

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 012**

51 Int. Cl.:

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 38/51 (2006.01)

A61P 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2012 E 12719752 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2707018**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

10.05.2011 EP 11305557

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

17.02.2016

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITE DE ROUEN (33.3%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
ROUEN (33.3%)**

72 Inventor/es:

**VITTECOQ, OLIVIER;
DERAMBURE, CÉLINE;
LEQUERRE, THIERRY;
BOYER, OLIVIER;
TRON, FRANÇOIS;
LE LOET, XAVIER y
GILBERT, DANIELÉ**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 560 012 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

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, especialmente de la artritis reumatoide.

10 **Estado de la técnica**

La artritis reumatoide (AR), cuya prevalencia mundial es de alrededor del 1 %, es un trastorno inflamatorio crónico caracterizado por hiperplasia sinovial que conduce a la destrucción de las articulaciones. Esta enfermedad afecta más frecuentemente a mujeres de entre 35 y 50 años, con una proporción entre sexos=4/1, y es responsable de discapacidad grave. En este aspecto, representa un problema de salud pública.

La etiología de la AR todavía es desconocida. Se han propuesto varias causas que incluyen: 1) factores ambientales (tabaco, patógenos microbianos), 2) factores genéticos (los alelos de susceptibilidad HLA-DRB1*0401 y *0404 en la población caucásica, el alelo T 1858 de PTPN22), 3) factores hormonales 4) factores inmunitarios. Tanto la inmunidad innata como la adaptativa están implicadas en la aparición y el mantenimiento de la enfermedad, respectivamente. Están implicadas muchas células (células presentadoras de antígeno, linfocitos T, células T reguladoras y linfocitos B) en la patogénesis de la AR. Este sistema multicelular desempeña una función fundamental en las distintas fases de la enfermedad con interacciones celulares directas y comunicación de citocinas (TNF-alfa, IL-1 beta, IL-1 Ra, IL-4, IL-10, IL-17, RANK-L). Aunque los distintos factores mencionados anteriormente interactúan para el desarrollo de la AR, es probable que en la patogénesis de la AR desempeñen una función importante los factores autoinmunitarios.

La identificación de autoanticuerpos en pacientes de AR ha sido de interés principal, y la búsqueda está todavía en curso de forma activa. Hasta la fecha, se ha informado que los autoanticuerpos más específicos (98 %) en la AR son los autoanticuerpos que reconocen autoantígenos citrulinados. En las proteínas los restos peptidil-citrulina se producen solo a través de una modificación postraduccionnal de argininas, que cataliza la peptidil arginina deiminasa (PAD), con un cambio posterior en la antigenicidad de las autoproteínas. Esta reacción, denominada citrulinación, está implicada en múltiples procesos inflamatorios, pero los autoanticuerpos anti péptidos citrulinados (AAPC) son altamente específicos de la AR. De hecho, los AAPC incluyen una extensa serie de especificidades antigénicas, incluyendo determinantes antigénicos presentes en varias proteínas.

En este contexto, un análisis previo mediante una estrategia proteómica (electroforésis en 2D acoplada a espectrómetro de masas MALDI-TOF) de las nuevas poblaciones de autoanticuerpos en la AR muy temprana, permitió identificar por primera vez a α -enosala como un nuevo autoantígeno en 255 pacientes de AR muy temprana. Estudios realizados adicionales, destacaron dos categorías de autoantígenos diana de la respuesta de autoanticuerpos de la AR temprana no tratada, algunos de ellos citrulinados: 1) enzimas de la familia glucolítica, y de forma notable, α -enolasa citrulinada (ENO) y 2) chaperonas moleculares incluyendo BIP, otro antígeno diana en la AR bien documentado. Otro grupo ha demostrado que la citrulinación de ENO es crucial para su autoantigenicidad, en comparación con la forma no citrulinada. En este sentido, el 46 % de los sueros de AR ensayados demostraron reactividad contra la forma citrulinada y solo el 13 % contra la forma no citrulinada.

Alfa-enolasa es una proteína multifuncional expresada en diversos tejidos tales como hígado, timo, riñón y también tejido sinovial. Es una enzima glucolítica clave que convierte 2-fosfo-glicerato en fosfoenolpiruvato. Además de esta propiedad, la alfa-enolasa ejerce varias funciones biológicas relacionadas con su localización celular. Su capacidad para servir como un receptor de plasminógeno en la superficie de una diversidad de células (epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas), sugiere que puede desempeñar un papel en la fibrinólisis intravascular y pericelular. Cuando se estimulan neutrófilos, monocitos, linfocitos B y T, con acetato miristato de forbol y LPS, se regula positivamente la expresión en la membrana de alfa-enolasa. Se puede encontrar en el núcleo la proteína de unión a Myc 1 (MBP-1), un producto de la iniciación alternativa de la traducción del ARN de alfa-enolasa, donde actúa como un represor transcripcional del proto oncogén c-myc, con regulación posterior del crecimiento y la diferenciación celular.

ENO es una diana de anticuerpos en un amplio espectro de enfermedades infecciosas y autoinmunitarias, tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colangitis esclerosante primaria, lupus eritematoso sistémico, hepatitis autoinmunitaria y enfermedad de Behçet. Se han encontrado anticuerpos contra ENO en del 0 al 6 % de los controles sanos. Sin embargo, hasta la fecha, la presencia de autoanticuerpos contra ENO citrulinada permanece exclusiva de la AR. Se ha propuesto que el papel patogénico de los anticuerpos de ENO podría explicarse por un proceso de mimetismo molecular. Se identificó un péptido inmunodominante ENO y recibe el nombre de EP1. Los anticuerpos contra este epítipo se observaron en el 37-62 % de los sueros obtenidos de pacientes con AR. Este péptido inmunodominante mostró el 82 % de homología con un péptido de ENO de *Porphyromonas gingivali* (que recibe el nombre de por-EP1). Los niveles de anticuerpos contra este péptido inmunodominante se correlacionan de forma alta con los niveles de anticuerpos contra el péptido bacteriano. Además, los anticuerpos contra el péptido de ser humano reaccionan de forma cruzada con enolasa citrulinada recombinante de *Porphyromonas gingivalis*. Estos datos pueden

indicar un papel para la infección bacteriana en la inducción de la autoinmunidad en un subconjunto de pacientes con AR.

Sin embargo, todavía no se han investigado las propiedades artritogénicas o inmunomoduladoras de ENO.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido α -enolasa para su uso en el tratamiento profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que lo necesite, como se define en las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han evaluado los efectos clínicos e inmunitarios de α -enolasa no citrulinada recombinante en el bien conocido modelo de artritis inducida por colágeno. En efecto, distintas dosis (10 - 100 μ g) de α -enolasa se inyectaron de forma intraperitoneal a ratones DBA/1 de 6 semanas, un día antes de la inducción de artritis con colágeno II. Se evaluaron los niveles clínicos (peso, puntuaciones globales y articulares, grosor del tarso) y biológicos (anticuerpos anti colágeno II y anti α -enolasa [ELISA diseñada en el laboratorio], citocinas [IL-1b, IL-2, TNF-a, IL-6, IL-4, IL-10, IL-17, IFNg]), durante un período de seguimiento de 72 días. A través de dos experimentos distintos, la inyección profiláctica de α -enolasa recombinante fue capaz de evitar la pérdida de peso y de disminuir la gravedad de la artritis, evaluada por las valoraciones global y articular, así como del grosor del tarso. Hubo un efecto de respuesta dependiente de dosis, dado que 100 μ g condujeron a mejores resultados (Figura 2). Del mismo modo, la inyección profiláctica de por-EP1 condujo a las mismas observaciones con, otra vez, un efecto de respuesta dependiente de dosis (Figura 3).

Habiéndose observado efectos inmunomoduladores de ENO recombinante y del polipéptido inmunodominante por-EP1, se realizaron varios experimentos para comprender los mecanismos que esta molécula induce. En ratones tratados con 100 μ g de α -enolasa los niveles de los anticuerpos anti colágeno II fueron significativamente menores, mientras que los títulos de los anticuerpos anti α -enolasa fueron significativamente mayores, en comparación con los ratones de control (Figura 4). Un experimento sugiere, mediante la tecnología Luminex, que en los ratones tratados con 100 μ g las citocinas proinflamatorias disminuyen desde el día 58, en comparación con los ratones de control. Además, los estudios *in vitro* demostraron que ENO recombinante incubada con CMSP de donantes de sangre sanos, inducía la producción de IL-10. Considerados en su conjunto, estos experimentos de citocinas sugieren la inducción de una desviación inmunitaria (perfil TH2) mediante ENO recombinante inyectada de una forma profiláctica. En conclusión, el tratamiento profiláctico con α -enolasa recombinante o con por-EP1 tiene efectos inmunomoduladores en ratones con artritis inducida por colágeno. Los mecanismos reguladores inducidos por esta proteína inducen parecerse, de forma parcial, a un control de la producción de anticuerpos anti colágeno II y de la respuesta Th1. Los resultados sugieren que los polipéptidos α -enolasa no citrulinados, o fragmentos de los mismos (incluyendo variantes conservativas de función de los mismos, tales como por-ENO), representan una nueva estrategia terapéutica en la AR.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido α -enolasa para su uso en el tratamiento profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que lo necesite.

La administración profiláctica del polipéptido α -enolasa de la invención debería servir para prevenir o atenuar dicha enfermedad autoinmunitaria en dicho sujeto. En un sujeto preferente de una realización, preferentemente un ser humano en alto riesgo de tener una enfermedad autoinmunitaria, se trata de forma profiláctica con el polipéptido α -enolasa de la invención. Ejemplos de tales sujetos incluyen, pero sin limitación, seres humanos con un historial familiar de enfermedad autoinmunitaria. En una realización preferente, dicha enfermedad autoinmunitaria es en parte consecuencia de la presencia de anticuerpos contra α -enolasa citrulinada. En otra realización preferente particular, dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.

El término " α -enolasa" o "ENO" tiene su significado general en la técnica, y se refiere a la enzima glucolítica que convierte 2-fosfo-glicerato en fosfoenolpiruvato. El término incluye a α -enolasa de origen natural y a las variantes conservativas de función y las formas modificadas de la misma.

α -enolasa puede ser de cualquier fuente, pero normalmente es una α -enolasa de mamífero (por ejemplo, un primate que sea ser humano o que no sea ser humano), y más particularmente una α -enolasa de ser humano. Los expertos en la materia conocen bien la secuencia de la proteína α -enolasa y de los ácidos nucleicos que codifican tal proteína. Se proporciona una secuencia ejemplar de α -enolasa de ser humano, como se indica en SEC ID N°: 1 y se proporciona una secuencia ejemplar de α -enolasa de ratón, como se indica en SEC ID N°: 2 [Figura 1]. Sin embargo, debería comprenderse que, así como los expertos en la materia conocen la secuencia de estas moléculas, puede utilizarse cualquier proteína α -enolasa o variante de la secuencia génica, mientras tenga las propiedades de una α -enolasa.

Las "variantes conservativas de función" son aquellas en las que un dado resto de aminoácido en una proteína o enzima, se ha cambiado sin alterar la conformación y función en conjunto del polipéptido, incluyendo, pero sin limitación, la sustitución de un aminoácido por uno que tiene propiedades semejantes (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático, y similares). En una proteína los aminoácidos que no son los indicados como conservados pueden ser distintos, de modo que el porcentaje de similitud de secuencia de

5 proteína o de aminoácidos entre cualesquiera dos proteínas de función semejante, pueden variar y pueden ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % como se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento tal como el Método Cluster, donde la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservativa de función" es un polipéptido que tiene al menos el 60 % de identidad de aminoácidos como se determina mediante los algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente al menos el 75 %, muy preferentemente al menos el 85 %, y todavía más preferentemente al menos el 90 %, y que tiene las mismas, o substancialmente semejantes, propiedades o funciones que la proteína natural o parental con la que se la compara.

10 De acuerdo con la invención, la expresión "polipéptido α -enolasa" se refiere a cualquier polipéptido que comprende al fragmento inmunodominante de α -enolasa EP1 (o variante conservativa de función del mismo) que consiste de la secuencia de aminoácidos que se extiende desde la posición 5 a la posición 21 en SEC ID N°: 1 o que se extiende desde la posición 6 a la posición 21 en SEDC ID N°: 2 (Figura 1). Por consiguiente, la expresión abarca a la α -enolasa misma o fragmentos de la misma, que comprenden al fragmento inmunodominante EP1 de α -enolasa.

15 En una realización particular, una variante conservativa de función del fragmento inmunodominante EP1 se puede representar por el péptido que se extiende desde la posición 5 a la posición 21 de SEC ID N°: 3 (por-EP1).

20 De acuerdo con la invención, todos los polipéptidos de la invención son polipéptidos recombinantes que no están citrulinados.

En una realización particular, los polipéptidos α -enolasa de la invención pueden restringirse conformacionalmente, para conservar sus propiedades de inmunogenicidad.

25 Normalmente, la ciclación es bien conocida en la técnica y en general implica la introducción de un enlace disulfuro entre dos restos de cisteína. Normalmente, este ciclo se forma a través de un anillo de cadena lateral a cadena lateral, que implica un puente monosulfuro o disulfuro entre pares de cisteínas, penicilaminas, homocisteínas, combinaciones de las anteriores, u otros pares de aminoácidos en los que las cadenas laterales se unen con uno o dos átomos de sulfuro. Los métodos para la síntesis del polipéptido cíclico por disulfuro se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo, los documentos US3.929.758., US4.216.141 y US4.102.877.

30 Por lo tanto, los polipéptidos de la invención pueden comprender restos de cisteína en los extremos terminales para permitir la ciclación de los polipéptidos.

35 En una realización particular, el polipéptido α -enolasa se selecciona del grupo que consiste de CKIHAREIFDSRGNPTVEC (SEC ID N°: 4), CIHAREIFDSRGNPTVEC (SEC ID N°: 5) o CKIIGREILDSRGNPTVEC (SEC ID N°: 6), que están ciclados mediante un enlace disulfuro entre dos restos de cisteína.

40 En realizaciones específicas, se contempla que los polipéptidos α -enolasa usados en los métodos terapéuticos de la presente invención, se puedan modificar para mejorar su eficacia terapéutica. Tal modificación de compuestos terapéuticos se puede usar para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo de circulación, o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes se puede disminuir de forma significativa, mediante la combinación con una diversidad de vehículos transportadores de fármacos que modifiquen la biodistribución.

45 Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Diversos polímeros solubles en agua han demostrado modificar la biodistribución, mejorar el modo de captación en la célula, cambiar la permeabilidad a través barreras fisiológicas; y modificar la tasa de eliminación del organismo. Para conseguir un efecto de dirección o de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármacos como grupos terminales, como parte de la estructura, o como grupos colgantes en la cadena polimérica.

50 Dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación, el polietilenglicol (PEG) se ha usado de forma amplia como transportador de fármacos. La aneión a diversos fármacos, proteínas y liposomas, ha demostrado mejorar el tiempo de residencia y disminuir la toxicidad. El PEG puede acoplarse a agentes activos a través de grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y a través de otros métodos químicos; sin embargo, el propio PEG se limita como máximo a dos agentes activos por molécula. En una estrategia distinta, se exploraron copolímeros de PEG y aminoácidos como biomateriales nuevos, que retendrían las propiedades de biocompatibilidad del PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de aneión por molécula (proporcionando mayor carga de fármaco), y que podría diseñarse de forma sintética para ajustarse a una diversidad de aplicaciones.

60 Los expertos en la materia conocen las técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de fármacos. Por ejemplo, VectraMed (Plainsboro, N.J.) ha usado polímeros para el suministro de fármacos que consisten de polímeros alternativos de PEG y de monómeros trifuncionales tales como la lisina. Las cadenas de PEG (normalmente de 2000 Dalton o menos) se unen a los grupos amino a- y e- de la lisina, a través de uniones uretano estables. Tales polímeros conservan las propiedades convenientes del PEG, a la vez que proporcionan grupos colgantes reactivos (los grupos de ácido carboxílico de la lisina) a lo largo de la cadena polimérica, a intervalos controlados de forma estricta, y predeterminados. Los grupos colgantes reactivos pueden usarse para derivatización, reticulación, o conjugación con

5 otras moléculas. Estos polímeros son útiles para producir profármacos estables de circulación prolongada, mediante la modificación del peso molecular del polímero, del peso molecular de los segmentos de PEG, y la unión escindible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta al espaciado del complejo fármaco/grupo de unión y a la cantidad de fármaco por peso molecular de conjugado (segmentos de PEG más pequeños proporcionan mayor carga de fármaco). En general, el aumento del peso molecular global del bloque copolímero conjugado aumentará la semivida circulatoria del conjugado. No obstante, el conjugado debe ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo del umbral de limitación de la filtración glomerular (es decir, menos de 45 kDa).

10 Además, siendo importante la estructura del polímero en el mantenimiento de la semivida circulatoria y la biodistribución, pueden usarse conectores para mantener al agente terapéutico en una forma de profármaco hasta que se libere de la estructura del polímero mediante un accionador específico, normalmente la actividad enzimática en el tejido diana. Por ejemplo, este tipo de suministro de fármaco activada por tejido es particularmente útil cuando se necesita el suministro en un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libera en el lugar de la patología, o cerca. Las bibliotecas de grupos de unión para el uso en el suministro de fármacos activados son conocidas para los expertos en la materia y se pueden basar en la cinética enzimática, el predominio de la enzima activa, y la especificidad de escisión de las enzimas específicas seleccionadas de una enfermedad (véase, por ejemplo, tecnologías de lo que establece VectraMed, Plainsboro, N.J.). Tales conectores pueden usarse en la modificación de polipéptidos α -enolasa descritos en el presente documento para suministro terapéutico.

20 De acuerdo con la invención, los polipéptidos α -enolasa se pueden producir por métodos de síntesis peptídica automatizada convencional, o por expresión recombinante. Los principios generales para el diseño y producción de proteínas son conocidos para los expertos en la materia.

25 Los polipéptidos α -enolasa de la invención se pueden sintetizar en solución o en un soporte sólido, en conformidad con técnicas convencionales. Están disponibles de forma comercial diversos sintetizadores automáticos, y pueden usarse en conformidad con protocolos conocidos. Los polipéptidos α -enolasa de la invención también pueden sintetizarse por tecnología de fase sólida empleando un sintetizador de péptidos ejemplar, tal como un Modelo 433A de Applied Biosystems Inc. La pureza de cualquier proteína dada generada a través de síntesis peptídica automatizada o a través de métodos recombinantes, se puede determinar usando análisis por HPLC en fase inversa. La autenticidad química de cada péptido se puede establecer por cualquier método bien conocido para los expertos en la materia.

35 Se puede emplear tecnología del ADN recombinante como una alternativa a la síntesis peptídica automatizada, donde una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de elección se inserta en un vector de expresión, se transforma o se transfecta en una célula hospedadora apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión, como se describe posteriormente en el presente documento. Los métodos recombinantes son especialmente preferentes para la producción de polipéptidos más largos.

40 Se puede usar una diversidad de sistemas de vector/hospedador de expresión, para contener y expresar la secuencia codificante del péptido o de la proteína. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, vectores de expresión de ADN de plásmidos o cósmidos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células de plantas transfectadas con vectores de expresión virales (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus de mosaico del tabaco, VMT) o transformadas con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales. Los expertos en la materia conocen diversas técnicas para la expresión de mamíferos de proteínas. Las células de mamífero que son útiles en las producciones de proteínas recombinantes incluyen, pero sin limitación, células VERO, células HeLa, líneas celulares de Ovario de hámster chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Los protocolos ejemplares para la expresión recombinante de sustratos peptídicos o polipéptidos de fusión en bacterias, levaduras y otros invertebrados, son bien conocidos para los expertos en la materia, y se describen brevemente a continuación en el presente documento. También son conocidos para los expertos en la materia, los sistemas hospedadores de mamífero para la expresión de proteínas recombinantes. Las cepas de células hospedadoras pueden elegirse por una capacidad particular para procesar la proteína expresada o para producir determinadas modificaciones postraduccionales, que serán útiles en proporcionar actividad proteica. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccionales que escinde una forma "prepro" de la proteína, también puede ser importante para la inserción, plegamiento y/o función correctos. Las distintas células hospedadoras tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38 y similares, tienen maquinarias celulares específicas y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales, y pueden elegirse para asegurar la modificación y procesamientos correctos de la proteína extraña introducida.

60 En la producción recombinante de los polipéptidos α -enolasa de la invención, sería necesario emplear vectores que comprendan moléculas de polinucleótido para codificar las proteínas derivadas de α -enolasa. Los expertos en la materia conocen bien los métodos para preparar tales vectores, así como para producir células hospedadoras transformadas con tales vectores. Las moléculas de polinucleótido usadas en tal intento pueden estar unidas a un vector que en general incluye, para la propagación en un hospedador, un marcador de selección y un origen de replicación. Estos elementos de las construcciones de expresión son conocidos para los expertos en la materia. En general, los vectores

de expresión incluyen ADN que codifica la proteína, estando unida operativamente a secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales, tales como las derivadas de genes de mamíferos, microbianas, virales, o de insecto. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, operadores, o potenciadores transcripcionales, sitios de unión ribosomales de ARNm, y secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción.

Las expresiones "vector de expresión", "construcción de expresión" o "casete de expresión" se usan indistintamente en toda esta especificación, y se pretende que incluyan cualquier tipo de construcción genética que contenga un ácido nucleico que codifica un producto génico, en el que parte o toda la secuencia de ácido nucleico codificante es capaz de transcribirse.

La elección de un vector de expresión adecuado para la expresión de los péptidos o polipéptidos de la invención, claro está, dependerá de la célula hospedadora específica a utilizar, y está dentro de la experiencia del experto habitual. Los métodos para la construcción de vectores de expresión de mamífero se divulgan, por ejemplo, en los documentos EP-A-0367566; y WO 91/18982.

En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos obtenidos de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de las secuencias de oligonucleótidos antisentido, ARNip, ARNhc o de ribozima. Los vectores virales son un tipo preferente de vector e incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico de los siguiente virus: retrovirus, tales como virus de la leucemia murina de moloney, virus del sarcoma murino de harvey, virus del tumor mamario murino, y virus del sarcoma de rous; adenovirus, virus adeno-asociado; virus tipo SV40; virus polioma; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; herpes virus; virus vaccinia; virus de la polio; y virus de ARN tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados, pero conocidos en la técnica.

Los vectores virales preferentes se basan en virus eucariotas no citopáticos, en los que se han reemplazado genes no esenciales con los genes de interés. Los virus no citopáticos incluyen a retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa de ARN viral genómico a ADN, con posterior integración proviral en el ADN celular del hospedador. Se han aprobado retrovirus para las pruebas de terapia génica de seres humanos. Los más útiles son los retrovirus que son deficientes en la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovirales genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Se conocen bien en la técnica los protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en la replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula empaquetadora recubierta con plásmido, producción de retrovirus recombinante en la línea celular empaquetadora, recogida de las partículas virales del medio del cultivo celular, e infección de las células diana con las partículas virales).

Los virus preferentes para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adeno-asociados (VAA), que son virus de ADN bicatenario aprobados ya para uso en el ser humano en terapia génica. Se conocen, de hecho, 12 serotipos distintos de VAA (VAA1 a 12), cada uno con distintos tropismos tisulares. Los VAA recombinantes se obtienen del parvovirus dependiente VAA2. El virus adeno-asociado tipo 1 a 12 se puede modificar por ingeniería genética para ser deficiente en la replicación, y ser capaz de infectar una amplia variedad de tipos celulares y especies. Adicionalmente, tiene ventajas tales como, estabilidad en calor y en disolventes lipídicos; frecuencias de transducción elevadas en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas; y ausencia de inhibición de sobreinfección, permitiendo así series múltiples de transducción. Supuestamente, el virus adeno-asociado puede integrarse en el ADN celular de ser humano de una manera específica de sitio, minimizando de esta forma la posibilidad de mutagénesis insercional y la variabilidad de la expresión del gen insertado, característico de la infección retroviral. Además, se continuaron infecciones de virus adeno-asociados del tipo silvestre en cultivo de tejido durante más de 100 pasajes, sin presión de selección, implicando que la integración genómica del virus adeno-asociado es un acontecimiento relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede funcionar de una manera extra cromosómica.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito de forma extensa en la técnica y los expertos en la materia los conocen bien. En los últimos años, se han usado los vectores plasmídicos como vacunas de ADN, para suministrar a células genes codificantes de antígeno *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto, debido a que no se tienen las mismas preocupaciones respecto a la seguridad como sucede con muchos de los vectores virales. Sin embargo, estos plásmidos, que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido a partir un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos de los plásmidos normalmente utilizados incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40, y pBlueScript. Los expertos en la materia conocen bien otros plásmidos. De forma adicional, el cliente puede diseñar los plásmidos usando reacciones de enzimas de restricción y ligamiento para eliminar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos se pueden administrar mediante una diversidad de vías parenterales, a través de la mucosa y tópicas. Por ejemplo, el plásmido de ADN se puede inyectar por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, u otras. También se puede administrar mediante pulverizadores o gotas intranasales, supositorio rectal o de forma oral. También se puede administrar en la epidermis o una superficie de la mucosa usando una pistola génica. Los plásmidos se pueden proporcionar en una solución acuosa, secos sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de suministro de ADN incluyendo, pero sin limitación, liposomas, dendrímeros, cocleatos y microencapsulación.

La expresión necesita que en los vectores se proporcionen señales adecuadas, tales como potenciadores/promotores de fuentes virales y de mamíferos, que puedan usarse para dirigir en la célula hospedadora la expresión de los ácidos nucleicos de interés. Normalmente, el ácido nucleico que se expresa está bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN que reconoce la maquinaria sintética de la célula o la maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de un gen. Las secuencias de nucleótidos están unidas operativamente cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con el ADN que codifica la proteína de interés (es decir, α -enolasa, una variante y similares). De tal forma, una secuencia de nucleótidos de un promotor está unida operativamente a una dada secuencia de ADN, si la secuencia de nucleótidos del promotor dirige la transcripción de la secuencia.

De forma semejante, la expresión "bajo control transcripcional" significa que el promotor está en la localización y en la orientación correctas, en relación al ácido nucleico, para controlar la iniciación de la ARN polimerasa y la expresión del gen. Puede utilizarse cualquier promotor que conduzca la expresión del ácido nucleico. No se piensa que sea importante el promotor particular empleado para controlar la expresión de un ácido nucleico de interés, en tanto sea capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en la célula diana. Por lo tanto, cuando se elige una célula como diana, es preferible colocar la región codificante de ácido nucleico adyacente a, y bajo el control de, un promotor que sea capaz de expresarse en una célula de ser humano. Hablando en términos generales, tal promotor podría incluir un promotor de ser humano o viral. Pueden usarse para obtener elevado nivel de expresión de la secuencia codificante de interés, promotores comunes que incluyen, por ejemplo, el promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano de SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, de la [beta]-actina, el promotor de la insulina de rata, el promotor de la fosfoglicerol quinasa y el promotor de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, todos los cuales son promotores bien conocidos y fácilmente disponibles para los expertos en la materia. También se considera el uso de otros promotores virales, de células de mamífero o de fagos bacterianos, que se conocen bien en la técnica, para lograr la expresión de una secuencia codificante de interés, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para producir un rendimiento recuperable de la proteína de interés. Después de la transfección o transformación, se puede optimizar el nivel y patrón de expresión de la proteína de interés mediante el empleo de un promotor con propiedades bien conocidas. También se pueden usar promotores inducibles.

Otro elemento regulador que se usa en la expresión de proteínas es un potenciador. Estos son elementos genéticos que aumentan la transcripción a partir de un promotor localizado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Cuando una construcción de expresión hace uso de un inserto de ADNc, normalmente se desea incluir una secuencia señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación correcta del transcrito génico. Es adecuada para la práctica de la invención, cualquier secuencia señal de poliadenilación que se reconozca en células de la especie animal transgénica seleccionada, tales como las señales de poliadenilación de la hormona de crecimiento de ser humano o bovina, y de SV40.

Otro aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria, como se define anteriormente.

Normalmente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o de ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, vector de fago o viral, como se describe anteriormente.

De esta manera, un objetivo adicional de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa para su uso en el tratamiento profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria, como se define anteriormente.

Un objetivo adicional de la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa (o un vector que comprende un ácido nucleico del mismo) para el tratamiento profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria, como se define anteriormente.

Los polipéptidos α -enolasa (o ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa, o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa) de la invención, se administran en dicho sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente de polipéptidos α -enolasa (o ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa, o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa) para conservar la integridad de la barrera celular endotelial vascular a una relación beneficio/riesgo razonable, aplicable a cualquier tratamiento médico. Se comprenderá que el uso total de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirá por el médico que atiende al paciente, dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular, dependerá de una diversidad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración, y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o en coincidencia con el polipéptido

específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es conocido dentro de las habilidades de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles más bajos que los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado, y aumentar de forma gradual la dosificación hasta lograr el efecto deseado.

5 Un objetivo adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido α -enolasa (o ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa), para su uso en el tratamiento profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria.

10 Normalmente, el polipéptido α -enolasa (o ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa, o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa), puede combinarse para formar composiciones terapéuticas con excipientes farmacéuticamente aceptables, y de forma opcional con matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables.

15 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desafortunada, cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un relleno, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo que no sean tóxicos, sólidos, semisólidos o líquidos.

20 En la composición farmacéutica de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar a animales y seres humanos en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales. Las formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, capsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublinguales y bucales, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal, y formas de administración rectales.

30 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de inyectarse. Estos pueden ser, en particular, soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro sódico, potásico, de calcio o de magnesio, y similares o mezclas de tales sales), o secas, especialmente composiciones liofilizadas que después de la adición de, dependiendo del caso, agua estéril o de solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

35 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones estériles acuosas; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o de dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe estar estéril y debe ser fluida en la medida que exista inyectabilidad fácil mediante una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe preservarse de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

40 Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o como sales farmacológicamente aceptables, se pueden preparar en agua mezclada de forma adecuada con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

50 El polipéptido α -enolasa (o ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa, o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido α -enolasa) se puede formular en una composición en una forma neutral o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y están formadas con sales inorgánicas tales como, por ejemplo, ácidos hidrocloreto y fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido sódico, potásico, de amonio, cálcico, o férrico, y de bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

55 El transportador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede ejecutar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede ejecutar mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

65 Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de polipéptidos activos en la cantidad

necesaria, en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan por la incorporación de diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril, que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado, a partir de una solución del mismo, esterilizada de forma previa por filtración.

Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en la cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos, y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse de forma adecuada si es necesario, y el diluyente líquido primero debe hacerse isotónico con suficiente solución salina o con glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este contexto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos para los expertos en la materia, a la luz de la presente divulgación. De forma necesaria, se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del paciente a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el paciente individual.

Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma utilizada actualmente.

La invención se describirá adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben ser interpretadas en modo alguno como limitando el alcance de la presente invención.

30 Descripción de las figuras

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de alfa-enolasa natural de ser humano, ratón y *Porphyromonas gingivalis*.

Figura 2: Efectos clínicos de la inyección profiláctica de α -enolasa en la artritis murina inducida por colágeno.

Figura 3: Efectos clínicos de la inyección profiláctica de por-EP1 en la artritis murina inducida por colágeno: La inyección profiláctica intraperitoneal (IP) del péptido cíclico de *P. gingivalis* (ckiiigreildsrngnptvec), obtenido de enolasa, permite disminuir de forma significativa la gravedad de la artritis en AIC (artritis inducida por colágeno). Se puede observar un efecto de respuesta dependiente de dosis, se obtuvieron mejores resultados con una dosis de péptido de 10 μ g (se indican las medias \pm EEM).

Figura 4: La inyección profiláctica de enolasa induce la disminución del título de anticuerpos anti-colágeno II y el aumento del título de anticuerpos anti-enolasa en la artritis murina inducida por colágeno: títulos de Ac (A) anti-CII y (B) anti-ENO.

45 Ejemplos

La AIC es un modelo experimental animal bien establecido, cercano a la AR de ser humano, con la que comparte muchas característica clínicas, inmunitarias e histopatológicas (Courtenay, J.S., *et al.*, Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. Nature, 1980. 283(5748): p. 666-8.). La AIC se puede inducir en cepas (DBA/1, B10.Q, B10.RIII) de ratones genéticamente (H-2^a o H-2^b) susceptibles, mediante la inmunización con colágeno II (CII) heterólogo natural, un componente conocido del cartílago. En este modelo están implicadas la inmunidad humoral y la celular, debido a que para el desarrollo de la artritis son necesarios anticuerpos anti-CII y linfocitos Th1 específicos de CII. Los ratones deficientes en linfocitos T no desarrollan la enfermedad. La enfermedad resultante es una sinovitis proliferativa crónica con considerable destrucción de colágeno y erosión ósea, que conduce a deformaciones de las articulaciones. La AIC es un modelo apropiado, que se ha utilizado extensamente para evaluar terapias aprobadas de AR (etanercept, anakinra, abatecept, tocilizumab) y compuestos que se descontinuaron durante la fase II o III de los ensayos clínicos.

Por consiguiente, los inventores han evaluado los efectos clínicos e inmunitarios de α -enolasa no citrulinada recombinante en el bien conocido modelo de artritis inducida por colágeno. Se inyectaron, efectivamente, distintas dosis (10 - 100 μ g) de α -enolasa de forma intraperitoneal, en ratones DBA/1 de seis semanas, un día antes de la inducción de la artritis con colágeno II. Se evaluaron los niveles clínicos (peso, puntuaciones globales y articulares, grosor del tarso) y biológicos (anticuerpos anti-colágeno II y anti- α -enolasa [ELISA diseñada en el laboratorio], citocinas [IL-1b, IL-2, TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10, IL-17, IFNg]), durante un período de seguimiento de 72 días. La inyección profiláctica de α -enolasa recombinante fue capaz de evitar la pérdida de peso y de disminuir la gravedad de la artritis, evaluada por las

puntuaciones globales y articulares, así como por el grosor del tarso, en dos experimentos diferentes. Hubo un efecto de respuesta dependiente de dosis, puesto que 100 µg condujeron a mejores resultados (Figura 2). Del mismo modo, la inyección profiláctica de por-EP1 conduce a las mismas observaciones con, otra vez, un efecto de respuesta dependiente de dosis (Figura 3).

5 Habiéndose observado los efectos inmunomoduladores de ENO recombinante y del péptido inmunodominante por-EP1, se realizaron varios experimentos para comprender los mecanismos que esta molécula induce. Los niveles de los anticuerpos anti-colágeno II fueron significativamente menores mientras que los títulos de los anticuerpos anti-α-enolasa fueron significativamente mayores en los ratones tratados con 100 µg de α-enolasa, en comparación con los ratones de control (Figura 4). Mediante la tecnología Luminex, un experimento sugiere que las citocinas proinflamatorias disminuyen desde el día 58 en los ratones tratados con 100 µg, en comparación con los ratones de control. Además, los estudios *in vitro* demostraron que ENO recombinante incubada con CMSP de donantes sanos inducía la producción de IL-10. Considerados en su conjunto, estos experimentos de citocinas sugieren la inducción de una desviación inmunitaria (perfil TH2), mediante ENO recombinante inyectada de un modo profiláctico. En conclusión, el tratamiento profiláctico con α-enolasa recombinante, o por-EP1, tiene efectos inmunomoduladores en ratones con artritis inducida por colágeno. Los mecanismos reguladores que induce esta proteína parecen deberse de forma parcial al control de la producción de anticuerpos anti-colágeno II y de la respuesta Th1. Los resultados sugieren que α-enolasa no citrulinada, o por-EP1, representa una nueva estrategia terapéutica potencial en la AR.

20 **Referencias:**

A lo largo de toda la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que la presente invención pertenece.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

30 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

<130> BI011173 VITTECOQ / MC

35 <160>6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

40 <211> 434

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 560 012 T3

Met Ser Ile Leu Lys Ile His Ala Arg Glu Ile Phe Asp Ser Arg Gly
 1 5 10 15

Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Phe Thr Ser Lys Gly Leu Phe Arg
 20 25 30

Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ile Tyr Glu Ala Leu Glu
 35 40 45

Leu Arg Asp Asn Asp Lys Thr Arg Tyr Met Gly Lys Gly Val Ser Lys
 50 55 60

Ala Val Glu His Ile Asn Lys Thr Ile Ala Pro Ala Leu Val Ser Lys
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Val Thr Glu Gln Glu Lys Ile Asp Lys Leu Met Ile Glu
 85 90 95

Met Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu
 100 105 110

Gly Val Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly Ala Val Glu Lys Gly Val
 115 120 125

Pro Leu Tyr Arg His Ile Ala Asp Leu Ala Gly Asn Ser Glu Val Ile
 130 135 140

Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly Ser His Ala Gly
 145 150 155 160

Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro Val Gly Ala Ala
 165 170 175

ES 2 560 012 T3

Asn Phe Arg Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val Tyr His Asn Leu
 180 185 190
 Lys Asn Val Ile Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asn Val Gly
 195 200 205
 Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Lys Glu Gly Leu
 210 215 220
 Glu Leu Leu Lys Thr Ala Ile Gly Lys Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Val
 225 230 235 240
 Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Phe Arg Ser Gly Lys
 245 250 255
 Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Pro Ser Arg Tyr Ile Ser
 260 265 270
 Pro Asp Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Ile Lys Asp Tyr Pro
 275 280 285
 Val Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly Ala Trp
 290 295 300
 Gln Lys Phe Thr Ala Ser Ala Gly Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg Ile Ala Lys Ala Val Asn Glu Lys Ser
 325 330 335
 Cys Asn Cys Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu
 340 345 350
 Ser Leu Gln Ala Cys Lys Leu Ala Gln Ala Asn Gly Trp Gly Val Met
 355 360 365
 Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Thr Phe Ile Ala Asp Leu
 370 375 380
 Val Val Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg
 385 390 395 400
 Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Leu Arg Ile Glu Glu Glu
 405 410 415
 Leu Gly Ser Lys Ala Lys Phe Ala Gly Arg Asn Phe Arg Asn Pro Leu
 420 425 430

Ala Lys

<210>2
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 2

```

Met Ser Ile Leu Arg Ile His Ala Arg Glu Ile Phe Asp Ser Arg Gly
1           5           10           15

Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Tyr Thr Ala Lys Gly Leu Phe Arg
          20           25           30

Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ile Tyr Glu Ala Leu Glu
          35           40           45

Leu Arg Asp Asn Asp Lys Thr Arg Phe Met Gly Lys Gly Val Ser Gln
          50           55           60

Ala Val Glu His Ile Asn Lys Thr Ile Ala Pro Ala Leu Val Ser Lys
65           70           75           80

Lys Val Asn Val Val Glu Gln Glu Lys Ile Asp Lys Leu Met Ile Glu
          85           90           95

Met Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu
          100          105          110

Gly Val Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly Ala Val Glu Lys Gly Val
          115          120          125

Pro Leu Tyr Arg His Ile Ala Asp Leu Ala Gly Asn Pro Glu Val Ile
          130          135          140

Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly Ser His Ala Gly
145           150           155           160

Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro Val Gly Ala Ser
          165          170          175

Ser Phe Arg Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val Tyr His Asn Leu
          180          185          190

Lys Asn Val Ile Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asn Val Gly
          195          200          205
    
```

10

ES 2 560 012 T3

Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Lys Glu Ala Leu
 210 215 220

 Glu Leu Leu Lys Thr Ala Ile Ala Lys Ala Gly Tyr Thr Asp Gln Val
 225 230 235 240

 Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Arg Ser Gly Lys
 245 250 255

 Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Pro Ser Arg Tyr Ile Thr
 260 265 270

 Pro Asp Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Val Gln Asn Tyr Pro
 275 280 285

 Val Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly Ala Trp
 290 295 300

 Gln Lys Phe Thr Ala Ser Ala Gly Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu
 305 310 315 320

 Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg Ile Ala Lys Ala Ala Ser Glu Lys Ser
 325 330 335

 Cys Asn Cys Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu
 340 345 350

 Ser Leu Gln Ala Cys Lys Leu Ala Gln Ser Asn Gly Trp Gly Val Met
 355 360 365

 Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Thr Phe Ile Ala Asp Leu
 370 375 380

 Val Val Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg
 385 390 395 400

 Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Ile Leu Arg Ile Glu Glu Glu
 405 410 415

 Leu Gly Ser Lys Ala Lys Phe Ala Gly Arg Ser Phe Arg Asn Pro Leu
 420 425 430

 Ala Lys

<210>3
 <211> 425
 <212> PRT

ES 2 560 012 T3

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400>3

Met Glu Ile Ala Lys Ile Ile Gly Arg Glu Ile Leu Asp Ser Arg Gly
 1 5 10 15

Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Val His Leu Ala Cys Gly Ile Ile Gly
 20 25 30

Arg Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Glu Asn Glu Ala Ile
 35 40 45

Glu Leu Arg Asp Gln Asp Lys Ala Arg Tyr Cys Gly Lys Gly Val Leu
 50 55 60

Lys Ala Val Lys Asn Val Asn Glu Val Ile Asp Pro Ala Leu Cys Gly
 65 70 75 80

Met Ser Val Leu Glu Gln Thr Ala Ile Asp Arg Lys Leu Ile Glu Leu
 85 90 95

Asp Gly Thr Lys Thr Lys Ser Asn Leu Gly Ala Asn Ala Met Leu Gly
 100 105 110

Val Ser Leu Ala Val Ala Lys Ala Ala Ala Tyr Leu Asp Ile Pro
 115 120 125

Leu Tyr Arg Tyr Ile Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Val Leu Pro Val Pro
 130 135 140

Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Ser His Ser Asp Ala Pro Ile Ala
 145 150 155 160

Phe Gln Glu Phe Met Ile Arg Pro Val Gly Ala Cys Cys Phe Arg Glu
 165 170 175

Gly Leu Arg Met Gly Ala Glu Val Phe His Ala Leu Lys Lys Val Leu
 180 185 190

His Asp Arg Gly Leu Ser Thr Ala Val Gly Asp Glu Gly Gly Phe Ala
 195 200 205

Pro Ala Leu Asn Gly Thr Glu Asp Ala Ile Glu Ser Ile Leu Lys Ala
 210 215 220

Val Glu Ala Ala Gly Tyr Val Pro Gly Lys Asp Ile Thr Ile Ala Met

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido α -enolasa no citrulinado para su uso en un método para el tratamiento profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que lo necesite, donde dicho polipéptido α -enolasa no citrulinado comprende:
- 5 una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia de aminoácidos que se extiende desde la posición 5 a la posición 21 en SEC ID N°: 1, la secuencia de aminoácidos que se extiende desde la posición 6 a la posición 21 en SEC ID N°: 2 y la secuencia de aminoácidos que se extiende desde la posición 5 a la posición 21 en SEC ID N°: 3; o
- 10 una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de CKIHAREIFDSRGNPTVEC (SEC ID N°: 4), CIHAREIFDSRGNPTVEC (SEC ID N°: 5) y CKIIGREILDSRGNPTVEC (SEQ ID N°: 6), que está ciclado mediante un enlace disulfuro entre los dos restos de cisteína.
2. El polipéptido α -enolasa no citrulinado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste de la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 1 o los aminoácidos SEC ID N°: 2, o una variante conservativa de función del mismo, que tenga al menos el 60 % de identidad de aminoácidos con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2.
- 15
3. El polipéptido α -enolasa no citrulinado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.

a-enolasa de Homo sapiens 434 aa (SEC ID N°: 1):

MSILKIHAREIFDSRGNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIYEALELRDNDKTRY
MGKGVSKAVEHINKTIAPALVSKKLVNTEQEKIDKLMIEDMGTENKSKFGANAILGV
SLAVCKAGAVEKGVPLYRHIADLAGNSEVILPVPFNVINGGSHAGNKLAMQEFMIL
PVGAA NFREAMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGKD ATNVGDEGGFAPNILENKEGLELL
KTAIGKAGYTDKVVIGMDVAASEFFRSGKYDLDFKSPDDPSRYISPDQLADLYKSF
IKDYPVVSIEDPFDQDDWGA WQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKSCNCLL
LKV NQIGSVTESLQACKLAQANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAP
CRSERLAKYNQLLRIEELGSKAKFAGRNFRNPLAK

a-enolasa Mus musculus 434 aa (SEC ID N°: 2):

MSILRIHAREIFDSRGNPTVEVDLYTAKGLFRAAVPSGASTGIYEALELRDNDKTRF
MGKGV SQAVEHINKTIAPALVSKKVVVEQEKIDKLMIEDMGTENKSKFGANAILGV
SLAVCKAGAVEKGVPLYRHIADLAGNPEVILPVPFNVINGGSHAGNKLAMQEFMIL
PVGASSFREAMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGKD ATNVGDEGGFAPNILENKEALELLK
TAIAKAGYTDQVVIGMDVAASEFYRSGKYDLDFKSPDDPSRYITPDQLADLYKSFVQ
NYPVVSIEDPFDQDDWGA WQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAASEKSCNCLL
KVNQIGSVTESLQACKLAQSNWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPC
R SERLAKYNQILRIEELGSKAKFAGRSFRNPLAK

a-enolasa Porphyromonas gingivalis 425 aa (SEC ID N°: 3):

MEIAKIIGREILDSRGNPTVEVDVHLACGIIGRAAVPSGASTGENEAIELRDQDKARY
CGKGV LKAVKNVNEVIDPALCGMSVLEQTAIDRKLIELDGTKTKSNLGANAMLGVS
LAVAKAAAAYLDIPLYRYIGGSNTYVLPVPMMNIIINGGSHSDAPIAFQEFMIRPVGAC
CFREGLRMGAEVFHALKKVLHDRGLSTAVGDEGGFAPALNGTEDAIESILKAVEAAG
YVPGKDITIAMDCASSEFFKDGIDYTKFEGEKGGKRSIDEQVAYLTEL VGKYPIDSIE
DGMSENDWEGWKKLTVALGDKVQLVGGDLFVTNVEFLRRGIAEKCGNSILIKVNQI
GTLTETLNAIEMAHRHGFTSVTSHRSGETEDTTIADIAVATNSGQIKTGSLSRTRMA
KYNQLLRIEELGPCAVYGYKKV

Figura 1

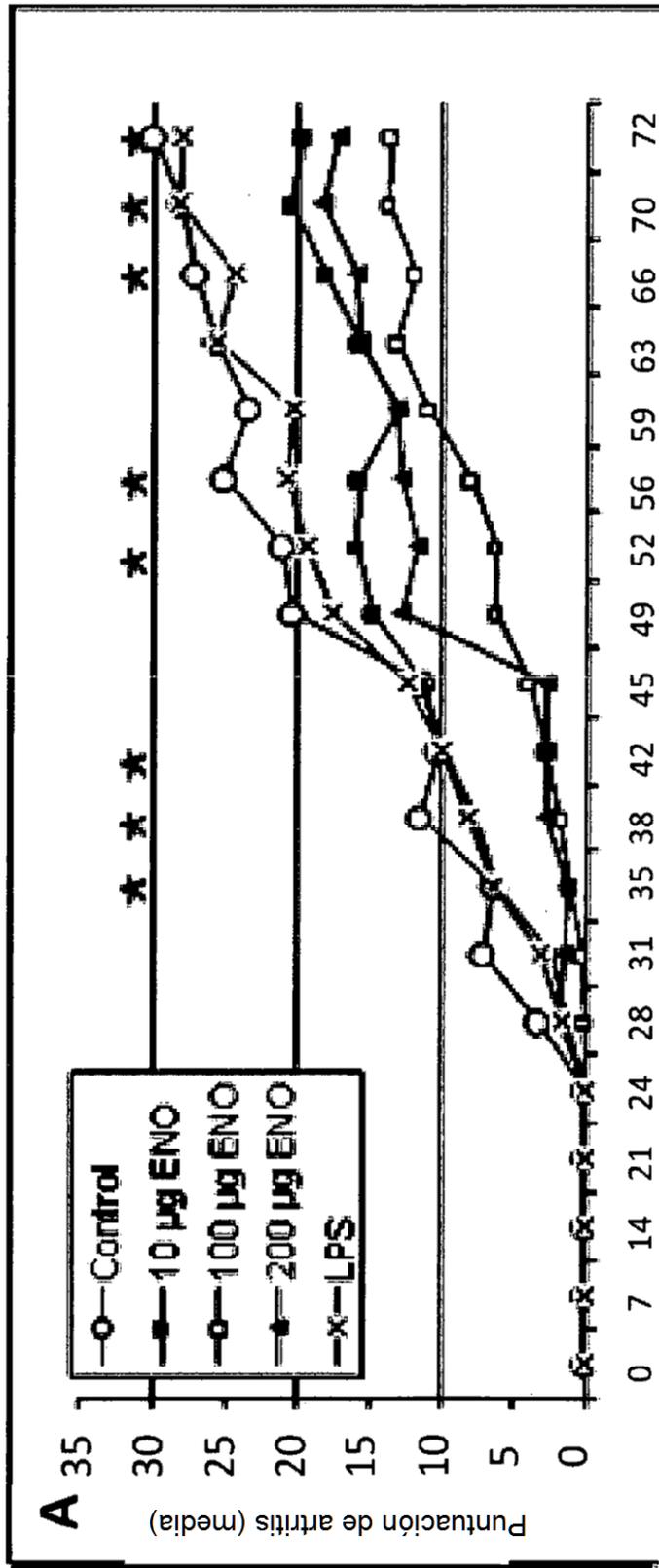


Figura 2A

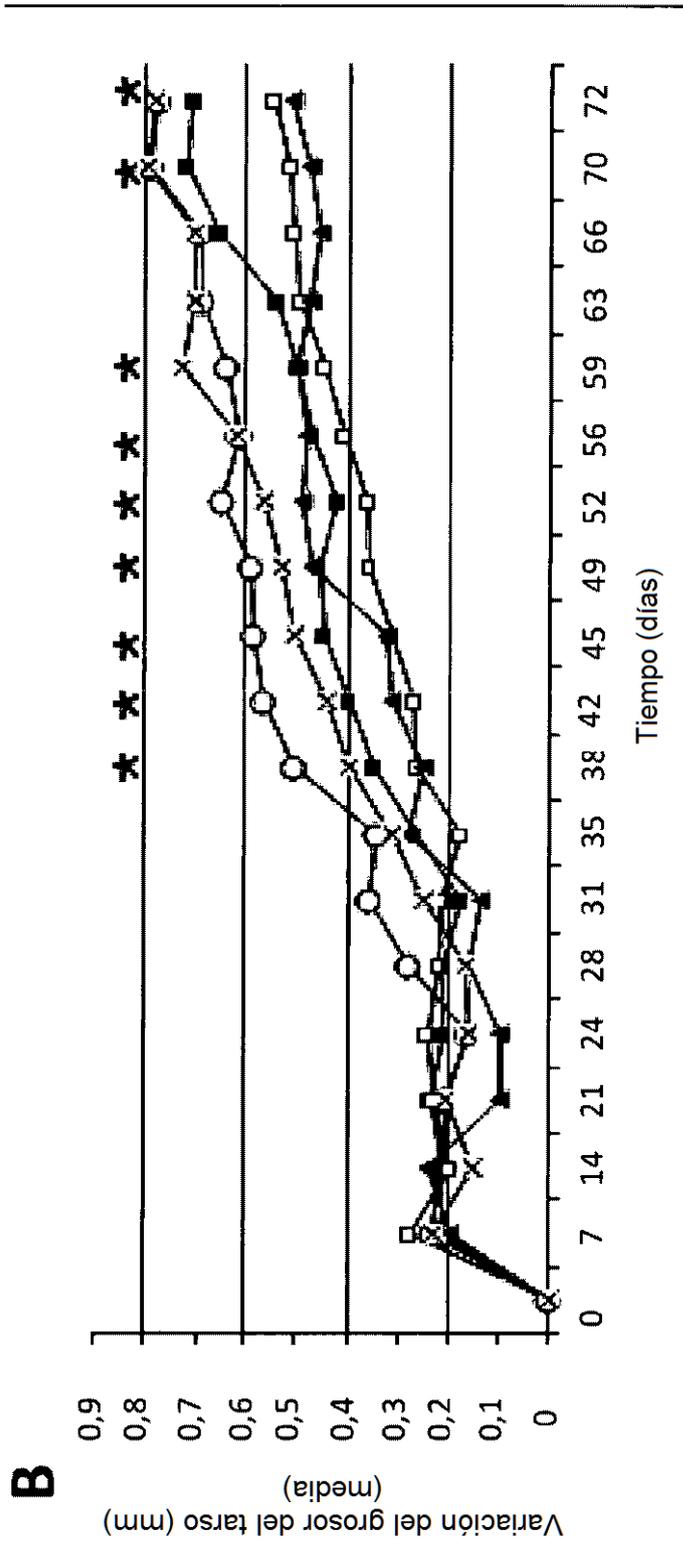


Figura 2B

Puntuación clínica: pEP1 (1, 10 µg) frente a PBS

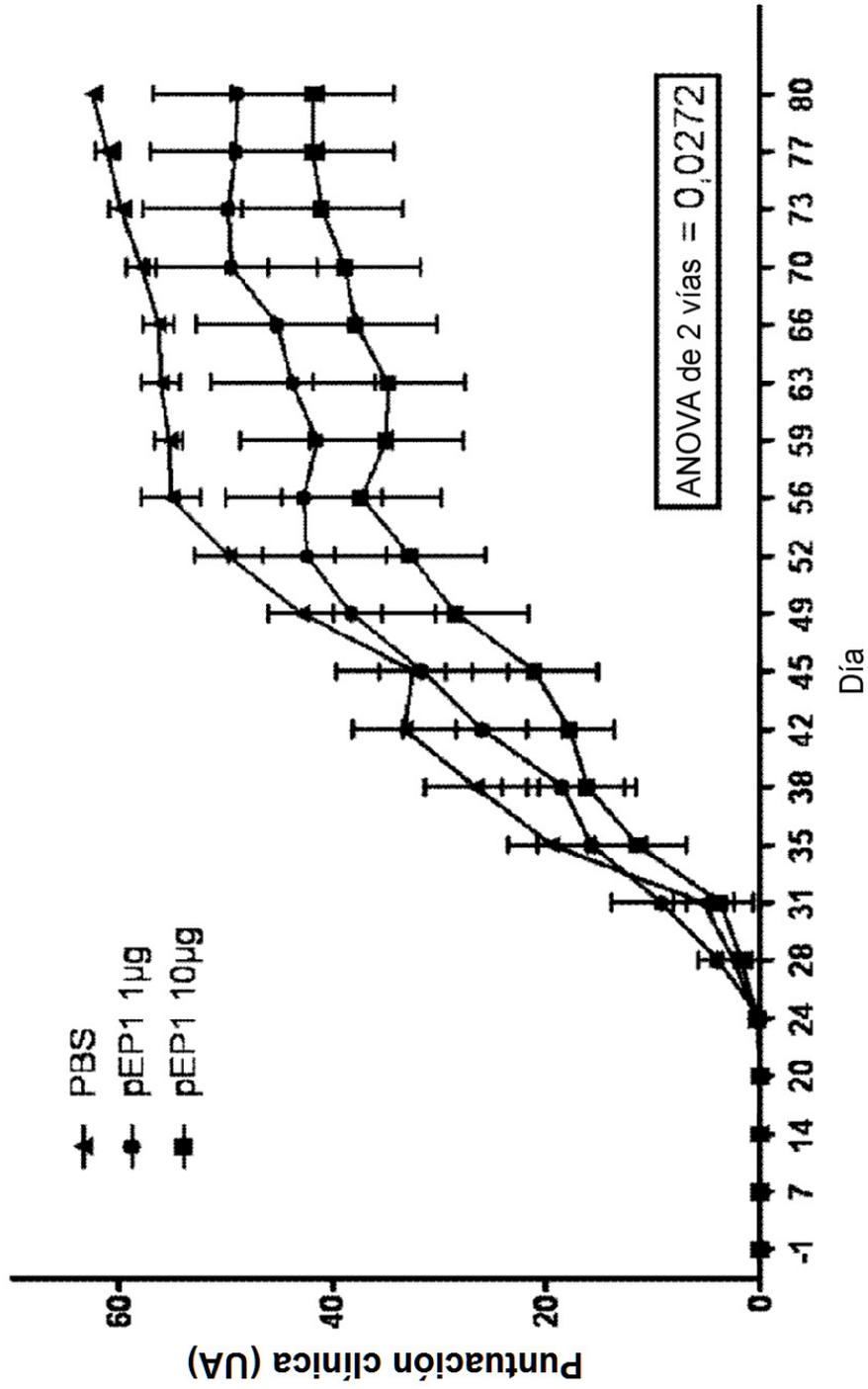


Figura 3

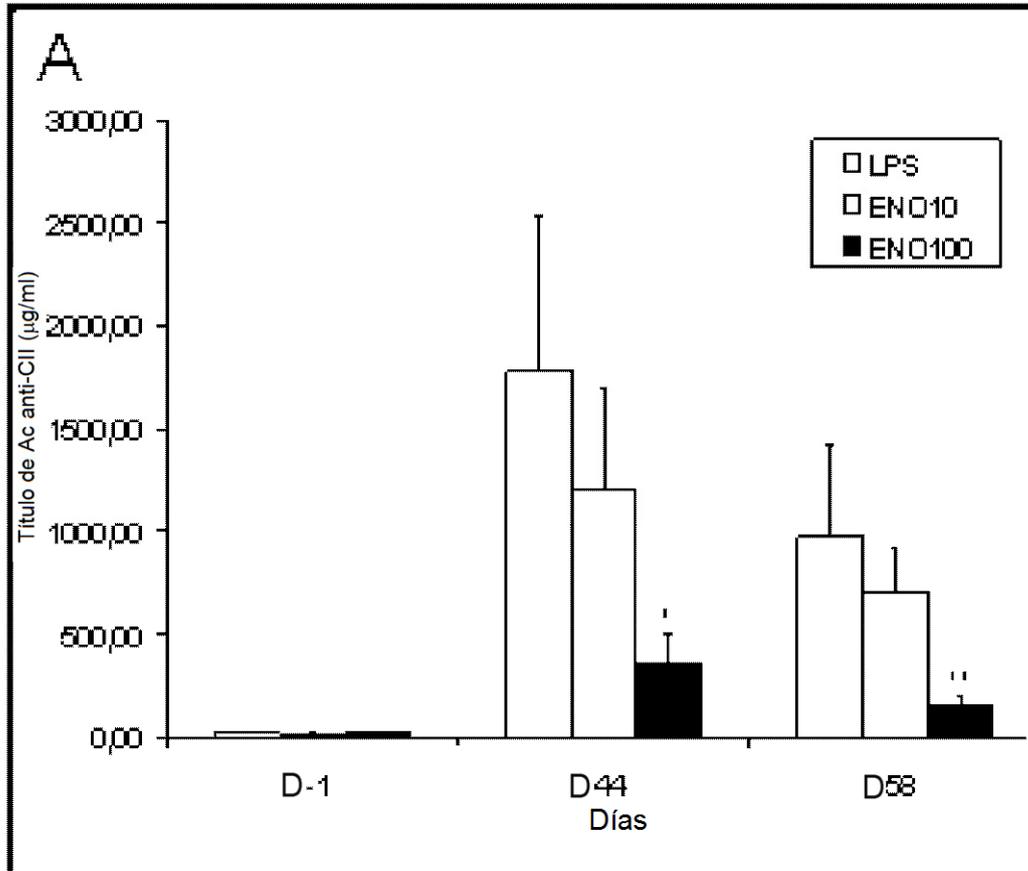


Figura 4A

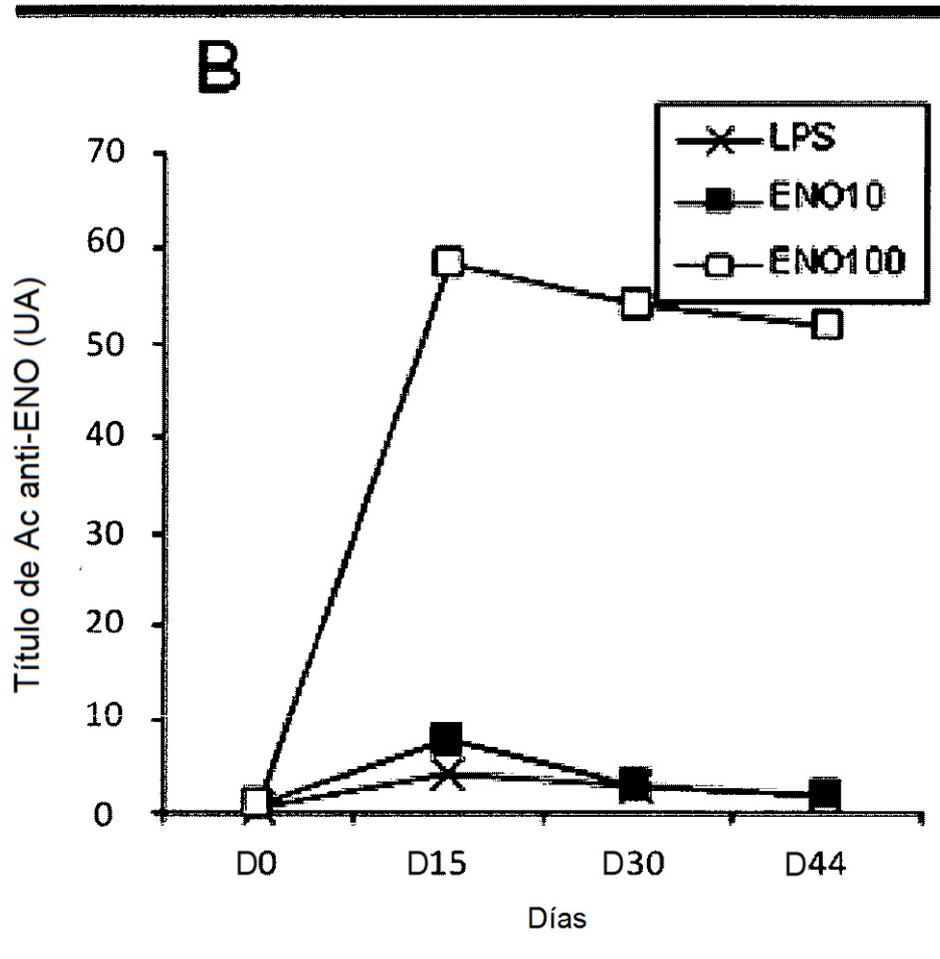


Figura 4B