclonal de ratón. Típicamente, el anticuerpo anti-Anx-A1 está humanizado, como se describe con detalle más adelante.

Los anticuerpos monoclonales se pueden producir a partir de hibridomas. Estos se forman típicamente por fusión de células de mieloma y células del bazo lo que produce el anticuerpo deseado con el fin de formar una línea celular inmortal. La técnica bien conocida de Kohler and Milstein (*Nature* 256:495-497 (1975)), o variaciones posteriores de esta técnica, se pueden utilizar para producir un anticuerpo monoclonal para uso de acuerdo con la invención.

Los anticuerpos policlonales se pueden obtener estimulando su producción en un hospedante animal adecuado (por ejemplo, ratón, rata, cobaya, conejo, oveja, cabra o mono) por inyección de Anx-A1, o una de sus variantes o fragmentos, en el animal. Si se desea, junto con la proteína Anx-A1 se puede administrar un adyuvante. Adyuvantes muy conocidos incluyen adyuvante de Freund (completo e incompleto) e hidróxido de aluminio. A continuación se pueden purificar los anticuerpos debido a su unión a Anx-A1.

Los métodos para producir anticuerpos monoclonales y policlonales que se unan a un polipéptido/proteína particular están ahora muy desarrolladas en la técnica y se recogen en libros de texto de inmunología estándares, por ejemplo en Roitt *et al.*, *Immunology* second edition (1989), Churchill Livingstone, London.

Además de los anticuerpos completos, la presente invención incluye el uso de sus derivados que sean capaces de unirse a Anx-A1, como se describe en la presente memoria. Así, la presente invención incluye el uso de fragmentos de anticuerpos y construcciones sintéticas. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos y construcciones sintéticas han sido dados por Dougall *et al.*, en *Trends Biotechnol.*, 12:372-379 (1994).

Los fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, los fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv. Los fragmentos Fab se tratan en Roitt *et al* [*supra*]. Los fragmentos Fv se pueden modificar para producir una construcción sintética conocida como una molécula Fv monocatenaria (scFv). Esta incluye un fragmento enlazador peptídico que une covalentemente regiones de cadena pesada variable (V_H) y de cadena ligera variable (V_L), lo que contribuye a la estabilidad de la molécula. El fragmento enlazador puede comprender de 1 a 20 aminoácidos, tal como por ejemplo 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, 5, 10 o 15 aminoácidos, u otros números intermedios en el intervalo de 1 a 20, según convenga. El fragmento enlazador peptídico se puede formar a partir de cualesquiera residuos de aminoácidos generalmente convenientes, tales como glicina y/o serina. Un ejemplo de fragmento enlazador adecuado es Gly₄Ser. Se pueden usar multímeros de dichos fragmentos enlazadores, tal como, por ejemplo, un dímero, un trímero, un tetramero o un pentámero, por ejemplo, (Gly₄Ser)₂, (Gly₄Ser)₃, (Gly₄Ser)₄ o (Gly₄Ser)₅. Sin embargo, en otras realizaciones no está presente ningún fragmento enlazador peptídico y el dominio V_L está unido al dominio V_H por un enlace peptídico.

La molécula de unión específica puede ser un análogo de un fragmento variable monocatenario (scFv). Por ejemplo, el scFv puede unirse a otras moléculas de unión específica (por ejemplo, otros scFv, fragmentos de anticuerpos Fab y anticuerpos IgG quiméricos (por ejemplo, con armazones humanos)). El scFv puede unirse a otros scFv con el fin

de formar un multímero que es una proteína de unión multi-específica, por ejemplo, un dímero, un trímero o un tetramero. Los fragmentos scFv biespecíficos se denominan a veces diacuerpos, los tri-específicos triacuerpos y los tetra-específicos tetracuerpos.

5 Un scFv se puede preparar por cualquier técnica adecuada usando técnicas estándares químicas o de biología molecular. En una realización, los análogos de anticuerpos monoclonales para uso en la invención se pueden preparar como fragmentos scFv partir de una quimioteca de expresión de fagos de anticuerpos humanos vírgenes (McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-554 (1990); y como se ha descrito en el documento WO 92/01047).

10 Otras construcciones sintéticas que se pueden usar incluyen péptidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Estos son péptidos sintéticos que comprenden determinantes de unión a antígeno. También se pueden utilizar imitadores de péptidos. Estas moléculas son normalmente anillos orgánicos conformacionalmente restringidos que imitan la estructura de un bucle de CDR y que incluyen cadenas laterales interactivas con antígenos.

15 Las construcciones sintéticas incluyen moléculas quiméricas. Por lo tanto, los anticuerpos humanizados o sus derivados están dentro del alcance de los anticuerpos para uso en la presente invención. Los métodos para humanizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica. El anticuerpo puede ser humanizado modificando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Un ejemplo de un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene regiones del armazón humano, pero regiones hipervariables de roedor (por ejemplo, de murido). Los modos de producir anticuerpos quiméricos están expuestos, por ejemplo, por Morrison *et al.*, en *PNAS*, 81: 6851-6855 (1984) y por Takeda *et al.*, en *Nature*, 314: 452-454 (1985). La humanización se puede realizar, por ejemplo, como ha sido descrito por Jones *et al.*, en *Nature*, 321: 522-525 (1986); Verhoeven *et al.*, en *Science*, 239: 1534-1536; Riechmann *et al.*, en *Nature* 332: 323-327, 1988. Los métodos para reducir la inmunogenicidad de las moléculas de unión específica para uso en la invención pueden incluir injertar CDR en un andamio del armazón del anticuerpo adecuado o remodelar un residuo variable de la superficie, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio u otras técnicas de biología molecular comúnmente utilizadas (Roguska *et al.*, *Protein Eng.* 9: 895-904 (1996)).

25 Otros métodos aplicables incluyen la identificación de potenciales epítopos de linfocitos T dentro de la molécula y la posterior separación de estos, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio (des-inmunización). Si se desea se puede realizar la humanización de las regiones CDR o de la secuencia del armazón circundante.

30 Las construcciones sintéticas también incluyen moléculas que comprenden un resto adicional que proporciona la molécula con alguna propiedad deseable además de la unión al antígeno. Por ejemplo, el resto puede ser un marcador (por ejemplo, un marcador fluorescente o radiactivo). Alternativamente, puede ser un agente farmacéuticamente activo.

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-anexina-1 (Anx-A1) o uno de sus fragmentos que se une a Anx-A1 para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

35 La molécula de unión específica que se une a Anx-A1 descrita en la presente memoria se puede utilizar para tratar una amplia gama de enfermedades que están mediadas por linfocitos T. En el presente contexto, "enfermedad mediada por linfocitos T" significa cualquier enfermedad o estado en el que los linfocitos T desempeñan un papel en la patogénesis o el desarrollo de la enfermedad o estado. Las enfermedades mediadas por linfocitos T son causadas típicamente por la activación anómala de los linfocitos T. Por consiguiente, dichas enfermedades se pueden tratar impidiendo la activación de los linfocitos T por bloqueo de la actividad de Anx-A1. Típicamente, las enfermedades mediadas por linfocitos T tratadas en la presente invención son enfermedades en las que desempeñan un papel los linfocitos Th1.

40 Las enfermedades mediadas por linfocitos T incluyen, aunque sin limitación, la enfermedad de injerto contra hospedante, rechazo de injertos, aterosclerosis, VIH y/o SIDA¹, psoriasis y algunas enfermedades autoinmunitarias. La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (SLE)(las abreviaturas corresponden a las expresiones en inglés), enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, esclerodermia, polimiositis, algunas formas de diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes de tipo 1), uveorretinitis autoinmunitaria, colitis ulcerosa, pénfigo vulgar, enfermedad inflamatoria intestinal, tiroiditis autoinmunitaria y psoriasis. La enfermedad autoinmunitaria es típicamente artritis reumatoide, esclerosis múltiple o lupus eritematoso sistémico.

50 La enfermedad autoinmunitaria es típicamente la artritis reumatoide. En la artritis reumatoide (RA), se cree que los linfocitos T reconocen e interaccionan con las células presentadoras de antígenos en la sinovia. Una vez activadas, estas células producen citoquinas y moléculas efectoras; esta producción ampliada secuencial de citoquinas constituye la "cascada de citoquinas" que da como resultado la activación de los macrófagos y la inducción del proceso inflamatorio, culminando en la degradación y resorción de cartilago y hueso. Con el tiempo, se pueden producir

¹ Salvo SIDA, VIH y SNC que son abreviaturas españolas suficientemente conocidas, todas las restantes abreviaturas son las correspondientes en inglés por ser las internacionalmente acreditadas y conocidas.

erosión ósea, destrucción del cartílago y pérdida completa de la integridad de las articulaciones. Finalmente, pueden verse afectados múltiples sistemas de órganos.

5 En otra realización, la enfermedad autoinmunitaria es lupus eritematoso sistémico (SLE). Los autores de la presente invención han encontrado ahora que el mRNA de Anx-A1 y su proteína se expresan en mayores niveles en los linfocitos T de pacientes con SLE que en los linfocitos T de voluntarios sanos.

Con relación a la capacidad de Anx-A1 para favorecer la diferenciación en linfocitos Th1, también se puede utilizar la presente invención, por ejemplo, para limitar las respuestas celulares protectoras no controladas (Th1) contra patógenos intracelulares y para tratar la infección extracelular (respuesta Th2) suprimiendo la diferenciación en Th1 y favoreciendo la diferenciación en Th2.

10 La molécula de unión específica que se une a Anx-A1 se formula típicamente para uso con un soporte, excipiente, vehículo, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. La presente invención abarca por tanto una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-anexina-1 (Anx-A1) o uno de sus fragmentos para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. La composición farmacéutica comprende un anticuerpo anti-anexina-1 (Anx-A1) o uno de sus fragmentos y un soporte, excipiente, vehículo, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica farmacéutica, por ejemplo mezclando el ingrediente activo con el soporte, excipiente, vehículo, adyuvante y/o diluyente en condiciones estériles.

20 Los soportes, vehículos, adyuvantes y/o diluyentes adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), carboximetilcelulosa (CMC), metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), dextrosa, liposomas, poli(alcohol vinílico), almidón de calidad farmacéutica, manitol, lactosa, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa (y otros azúcares), carbonato de magnesio, gelatina, aceite, alcohol, detergentes, emulsionantes o agua (preferiblemente estéril). El anticuerpo anti-Anx-A1 o su fragmento se puede formular como una formulación líquida, que consistirá generalmente en una suspensión o solución del anticuerpo anti-Anx-A1 o su fragmento en un vehículo o vehículos líquidos acuosos o no acuosos adecuados, por ejemplo, agua, etanol, glicerina, polietilenglicol (PEG) o un aceite.

25 Típicamente, el anticuerpo es PEGilado, es decir, unido covalentemente a un polietilenglicol. Típicamente, esto tiene el efecto de reducir la inmunogenicidad y aumentar la semivida de dicho anticuerpo.

El anticuerpo anti-Anx-A1 o su fragmento se puede administrar solo o junto con otro agente.

30 El anticuerpo anti-Anx-A1 o su fragmento para uso en la presente invención se administra típicamente a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Dicha cantidad es una cantidad eficaz para mejorar, eliminar o prevenir uno o más síntomas de una enfermedad autoinmunitaria. Preferiblemente, el sujeto que se va a tratar es un ser humano. Sin embargo, la presente invención es igualmente aplicable a la medicina humana o veterinaria. Por ejemplo, la presente invención puede encontrar uso en el tratamiento de animales de compañía, tales como perros y gatos, o animales de trabajo, tales como caballos de carreras.

35 El anticuerpo anti-Anx-A1 o su fragmento se puede administrar al sujeto por cualquier medio adecuado. El anticuerpo anti-Anx-A1 o su fragmento se puede administrar sistémicamente, en particular, por vía intra-articular, intraarterial, intraperitoneal (i.p.), intravenosa o intramuscular. Sin embargo, el anticuerpo anti-Anx-A1 o su fragmento también puede ser administrado por otras vías enterales o parenterales, tales como por vía subcutánea, intradérmica, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), oral (incluyendo bucal o sublingual), nasal, vaginal, anal, pulmonar u otras vías de administración apropiadas.

45 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden presentarse como unidades individuales, tales como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos; o como espumas o batidos comestibles; o como emulsiones). Los excipientes adecuados para comprimidos o cápsulas de gelatina dura incluyen lactosa, almidón de maíz o sus derivados, ácido esteárico o sus sales. Los excipientes adecuados para uso con cápsulas de gelatina blanda incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos, etc. Para la preparación de soluciones y jarabes, los excipientes que se pueden usar incluyen, por ejemplo, agua, polioles y azúcares. Para la preparación de suspensiones, se pueden utilizar aceites (por ejemplo, aceites vegetales) para proporcionar suspensiones del tipo aceite en agua o agua en aceite.

50 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica se pueden presentar como parches individuales destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede suministrar desde el parche por iontoforesis como se describe en general en *Pharmaceutical Research*, 3(6): 318 (1986).

55 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites. Para las infecciones de los ojos u otros tejidos externos, por ejemplo boca y piel, las composiciones se aplican preferiblemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formula como una pomada, el ingrediente activo se puede emplear

- 5 con una base de pomada parafínica o miscible con agua. Alternativamente, el ingrediente activo se puede formular como una base de crema del tipo aceite en agua o una base del tipo agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica a los ojos incluyen colirios, en los que el ingrediente activo está disuelto o en suspensión en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, pastillas y colutorios.
- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal se pueden presentar como supositorios o enemas.
- 10 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal, en las que el vehículo es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partículas, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros, que se administra esnifando, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las composiciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para administración como una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo.
- 15 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración por inhalación incluyen polvos o nieblas de partículas finas que se pueden generar por medio de diversos tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados dosificadores.
- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal se pueden presentar como óvulos, taponnes, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones para pulverización.
- 20 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea sustancialmente isotónica con la sangre del receptor al que están destinadas; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de puesta en suspensión y agentes espesantes. Los excipientes que se pueden usar para las soluciones inyectables incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales. Las composiciones se pueden presentar en recipientes de unidosis o multi-dosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y se pueden conservar en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.
- 25 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, aromatizantes, sales, tampones, agentes de recubrimiento o antioxidantes. También pueden contener agentes terapéuticamente activos además del anticuerpo anti-Anx-A1 o su fragmento.
- 30 La dosis del anticuerpo anti-Anx-A1 o su fragmento que se ha de administrar se puede determinar de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con el anticuerpo anti-Anx-A1 o su fragmento usado; la edad, el peso y el estado del paciente que se va a tratar; la vía de administración; y el régimen requerido. Un médico podrá determinar la vía de administración y la dosificación requeridas para un paciente particular.
- 35 Esta dosificación se puede repetir con la frecuencia adecuada. Si se presentan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosificación se pueden reducir, de acuerdo con la práctica clínica normal.
- 40 Para la administración a mamíferos, y particularmente a seres humanos, se espera que la dosificación diaria del agente activo sea de 1 µg/kg a 10 mg/kg de peso, típicamente alrededor de 10 µg/kg a 1 mg/kg de peso. En cualquier caso el médico determinará la dosificación real que sea la más adecuada para un individuo y dependerá de factores que incluyen la edad, el peso, el sexo y la respuesta del individuo. Las dosificaciones anteriores son ilustrativas del caso medio. Naturalmente, puede haber casos en los que se requieran dosis mayores o menores, y dichas dosis están dentro del alcance de esta invención.
- 45 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de un anticuerpo anti-Anx-A1 o uno de sus fragmentos que se une a Anx-A1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.
- Las características preferidas para el segundo y tercer aspectos de la invención son *mutatis mutandis* como para el primer aspecto.
- 50 La invención se describirá ahora adicionalmente haciendo referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras que se proporcionan solamente para fines de ilustración y no han de ser interpretados como limitativos de la invención. Se hace referencia a las Figuras por sus números, en las que:
- 55 La Figura 1A es un diagrama de cintas de la estructura de la anexina-1 que muestra las cuatro repeticiones de anexina y el dominio N-terminal. La Figura 1B es una representación esquemática de las repeticiones de anexina y la ubicación de la secuencia bioactiva, el péptido Ac.2-26A de la anexina-1. La Figura 1C muestra la secuencia de aminoácidos del péptido Ac.2-26, que es un fragmento acetilado del péptido N-terminal de Anx-A1.

- La Figura 2a muestra (i) la secuencia de aminoácidos y (ii) la secuencia de nucleótidos de la anexina-1 (Anx-A1) humana, isoforma ANXA1-003. La Figura 2b muestra la secuencia de aminoácidos de la anexina-1 (Anx-A1) humana, isoforma ANXA1-002. La Figura 2c muestra la secuencia de aminoácidos de la anexina-1 (Anx-A1) humana, isoforma ANXA1-004. La Figura 2d muestra la secuencia de aminoácidos de la anexina-1 (Anx-A1) humana, isoforma ANXA1-006.
- La Figura 3 muestra el efecto de la anexina-1 recombinante humana (hrAnx-A1) sobre la activación de los linfocitos T. El pre-tratamiento de células primarias CD4⁺ vírgenes de múridos con hrAnx-A1 seguido por activación con diferentes concentraciones de anti-CD3/CD28 aumentó la proliferación celular (Figura 3A), la producción de IL-2 (Figura 3B) y la expresión en la superficie celular de CD25 y CD69 (Figuras 3C y 3D).
- La Figura 4 muestra que la Anx-A1 endógena modula la proliferación de linfocitos T. La estimulación de linfocitos T Anx-A1^{+/+} o Anx-A1^{-/-} con anti-CD3, anti-CD3/CD28 o PMA/ionomicina mostró una tasa de disminución de la incorporación de ³H-timidina (Figuras 4A, 4B y 4C, respectivamente) y la producción de IL-2 (Figura 4D) en los linfocitos T deficientes en Anx-A1 en comparación con los linfocitos T no estimulados de control.
- La Figura 5 muestra la activación de la proteína activadora-1 (AP-1), el factor nuclear-κB (NF-κB) y el factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT) en presencia o ausencia de Anx-A1 (Figura 5A) y una comparación de la activación de AP-1, NF-κB y NFAT en linfocitos T Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} (Figura 5B).
- La Figura 6A muestra el análisis por FACS de la expresión de FPRL-1 en linfocitos T estimulados con anti-CD3/CD28 (5,0 µg/mL) durante los tiempos indicados. La Figura 6B muestra la localización celular de Anx-A1 en los linfocitos T antes (control) o después de la estimulación con anti-CD3/CD28 (5,0 µg/mL). La Figura 6C es una representación esquemática de la función del sistema Anx-A1/FPRL-1 en linfocitos T.
- La Figura 7 muestra que Anx-A1 exógena y endógena modulan la diferenciación en Th1/Th2. La Figura 7A muestra los resultados cuando se diferenciaron *in vitro* linfocitos T de ganglios linfáticos vírgenes en Th1 (barras negras) o Th2 (barras blancas) en presencia o ausencia de hrAnx-A1 y luego se volvieron a estimular con anti-CD3 unido a una placa para medir la producción de las citoquinas Th1 o Th2. La Figura 7B muestra los resultados cuando linfocitos T de ganglios linfáticos vírgenes de ratones Anx-A1^{+/+} o Anx-A1^{-/-} fueron diferenciados *in vitro* en Th1 (primero y segundo gráficos de columnas desde la izquierda) o Th2 (tercero y cuarto gráficos de columnas desde la izquierda) en presencia y ausencia de hrAnx-A1 y luego se estimularon de nuevo con anti-CD3 unido a una placa para medir la producción de las citoquinas Th1 o Th2.
- La Figura 8 muestra el volumen de la pata (Figura 8A) y la puntuación clínica (Figura 8B) de ratones DBA tratados con PBS o hrAnx-A1 durante 12 días en la fase de inmunización del modelo de artritis inducida por colágeno (CIA). La Figura 8C es un análisis de la expresión de Anx-A1 en las células CD4⁺ de voluntarios sanos de control (HC) o pacientes con artritis reumatoide (RA). La Figura 8D muestra un análisis inmunohistoquímico de la expresión de Anx-A1 en el tejido sinovial de pacientes con RA.
- La Figura 9 muestra los efectos de hrAnx-A1 de longitud completa y el péptido N-terminal Ac.2-26 sobre la activación de linfocitos T.
- La Figura 10 muestra la expresión de Anx-A1 en placas ateroscleróticas humanas. El análisis inmunohistoquímico de la expresión de Anx-A1 con el anticuerpo monoclonal anti-Anx-A1 humano de ratón 1B (Figura 10A) o con IgG no inmunitaria (Figura 10B) en placas ateroscleróticas carotídeas extraídas de pacientes durante cirugía por endarterectomía carotídea. Las fotografías son de un solo paciente y son representativas de seis pacientes diferentes en condiciones similares.
- La Figura 11 muestra la expresión de Anx-A1 en placas ateroscleróticas de múridos. La Figura 11 muestra la visualización por inmunofluorescencia de Anx-A1 en el seno aórtico de ratones ApoE^{-/-} (Figura 11A y Figura 11B) y la arteria braquiocefálica (Figura 11C). Los cortes fueron teñidos con Dapi para localizar los núcleos. Los resultados ilustrados son de un solo experimento y son representativos de tres experimentos separados. Los aumentos originales fueron: 200 (Figura 11A y Figura 11B) y 400 (Figura 11C).
- La Figura 12 muestra la expresión de anexina-1 en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE). Análisis por RT-PCR (panel superior) y por transferencia de Western (panel inferior) de la expresión de Anx-A1 en linfocitos T de pacientes sanos (control) o con lupus eritematoso sistémico (SLE). Los números de la figura indican el volumen (µL) de cDNA o la cantidad (µg) de las proteínas obtenidas a partir del mismo número (2x10⁶) de linfocitos T recogidos de pacientes sanos (control) o con lupus eritematoso sistémico (SLE).
- La Figura 13 muestra la inhibición de la activación del receptor de linfocitos T (TCR), medida en términos de producción de interleuquina-2 (IL-2), en linfocitos T periféricos humanos de un donante incubados con un anticuerpo monoclonal neutralizante producido contra la anexina-1 recombinante humana (mAb1A anti-Anx-A1).
- La Figura 14 muestra la inhibición de la activación del receptor de linfocitos T (TCR), medida en términos de producción de interleuquina-2 (IL-2), en linfocitos T periféricos humanos de un donante diferente incubados con un anticuerpo monoclonal neutralizante producido contra anexina-1 recombinante humana 1 (mAb1A anti-Anx-A1).

- 5 La Figura 15 muestra cortes de la médula espinal de ratones C57BL/6 inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ y CFA y de los cuales se extrajo la médula espinal el día 12 (puntuación 0), el día 18 (puntuación 2) y el día 20 (puntuación 4). Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E, Figura 15A) o anti-Anx-A1 (Figura 15B). Para cada tinción, los paneles de la derecha (20 aumentos) muestran un aumento mayor de una zona de los paneles de la izquierda (4 aumentos). Los resultados son representativos de 3 experimentos.
- La Figura 16 muestra cortes de la médula espinal de ratones C57BL/6 inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ y CFA y de los cuales se extrajo la médula espinal el día 20 (puntuación 4). Los cortes fueron teñidos con anti-Anx-A1 y anti-CD3 (A) o anti-F4/80 (B). Los paneles de la derecha muestran una superposición de las dos coloraciones individuales en la derecha. Los resultados son representativos de 3 experimentos.
- 10 La Figura 17 muestra los resultados de un estudio en el cual fueron inmunizados ratones C57BL/6 con MOG₃₅₋₅₅ y CFA y se monitorizaron diariamente para detectar signos y síntomas de la EAE (A) o la ganancia/pérdida de peso (B) durante 23 días. Los resultados son valores medios \pm error típico de la media (SEM) (n=10/grupo), **p<0,01, representativos de 3 experimentos.
- La Figura 18 muestra la incorporación de ³H-timidina (A) y la producción de IL-2 (B) de los linfocitos de ganglios linfáticos obtenidos de ratones Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ y CFA y sacrificados después de 14 días. Los linfocitos fueron estimulados con MOG₃₅₋₅₅ durante 48 horas y se pulsaron con 1 μ gCi de ³H-timidina durante 12 horas. Los líquidos sobrenadantes de las células se utilizaron para medir la producción de IL-2. Los resultados son valores medios \pm SEM (n=4/grupo), *p<0,05, **p<0,01, representativos de 3 experimentos.
- 15 La Figura 19 muestra el número total de linfocitos del bazo (A) y de los ganglios linfáticos (B) obtenidos de ratones Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ y CFA y sacrificados después de 14 días. Los gráficos C y D muestran el análisis citofluorimétrico de los linfocitos de ganglios linfáticos con anti-CD4 FITC y anti-CD8 PE. Los resultados son valores medios \pm SEM (n=10/grupo), **p<0,01, representativos de 3 experimentos.
- La Figura 20 muestra los niveles de (A) IFN- γ , (B) IL-2, (C) TNF- α y (D) IL-17 en los líquidos sobrenadantes de linfocitos de nódulos linfáticos obtenidos de ratones Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ y CFA y sacrificados después de 14 días. Los linfocitos fueron estimulados con la concentración indicada de MOG₃₅₋₅₅ durante 4 días y los líquidos sobrenadantes se utilizaron para análisis de las citoquinas por ELISA. Los resultados son valores medios \pm SEM (n= 4/grupo), *p<0,05, **p<0,01, representativos de 3 experimentos.
- 25 La Figura 21 muestra la tinción con hematoxilina-eosina de cortes de la médula espinal obtenida de ratones Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ y CFA y sacrificados después de 22 días. Para cada tinción, los paneles de la derecha (20 aumentos) muestran un aumento mayor de una zona que los paneles de la izquierda (4 aumentos). Los cortes consecutivos se tiñeron con anti-CD3 (C) o anti-F4/80 (D). Las imágenes son representativas de tres experimentos separados con resultados similares.
- La Figura 22 muestra el análisis por FACS de células mononucleares positivas CD3 (A) y F4/80 (B) recuperadas en gradiente de Percoll de homogeneizados de médula espinal obtenida de ratones Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ y CFA y sacrificados después de 14 días. Los gráficos de puntos y los histogramas son de un solo ratón y representativos de 2 experimentos con n = 4 ratones. Los números de los histogramas indican el porcentaje de células CD3⁺ y F4/80⁺.
- 35

Ejemplos 1 a 10

Materiales y métodos

40 Reactivos

- Anti-CD3 de ratón (clon 145-2C11), anti-CD28 de ratón (clon 37.51), anti-CD3 humano (clon OKT3), anti-CD28 humano (clon CD28.2), anti-CD69 conjugado con PE (clon H1.2F3), anti-CD25 conjugado con FITC (clon PC61.5), IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-12, anti-IL-4 (clon 11B11) y anti-IFN- γ (clon XMG1.2) de muridos fueron adquiridos a eBioscience (Wembley, Reino Unido). La Anx-A1 recombinante humana (hrAnx-A1) libre de endotoxina se preparó como se describe. En algunos experimentos, los autores de la presente invención utilizaron hrAnx-A1 desnaturalizada (inactivada por calor a 95°C durante 5 minutos) como control positivo. Salvo indicación contraria, todos los demás reactivos fueron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO).
- 45

Ratones

- Ratones macho BALB/C, C57/BL6 y DBA/1 se obtuvieron de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). En el laboratorio de los inventores se generaron ratones nulos en anexina 1 BALB/C y se criaron en condiciones libres de patógenos las instalaciones de los inventores. Todos los ratones utilizados en estos estudios tenían entre 6 y 8 semanas. El trabajo con animales se realizó de acuerdo con las disposiciones de la *United Kingdom Home Office (Guidance on the Operation of Animals, Scientific Procedures Act 1986)* y con las directivas de la Unión Europea.
- 50

Aislamiento de células de pacientes

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre periférica usando centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (Ficoll-Paque Plus; Amersham Biosciences, Friburgo, Alemania). Se seleccionaron las células CD4⁺ de la sangre periférica utilizando selección positiva. En resumen, la sangre periférica se sometió a centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (Ficoll-Paque Plus; Amersham Biosciences). Las células adherentes se separaron de las células mononucleares por adherencia a plástico recubierto de suero. Las células no adherentes se incubaron con anticuerpo anti-CD4 humano de ratón (RFT4), se lavaron en tampón (solución salina tamponada con fosfato [PBS], 0,5% de seroalbúmina bovina [BSA], EDTA 2 mM pH 7,2) y se incubaron con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado a una perla magnética (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Las células se hicieron pasar a través de una columna MACS (Miltenyi Biotec) y se recogieron las células CD4⁺. La pureza de las células se determinó por citometría de flujo. La mediana del porcentaje de las células CD3⁺ CD4⁺ después de 10 agotamientos fue 98% (intervalo, 97%-99,3%). Las células restantes se volvieron a poner en suspensión en tampón de lisis (Ambion, Huntingdon, Reino Unido).

Cultivo celular

Se prepararon linfocitos T primarios de múrido de ganglios linfáticos por selección negativa. En resumen, se separaron ganglios linfáticos axilares, inguinales y mesentéricos para preparar una única suspensión celular, a continuación se lavaron y extendieron en capas sobre Ficoll. La capa leucocítica se lavó 2 veces y después se incubó con la mezcla de anticuerpos y las perlas magnéticas siguiendo las instrucciones del fabricante (kit de aislamiento negativo de linfocitos T de ratón; Dynal, Bromborough, Reino Unido). En algunos experimentos, las células se purificaron más para obtener linfocitos T CD62L⁺ CD4⁺ vírgenes usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD62L⁺ CD4⁺ de Miltenyi Biotec. Las condiciones Th0 fueron creadas por los linfocitos T durante 4 días en placas de 6 pocillos recubiertos previamente con anti-CD3 (5 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) en un medio RPMI completo (10% de suero fetal de ternera [FCS], L-glutamina 2 mM y 100 unidades mL⁻¹ de gentamicina) que contenía IL-2 de múrido (20 U/mL). Las condiciones Th1 fueron creadas con IL-12 de múrido (3,4 ng/mL; eBioscience), IL-2 (20 U/mL; eBioscience) y anti-IL4 (clon 11B11; 2 µg/mL). Las condiciones Th2 fueron creadas con IL-4 (3000 U/mL; Peprotech, Rocky Hill, NJ), IL-2 (20 U/mL) y anti-IFN-γ (clon XMG1.2; 2 µg/mL). Las células Jurkat se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron en medio RPMI completo.

Análisis por citometría de flujo

Los linfocitos T de ganglios linfáticos purificados se trataron previamente con Anx-A1 recombinante humana durante 2 horas a 37°C en tubos Eppendorf y a continuación se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 unidas a una placa como se indica en las figuras. Después de 16 horas, los linfocitos se tiñeron con anti-CD69 conjugado con PE (clon H1.2F3) y anti-CD25 conjugado con FITC (clon PC61.5) diluidos en tampón FACS (PBS que contenía 1% de FCS y 0,02% de NaN₂). Las células intactas se regularon usando dispersión frontal y lateral y se analizaron con el programa CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) en un citómetro de flujo FACScan. Para analizar la expresión de FPRL-1, se estimularon linfocitos T de sangre periférica humana con anti-CD3 y anti-CD28 unidos a una placa durante diferentes tiempos y, posteriormente, se tiñeron con anti-FPRL-1 humano de ratón (clon 6C7-3-A; 5 µg/mL), seguido por el anticuerpo conjugado con FITC.

Ensayo de proliferación celular

Linfocitos T de ganglios linfáticos purificados (10⁵ linfocitos/mL) se incubaron con un medio solo o con diferentes concentraciones de hrAnx-A1 durante 2 horas a 37°C en tubos Eppendorf. A continuación, se estimularon partes alícuotas de 200 µL de la suspensión celular por anti-CD3 y anti-CD28 unidos a una placa durante 24 horas en placas de 96 pocillos. Después de 18 horas, los cultivos se pulsaron durante 8 horas con 1 µCi (3,7 x 10⁴ Bq) de [³H]-timidina (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y se midió la radiactividad incorporada con un contador de centelleo automatizado (Packard Instruments, Pangbourne, Reino Unido).

Ensayos de desplazamiento de la electromovilidad

Se recolectaron extractos nucleares de 3 x 10⁶ a 5 x 10⁶ células de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente. Los extractos nucleares (3 µg a 5 µg) se incubaron con 1 µg (para NFAT) o 2 µg (para NF-κB y AP-1) de poli(dI:dC) en 20 µL de tampón de unión con sondas de oligonucleótidos bicatenarios marcadas en los extremos con ³²P (5 x 10⁵ cpm) y se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 6% (relación de reticulación 29:1) en 0,5% de TBE durante 2,5 horas a 150 V. El tampón de unión a NF-κB y AP-1 (10x) contenía Tris-HCl 100 mM, (pH 7,5), NaCl 500 mM, EDTA 10 mM, 50% de glicerol, 10 mg/mL de albúmina, GTP 30 mM, DTT 10 mM. El tampón de unión a NFAT (10x) contenía Hepes 100 mM (pH 7,9), KCl 500 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 50% de glicerol, 5 mg/mL de albúmina, 1% de Nonidet P-40, DTT 10 mM. Las sondas de oligonucleótidos bicatenarios de NF-κB y AP-1 eran de Promega y el NFAT era de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Análisis por transferencia de Western

Se incubaron linfocitos T de ganglios linfáticos como se indica en las figuras. Después de incubación a 37°C durante diversos períodos de tiempo, los linfocitos se lisaron en tampón de lisis enfriado con hielo (1% de NP-40, Tris 20 mM

a pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 0,5 mM, aprotinina 1 µM, leupeptina 1 µM, pepstatina 1 µM, NaF 50 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM y NaVO₄ 1 mM, β-glicerofosfato 1 mM). Los lisados celulares se centrifugaron a 13/226 g (13.000 rpm) durante 5 minutos a 4°C y se recogieron los líquidos sobrenadantes y se sometieron a electroforesis en SDS-10% de gel de poliacrilamida. Después de la transferencia, las membranas se incubaron durante una noche con anticuerpos diluidos en solución salina tamponada con Tris que contenía Tween-20 (TTBS: NaCl 0,13 M; KCl 2,68 mM; Tris-HCl 0,019 M; 0,001% vol/vol de Tween-20; pH 7,4) con 5% de leche desnatada en polvo a 4°C. Para los experimentos con anti-pERK1/2 y anti-Akt, el tampón TTBS se suplementó con NaF 50 mM y se usó seroalbúmina bovina (5%) en lugar de leche. Para cada condición, se utilizaron los equivalentes de extractos obtenidos del mismo número de células. La inmunotransferencia y la visualización de las proteínas por quimioluminiscencia potenciada (ECL; Amersham Pharmacia Biotech) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para obtener fracciones citosólicas y de membranas, las células se recogieron primero y se lavaron en PBS enfriado con hielo y después se centrifugaron brevemente durante 2 minutos a 300 g. El sedimento celular resultante se lisó en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; inhibidores de la proteasa que se enumeran en el tampón de lisis) y se pasó a través de una aguja de calibre 25 al menos 5 veces para asegurar suficiente lisis. A continuación se centrifugó la suspensión durante 2 minutos a 300 g, se recogió el líquido sobrenadante y se centrifugó de nuevo durante 45 minutos a 800 g (4°C). En esta etapa se recogió el líquido sobrenadante (fracción citosólica) y el sedimento (fracción de membrana) se volvió a poner en suspensión en tampón de lisis que contenía 1% (vol/vol) de Triton X-100. Todas las fracciones se mantuvieron en hielo durante los experimentos.

ELISA de citoquinas

Para el análisis de la producción de las citoquinas Th1/Th2, los linfocitos Th0/Th1/Th2 (10⁶/mL) obtenidos después de diferenciación durante 4 días en condiciones inclinadas y 1 día de reposo en medio RPMI completo, se estimularon con anti-CD3 unido a una placa (5 µg/mL) durante 8 horas en placas de 24 pocillos. Se recogieron los líquidos sobrenadantes del cultivo y se analizaron para determinar el contenido de IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10 usando el kit de ELISA con panel para Th1/Th2 (eBioscience). El kit de ELISA para IL-13 también fue adquirido a eBioscience.

25 Ejemplo 1 - Efecto de la anexina-1 recombinante humana (hrAnx-A1) sobre la activación de linfocitos T

Linfocitos T de ganglios linfáticos vírgenes de múridos se estimularon con 5,0 (■), 2,5 (▲) y 1,25 (▼) µg/mL de anti-CD3/CD28 en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de hrAnx-A1 durante 24 horas y luego se pulsaron con ³H-timidina para medir la proliferación. Los resultados se muestran en la Figura 3A.

La Figura 3B muestra la producción de IL-2 a partir de linfocitos T primarios de ganglios linfáticos vírgenes de múridos estimulados con anti-CD3/CD28 (1,25 µg/mL) en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de hrAnx-A1 durante 24 horas.

Linfocitos T de ganglios linfáticos vírgenes de múridos se estimularon con anti-CD3/CD28 a una concentración de 1,25 µg/mL (columna de la izquierda), 2,5 µg/mL (columna central) y 5,0 µg/mL (columna de la derecha), en ausencia (paneles superiores) o en presencia (paneles inferiores) de hrAnx-A1 (600 nM) durante 12 horas y luego se analizaron por FACS para determinar la expresión de CD25 y CD69. Los resultados se muestran en la Figura 3C.

En la Figura 3D, los linfocitos T de ganglios linfáticos vírgenes de múridos se estimularon con la concentración indicada de anti-CD3/CD28 en presencia de 150 (X), 300 (✱) y 600 (O) nM de hrAnx-A1 durante 12 horas y luego se analizaron por FACS para determinar la expresión de CD25 (gráfico de la izquierda) y CD69 (gráfico de la derecha).

En todos los experimentos los valores son la media ± S.E.M de n = 3-4 ratones. *P<0,05; **P<0,01.

Los resultados muestran que el tratamiento previo de las células primarias CD4+ vírgenes de múridos con hrAnx-A1 seguido por activación con diferentes concentraciones de anti-CD3/CD28 aumentó la proliferación celular (Figura 3A), la producción de IL-2 (Figura 3B) y la expresión en la superficie celular de CD25 y CD69 (Figuras 3C y D).

Ejemplo 2- La Anx-A1 endógena modula la proliferación de linfocitos T

La Figura 4 muestra que: (A) anti-CD3 (5,0 µg/mL), (B) anti-CD3/CD28 (5,0 µg/mL) o (C) PMA (20 ng/mL) e ionomicina (2 ng/mL) indujeron la proliferación de linfocitos T de tipo natural y deficientes en Anx-A1, expresada como porcentaje de la incorporación de ³H-timidina en comparación con los linfocitos T no estimulados de control. En algunos experimentos, los linfocitos también fueron activados en presencia de IL-2 recombinante de ratón (20 ng/mL). Los valores son la media ± S.E.M de n = 4-5 † † P<0,01 frente a linfocitos Anx-A1^{+/+} estimulados con IL-2; **P<0,01 frente a anti-CD3 o anti-CD3/CD28 o a linfocitos Anx-A1^{+/+} estimulados con PMA/ionomicina; §§P<0,01 frente a anti-CD3 o anti-CD3/CD28 o a linfocitos Anx-A1^{-/-} estimulados con PMA/ionomicina.

La Figura 4D muestra la producción de IL-2 a partir de linfocitos T de ganglios linfáticos vírgenes estimulados con anti-CD3, anti-CD3/CD28 (5,0 µg/mL) o PMA (20 µg/mL) e ionomicina (2 ng/mL) durante 24 horas. Los valores son la media ± S.E.M de n = 4-5 ratones. **P<0,01.

Los resultados muestran que la estimulación de linfocitos T Anx-A1^{+/+} o Anx-A1^{-/-} con anti-CD3, anti-CD3/CD28 o PMA/ionomicina muestra una tasa de disminución de la incorporación de ³H-timidina (Figuras 4A, 4B y 4C, respecti-

vamente) y la producción de IL-2 (Figura 4D) en los linfocitos T deficientes en Anx-A1 en comparación con los linfocitos T no estimulados de control.

Ejemplo 3 - Activación de AP-1, NF- κ B y NFAT en presencia o ausencia de Anx-A1

5 Se realizaron investigaciones de cómo Anx-A1 exógena y endógena modulan la activación de linfocitos T. Los tres principales activadores de la transcripción de los linfocitos T, a saber proteína activadora-1 (AP-1), factor nuclear- κ B (NF- κ B) y factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT), se analizaron en linfocitos estimulados en presencia de hrAnx-A1.

10 La Figura 5A es un ensayo del desplazamiento de la movilidad electroforética para determinar la activación de AP-1, NF- κ B y NFAT en linfocitos T estimulados con anti-CD3/CD28 (1,25 μ g/mL) en presencia o ausencia de la concentración indicada de hrAnx-A1. La Figura 5B muestra una comparación de la activación de AP-1, NF- κ B y NFAT en linfocitos T Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} estimulados con anti-CD3/CD28 (5,0 μ g/mL).

Los resultados demostraron mayor activación de los tres factores de transcripción (Figura 5A). Por el contrario, los linfocitos T Anx-A1^{-/-} mostraron una disminución de la activación de estos factores de transcripción en comparación con sus compañeros de control (Figura 5B).

15 Ejemplo 4 - Exteriorización de FPRL-1 y Anx-A1 en linfocitos T

Los autores de la presente invención investigaron si los linfocitos T expresan el receptor para Anx-A1, el receptor de tipo 1 de formil-péptido (FPRL-1). La tinción por FACS de linfocitos T de sangre periférica (PBT) humanos no estimulados con el anticuerpo monoclonal anti-FPRL-1 específico no demostró expresión del receptor. Sin embargo, la estimulación con anti-CD3/CD28 indujo la exteriorización de FPRL-1 en 1 hora seguida por una expresión estacionaria estable sobre la superficie celular (Figura 6A). Curiosamente, los autores observaron un patrón similar para Anx-A1. Así, el análisis de la distribución de Anx-A1 en PBT humanos demostró que la proteína está uniformemente distribuida entre el citosol y la membrana. Sin embargo, cuando los linfocitos fueron estimulados con anti-CD3/CD28, se observó una acumulación de Anx-A1 en la membrana.

25 La proteína se exportó luego al lado exterior de la membrana y se liberó en el medio extracelular. De acuerdo con este modelo, cuando se inmunoprecipitó Anx-A1 desde el líquido sobrenadante de cultivo de los PBT humanos estimulados con anti-CD3/CD28, se observó un aumento de la liberación de Anx-A1 en comparación con los linfocitos no estimulados de control (Figura 6B). En conjunto, estas observaciones demuestran que la señalización a través del TCR aumenta la liberación de Anx-A1, simultáneamente con la sobre-regulación de sus receptores.

30 En condiciones fisiológicas, Anx-A1/FPRL-1 se integra con el TCR para modular la fuerza de señalización del TCR. Sin embargo, en condiciones patológicas, tales como en la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico (datos no publicados), donde la proteína se expresa a mayores niveles, esto podría conducir a un aumento de la activación de los linfocitos T debido al menor umbral de señalización de TCR (Figura 6C).

Ejemplo 5 - Anx-A1 exógena y endógena modulan la diferenciación en Th1/Th2

35 Estudios recientes han postulado que la fuerza de la señalización de TCR influye sobre el compromiso del linaje de linfocitos T con las células efectoras Th1 o Th2. Dado el aumento o disminución de la señalización de TCR en linfocitos T tratados con hrAnx-A1 (Figuras 3 y 5A) o linfocitos Anx-A1^{-/-} (Figuras 4 y 5B), se buscó a continuación determinar si diferentes niveles de Anx-A1 influirían sobre la diferenciación de los linfocitos T en linfocitos Th1 o Th2.

40 Los linfocitos T de ganglios linfáticos vírgenes se diferenciaron *in vitro* en Th1 (barras negras) o Th2 (barras blancas) en presencia o ausencia de hrAnx-A1 (600 nM) y luego se volvieron a estimular con anti-CD3 unido a una placa (5,0 μ g/mL) durante 8 horas para medir la producción de citoquinas Th1 o Th2. Los resultados se muestran en la Figura 7A. Los valores son la media \pm S.E.M de n = 4-5 ratones. **P<0,01.

45 Como se muestra en la Figura 7A, la diferenciación de linfocitos T vírgenes (CD44^{lo}, CD62L^{hi}) en Th1 (anti-CD3/CD28, IL-2, IL-12 y anti-IL-4) o Th2 (anti-CD3/CD28, IL-2, IL-4 y anti-IFN- γ) en presencia de hrAnx-A1 aumentó la producción de IL-2 y de IFN- γ con una disminución simultánea de la liberación de IL-4 e IL-10 por una nueva estimulación con anti-CD3.

50 Los linfocitos T de ganglios linfáticos vírgenes procedentes de ratones Anx-A1^{+/+} o Anx-A1^{-/-} fueron diferenciados *in vitro* en Th1 (primero y segundo gráficos desde la izquierda) o Th2 (tercero y cuarto gráficos desde la izquierda) y luego se volvieron a estimular con anti-CD3 unido a una placa (5,0 μ g/mL) durante 8 horas para medir la producción de citoquinas Th1 o Th2. Los resultados se muestran en la Figura 7B. Los valores son la media \pm S.E.M de n = 4-5 ratones. ** P<0,01.

Como se muestra en la Figura 7B, se obtuvieron también hallazgos similares respecto a la proteína endógena: el análisis de la producción de las citoquinas Th1/Th2 en los linfocitos Th1/Th2 diferenciados procedentes de ratones Anx-A1^{+/+} o Anx-A1^{-/-} proporcionó mayores niveles de IL-2 y IFN- γ en ratones de tipo natural en comparación con los ratones inactivados, con perfiles opuestos para la producción de IL-4 e IL-13.

Ejemplo 6 - Anx-A1 y artritis reumatoide

Para demostrar que hrAnx-A1 aumentó la activación de los linfocitos T *in vivo*, los autores de la presente invención utilizaron un modelo de ratón con enfermedad autoinmunitaria crónica, el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones DBA. Se inyectaron a los ratones hrAnx-A1 diariamente durante 12 días después de inmunización con colágeno (tiempo durante el cual los linfocitos vírgenes se diferenciaban en linfocitos Th efectores) y a continuación se analizó el progreso de la enfermedad por inoculación del antígeno. La Figura 8 muestra el volumen de la pata (Figura 8A) y la puntuación clínica (Figura 8B) de los ratones tratados con PBS (100 µL) o hrAnx-A1 (1 µg s.c. dos veces al día). La sincronización del comienzo de la enfermedad se obtuvo por refuerzo con colágeno el día 21 y los signos clínicos fueron evidentes a partir del día 22 (día 1 del comienzo de las enfermedades). Los valores son la media ± S.E.M de n = 6-8 ratones. Los grupos se compararon usando el ensayo de Mann-Whitney. *P<0,01.

Como se puede ver en las Figuras 8A y 8B, el tratamiento de ratones con hrAnx-A1 agravó los signos y síntomas de la artritis en comparación con los ratones tratados con el vehículo PBS, confirmando que los altos niveles de Anx-A1 influyen sobre la activación y diferenciación de los linfocitos T y que estos efectos influyen sobre el desarrollo de la enfermedad en un modelo de ratón de RA.

Para investigar la relevancia clínica de estos estudios se analizó la expresión de Anx-A1 en linfocitos T periféricos CD4+ y células CD3+ sinoviales de pacientes con RA. La Figura 8C muestra los resultados. Los valores de la mediana se indican por líneas horizontales y se muestran los valores de p del ensayo de Mann-Whitney. *P<0,01. Como se muestra en la Figura 8C, las células CD4+ de la artritis reumatoide expresan altos niveles del mRNA de Anx-A1 y su proteína (datos no mostrados) en comparación con células de voluntarios sanos de control (HC).

También se realizó una inmunohistoquímica de fluorescencia usando antisuero secundario marcado con fluorescencia verde y roja, como se muestra en cada panel de la Figura 8D. Este análisis inmunohistoquímico de la expresión de Anx-A1 en el tejido sinovial de pacientes con RA reveló un alto grado de co-localización con células CDR3+. Por lo tanto, teniendo en cuenta que las células CD4 de pacientes con RA expresan mayores niveles de Anx-A1, se puede llegar a la conclusión de que la expresión desregulada de esta proteína podría contribuir al desarrollo de esta enfermedad.

Ejemplo 7 - Efectos de la hrAnx-A1 de longitud completa y el péptido N-terminal Ac.2-26 sobre la activación de los linfocitos T.

Se investigaron los efectos de un péptido N-terminal de hrAnx-A1 (péptido Ac.2-26) y de hrAnx-A1 de longitud completa sobre la activación de linfocitos T. Se estimuló la producción de IL-2 a partir de linfocitos T de ganglios linfáticos vírgenes de múridos con 0,6, 1,25 o 2,5 [µg/mL] de anti-CD3/CD28 en presencia o ausencia de hrAnx-A1 de longitud completa (300 nM) o el péptido N-terminal derivado de Anx-A1, Ac.2-26 (100 µM) durante 24 horas.

Se encontró que el péptido N-terminal, Ac.2-26, retiene la mayor parte de la actividad biológica de la proteína de longitud completa, es decir, aumentó la producción de IL-2 (Figura 9) y la proliferación de linfocitos T (datos no mostrados).

Ejemplo de referencia 8 - Anx-A1 y aterosclerosis

Para investigar si Anx-A1 se expresa en placas ateroscleróticas humanas, se tiñeron cortes de placas ateroscleróticas carotídeas extraídas de pacientes durante la cirugía endarterectomía carotídea con un anticuerpo anti-Anx-A1 humano monoclonal de ratón (mAb1B). La producción de este anticuerpo está descrita en Pepinsky *et al.*, *FEBS Letters* 261: 247-252, 1990. En resumen, ratones BALB/c fueron inmunizados con una inyección intraperitoneal de anexina-1 (denominada lipocortina-1 en Pepinsky *et al.*) en adyuvante de Freund completo. A los animales se les puso una inyección de recuerdo los días 14 y 28 de anexina-1 en adyuvante de Freund incompleto. Después de 6 semanas, se tomaron muestras de sangre para ensayo y se cribaron en busca de anticuerpos que bloquearan la actividad de la anexina-1. Las células del bazo de ratones cuyos antisueros presentaban una actividad anti-anexina se fusionaron con células SP3 x Ag8 para la producción de hibridomas. Se analizaron los líquidos sobrenadantes del cultivo de hibridomas para determinar anticuerpos que pudieran precipitar la anexina-1 radiomarcada y se subclonaron los hibridomas productores de anticuerpos que precipitaron más del 50% de los recuentos de entrada por dilución limitante. Las líneas más prometedoras se cultivaron como líquido ascítico en ratones cebados con prístano y los anticuerpos monoclonales se purificaron por afinidad sobre proteína A-sefariosa, utilizando los sistemas de tampones de elución y unión de Pierce.

Como se muestra en la Figura 10, se pudo observar una tinción compacta y clara para Anx-A1 dentro de la placa confirmando que el infiltrado inflamatorio dentro de estos tejidos expresa altos niveles de Anx-A1.

También se realizó un análisis similar en ratones ApoE^{-/-}. La localización de Anx-A1 en el seno aórtico y en la arteria branquiocefálica (BCA) de ratones ApoE^{-/-} de 10 meses se realizó por microscopía confocal para determinar la expresión y distribución espacial de Anx-A1. El tejido arterial no aterosclerótico carecía de Anx-A1 inmunorreactiva (datos no mostrados). En contraste, la placa aterosclerótica tanto del seno aórtico como de BCA se tiñeron fuertemente para Anx-A1 (Figura 11).

Se detectó una inmunoreactividad clara para Anx-A1 en la proximidad de la capa fibrosa tanto en el seno aórtico (Figura 11A) como en BCA (Figura 11B) y en la proximidad del núcleo necrótico de la placa en el seno aórtico (Figura 11B). Estos resultados demuestran que Anx-A1 se expresa tanto en las placas ateroscleróticas humanas como de murinos y sugieren que su expresión podría influir potencialmente sobre la estabilidad de la placa.

5 Ejemplo 9 - Anx-A1 y lupus eritematoso sistémico (SLE)

Estudios clínicos sobre las funciones biológicas de anexina-1 han asociado la presencia de auto-anticuerpos contra esta proteína con el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias incluyendo el lupus eritematoso sistémico (SLE), la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal. A la luz de estos hallazgos los autores de la invención han planteado la hipótesis de que la generación de estos autoanticuerpos podría ser debida a una expresión incontrolada de anexina-1 en estos pacientes. Para verificar esta hipótesis, se analizó el nivel de expresión de anexina-1 en linfocitos T recogidos de voluntarios sanos y pacientes con SLE. El mRNA de anexina-1 y su proteína se expresaron a un nivel mucho más marcado en los linfocitos T de pacientes con lupus eritematoso sistémico (Figura 12). Por lo tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el aumento de la expresión de anexina-1 en los linfocitos T de pacientes con lupus eritematoso sistémico y por lo tanto en los linfocitos T de pacientes con otras patologías autoinmunitarias, podía ser responsable del aumento de niveles de las citoquinas Th1 descritas en estas patologías, representando con ello un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias.

Ejemplo 10 - Inhibición de la activación de linfocitos T por anticuerpos anti-Anx-A1

Se incubaron linfocitos T de sangre periférica humana purificada con una mezcla de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (5 µg/mL) para activar el receptor del linfocito T (TCR): esto ocurrió como se demuestra en la Figura 13 por la notable producción de interleuquina 2 (IL-2), una citoquina central en la activación y diferenciación de linfocitos T.

A continuación se incubaron células con diferentes concentraciones (1,0, 0,1, 0,01 y 0,001 microgramos/mL) de un anticuerpo monoclonal de ratón neutralizante producido contra anexina-1 recombinante humana (mAb1A). La producción de este anticuerpo está descrita en Pepinsky *et al.*, *FEBS Letters* 261: 247-252, 1990, y en el Ejemplo 8.

El tratamiento con mAb1A produjo una inhibición dependiente de la concentración de la producción de IL-2 (Figura 13) y de la proliferación celular (datos no presentados). Se utilizó IgG como control a concentraciones de 1,0, 0,1, 0,01 y 0,001 microgramos/mL y no fue eficaz a ninguna concentración. Los resultados mostraron que el bloqueo de los efectos de la anexina-1 parecía ser más eficaz a menores concentraciones del anticuerpo monoclonal específico mAb1A.

En todos los casos, los datos son la media ± S.E.M de las mediciones por triplicado. *P<0,01.

A continuación se incubaron linfocitos T de sangre periférica humana purificada de un donante diferente con una mezcla de anticuerpos anti-CD28 y anti-CD3 a una concentración diferente (1 µg/mL) para activar el receptor de linfocitos T (TCR). De nuevo, se produjo esta activación como se demuestra en la Figura 14 por la producción de interleuquina-2 (IL-2), pero a un nivel menor debido a la menor concentración de anticuerpos anti-CD28 y anti-CD3 utilizada.

De nuevo, las células se incubaron a continuación con diferentes concentraciones (1,0, 0,1, 0,01 y 0,001 microgramos/mL) del anticuerpo monoclonal de ratón neutralizante producido contra la anexina-1 recombinante humana (mAb1A). El tratamiento con mAb1A produjo una inhibición dependiente de la concentración de la producción de IL-2 (Figura 14). Se utilizó IgG como control a una concentración de 1,0 microgramos/mL y no fue eficaz. Otra vez, los resultados mostraron que el bloqueo de los efectos de anexina-1 parecía ser más eficaz a menores concentraciones del anticuerpo monoclonal específico mAb1A, excepto con una concentración de 1,0 microgramos/mL de mAb1A.

En todos los casos, los datos son la media ± S.E.M de las mediciones por triplicado, *P<0,01.

Estos experimentos demuestran que la anexina-1 endógena promueve la activación de los linfocitos T en presencia de un estímulo específico. Además, el bloqueo de la vía de la anexina-1 atenúa la activación de los linfocitos T hasta un 50%. El hecho de que la inhibición alcance un máximo de alrededor del 50% sugiere que la inmunidad "normal y constitutiva" no se veía afectada por el tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos T usando una molécula que se une específicamente a Anx-A1, como se reivindica.

Ejemplo 11 - Anx-A1 y esclerosis múltiple (MS)

Materiales y métodos

Reactivos

El péptido glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG)₃₃₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) fue sintetizado y purificado por Cambridge Research Biochemicals (Billingham, Reino Unido). El adyuvante de Freund completo que contenía *Mycobacterium tuberculosis* H37a fue adquirido a Difco mientras que la toxina de *Bordetella pertussis* fue comprada a Sigma-Aldrich Co (Poole, Reino Unido). A menos que se especifique lo contrario, todos los demás reactivos eran de Sigma-Aldrich Co.

Ratones

Los ratones nulos en Anx-A1 machos fueron como los descritos anteriormente (Hannon *et al.*, *FASEB J.*, 17: 253-255, 2003; Roviezzo *et al.*, *J. Physiol. Pharmacol.* 53: 541-553, 2002) (de 9-11 semanas) y se retrocruzaron en un antecedente C57BL/6 durante más de 10 generaciones y se criaron en instalaciones para el cuidado de animales de B&K (Hull, Reino Unido). Se utilizaron ratones C57BL/6 de igual edad y género como controles para todos los experimentos. Los animales se mantuvieron en condiciones estándares en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h a 22 ± 1°C, de acuerdo con las regulaciones de la United Kingdom Home Office (Animal Act 1986) y las directivas de la Unión Europea.

Inducción de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE)

Se inmunizaron ratones por vía subcutánea el día 0 con 300 µL de emulsión que consistía en 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ en PBS combinada con un volumen igual de CFA que contenía 300 µg de *M. tuberculosis* H37Ra muertos por calor. La emulsión se inyectó en ambos costados y fue seguida por una inyección intraperitoneal de la toxina de *B. pertussis* (500 ng/100 µL) en 100... de solución salina los días 0 y 2. Los ratones se observaron diariamente para detectar signos de EAE y pérdida de peso. La gravedad de la enfermedad se puntuó en una escala de 6 puntos: 0 = sin enfermedad; 1 = cola flácida parcial; 2 = cola flácida completa; 3 = hipotonía de las extremidades posteriores; 4 = parálisis parcial de las extremidades posteriores; 5 = parálisis completa de las extremidades posteriores; 6 = animal moribundo o muerto.

Ensayo de proliferación celular

Linfocitos de ganglios linfáticos (10⁵ linfocitos/200 µL) obtenidos de ratones inmunizados con MOG₃₃₋₅₅ durante 14 días fueron estimulados con MOG₃₃₋₅₅ (50-100 µg/200 µL) durante 48 horas en placas de 96 pocillos. Durante las últimas 12 horas, los cultivos se pulsaron con 1 µCi de [³H]-timidina (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) y se midió la radiactividad incorporada por un contador de centelleo automatizado (Packard Instrument Company, Inc., Illinois, Estados Unidos).

ELISA de citoquinas

Linfocitos de ganglios linfáticos (10⁶ linfocitos/mL) obtenidos de ratones inmunizados con MOG₃₃₋₅₅ durante 14 días fueron estimuladas con MOG₃₃₋₅₅ (100 µg/mL) durante 4 días. Se recogieron los líquidos sobrenadantes celulares y se analizaron para determinar el contenido de IFN-γ, IL-2, IL-17A y TNF-α usando kits de ELISA (eBioscience, Dorset, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de células inflamatorias de la médula espinal

Se sacrificaron los ratones usando CO₂. Las médulas espinales fueron expulsadas de la columna vertebral con PBS por presión hidrostática usando una jeringa unida a una aguja de calibre 21. Se cortaron los tejidos en trozos pequeños y se pasaron por un filtro de células (70 nm; BD Falcon) usando el émbolo de una jeringa estéril de 1 mL. Se centrifugó la única suspensión celular durante 10 minutos a 390xg, se volvió a poner en suspensión en 20 mL de PBS que contenía 30% de Percoll (Sigma) y se superpuso sobre 10 mL de PBS que contenía 70% de Percoll. Después de centrifugación a 390xg durante 20 minutos, se separaron las células mononucleares de la interfase, se lavaron y se volvieron a poner en suspensión en tampón FACS (PBS que contiene 1% de FCS y 0,02% de NaN₂) para su análisis posterior.

Citometría de flujo

Se volvieron a poner en suspensión muestras celulares de tejidos de médula espinal purificados con Percoll o de ganglios linfáticos purificados con Ficoll en tampón FACS que contenía anticuerpo bloqueante de FcγIIIR de CD16/CD32 (clon 93; eBioscience) durante 30 minutos a 4°C. A continuación, las suspensiones celulares se marcaron con el anti-CD3 conjugado con FITC (1:100; clon 145 2C11) o anti-F4/80 (1:100; clon BMT) mientras que se teñían los linfocitos de ganglios linfáticos con anti-CD4-FITC (1:500; clon L3T4) y anti-CD8 (1:1000; clon Ly-2) durante 30 minutos a 4°C, antes del análisis por FACS Calibur utilizando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson). Se analizaron al menos 10⁴ linfocitos por muestra y se realizó la determinación de las poblaciones positivas y negativas basándose en la tinción alcanzada con los isotipos irrelevantes de IgG.

Histología

Se diseccionaron tejidos de la médula espinal y se fijaron en 4% de formalina tamponada neutra durante 48 horas y después se incubaron con solución descalcificante que contenía EDTA (0,1 mM en PBS) durante 14 días antes de la incrustación en parafina. Se realizó la evaluación histológica en cortes incrustados en parafina tomados como muestra en diversos momentos dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Se desparafinaron los cortes de la médula espinal (5 µm) con xileno y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar la inflamación. Se realizó la tinción para Anx-A1 en cortes congelados usando los anticuerpos anti-Anx-A1 (dilución 1:500; Zymed, Invitrogen) y anti-Ig de conejo conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (HRP) (dilución 1: 500; Dako). Se realizó una doble tinción para Anx-A1 y CD3 o F4/80 como se ha descrito anteriormente utilizando anti-CD3 conjugado con FITC

(1:100; clon 145 2C11) o anti-F4/80 (1:100; clon BMT). Los cortes también se contratiñeron con hematoxilina. En todos los casos, se evaluó un mínimo de ≥ 3 cortes por animal. Se tomaron imágenes digitales por contraste de fase usando el paquete de programas informáticos para análisis de imágenes Image Pro.

Análisis estadístico

5 Se utilizó el programa informático Prism (programa informático GraphPad) para realizar todos los ensayos. Las evaluaciones estadísticas de la frecuencia, proliferación y producción de citoquinas de las células se realizaron usando las pruebas t de Student desapareadas de dos colas. Se aplicó ANOVA para analizar la clasificación clínica de EAE. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Valores de P inferiores a 0,05 se consideraron significativos. Los datos se presentan como media \pm S.E.M de n muestras por grupo.

10 **Resultados**

La expresión de Anx-A1 está correlacionada con la gravedad de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE)

15 La correlación entre los niveles de Anx-A1 en el contenido de la médula espinal y el alcance de la infiltración de células mononucleares en el sistema nervioso central (SNC) se determinó en un modelo de ratón con MS inducida por inmunización con MOG₃₅₋₅₅, EAE. La EAE inducida por MOG₃₅₋₅₅ es un modelo para la desmielinización autoinmunitaria del sistema nervioso central y se ha usado ampliamente para investigar los mecanismos patogénicos responsables del desarrollo de la MS. Para este objetivo se recogieron médulas espinales y cerebros de ratones de tipo natural inmunizados con el péptido MOG₃₅₋₅₅ en diferentes etapas de las enfermedades, es decir, el día 12 (puntuación 0), el día 18 (puntuación 2) y el día 20 (puntuación 4) y se realizó la inmunohistoquímica para Anx-A1 junto con tinción con hematoxilina y eosina.

20 Como se muestra en la Figura 15, los tejidos de la médula espinal recogidos durante la fase de inducción de los ratones sin signos de enfermedad mostraron una tinción débil para Anx-A1 (puntuación 0, Fig.15A y B, respectivamente). Sin embargo, con la aparición de signos clínicos y el aspecto de los infiltrados inflamatorios en el sistema nervioso central (SNC), se observaron parches discretos de de inmunotinción de Anx-A1 todo alrededor de las meninges (puntuación 2, Fig.15A y B, respectivamente). A medida que la enfermedad progresaba, se observó un aumento en el número de parches de infiltrados celulares positivos a Anx-A1 (puntuación 4, Fig.15A y B, respectivamente), lo que sugiere que la infiltración de células inflamatorias que expresan altos niveles de Anx-A1 está correlacionada con la gravedad de la enfermedad.

25 Para identificar las fuentes celulares de la inmunorreactividad de Anx-A1 en la médula espinal se realizó la tinción por inmunofluorescencia doble de los cortes con anti-Anx-A1 y anti-CD3 (marcador de linfocitos T) o anti-F4/80 (marcador de macrófagos). Se detectó un gran número de linfocitos T y macrófagos infiltrados en los cortes de la médula espinal de ratones en el pico de EAE (Fig.16A y B, paneles centrales, respectivamente). Sin embargo, la tinción de Anx-A1 en los mismos cortes mostró una co-localización parcial tanto con linfocitos T como con macrófagos sin preferencia particular por uno u otro tipo de células (Fig.16A y B, paneles de la derecha, respectivamente).

35 **Los ratones Anx-A1^{-/-} desarrollan una EAE debilitada**

Puesto que la expresión de Anx-A1 estaba sobre-regulada en el pico de la EAE, se investigó el papel de esta proteína en el desarrollo de la EAE. Los ratones Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} se inmunizaron s.c. con el péptido MOG₃₅₋₅₅ en CFA el día 0, y luego se inyectaron i.v. con la toxina de *B. pertussis* tanto el día 0 como el día 2. Tanto los ratones Anx-A1^{+/+} como Anx-A1^{-/-} empezaron a desarrollar EAE desde el día 12 después de la inmunización, alcanzando el pico de la enfermedad alrededor del día 20. Sin embargo, los ratones Anx-A1^{-/-} habían reducido los niveles de enfermedad en comparación con los ratones Anx-A1^{+/+} (Figura 17A). Curiosamente, esto era evidente y significativo sólo en la etapa posterior de la enfermedad, es decir, desde el día 18 al 23 y en adelante.

40 Los estudios en modelos animales de EAE han demostrado que la fase aguda de la enfermedad coincide con la pérdida de peso, debido probablemente a anorexia y deficiente absorción de fluidos. La medición del peso de los ratones inmunizados estaba correlacionada con la gravedad de la puntuación clínica y mostró una pérdida de peso reducida - desde el día 18 en adelante - en los ratones Anx-A1^{-/-} en comparación con los controles Anx-A1^{+/+} (Figura 17B). Además la comparación del desarrollo de la EAE en ratones Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} mostró una disminución tanto en la tasa de mortalidad como en la puntuación máxima de la enfermedad, sin diferencias en la tasa de incidencia o aparición de la enfermedad (Tabla 1).

50

Tabla 1: Parámetros clínicos de EAE inducida por MOG₃₅₋₅₅ en ratones Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} (valores medios ± SEM, n = 10/grupo)

Ratones	Incidencia [§]	Mortalidad	Día de iniciación (valor medio ± SEM)	Puntuación máxima (valor medio ± SEM)
Anx-A1 ^{+/+}	100% (10/10)	33,3% (3/10)	16,4 ± 2,3	5,7 ± 0,2
Anx-A1 ^{-/-}	100% (10/10)	0% (0/10)**	15,9 ± 1,3	4,3 ± 0,1**

**p<0,01, representativa de 3 experimentos, § puntuación clínica de la EAE igual o mayor que 1.

Respuesta de recuerdo *in vitro* a MOG₃₅₋₅₅ en ratones Anx-A1^{-/-}

5 Los linfocitos T desempeñan un papel clave en el desarrollo de la EAE y los linfocitos T Anx-A1^{-/-} tienen una capacidad deteriorada para responder a la estimulación por anti-CD3/CD28. A la luz de estos hallazgos, se investigó si la disminución del desarrollo de la EAE en ratones Anx-A1^{-/-} estaba asociada con una menor respuesta a la estimulación por antígenos. Los linfocitos de los ganglios linfáticos de ratones Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-}, recogidos 14 días después de la inmunización, se estimularon *in vitro* con MOG₃₅₋₅₅. Los linfocitos Anx-A1^{-/-} de ganglios linfáticos mostraron una disminución de la tasa de proliferación y produjeron niveles más bajos de IL-2 cuando se estimularon con MOG₃₅₋₅₅ en comparación con los ratones de tipo natural (Figura 18A y B, respectivamente). Se obtuvieron resultados similares con esplenocitos (datos no mostrados).

10 Estos resultados sobre la proliferación celular se reflejaron en el número de células recuperadas del bazo y del drenaje de los ganglios linfáticos de los ratones inmunizados. El recuento total de células mononucleares del bazo y de los ganglios linfáticos purificadas por Ficoll de los mismos animales, reveló una disminución significativa en ratones Anx-A1^{-/-} en comparación con los controles (Figura 19A y B, respectivamente), sin cambios mensurables en los porcentajes de células CD4 o CD8 positivas (Figura 19C y D, respectivamente).

Respuestas reducidas de citoquinas Th1 y Th17 específicas de MOG₃₅₋₅₅ en ratones Anx-A1^{-/-}

15 Los estudios que utilizan drenajes de linfocitos de ganglios linfáticos de ratones C57/BL6 inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ mostraron cambios significativos en la producción de las citoquinas Th1 y Th17. El análisis de la producción de citoquinas de linfocitos Anx-A1^{-/-} de ganglios linfáticos tras la re-exposición con MOG₃₅₋₅₅ durante 96 horas mostró una disminución en la producción por Th1 de las citoquinas IFN-γ, IL-2 y TNF-α en comparación con los linfocitos de tipo natural (Figura 20A-C). Del mismo modo, la medición del producto Th17, IL-17, mostró una disminución de los niveles de esta citoquina en ratones Anx-A1^{-/-} en comparación con el tipo natural (Figura 20D).

25 Infiltración de linfocitos T en el sistema nervioso de ratones Anx-A1^{-/-} durante la EAE

Los signos reducidos de EAE en ratones Anx-A1^{-/-} desde el día 18 en adelante, llevó a los inventores a investigar si podría haber una correlación neuro-patológica. Las médulas espinales de ratones Anx-A1^{+/+} y Anx-A1^{-/-} tratados, recogidas el día 18 o 22, fueron analizadas para detectar si había evidencia histológica de inflamación. Se encontró que se había reducido los números de infiltrados celulares inmunitarios detectados en ratones Anx-A1^{-/-} en comparación con animales Anx-A1^{+/+} (Figura 21A y B).

30 Los signos histológicos reducidos de la inflamación en ratones Anx-A1^{-/-} estaban asociados con un número reducido de células CD3 y F4/80 positivas que infiltran el sistema nervioso central (Figura 21C y D, respectivamente). Estos análisis cualitativos fueron confirmados por FACS midiendo los porcentajes de leucocitos CD3 y F4/80 positivos aislados desde el día 18 en tejidos de la médula espinal. Concordante con los resultados de la inmunohistoquímica, los ratones Anx-A1^{-/-} tenían aproximadamente 60 y 80% menos linfocitos T y macrófagos, respectivamente, en comparación con los ratones Anx-A1^{+/+} (Figura 22A y B, respectivamente).

35 Los resultados muestran que hay una notable acumulación de linfocitos que expresan la anexina-1 en la médula espinal de ratones en el pico de la enfermedad. Existe por lo tanto una correlación entre la expresión de anexina-1 y el desarrollo de EAE.

40 Además, los resultados muestran que los ratones deficientes en anexina-1 desarrollan una EAE menos grave. Por lo tanto, la supresión de la expresión de anexina-1 limita el desarrollo de la EAE, en un modelo de ratón para la MS.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-anexina-1 (Anx-A1), o uno de sus fragmentos que se une a Anx-A1, para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.
- 5 2. El anticuerpo anti-Anx-A1, o uno de sus fragmentos, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-Anx-A1 es un anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos.
3. El anticuerpo anti-Anx-A1, o uno de sus fragmentos, de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo monoclonal está humanizado.
4. El anticuerpo anti-Anx-A1, o uno de sus fragmentos, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fragmento es un fragmento Fab, F(ab')₂ o Fv o una molécula monocatenaria Fv (scFv).
- 10 5. El anticuerpo anti-Anx-A1, o uno de sus fragmentos, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, esclerodermia, polimiositis, diabetes mellitus, uveorretinitis autoinmunitaria, colitis ulcerosa, pénfigo vulgar, enfermedad inflamatoria intestinal, tiroiditis autoinmunitaria y psoriasis.
- 15 6. El anticuerpo anti-Anx-A1, o uno de sus fragmentos, de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS) y lupus eritematoso sistémico (SLE).
7. Uso de un anticuerpo anti-Anx-A, o uno de sus fragmentos que se une a Anx-A1, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.
- 20 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, esclerodermia, polimiositis, diabetes mellitus, uveorretinitis autoinmunitaria, colitis ulcerosa, pénfigo vulgar, enfermedad inflamatoria intestinal, tiroiditis autoinmunitaria y psoriasis.
- 25 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS) y lupus eritematoso sistémico (SLE).

FIGURA 1A

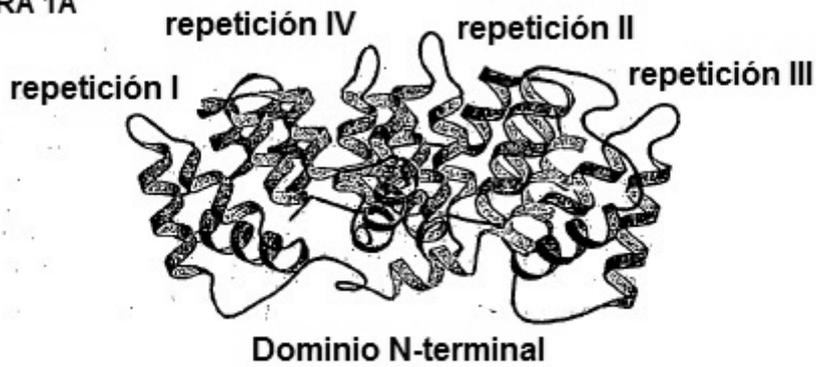


FIGURA 1B



FIGURA 1C



FIGURA 2A

(i)

```

1   MAMVSEFLKQ AWFIENEEQE YVQTVKSSKG GPGSAVSPYP
41  TFPNSSDVAA LHKAIMVKGV DEATIIDILT KRNNQRQOI
81  KAAYLQETGK PLDETLKKAL TGHLEEVVLA LLKTPAQFDA
121 DELRAAMKGL GTDEDTLIEI LASRTNKEIR DINRVYREEL
161 KRDLAKDITS DTSGDFRNAL LSLAKGDRSE DFGVNEDLAD
201 SDARALYEAG ERRKGTDVNV FNTILTTRSY PQLRRVFQKY
241 TKYSKDHDMNK VLDLELKGDI EKCLTAIVKC ATSKPAFFAE
281 KLHQAMKGVG TRHKALIRIM VSRSEIDMND IKAFYQKMYG
321 ISLCQAILDE TKGDYEKILV ALCGGN

```

(ii)

```

1   ATGGCAATGG TATCAGAATT CCTCAAGCAG GCCTGGTTTA
41  TTGAAAATGA AGAGCAGGAA TATGTTCAAA CTGTGAAGTC
81  ATCCAAAGGT GGTCCCGGAT CAGCGGTGAG CCCCTATCCT
121 ACCTTCAATC CATCCTCGGA TGTCGCTGCC TTGCATAAGG
161 CCATAATGGT TAAAGGTGTG GATGAAGCAA CCATCATTGA
201 CATTCTAACT AAGCGAAACA ATGCACAGCG TCAACAGATC
241 AAAGCAGCAT ATCTCCAGGA AACAGGAAAG CCCCTGGATG
281 AAACACTGAA GAAAGCCCTT ACAGGTCACC TTGAGGAGGT
321 TGTTTTGGCT CTGCTAAAAA CTCCAGCGCA ATTTGATGCT
361 GATGAACTTC GTGCTGCCAT GAAGGGCCTT GGAAGTATG
401 AAGATACTCT AATTGAGATT TTGGCATCAA GAACTAACAA
441 AGAAATCAGA GACATTAACA GGGTCTACAG AGAGGAACTG
481 AAGAGAGATC TGGCCAAAGA CATAACCTCA GACACATCTG
521 GAGATTTTCG GAACGCTTTG CTTTCTCTTG CTAAGGGTGA
561 CCGATCTGAG GACTTTGGTG TGAATGAAGA CTTGGCTGAT
601 TCAGATGCCA GGGCCTTGTA TGAAGCAGGA GAAAGGAGAA
641 AGGGGACAGA CGTAAACGTG TTCAATACCA TCCTTACCAC
681 CAGAAGCTAT CCACAACCTC GCAGAGTGTT TCAGAAATAC
721 ACCAAGTACA GTAAGCATGA CATGAACAAA GTTCTGGACC
761 TGGAGTTGAA AGGTGACATT GAGAAATGCC TCACAGCTAT
801 CGTGAAGTGC GCCACAAGCA AACCAGCTTT CTTTGCAGAG
841 AAGCTTCATC AAGCCATGAA AGGTGTTGGA ACTCGCCATA
881 AGGCATTGAT CAGGATTATG GTTTCCCGTT CTGAAATTGA
921 CATGAATGAT ATCAAAGCAT TCTATCAGAA GATGTATGGT
961 ATCTCCCTTT GCCAAGCCAT CCTGGATGAA ACCAAAGGAG
1001 ATTATGAGAA AATCCTGGTG GCTCTTTGTG GAGGAAACTA
1041 A

```

FIGURA 2b

```

1   MAMVSEFLKQ AWFIEEEEQE YVQTVKSSKG GPGSAVSPYP
41  TFPNSSDVAA LHKAIMVKGV DEATIIDILT KRNNQRQQI
81  KAAYLQETGK PLDETLKKAL TGHLEEVVLA LLKTPAQFDA
121 DELRAAMKGL GTDEDLIEI LASRTNKEIR DINRVYREEL
161 KRDLAKDITS DTSGDFRNAL LSLAKGDRSE DFGVNEDLAD
201 SDARALYEAG ERRKGTDVNV FNTILTTRSY PQLRRVFQKY
241 TKYSKHDMMNK VLDLELKGDI EKCLTAIVKC ATSKPAFFAE
281 KLHQAMKGVG TRHKALIRIM VSRSEIDMND IKAFYQKMYG
321 ISLCQAILDE TKGDYEKILV ALCGGN

```

FIGURA 2c

```

1   MNLILRYTFS KMAMVSEFLK QAWFIEEEEQ EYVQTVKSSK
41  GGPGSAVSPY PTFNSSDVA ALHKAIMVKG VDEATIIDIL
81  TKRNNQRQQ IKAAYLQETG KPLDETLKKA LTGHLEEVVL
121 ALLKTPAQFD ADELRAAMKG LGTDEDLIE ILASRTNKEI
161 RDINRVYREE LKRDLAKDIT SDTSGDFRNA LLSLAKGDRS
201 EDGF

```

FIGURA 2d

```

1   MAMVSEFLKQ AWFIEEEEQE YVQTVKSSKG GPGSAVSPYP
41  TFPNSSDVAA LHKAIMVKGV DEATIIDILT KRNNQRQQI
81  KAAYLQETGK PLDETLKKAL TGHLEEVVLA LLKTP

```

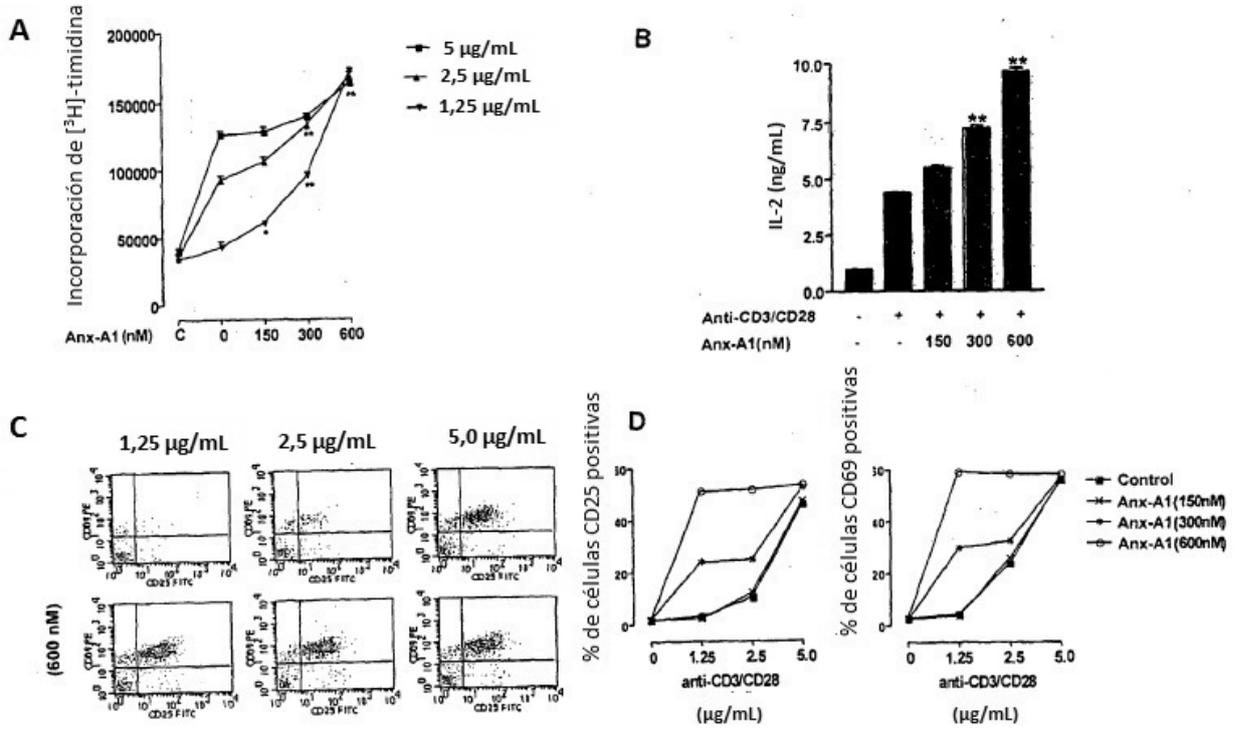


FIGURA 3

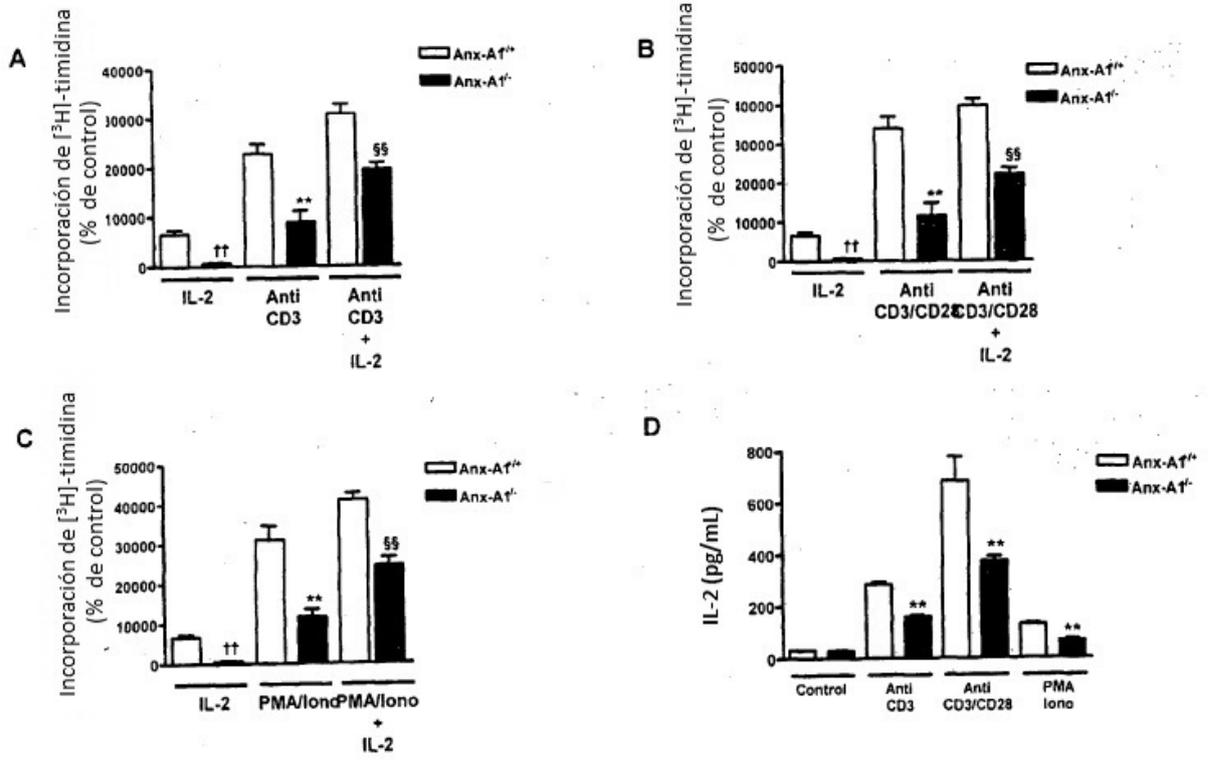


FIGURA 4

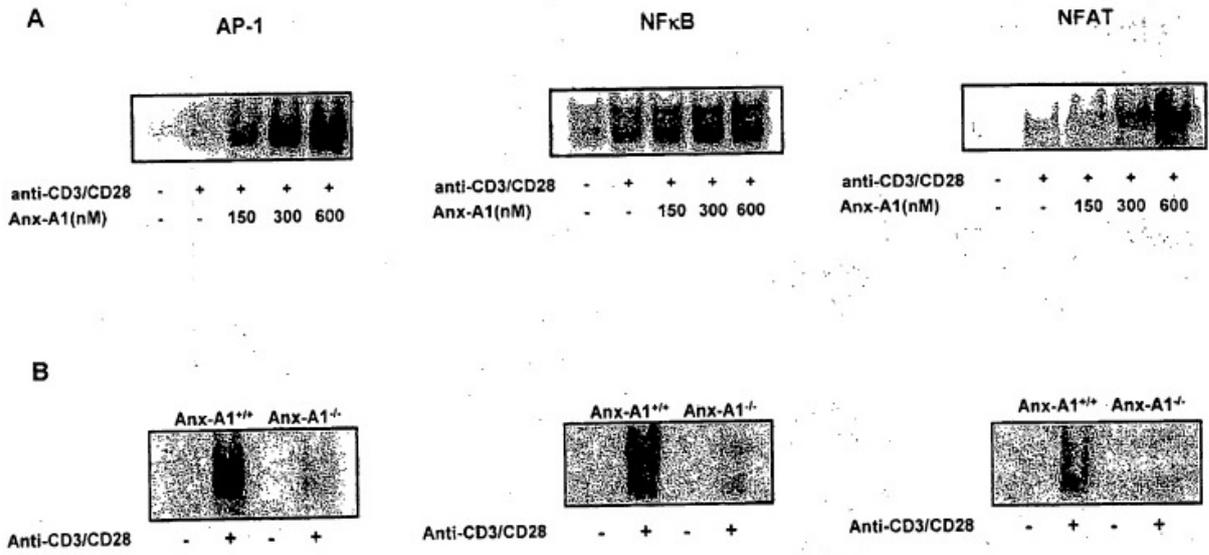


FIGURA 5

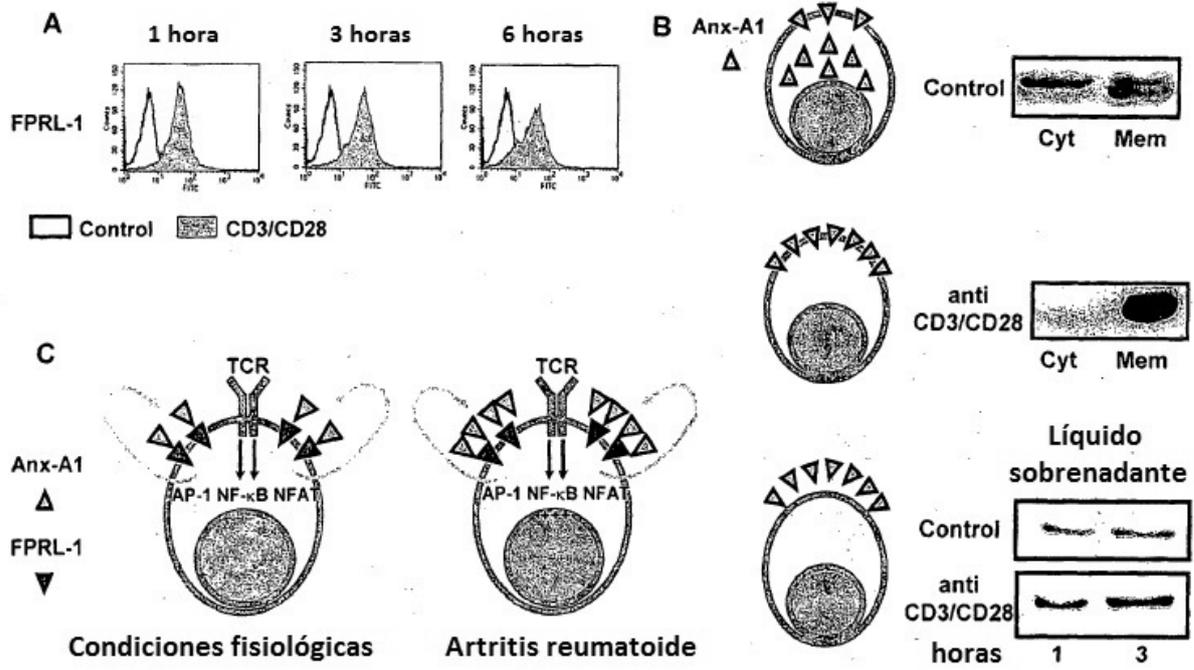


FIGURA 6

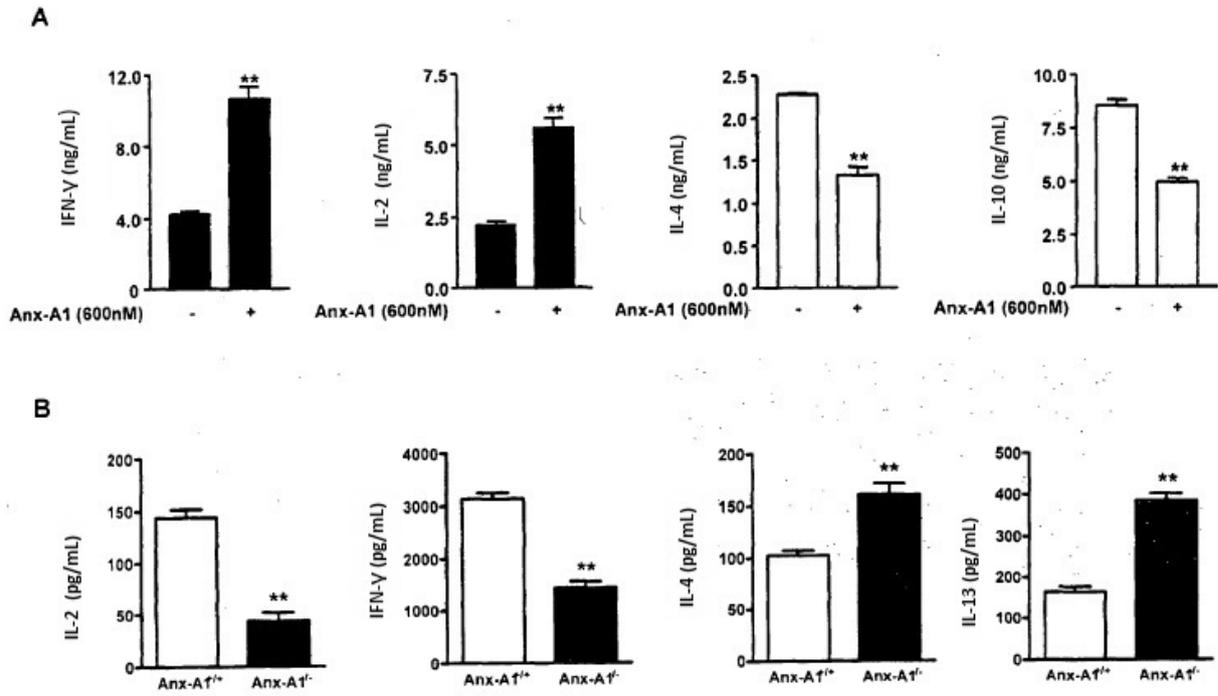
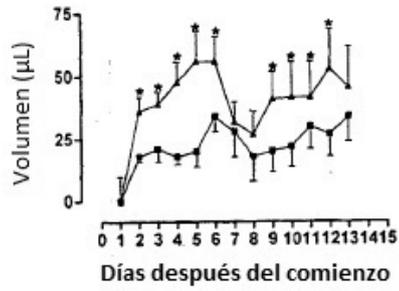


FIGURA 7

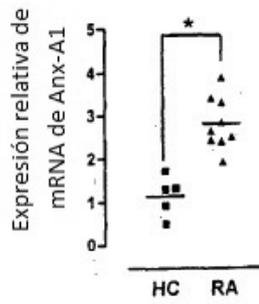
A



B



C



D

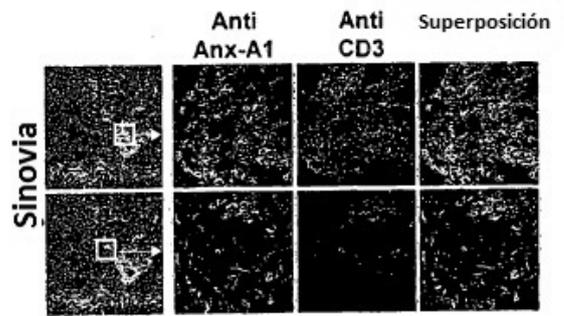


FIGURA 8

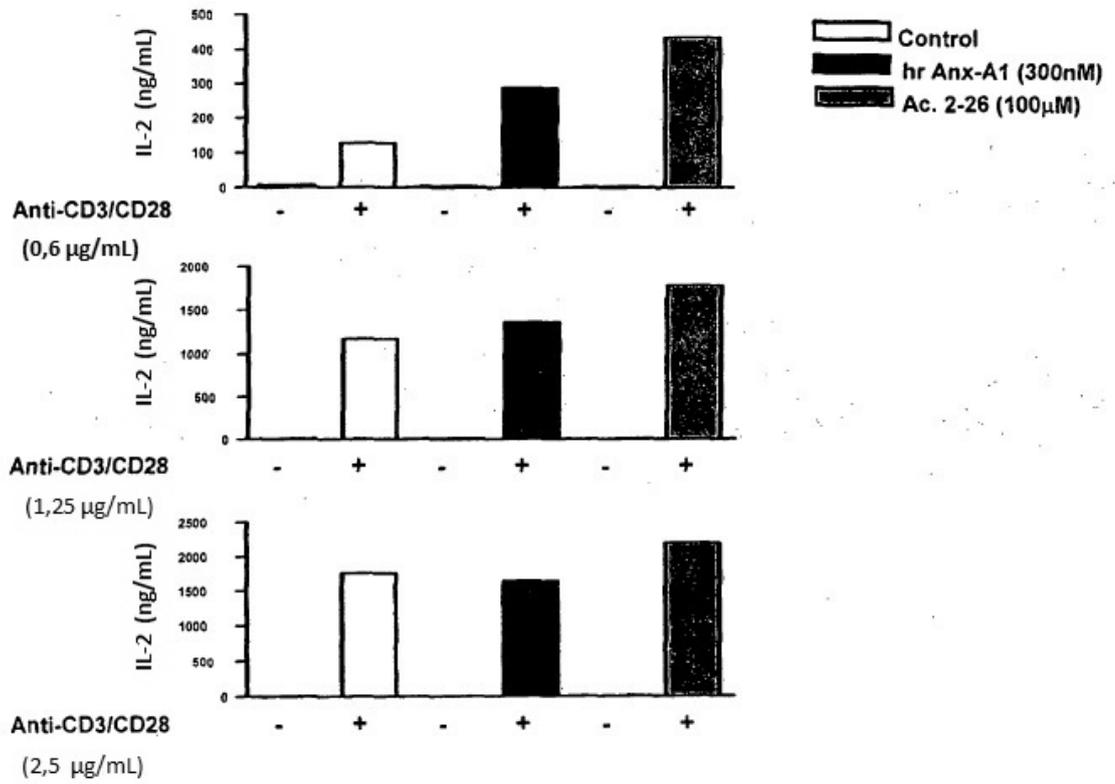
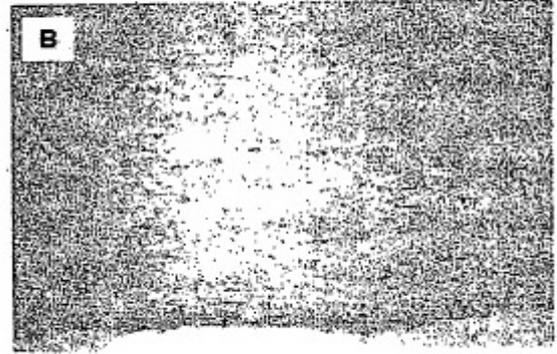
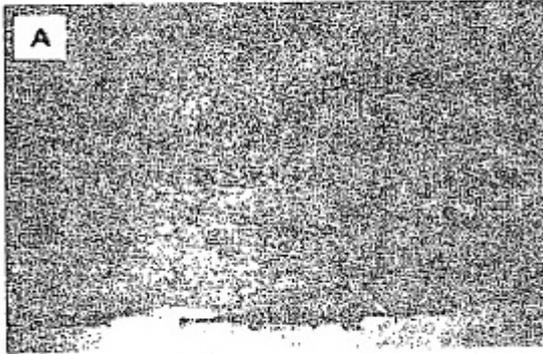


FIGURA 9

FIGURA 10



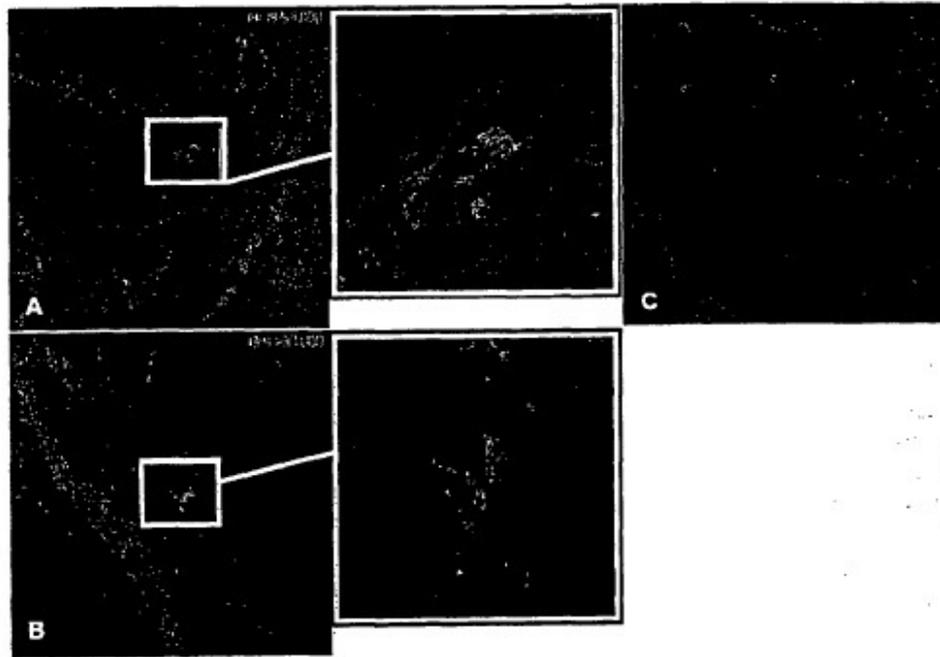


FIGURA 11

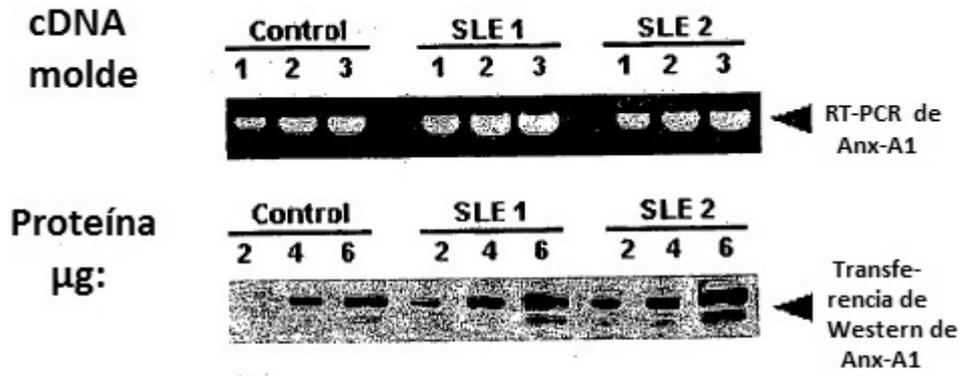


FIGURA 12

**Linfocitos T periféricos humanos
(Donante 1)**

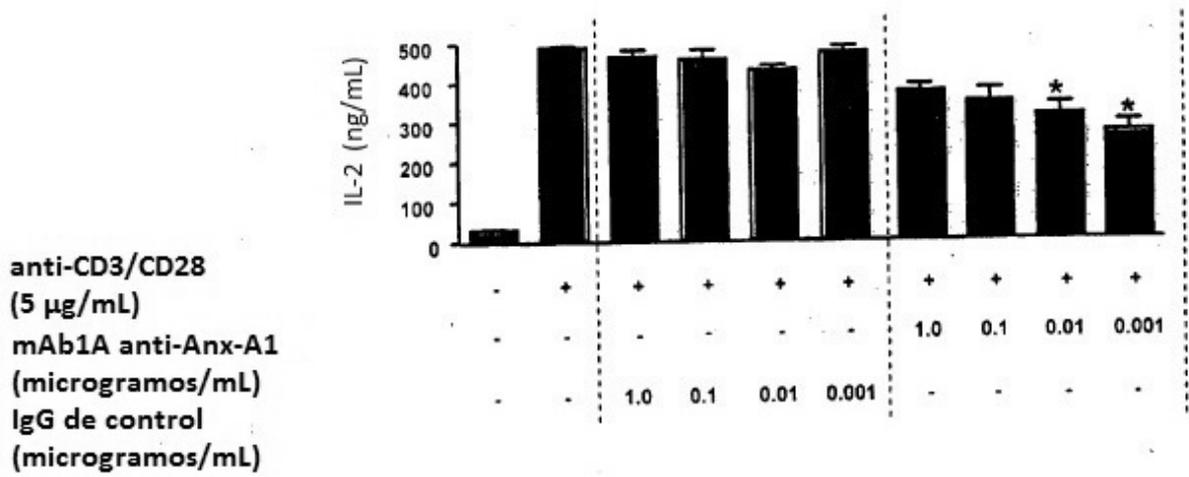


FIGURA 13

**Linfocitos T periféricos humanos
(Donante 2)**

anti-CD3/CD28
(1 µg/mL)
mAb1A anti-Anx-A1
(microorganismos/mL)
IgG de control
(microorganismos/mL)

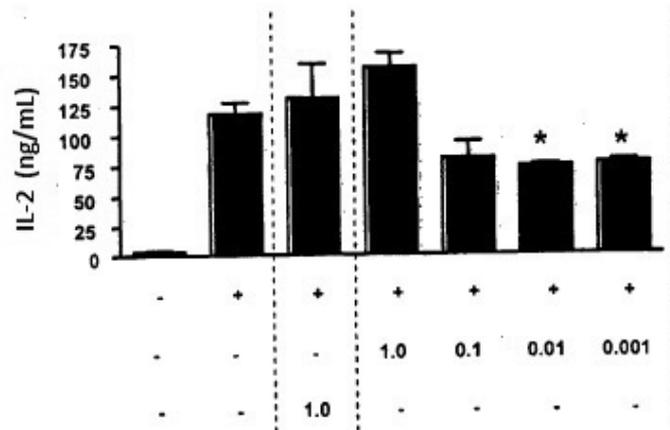


FIGURA 14

FIGURA 15

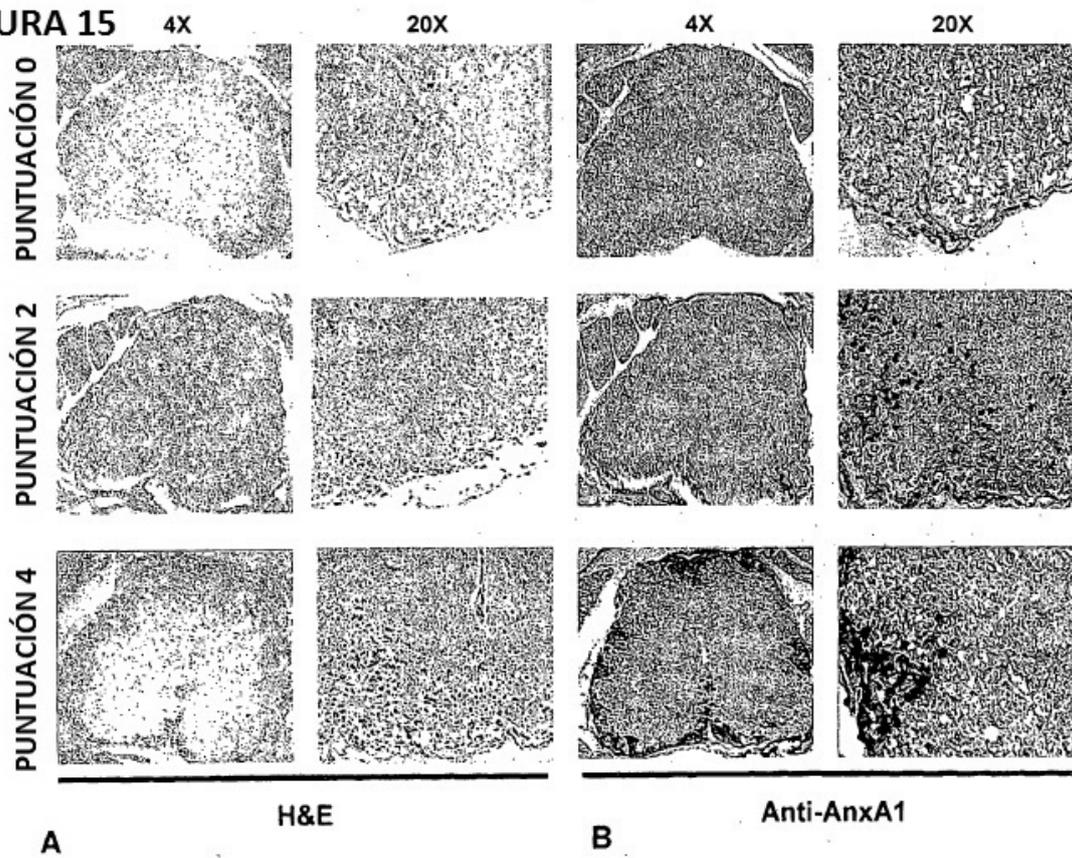


FIGURA 16

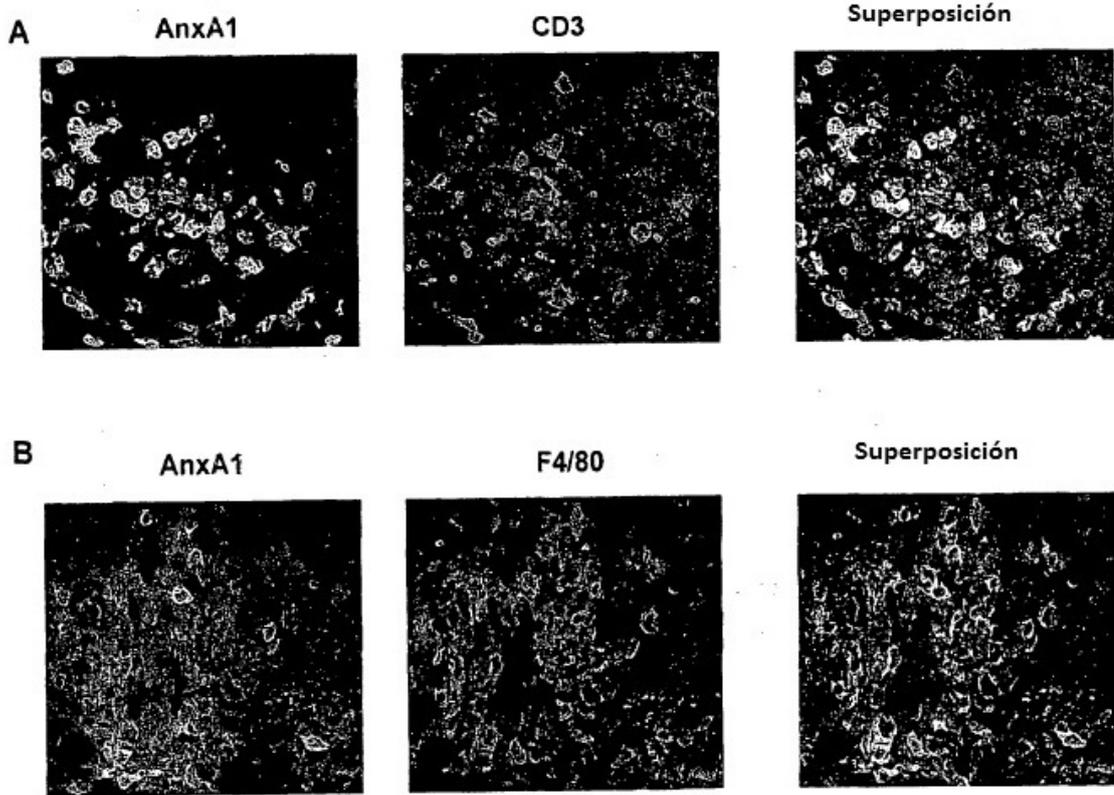


FIGURA 17

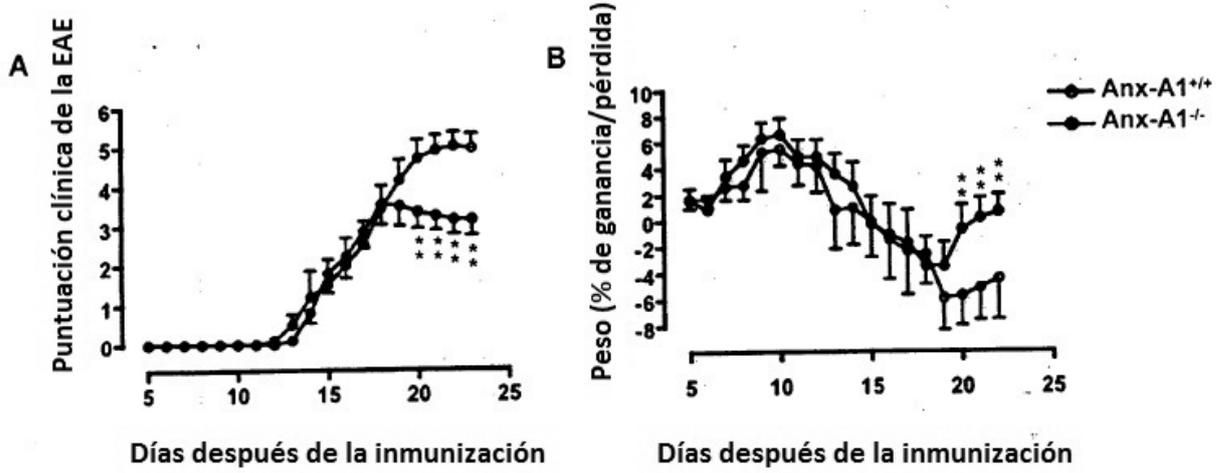
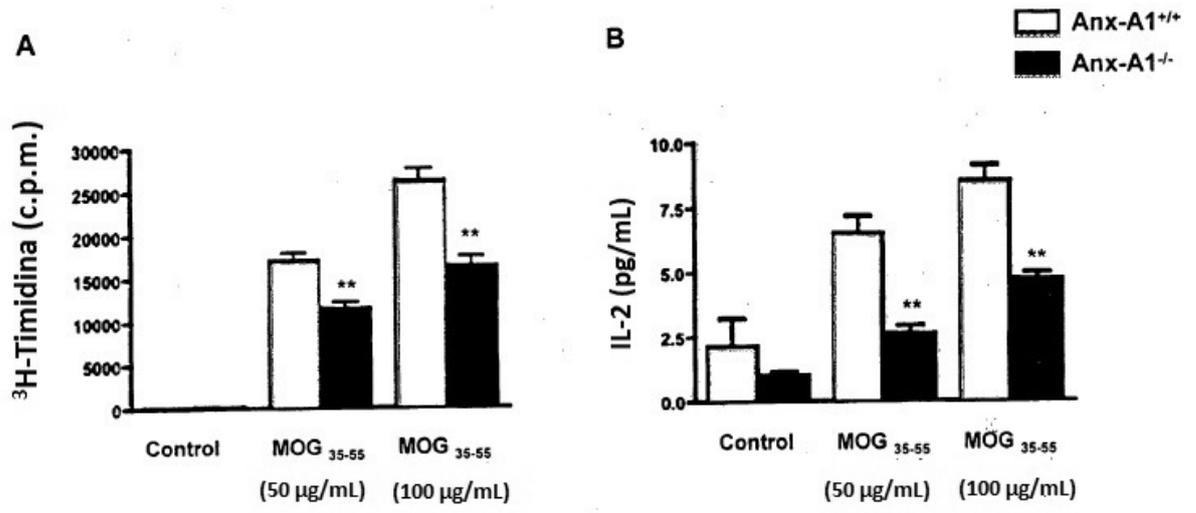
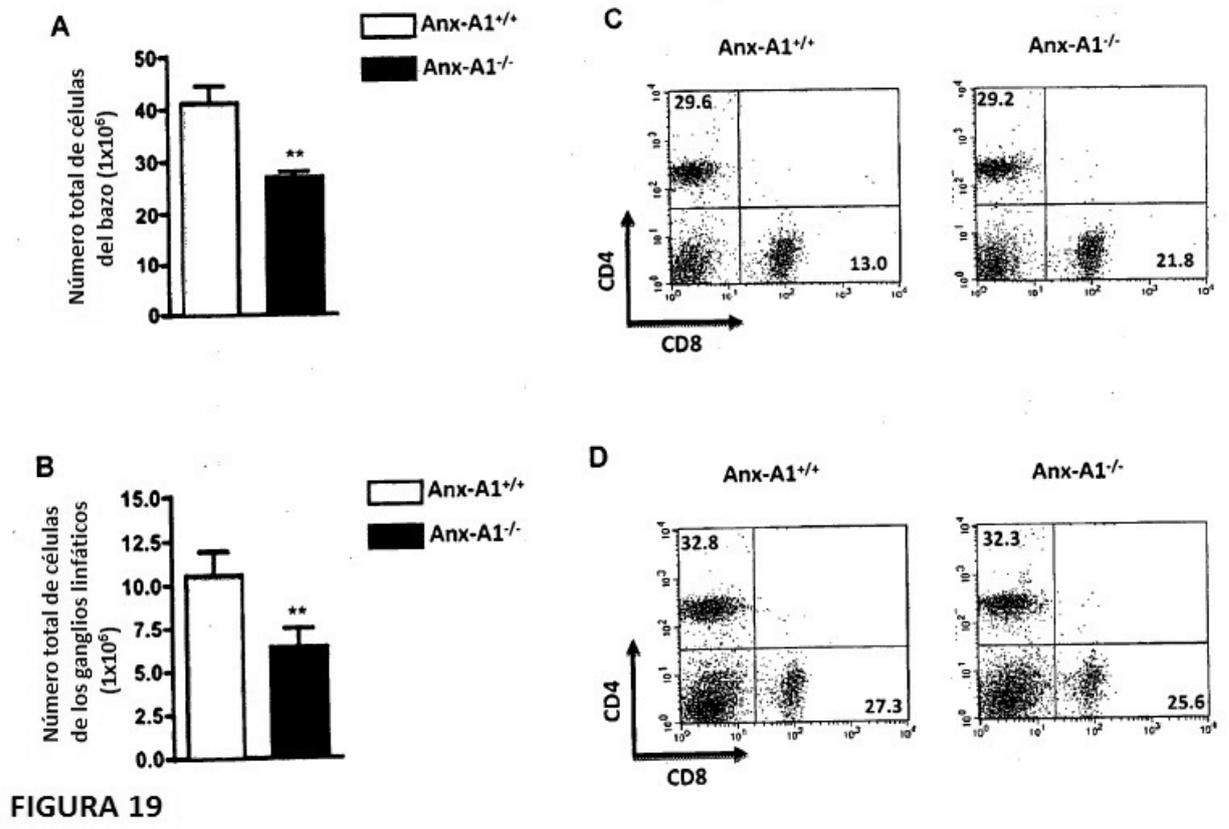


FIGURA 18





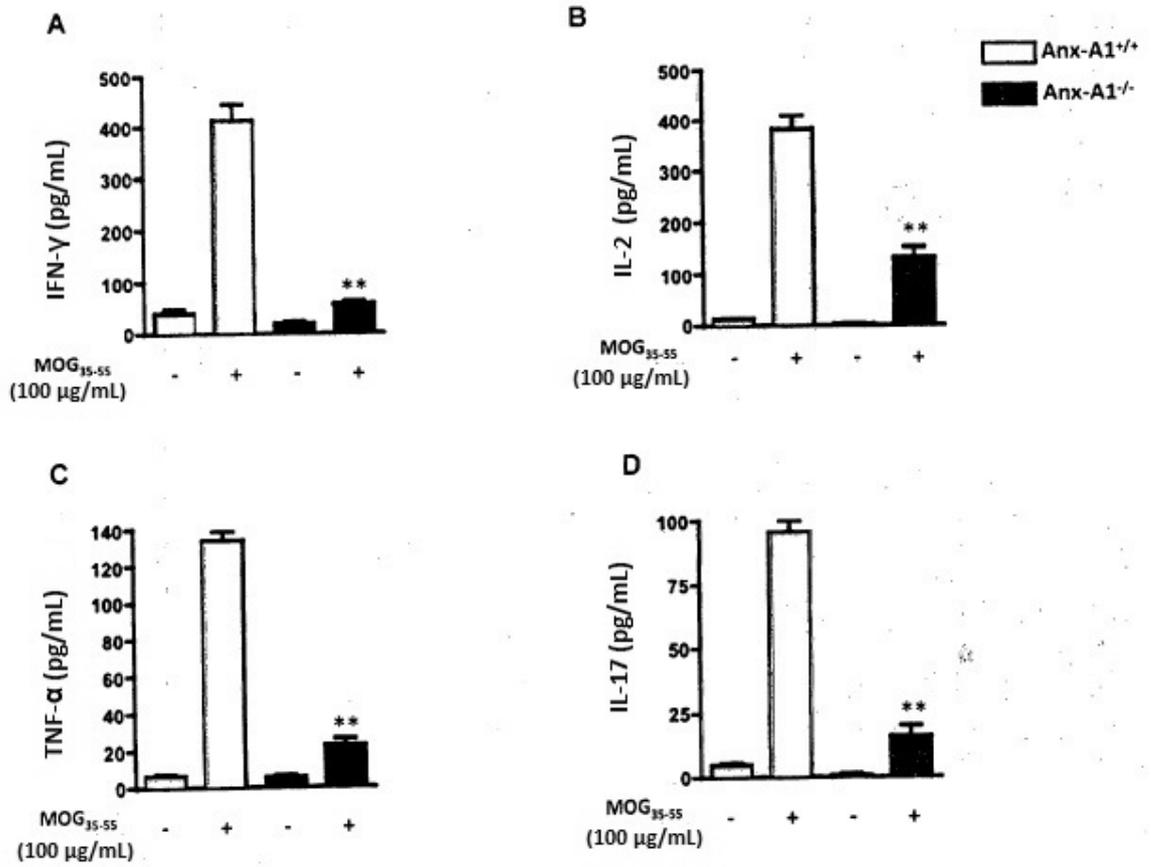


FIGURA 20

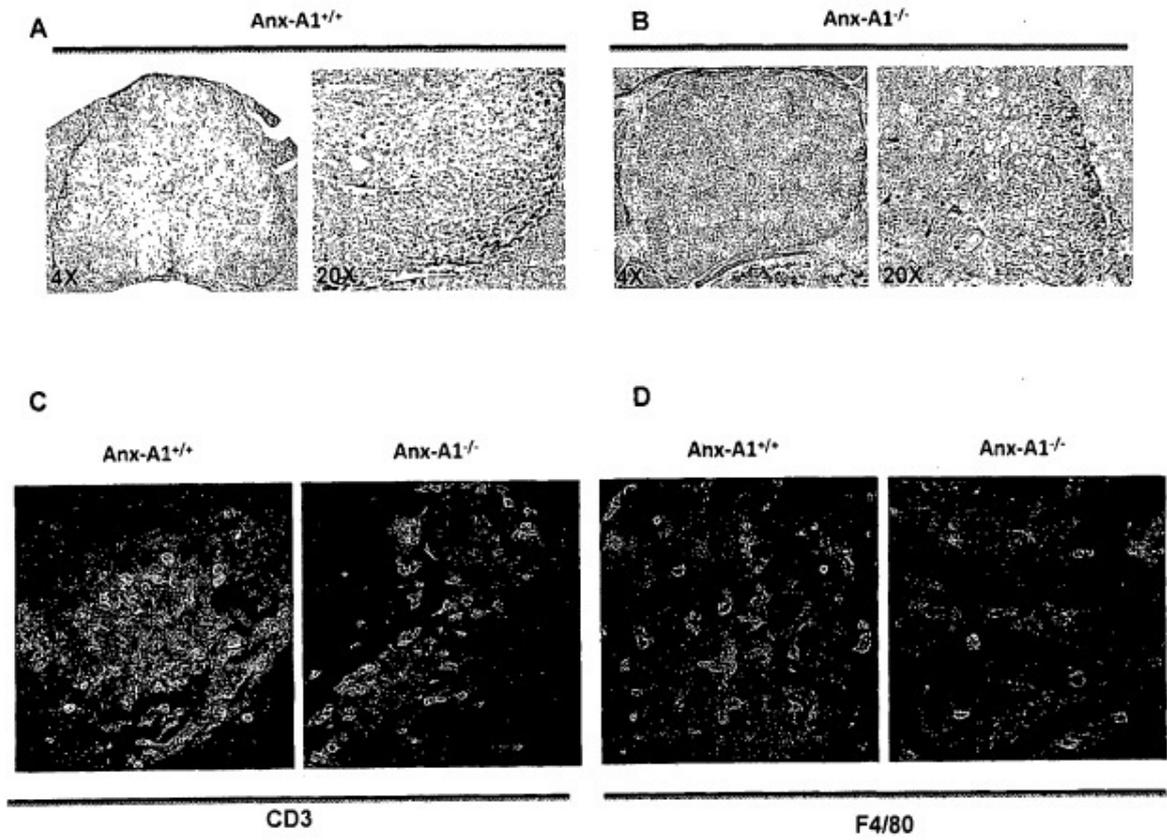


FIGURA 21

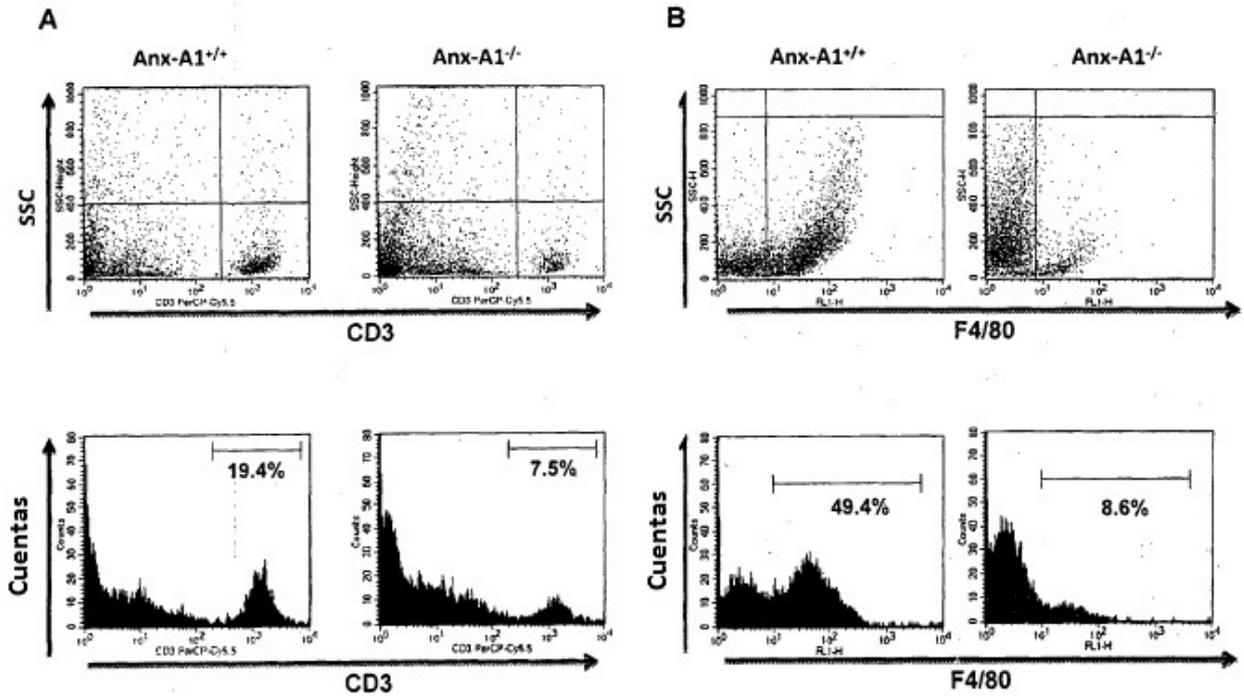


FIGURA 22