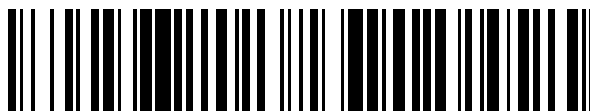


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 711**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/35** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**A61P 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2011 E 11836713 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2633054**

54 Título: **Nuevas composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y alérgicas**

30 Prioridad:

**28.10.2010 SE 1051122**

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

**29.07.2016**

73 Titular/es:

**TOLERANZIA AB (100.0%)  
Erik Dahlbergsgatan 11A  
411 26 Gothenburg, SE**

72 Inventor/es:

**LYCKE, NILS**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**Observaciones :**

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

**ES 2 578 711 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

Nuevas composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y alérgicas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a los campos de inmunología y medicina. La presente invención proporciona métodos mejorados y composiciones para el tratamiento y la prevención de enfermedades autoinmunes y alérgicas. Más específicamente, la invención se refiere a nuevos complejos inmunomoduladores que son proteínas de fusión que comprenden subunidades mutantes de endotoxinas bacterianas, un péptido capaz de unirse a un receptor celular específico, y uno o más epítomos que provocan alergia o autoantígenos asociados con una enfermedad autoinmune o alérgica.

10 Antecedentes

Enfermedad autoinmune y modulación de la respuesta inmune

15 La enfermedad autoinmune es cualquier enfermedad causada por células inmunes que se convierten en mal dirigidas en células y/o tejidos del cuerpo sanos. Enfermedad autoinmune afecta a 3% de la población de los Estados Unidos, y es probable un porcentaje similar de la población mundial industrializada (Jacobson et al., Clin Immunol Immunopathol 84: 223-43, 1997). Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por los linfocitos T y B que se dirigen de forma aberrante a autoproteínas, -polipéptidos, -péptidos, y/u otras automoléculas, causando lesiones y o mal funcionamiento de un órgano, tejido, o tipo de célula dentro del cuerpo (por ejemplo, páncreas, cerebro, tiroides o tracto gastrointestinal) para causar las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Marrack et al., Nat Med 7: 899-905, 2001). Las enfermedades autoinmunes incluyen enfermedades que afectan a tejidos específicos, así como enfermedades que pueden afectar múltiples tejidos. Para algunas enfermedades, esto puede, en parte, depender de si las respuestas autoinmunes se dirigen a un antígeno limitado a un tejido particular, o a un antígeno que se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo. El rasgo característico de la autoinmunidad específica de tejido es la dirección selectiva de un solo tejido o tipo de célula individual. Sin embargo, ciertas enfermedades autoinmunes que se dirigen a las autoproteínas ubicuas también pueden afectar a tejidos específicos. Por ejemplo, en la polimiositis, la respuesta autoinmune se dirige a la proteína ubicua histidil-ARNt sintetasa, sin embargo, las manifestaciones clínicas implican principalmente la destrucción autoinmune de músculo.

20 El sistema inmunitario emplea un mecanismo muy complejo diseñado para generar respuestas para proteger a los mamíferos contra una variedad de patógenos foráneos, mientras que al mismo tiempo previenen las respuestas contra autoantígenos. Además de decidir si responder (especificidad de antígeno), el sistema inmune también debe elegir las funciones efectoras apropiadas para hacer frente a cada patógeno (especificidad efectora). Una célula fundamental en la mediación y la regulación de estas funciones efectoras es la célula T CD4+. Adicionalmente, es la elaboración de citocinas específicas de las células T CD4+ que parece ser el principal mecanismo por el cual las células T median sus funciones. Por lo tanto, la caracterización de los tipos de citoquinas producidas por las células T CD4+ así como cómo se controla su secreción es extremadamente importante en la comprensión de cómo se regula la respuesta inmune.

30 La caracterización de la producción de citoquinas de clones de células T CD4+ de ratón a largo plazo se publicó por primera vez hace más de 20 años (Mosmann et al., J Immunol 136: 2348- 2357, 1986). En estos estudios, se demostró que las células T CD4+ producen dos patrones distintos de la producción de citoquinas, que se designan células T auxiliares 1 (Th1) y T auxiliares 2 (Th2). Se encontró que las células Th1 producen interleucina-2 (IL-2), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y linfoxina (LT), mientras que los clones Th2 predominantemente producen IL-4, IL-5, IL-6, e IL-13 (Cherwinski et al., J Exp Med 169:1229-1244, 1987). Algo más tarde, las citoquinas adicionales, IL-9 e IL-10, se aislaron a partir de clones Th2 (Van Snick et al., J Exp Med 169:363-368, 1989) (Fiorentino et al., J Exp Med 170:2081-2095, 1989). Por último, se encontró que las citoquinas adicionales, tales como IL-3, factor de estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor- $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) se secretan tanto por células Th1 como Th2. Recientemente, se informó de que las células T CD4+ aisladas a partir de las articulaciones inflamadas de pacientes con la enfermedad de Lyme contienen un subconjunto de células T CD4+ productoras de IL-17 que son distintas de Th1 y Th2 (Infante-Duarte et al., J. Immunol 165:6107-6115, 2000). Estas células T CD4+ productoras de IL-17 se designan Th17. IL-17, una citoquina proinflamatoria producida principalmente por células T activadas, mejora la imprimación de células T y estimula fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y células epiteliales para producir múltiples mediadores proinflamatorios, incluyendo IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , NOS-2, metaloproteasas, y quimiocinas, lo que resulta en la inducción de la inflamación. La expresión de IL-17 se aumenta en pacientes con una variedad de enfermedades alérgicas y autoinmunes, tales como RA, MS, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), y asma, lo que sugiere la contribución de la IL-17 a la inducción y/o desarrollo de dichas enfermedades.

45 Existe una amplia evidencia que muestra que las células T supresoras, ahora llamadas células T reguladoras (células Treg), suprimen las células T autorreactivas como un mecanismo activo de la tolerancia inmune periférica. Hasta el momento, se ha establecido firmemente que las células Treg se pueden dividir en dos subtipos diferentes, a saber, las poblaciones naturales (o constitutivas) e inducible (o adaptativas) de acuerdo con sus orígenes (Mills, Nat Rev Immunol

4:841-855, 2004). Además, una variedad de subconjuntos de células Treg se han identificado de acuerdo a sus marcadores de superficie o productos de citoquinas, tales como células Treg CD4+ (incluyendo las células naturales Treg CD4+CD25+, células Tr1 productoras de IL-10, y células Th3 productoras de TGF- $\beta$ ), células Treg CD8+, células Veto CD8+, células  $\gamma\delta$ T, células NKT (NK1.1+CD4-CD8), células NK1.1- CD4-CD8-, etc. La acumulación de pruebas ha demostrado que las células Treg CD4+CD25+ de origen natural desempeñan un papel activo en inhibición de la expresión de las respuestas autoinmunes patógenos y en el mantenimiento de la homeostasis inmune (Akbari et al, *Curr Opin Immunol.* 15: 627-633, 2003).

La enfermedad autoinmune abarca un amplio espectro de enfermedades que pueden afectar a muchos órganos y tejidos diferentes dentro del cuerpo (véase, por ejemplo, Paul, W.E. (1999), *Fundamental Immunology*, Fourth Edition, Lippincott-Raven, New York.)

Las terapias actuales para la enfermedad autoinmune humana incluyen glucocorticoides, agentes citotóxicos, y agentes terapéuticos biológicos recientemente desarrollados. En general, el manejo de la enfermedad autoinmune sistémica humana es empírica y poco satisfactoria. En su mayor parte, los fármacos inmunosupresores en términos generales, tales como corticosteroides, se utilizan en una amplia variedad de trastornos autoinmunes e inflamatorias graves. Además de los corticosteroides, otros agentes inmunosupresores se utilizan en el manejo de las enfermedades autoinmunes sistémicas. La ciclofosfamida es un agente alquilante que causa profundo agotamiento de ambos linfocitos T y B y el deterioro de la inmunidad mediada por células. La ciclosporina, tacrolimus, y micofenolato de mofetilo son productos naturales con propiedades específicas de la supresión de los linfocitos T, y se han utilizado para tratar el lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (RA) y, en una medida limitada, vasculitis y miositis. Estos fármacos están asociados con la toxicidad renal significativa. El metotrexato también se usa como un agente de "segunda línea" en la RA, con el objetivo de reducir la progresión de la enfermedad. También se utiliza en la polimiositis y otras enfermedades del tejido conectivo. Otros enfoques que se han probado incluyen anticuerpos monoclonales destinados para bloquear la acción de citoquinas o para agotar linfocitos (Fox, *Am J Med* 99:82-88, 1995). Los tratamientos para la esclerosis múltiple (MS) incluyen interferón  $\beta$  y copolímero 1, lo que reduce la tasa de recaídas en un 20-30% y sólo tienen un impacto modesto sobre la progresión de la enfermedad. MS también es tratada con agentes inmunosupresores, incluyendo metilprednisolona, otros esteroides, metotrexato, cladribina y ciclofosfamida. Estos agentes inmunosupresores tienen una eficacia mínima en el tratamiento de MS. La introducción del anticuerpo Tysabri (natalizumab), un antagonista alfa-4 integrina, como tratamiento para MS ha sido eclipsada por incidencias de leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML) en pacientes que reciben la terapia. La terapia actual para RA utiliza agentes que no suprimen específicamente o modulan la función inmune, tales como metotrexato, sulfasalazina, hidroxicloroquina, leflunomida, prednisona, así como los antagonistas TNF $\alpha$  recientemente desarrollados etanercept e infliximab (Moreland et al, *J Rheumatol* 28.: 1431-1452, 2001). Etanercept e infliximab a nivel mundial bloquean TNF $\alpha$ , haciendo los pacientes más susceptibles a la muerte por sepsis, agravamiento de las infecciones micobacterianas crónicas, y el desarrollo de eventos desmielinizantes.

En el caso de la autoinmunidad específica de órgano, una serie de diferentes enfoques terapéuticos han sido juzgados. Antígenos de proteínas solubles se han administrado sistémicamente para inhibir la respuesta inmune posterior a ese antígeno. Tales terapias incluyen la entrega de la proteína básica de la mielina, su péptido dominante, o una mezcla de proteínas de la mielina a los animales con encefalomiелitis autoinmune experimental y los seres humanos con esclerosis múltiple (Brocke et al., *Nature* 379: 343-6, 1996; Critchfield et al., *Science* 263: 1139-43, 1994; Weiner et al., *Annu Rev Immunol* 12: 809-37, 1994), administración de colágeno de tipo II o una mezcla de proteínas de colágeno a los animales con artritis inducida por colágeno y seres humanos con artritis reumatoide (Gumanovskaya et al., *Immunology* 91: 466-73, 1999; McKown et al., *Arthritis Rheum* 42: 1204-8, 1999; Trentham et al., *Science* 261: 1727-30, 1993), entrega de insulina a los animales y los seres humanos con diabetes autoinmune (Pozzilli and Gisella Cavallo, *Diabetes Metab Res Rev* 16: 306-7, 2000), y la entrega de antígeno S a animales y seres humanos con uveítis autoinmune (Nussenblatt et al., *Am J Ophthalmol* 123: 583-92, 1997). Otro enfoque es el intento de diseñar estrategias terapéuticas racionales para la administración sistémica de un antígeno de péptido basado en la interacción específica entre los receptores de las células T y péptidos unidos a moléculas MHC. Un estudio utilizando el enfoque de péptido en un modelo animal de diabetes resultó en el desarrollo de la producción de anticuerpos para el péptido (Hurtenbach et al., *J Exp Med* 177:1499, 1993). Otro enfoque es la administración de inmunización con péptidos del receptor de células T (TCR) (véase, por ejemplo, Vandenbark et al., *Nature* 341:541, 1989). Otro enfoque es la inducción de la tolerancia oral por la ingestión de antígenos de péptidos o proteínas (véase, Weiner, *Immunol Today* 18:335, 1997).

La tolerancia de la mucosa se refiere al fenómeno de la tolerancia sistémica a desafiar con un antígeno que ha sido previamente administrado a través de una vía mucosal, por lo general por vía oral, nasal o naso-respiratorio, sino también vaginal y rectal (Weiner et al., *Annu Rev Immunol* 12:809-837, 1994). La tolerancia de la mucosa fue descubierto a principios del siglo 20 en los modelos de tipo retardado y las reacciones de hipersensibilidad de contacto en cobayas, pero los mecanismos de tolerancia permaneció mal definidos hasta la era de la inmunología moderna. El uso de técnicas de separación de células, pruebas de la producción de citoquinas y modelos transgénicos en los que las células T específicas de antígeno pueden ser rastreadas in vivo han elucidado gradualmente mecanismos de tolerancia de la mucosa (Garside and Mowat., *Crit Rev Immunol* 17:119-137, 1997). Se ha hecho evidente que la administración del antígeno a través de vías mucosas puede resultar en distintos tipos de tolerancia, dependiendo de la ruta de administración y la dosis de antígeno. Por ejemplo, una alta dosis de antígeno por vía oral induce la activación de

células T seguido por delección o anergia de las células T respondedoras (Chen et al., Nature 376:177-180, 1995), análogas a la administración parenteral de antígeno soluble de dosis alta. Esto resulta en la extinción de las células T específicas a ese antígeno y la falta de respuesta a la exposición al antígeno posterior, esto es, tolerancia pasiva. Por el contrario, una dosis baja de antígeno por vía oral no induce delección o anergia, pero, cuando se administra repetidamente, induce un tipo distinto de la respuesta inmune caracterizada por la aparición de células T reguladoras protectoras, células Treg, que secretan citoquinas anti-inflamatorias, esto es, tolerancia activa (von Herrath, Res Immunol. 148:541-554, 1997). Estas células Treg generalmente pertenecen a la clase de células T CD4 (auxiliares). La instilación de antígeno de proteína intacta sobre la mucosa nasofaríngea también induce a las células Treg que son de protección. En este caso, las células T tanto CD4 como CD8 pueden ser inducidas. Las células Treg reguladoras inducidas después de la administración de antígeno oral o intranasal producen citoquinas anti-inflamatorias tales como IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ . Para inducir la tolerancia de la mucosa, el antígeno también se puede administrar en forma de aerosol. La administración a través de estas tres rutas, oral, intranasal e inhalación de aerosol, se traduce en la captación y presentación de antígenos en diferentes compartimentos linfoides en cada caso. De acuerdo con lo anterior, el antígeno por vía oral se presenta a las células T en su mayoría en los ganglios linfáticos mesentéricos y en cierta medida en las placas de Peyer, antígeno intranasal en ganglios linfáticos cervicales profundos y antígeno inhalado en los ganglios linfáticos mediastínicos. La exposición repetida al antígeno en cada caso es capaz de inducir células T reguladoras, pero la naturaleza de estas células difiere, dependiendo de la ruta y forma de antígeno. Mientras que las células reguladoras inducidas por el antígeno oral son las células T CD4 y expresan los receptores de células T (TCR) que consiste en heterodímeros  $\alpha\beta$ , en el caso de antígeno naso-respiratorio, las células reguladoras también pueden ser células T CD8 que expresan un TCR heterodímero  $\gamma\delta$  (esto es, células T $\gamma\delta$ ). Algunas de estas células también pueden tener un receptor CD8 que es un homodímero  $\alpha\alpha$  en lugar del TCR heterodímero  $\alpha\beta$  convencional. La mayoría de las células que llevan el CD8 $\alpha\alpha$  y TCR $\gamma\delta$  residen en la piel o tejidos de mucosas.

En las últimas décadas, ha habido un aumento significativo tanto en la incidencia como la prevalencia de las enfermedades alérgicas en los países occidentales. La rinitis alérgica es la más común de estas enfermedades, que afecta a 15 a 20% de la población. La reacción alérgica es provocada por entrecruzamiento mediado por alérgeno de IgE específica en la superficie de los mastocitos y basófilos, conduciendo a la liberación de histamina y otros mediadores, lo que provoca una reacción alérgica aguda, seguido por una reacción de fase tardía caracterizada por una afluencia de eosinófilos, neutrófilos y células Th2 que producen IL-4, IL-5 y 1L-13.

La inmunoterapia específica (SIT) se reconoce como un tratamiento eficaz de la rinitis alérgica. Tradicionalmente, SIT se ha llevado a cabo mediante la administración subcutánea repetida de pequeñas cantidades de alérgeno específico. Aunque esta forma de tratamiento puede ser una opción terapéutica eficaz, existen preocupaciones con la seguridad de esta forma de inmunoterapia, así como con la dificultad de estandarizar el extracto de alérgeno utilizado como vacuna. Por consiguiente, hay un fuerte interés en el desarrollo de tratamientos alternativos y novedosos contra las enfermedades alérgicas. Uno de los enfoques es la utilización de las vacunas mucosas (Widermann, Curr Drug Targets Inflamm Allergy 4, 577-583, 2005). Otras alternativas se basan en el uso de derivados de alérgenos con reducción o no alergenicidad como vacunas (Vrtala et al., Methods 32, 313-320, 2004). Estos incluyen alérgenos obtenidos por ingeniería de proteínas y péptidos sintéticos que representan epítomos de células T inmunodominantes de alérgenos. Por ejemplo, Ole e1 ha sido identificado como el alérgeno más relevante de polen de oliva (Wheeler et al., Mol Immunol 27,631-636, 1990).

Las respuestas inmunes están actualmente alteradas por polipéptidos de entrega, solos o en combinación con adyuvantes (agentes inmunomoduladores). Por ejemplo, la vacuna del virus de la hepatitis B contiene antígeno de superficie del virus de la hepatitis B recombinante, un no-auto antígeno, formulado en hidróxido de aluminio, que sirve como un adyuvante. Esta vacuna induce una respuesta inmune contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B para proteger contra la infección. Un enfoque alternativo implica la entrega de una forma atenuada, deficiente en replicación, y/o no patógena de un virus o bacteria, cada un no-auto antígeno, para provocar una respuesta inmune protectora del huésped contra el patógeno. Por ejemplo, la vacuna oral contra la poliomielitis se compone de un virus vivo atenuado, un no-auto antígeno, que infecta a las células y se replica en el individuo vacunado para inducir una inmunidad eficaz contra el virus de la polio, un foráneo o no-auto antígeno, sin causar enfermedad clínica. Alternativamente, la vacuna de la polio inactivada contiene un virus inactivado o "muerto" que es incapaz de infectar o replicarse y se administra por vía subcutánea para inducir inmunidad protectora contra el virus de la polio.

Las terapias de ADN se han descrito para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Tales terapias de ADN incluyen moléculas de ADN que codifican las regiones de unión a antígeno del receptor de células T para alterar los niveles de células T autorreactivas que impulsan la respuesta autoinmune (Waisman et al., Nat Med 2:899-905, 1996; la Patente de los Estados Unidos 5,939,400). Moléculas de ADN que codifican autoantígenos estaban unidos a las partículas y se entregan por pistola de genes a la piel para evitar la artritis inducida por MS y colágeno. (WO 97/46253; Ramshaw et al., Immunol Cell Biol 75:409-413, 1997). Moléculas de ADN que codifican las moléculas de adhesión, citoquinas (por ejemplo, TNF $\alpha$ ), quimiocinas (por ejemplo, quimiocinas CC), y otras moléculas inmunes (por ejemplo, Fas-ligando) se han utilizado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes en modelos animales (Youssef et al., J Clin Invest 106:361-371, 2000; Wildbaum et al., J Clin Invest 106:671-679, 2000; Wildbaum et al., J Immunol 165:5860-5866, 2000).

Los métodos para tratar la enfermedad autoinmune por la administración de un ácido nucleico que codifica uno o más autoantígenos se describen en WO 00/53019, WO 2003/045316 y WO 2004/047734. Si bien estos métodos han tenido éxito, todavía se necesitan más mejoras.

5 Se utilizan enterotoxinas bacterianas como adyuvantes inmunoestimulantes en las vacunas para la prevención de enfermedades infecciosas. La toxina del cólera (CT) y la estrechamente relacionada toxina lábil al calor E. coli (LT) son quizás los adyuvantes de la mucosa más potentes y mejor estudiados en el uso experimental de hoy (Rappuoli et al., Immunol Today 20:493-500), pero cuando se utiliza en la clínica, su potencial toxicidad y la asociación con los casos de parálisis de Bell (parálisis del nervio facial) han dado lugar a su retirada del mercado (Gluck et al., J Infect Dis 181: 1129-1132, 2000; Gluck et al., Vaccine 20 (Suppl.1):S42-44, 2001; Mutsch et al., N Engl J Med. 350: 896-903, 2004).

10 Las enterotoxinas bacterianas CT y LT han demostrado ser eficaces inmunopotenciadores en animales de experimentación, así como en los seres humanos (Freytag et al., Curr Top Microbiol Immunol 236: 215-236, 1999). Estructuralmente, estas enterotoxinas son complejos de AB<sub>5</sub>, y consisten en una subunidad A1 ADP-ribosiltransferasa activa y una subunidad A2 que une la A1 a un pentámero de subunidades B. Los holotoxinas se unen a la mayoría de las células de mamífero a través de la subunidad B (CTB), que interactúa específicamente con el receptor de gangliósido GM1 en la membrana celular. Considerando que se han encontrado que las holotoxinas mejoran las respuestas inmunitarias de las mucosas, conjugadas entre CTB y el antígeno se han usado para inducir tolerancia específica del sistema inmune (Holmgren et al., Am J Trop Med Hyg 50: 42-54, 1994). Los estudios en ratones han demostrado que la CT y LT se pueden acumular en el nervio y bulbo olfatorio cuando se administra por vía intranasal, un mecanismo que depende de la capacidad de las subunidades B de CT o LT para unirse a receptores de gangliósido GM1, presente en todas las células de mamíferos nucleadas (Fujihashi et al., Vaccine 20: 2431-2438, 2002). Aunque los mutantes menos tóxicos de CT y LT han sido diseñados con la función adyuvante sustancial, tales moléculas aún tienen un riesgo significativo de causar reacciones adversas (Giuliani et al., J Exp Med 187: 1123-1132, 1998; Yamamoto et al., J Exp Med 185: 1203-1210, 1997), especialmente cuando se considera que la capacidad adyuvante de CT y LT parece ser una combinación de la actividad de ADP-ribosiltransferasa de la subunidad A y la capacidad de unirse a receptores de gangliósidos en las células diana (Soriani et al., Microbiology 148:667-676, 2002). Estas observaciones y otras impiden el uso de holotoxinas CT o LT en las vacunas para los seres humanos. Por otra parte, las observaciones recientes han demostrado que es posible retener las funciones adyuvantes de estas moléculas sin toxicidad o muy reducida toxicidad por la introducción de mutaciones de localización dirigida en el gen que codifica para la subunidad A1. Ejemplos de moléculas mutantes que han demostrado ser adyuvantes eficaces son LTK63 y LTR72 (Giuliani et al., J Exp Med 187: 1123-1132, 1998), el primero sin actividad enzimática y el segundo con capacidad de ribosilación de ADP reducida significativamente. A pesar de esto, la unión dependiente del receptor gangliósido GM1 sigue siendo un problema en estos mutantes, y por lo tanto todavía puede causar acumulación de las células nerviosas y neurotoxicidad.

Una mejor solución a este dilema de la eficacia frente a toxicidad es la molécula CTA1-DD que ha demostrado ser una de la mucosa muy eficaz y adyuvante sistémico (Agren et al., J Immunol 158: 3936-3946, 1997; US 5,917,026). Este adyuvante único se basa en la subunidad A1 enzimáticamente activa de CT, en combinación con un dímero de un elemento de unión de la inmunoglobulina de la proteína A de Staphylococcus aureus. La molécula de este modo evita la unión a todas las células nucleadas, lo que podría dar lugar a reacciones no deseadas, y explota plenamente la enzima de CTA1 en la holotoxina. De acuerdo con lo anterior, todos los estudios realizados hasta la fecha han encontrado que CTA1-DD no es tóxica y ha conservado excelentes funciones inmunopotenciadoras. Cuando se administra sistémicamente, CTA1-DD proporciona un efecto adyuvante comparable al de CT intacta, aumentando en gran medida la inmunidad tanto celular como humoral contra inmunógenos específicos coadministrados con el adyuvante. También funciona como un adyuvante de la mucosa y debe ser seguro, ya que carece de la subunidad B que es un requisito previo de la toxicidad holotoxina de CT. CTA1-DD no puede unirse a los receptores de gangliósidos; más bien, se dirige a las células B, lo que limita el adyuvante de CTA1-DD a un repertorio limitado de células que puede interactuar. Sin embargo, el efecto adyuvante no es completamente dependiente de las células B, como se muestra en la fuerte inducción de la inmunidad específica de células T CD4 después de las inmunizaciones intranasales utilizando el adyuvante CTA1-DD en ratones con deficiencia de células B (Eliasson et al., Vaccine 25: 1243-52, 2008, Akhiani et al., Scand J. Immunol 63: 97-105, 2006).

50 El efecto adyuvante de CTA1-DD estuvo ausente en los mutantes CTA1-E112K-DD y CTA1-R7K-DD, que carecen la actividad enzimática de ribosilación de ADP (Lycke, Immunol Lett 97: 193-198, 2005).

WO 2009/078796 describe además complejos inmunomoduladores que comprenden el mutante CTA1-R7K-DD, y más específicamente los complejos inmunomoduladores que comprenden CTA1-R7K-DD unido al péptido de colágeno II inmunodominante compartido que comprende los aminoácidos 260-273 (CII260-273).

55 Un conjugado de CTB y un péptido derivado de colágeno II de bovino ha demostrado ser capaz de proteger a los ratones de desarrollar una enfermedad del oído autoinmune inducida por colágeno, así como la artritis inducida por colágeno (Kim et al., Ann Otol Rhinol Laryngol 110: 646-654, 2001; Tarkowski et al., Arthritis Rheum 42: 1628-34, 1999). Sin embargo, CTB puede no ser apropiado para uso humano debido a sus propiedades de unión de gangliósido GM1 y posibles efectos neurotóxicos, como se discutió anteriormente.

60 Los complejos inmunomoduladores de la presente invención difieren de los complejos inmunomoduladores que comprenden el mutante CTA1-R7K-DD de acuerdo con WO 2009/078796 al menos en que el aminoácido 187 se ha

cambiado a partir de cisteína a alanina y, opcionalmente, en que un residuo de lisina, además, se ha insertado en el terminal N de la subunidad CTA1 1 mutante.

5 Los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que una sustitución adicional del aminoácido 187 cisteína por una alanina de los complejos inmunomoduladores que comprenden el mutante CTA1-R7K-DD de acuerdo con WO 2009/078796, y en particular los complejos inmunomoduladores que comprende CTA1-R7K-DD unido al péptido de colágeno II inmunodominante común, proporciona un efecto terapéutico mejorado de forma significativa sobre la artritis, con significativamente menor incidencia y gravedad de la artritis en ratones.

10 Sin limitarse a la teoría, el mecanismo detrás de la sorprendente mejora en el efecto terapéutico de la CTA1-R7K/C187A-DD de acuerdo con la presente invención en comparación con CTA1-R/K-DD de acuerdo con WO 2009/078796 parecería explicable por el hecho de que la sustitución del aminoácido 187 cisteína por alanina suprime la formación de dímeros a través de enlaces disulfuro.

15 A priori se desconocía si la obtención de un efecto terapéutico sería dependiente de al menos algunos o incluso un grado sustancial de la dimerización de la proteína de fusión resultante. Por lo tanto, antes de los sorprendentes descubrimientos de los presentes inventores, no fue predecible, ya sea tratando de evitar la dimerización de hecho sería perjudicial para la actividad terapéutica de los complejos inmunomoduladores, y si hacer esta sustitución de aminoácidos daría lugar a una proteína de fusión que tiene al menos como buenos efectos terapéuticos como la construcción CTA1-R7K-DD.

20 Adicionalmente, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la inserción de un residuo de lisina en el terminal N de la proteína de fusión aumenta drásticamente la expresión y producción de la proteína de fusión, K-CTA1-R7K/C187A-DD, sin ninguna pérdida con respecto a la eficacia terapéutica de la proteína debido a mal plegamiento, translocación o degradación proteolítica. Por lo tanto, hasta ahora era desconocido si la inserción de un residuo de lisina en el terminal N sería perjudicial para la disponibilidad biológica y actividad terapéutica de la proteína de fusión (por ejemplo, debido a los efectos en el plegado, etc.), y si la inserción de lisina en el terminal N daría como resultado una proteína de fusión con al menos tan buenos efectos terapéuticos como la construcción CTA1-R7K-DD.

25 Breve descripción de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no cae dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente como información.

30 La presente invención se refiere a la mejora de los complejos inmunomoduladores y composiciones que los comprenden, así como usos de los mismos para la producción de medicamentos y en métodos para la profilaxis, prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes o alérgicas. Los complejos inmunomoduladores mejorados de acuerdo con la invención son proteínas de fusión que comprenden una subunidad mutante de la subunidad A1 de ribosilación de ADP de la toxina del cólera (CTA1), en donde en la subunidad CTA1 mutante, los aminoácidos que corresponden al aminoácido 7, arginina, y aminoácido 187, cisteína, en la CTA1 nativa han sido reemplazados con lisina en el aminoácido 7 y la alanina en el aminoácido 187, un péptido capaz de unirse a un receptor celular específico en donde dicho péptido es dímero de la subunidad D de la proteína A de Staphylococcus aureus, y uno o más epítopos asociados con la enfermedad. La administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del complejo inmunomodulador a un sujeto provoca la supresión de una respuesta inmune contra un antígeno asociado a la enfermedad, de ese modo, el tratamiento o prevención de la enfermedad.

40 El epítipo puede ser un epítipo autoinmune cuando la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad autoinmune y un epítipo que provoca alergia cuando la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad alérgica.

A continuación, se describe:

un complejo inmunomodulador que es una proteína de fusión que comprende:

(a) una subunidad mutante de la subunidad A1 de ribosilación de ADP de la toxina del cólera (CTA1),

(b) un péptido capaz de unirse a un receptor celular específico, y

45 (c) uno o más epítopos asociados con una enfermedad autoinmune o alérgica

en donde, en la subunidad CTA1 mutante, los aminoácidos que corresponden al aminoácido 7, arginina y aminoácidos 187, cisteína, en la CTA1 nativa han sido reemplazados.

En una realización preferida, el aminoácido lisina además ha sido insertado en el terminal N de la subunidad CTA1 mutante.

La proteína de fusión comprende el mutante CTA1-R7K/C187A (SEQ ID NO: 1), donde el aminoácido 7, arginina, en la secuencia CTA1 nativa ha sido sustituido por una lisina, y donde el aminoácido 187 cisteína, en la secuencia CTA1 nativa ha sido sustituido por una alanina.

5 En una realización aún más preferida, la proteína de fusión comprende el mutante K-CTA1-R7K/C187A (SEQ ID NO: 2), donde el aminoácido 7, arginina, en la secuencia CTA1 nativa ha sido sustituido por una lisina, en donde el aminoácido 187 cisteína, en la secuencia CTA1 nativa ha sido sustituido por una alanina, y el aminoácido lisina se ha insertado en el terminal N.

10 La sustitución de aminoácido 7, arginina, por una lisina suprime la actividad de ribosilación de ADP, la sustitución del aminoácido 187, cisteína, por una alanina impide la formación de dímeros, y la inserción de una lisina en el terminal N aumenta drásticamente la expresión y producción de proteína de fusión.

15 Por lo tanto, la proteína de fusión de acuerdo con la presente invención, K-CTA1-R7K/C187A, proporciona un efecto sorprendente y ventajoso en comparación con CTA1-R7K de acuerdo con WO 2009/078796. Por lo tanto, se ha encontrado sorprendentemente que el efecto terapéutico de KCTA1-R7K/C187A-COL-DD es significativamente mejor que el efecto terapéutico de CTA1-R7K-COL-DD, como se puede ver en la disminución de la gravedad e incidencia de la artritis en comparación con el grupo de control de ratones en los ensayos comparativos de los ejemplos 2 y 3.

La proteína de fusión comprende un péptido que se une específicamente a un receptor expresado en una célula capaz de presentar los antígenos, especialmente células que expresan antígeno por MHC clase I o MHC clase II. La célula presentadora de antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en linfocitos, tales como los linfocitos B, células T, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, células epiteliales y células endoteliales.

20 El péptido es un péptido que se une a los receptores de las células anteriores, preferiblemente a un receptor de Ig o Fc expresado por dicha célula presentadora de antígeno y más preferiblemente para los receptores de los linfocitos B y células dendríticas.

Ejemplos de péptidos específicos son péptidos capaces de unirse a receptores tales como:

25 (i) factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), capaz de unirse al receptor de heterodímero  $\alpha/\beta$  GM-CSF presente en monocitos, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos y células endoteliales,

(ii) CD4 y CD8, expresados en las células T que, junto con el receptor de células T (TcR), actúan como correceptores para moléculas de MHC clase I y MHC clase II, respectivamente. MHC clase I se expresa en la mayoría de células nucleadas, mientras que moléculas MHC clase II se expresan en las células dendríticas, células B, monocitos, macrófagos, mieloides y células precursoras de eritroides y algunas células epiteliales,

30 (iii) CD 28 y CTLA-4, dos proteínas homodiméricas expresadas principalmente en células T que se unen a CD80 y CD86B7 expresadas en células B,

(iv) CD40, presente principalmente en la superficie de las células B maduras que interactúan con CD40L (gp39 o CD 154) expresadas en células T,

35 (v) diferentes isotipos de las regiones constantes de cadena pesada Ig que interactúan con un número de receptores Fc de alta o baja afinidad presentes en los mastocitos, basófilos, eosinófilos, plaquetas, células dendríticas, macrófagos, células NK y células B,

(vi) receptores del complemento (CRs), CR1, CR2 y CR3, expresados en las células B y células dendríticas foliculares han demostrado ser importantes en la generación de respuestas inmunes humorales normales, y probablemente también participan en el desarrollo de autoinmunidad,

40 (vii) receptores de lectina tipo C (CLR), como el Dectin-1 expresado en células dendríticas,

(viii) DEC205, un receptor endocítico para la captación de antígeno y procesamiento expresado en altos niveles en un subconjunto de células dendríticas,

(ix) CD11c, un receptor de superficie de células de numerosos factores solubles y proteínas (LPS, fibrinógeno, iC3b) encontrado principalmente en las células mieloides,

45 (x) el receptor de manosa, presente en las células dendríticas, macrófagos y otras células presentadoras de antígenos,

(xi) el receptor HSP60 específica, presente en los macrófagos.

(xii) CD103, una cadena de integrina alfa expresada por un subconjunto de células dendríticas.

(xii) el antígeno 33D1, presente en las células dendríticas.

De acuerdo con la invención, dicho péptido está constituido por la proteína A o un fragmento del mismo en una o varias copias, tales como una o más subunidades D de los mismos. Dicho péptido puede estar constituido por un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo de una sola cadena, que se une específicamente a un receptor expresado en una célula capaz de presentar los antígenos.

El péptido es preferiblemente tal que la proteína de fusión resultante está en posesión de la solubilidad en agua y la capacidad de dirigir la proteína de fusión a un receptor celular específico diferente de los receptores de unión a la toxina nativa, mediando de este modo la captación intracelular de al menos dicha subunidad.

Los epítomos autoantigénicos se pueden asociar con una enfermedad autoinmune, tal como diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM), esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (RA), o síndrome de Sjögren (SS).

En algunas realizaciones, el epítomo autoantigénico asociado con IDDM es un epítomo derivado del grupo que consiste en: preproinsulina; proinsulina, insulina, y cadena B de la insulina; descarboxilasa del ácido glutámico (GAD)-65 y -67; tirosina fosfatasa IA-2; proteína relacionada a la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP) y antígeno de células de los islotes 69 kD.

En algunas realizaciones, el epítomo autoantigénico asociado con MS es un epítomo derivado del grupo que consiste en proteína básica de la mielina (MBP), proteína proteolípídica (PLP), proteína básica de los oligodendrocitos asociados con la mielina (MOBP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y glicoproteína asociada a la mielina (MAG).

En algunas realizaciones, el epítomo autoantigénico asociado con RA es un epítomo derivado del grupo que consiste en colágeno tipo I, II, III, IV, V, IX, y XI, GP-39, filagrina, y fibrina. En una realización preferida, el epítomo se deriva de colágeno tipo II, preferiblemente el epítomo es el péptido colágeno II inmunodominante compartido que comprende los aminoácidos 260 a 273 (CII260-273).

Los epítomos alérgicos pueden estar asociados con asma alérgica, rinitis alérgica, alveolitis alérgica, dermatitis atópica, o hipersensibilidad alimentaria. En algunas realizaciones, el epítomo alérgico es un epítomo derivado de un polen de las plantas, tales como alérgeno Ole e1 del polen de olivo, el alérgeno Cry jI y Cry jII del polen de cedro japonés, el polen de pasto timothy nPhl p4, el alérgeno principal del polen de abedul Bet v1, o el alérgeno principal del polen de artemisia Art v1; un antígeno de animales, tales como el alérgeno del gato Fel d1, el alérgeno del perro Can fl, o los alérgenos de los ácaros del polvo Der f1, Der p1, Der m1, Blo t4; un antígeno fúngico, tal como el antígeno de Alternaria Alt a1, el antígeno de Aspergillus Asp fl, los antígenos de Cladosporium C1A h1 y C1A h2, o el antígeno de Penicillium Pen chl3; o un alérgeno alimentario, tal como los alérgenos de huevo blanco de gallina Gal d1, Gal d2, y Gal d3, el alérgeno de cacahuete Ara h2, el alérgeno de soja Gly m1, Gly m5 y Gly m6, el alérgeno de pescado Gad c1, o el alérgeno de camarones Pen a.

En una realización preferida, el complejo inmunomodulador es la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD (SEQ ID NO: 4), donde COL es el péptido de colágeno II inmunodominante compartido que comprende los aminoácidos 260-273 (CII260-273) (SEQ ID NO: 5). En otra realización, el complejo inmunomodulador es la proteína de fusión CTA1-R7K/C187A-COL-DD (SEQ ID NO:10). En otra realización preferida, el complejo inmunomodulador es la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Ro169-DD (SEQ ID NO:11). En aún otra realización preferida, el complejo inmunomodulador es la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Ro211-DD (SEQ ID NO: 12). En aún otra realización preferida, el complejo inmunomodulador es la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Ro274-DD (SEQ ID NO:13). En aún otra realización preferida, el complejo inmunomodulador es la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Betv1-DD (SEQ ID NO:17). En aún otra realización preferida, el complejo inmunomodulador es la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Phlp5-DD (SEQ ID NO:18). En aún otra realización preferida, el complejo inmunomodulador es la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Phlp5-DD (SEQ ID NO:19).

Los métodos y composiciones para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de una enfermedad autoinmune se describen, tal como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de insulina, uveítis autoinmune, enfermedad de Behcet, cirrosis biliar primaria, miastenia gravis, síndrome de Sjögren, pénfigo vulgar, esclerodermia, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico (LES) y enfermedad de grave que comprende administrar a un sujeto un complejo inmunomodulador de acuerdo con la invención comprende uno o más epítomos autoantigénicos asociados con la enfermedad.

La presente divulgación proporciona métodos mejorados para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de la enfermedad autoinmune de diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM), que comprende administrar a un sujeto un complejo inmunomodulador de acuerdo con la invención que comprende uno o más epítomos autoantigénicos asociados con IDDM. En algunas realizaciones, los epítomos autoantigénicos asociados con IDDM son epítomos derivados del grupo que consiste en: preproinsulina; proinsulina, insulina, y cadena B de la insulina; descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) -65 y -67; tirosina fosfatasa IA-2; proteína relacionada con la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP) y antígeno de las células de los islotes 69 kD.



5 En la presente divulgación se proporcionan métodos mejorados para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de la esclerosis múltiple (MS) que comprende administrar a un sujeto un complejo inmunomodulador de acuerdo con la invención que comprende uno o más epítomos autoantigénicos asociados con la MS. En algunas realizaciones, los epítomos autoantigénicos son epítomos derivados del grupo que consiste en proteína básica de la mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP), proteína básica de los oligodendrocitos asociados con la mielina (MOBP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y glicoproteína asociada a la mielina (MAG).

10 Se proporcionan métodos mejorados para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de artritis reumatoide (RA) que comprenden administrar a un sujeto un complejo inmunomodulador de acuerdo con la invención que comprende uno o más epítomos autoantigénicos asociados con RA. En algunas realizaciones, los epítomos autoantigénicos son epítomos derivados del grupo que consiste en colágeno tipo I, II, III, IV, V, IX, y XI, GP-39, filagrina, y fibrina. En una realización preferida, el epítomo se deriva del colágeno tipo II, preferiblemente el epítomo inmunodominante es el péptido compartida colágeno II que comprende los aminoácidos 260-273 (CII260-273).

15 Complejos inmunomoduladores múltiples que comprenden diferentes epítomos autoantigénicos se pueden administrar como un cóctel, y cada complejo inmunomodulador individual pueden comprender múltiples epítomos autoantigénicos. De manera similar, múltiples complejos inmunomoduladores que comprenden diferentes epítomos alérgicos se pueden administrar como un cóctel, y cada complejo inmunomodulador individual pueden comprender múltiples epítomos que provocan alergia.

20 En ciertas variantes, los métodos y composiciones para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de una enfermedad autoinmune o alérgica comprenden además la administración del complejo inmunomodulador de acuerdo con la invención en combinación con otras sustancias, tales como, por ejemplo, polinucleótidos que comprenden una secuencia moduladora inmune, agentes farmacológicos, adyuvantes, citoquinas, o vectores que codifican citoquinas.

25 Sin embargo, otra realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un complejo inmunomodulador de acuerdo con la invención. La composición farmacéutica de la invención se puede utilizar para la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad alérgica o autoinmune. La enfermedad autoinmune puede ser seleccionada del grupo que consiste de diabetes mellitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, uveitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, miastenia gravis, síndrome de Sjögren, pénfigo vulgar, esclerodermia, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico, y enfermedad de graves. La enfermedad alérgica se puede seleccionar del grupo que consiste en asma alérgica, rinitis alérgica, alveolitis alérgica, dermatitis atópica, o hipersensibilidad alimentaria.

30 Sin embargo, otra realización de la presente invención proporciona el uso de un complejo inmunomodulador de acuerdo con la invención para la producción de un medicamento para la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad alérgica o autoinmune. La enfermedad autoinmune puede ser seleccionada del grupo que consiste en diabetes mellitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, uveitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, miastenia gravis, síndrome de Sjogren, pénfigo vulgar, esclerodermia, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico, y enfermedad de graves. La enfermedad alérgica se puede seleccionar del grupo que consiste en asma alérgica, rinitis alérgica, alveolitis alérgica, dermatitis atópica, o la hipersensibilidad alimentaria.

40 En otra realización más, la presente invención proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican un complejo inmunomodulador de acuerdo con la invención. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican un complejo inmunomodulador que es una proteína de fusión que comprende una subunidad mutante de la subunidad A1 de ribosilación de ADP de la toxina del cólera (CTA1), un péptido capaz de unirse a un receptor celular específico, y uno o más epítomos asociados una enfermedad autoinmune o alérgica tal como se define en las reivindicaciones.

En una realización, el ácido nucleico de acuerdo con la invención codifica un complejo inmunomodulador que es una proteína de fusión que comprende:

- 45 (a) una subunidad mutante de la subunidad A1 de ribosilación de ADP de la toxina del cólera (CTA1),
- (b) un péptido capaz de unirse a un receptor celular específico, en donde dicho péptido es un dímero de una subunidad D de la proteína A del *Staphylococcus aureus*, y
- (c) uno o más epítomos asociados con una enfermedad autoinmune o alérgica

50 en donde, en la subunidad CTA1 mutante, los aminoácidos que corresponden al aminoácido 7, arginina y aminoácido 187, cisteína, en la CTA1 nativa han sido reemplazados.

En una realización preferida, el aminoácido lisina además ha sido insertado en el terminal N de la subunidad CTA1 mutante.

- El ácido nucleico de acuerdo con la invención codifica una proteína de fusión que comprende el mutante CTA1-R7K/C187A (SEQ ID NO: 1), donde el aminoácido 7, arginina, en la secuencia CTA1 nativa ha sido sustituida por una lisina, y donde el aminoácido 187, cisteína, en la secuencia CTA1 nativa ha sido sustituida por una alanina.
- 5 Adicionalmente, el ácido nucleico de acuerdo con la invención codifica una proteína de fusión que comprende el mutante K-CTA1-R7K/C187A (SEQ ID NO: 2), donde el aminoácido 7, arginina, en la secuencia CTA1 nativa ha sido sustituido por una lisina, donde el aminoácido 187, cisteína, en la secuencia CTA1 nativa ha sido sustituido por una alanina, y donde el aminoácido lisina se ha insertado en el terminal N.
- 10 El ácido nucleico puede codificar una proteína de fusión que comprende un péptido que se une específicamente a un receptor expresado en una célula capaz de presentar los antígenos, especialmente las células que expresan las moléculas MHC clase I o MHC clase II. La célula presentadora de antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en linfocitos, tales como los linfocitos B, células T, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, células epiteliales y células endoteliales.
- 15 En una realización, el ácido nucleico de acuerdo con la invención codifica una proteína de fusión que comprende un epítipo autoantigénico asociado con una enfermedad autoinmune, tal como diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM), esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (RA), o síndrome de Sjögren (SS).
- En otra realización, el ácido nucleico de acuerdo con la invención codifica una proteína de fusión que comprende un epítipo alérgico asociado con una enfermedad alérgica, tal como asma alérgica, rinitis alérgica, alveolitis alérgica, dermatitis atópica, o hipersensibilidad alimentaria.
- 20 En algunas realizaciones, el epítipo autoantigénico asociado con IDDM es un epítipo derivado del grupo que consiste en: preproinsulina; proinsulina, insulina, y cadena B de la insulina; descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) -65 y -67; tirosina fosfatasa IA-2; proteína relacionada con la glucosa 6 fosfatasa específica de los islotes (IGRP) y antígeno de las células de los islotes 69 kD. En algunas realizaciones, el epítipo autoantigénico asociado con MS es un epítipo derivado del grupo que consiste en la proteína básica de la mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP), proteína básica de los oligodendrocitos asociados con la mielina (MOBP), glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), y glicoproteína asociada a la mielina (MAG). En algunas realizaciones, el epítipo autoantigénico asociado con RA es un epítipo derivado del grupo que consiste en colágeno tipo I, II, III, IV, V, IX, y XI, GP-39, filagrina, y fibrina. En algunas realizaciones, el epítipo autoantigénico asociado con SS es un epítipo derivado del grupo que consiste en proteína de choque térmico HSP60, fodrina, ribonucleoproteínas Ro (o SSA) y La (o SSB).
- 25
- 30 Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser ADN o ARN.
- El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede ser una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión KCTA1-R7K/C187A-COL-DD, tal como la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 3; una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión CTA1-R7K/C187A-COL-DD, tal como la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 9; una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Ro169-DD; una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión KCTA1-R7K/C187A-Ro211-DD; una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Ro274-DD; una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Betv1-DD; una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Phl p1-DD; y una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión K-CTA1-R7K/C187A-Phl p5-DD.
- 35
- 40 En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención. La composición farmacéutica se puede utilizar para la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad alérgica o autoinmune. La invención proporciona además métodos para la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune o alérgica en un sujeto, comprendiendo el método: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ácido nucleico de acuerdo con la invención.
- 45 En otra realización más, la presente invención proporciona plásmidos recombinantes, vectores y sistemas de expresión que comprenden un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Los sistemas de expresión recombinantes se adaptan preferiblemente para la expresión bacteriana. La invención proporciona además células transformadas que contienen un plásmido, vector o un sistema de expresión de acuerdo con la invención. Las células transformadas son preferiblemente células bacterianas transformadas.
- 50 **Definiciones**
- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por aquellos de experiencia habitual en el arte a la que pertenece esta invención. Tal como se usa en este documento, los siguientes términos y frases tienen los significados atribuidos a los mismos a menos que se especifique lo contrario.

La secuencia de aminoácidos de la subunidad A1 de ribosilación de ADP de la toxina del cólera (CTA1) se puede encontrar, por ejemplo, en Nos. de Acceso GenBank AAM22586.1, ADG44926.1, AAM74170.1, CAE11218.1, o AAA27514.1. El término "una subunidad de la subunidad A1 de ribosilación de ADP de la toxina del cólera (CTA1)" se refiere a un polipéptido que comprende al menos una secuencia que corresponde a la secuencia desde el aminoácido 7, lisina, al aminoácido 187, cisteína, de la secuencia de la subunidad A1 de ribosilación de ADP madura de la toxina del cólera (CTA1), tal como un polipéptido que comprende al menos una secuencia que corresponde a la secuencia desde el aminoácido 1, asparagina, al aminoácido 187, cisteína, de la secuencia de la subunidad A1 de ribosilación de ADP madura de la toxina del cólera (CTA1), o al menos una secuencia que corresponde a la secuencia desde el aminoácido 1, asparagina, al aminoácido 194, serina, de la secuencia de la subunidad A1 de ribosilación de ADP madura de la toxina del cólera (CTA1).

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se refieren a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótidos (ribonucleótidos o desoxirribonucleótido o variantes estructurales relacionadas) unidos a través de enlaces fosfodiéster. Un polinucleótido o ácido nucleico pueden ser de sustancialmente cualquier longitud, por lo general desde aproximadamente seis (6) nucleótidos a aproximadamente  $10^9$  nucleótidos o más grandes. Los polinucleótidos y ácidos nucleicos incluyen ARN, ADN, formas sintéticas, y polímeros mixtos, tanto cadenas sentido y antisentido, cadena doble o sencilla, y también puede ser química o bioquímicamente modificados o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivadas, como será fácilmente apreciado por el experto en el arte.

"Antígeno", como se usa en este documento, se refiere a cualquier molécula que puede ser reconocida por el sistema inmune que es por las células B o células T, o ambas.

"Autoantígeno", como se usa en este documento, se refiere a una molécula endógena, por lo general un polisacárido o una proteína o fragmento de la misma, que provoca una respuesta inmune patogénica. Autoantígeno incluye proteínas glicosiladas y péptidos, así como proteínas y péptidos que llevan otras formas de modificaciones después de la traducción, incluyendo péptidos citrulinados. Cuando se hace referencia al autoantígeno o epítipo del mismo como "asociado con una enfermedad autoinmune," se entiende en el sentido de que el autoantígeno o epítipo está implicado en la fisiopatología de la enfermedad, ya sea mediante la inducción de la fisiopatología (esto es, asociada con la etiología de la enfermedad), mediación o facilitación de un proceso fisiopatológico; y/o al ser el objetivo de un proceso fisiopatológico. Por ejemplo, en la enfermedad autoinmune, el sistema inmune se dirige de forma aberrante autoantígenos, causando daño y disfunción de las células y tejidos en los que se expresa y/o presente el autoantígeno. En condiciones fisiológicas normales, los autoantígenos son ignorados por el sistema inmune del huésped a través de la eliminación, inactivación, o falta de la activación de las células inmunes que tienen la capacidad de reconocer el autoantígeno a través de un proceso denominado "tolerancia inmunológica".

"Alergeno" como se utiliza en este documento, se refiere a una molécula exógena, por lo general un polisacárido o una proteína o fragmento de la misma, que provoca una respuesta inmune patogénica. Alergeno incluye proteínas glicosiladas y péptidos, así como proteínas y péptidos que llevan otras formas de modificaciones después de la traducción. El alergeno se puede derivar de, por ejemplo, polen, hongos, veneno de insectos, caspa, moho, productos alimenticios. Numerosos alérgenos alimentarios se purifican y bien caracterizados, tal como cacahuete Ara h1, Ara h2, Ara h3 y Ara h6; huevo blanco de gallina Gal d1, Gal d2, y Gal d3; soja Gly m1; peces-Gad c1; y camarones-Pen a1. Los alérgenos principales gato (Fel d1) y perro (Can f1), así como los alérgenos de ácaros del polvo Der fl y Der p1 están bien caracterizados. El polen de nativo de timothy nativo nPh1 p4, así como un número de alérgenos recombinantes relacionados, rPh1 1p, rPh1 2p, rPh1 5p, rPh1 6p, rPh1 7p, rPh1 11p, rPh1 12p, el principal alergeno del polen de abedul Bet v1, el principal alergeno del polen de plátano Pla l 1, el principal alergeno del polen de olivo Ole e1, el principal alergeno del polen de ambrosía Amb a1, los principales alérgenos del polen de artemisia Art v1 y Art v3, están bien definidos.

Como se utiliza en este documento, el término "epítipo" se entiende que significa una porción de un polisacárido o polipéptido que tiene una forma o estructura particular, que es reconocido por cualquiera de las células B o células T del sistema inmune del animal. Un epítipo puede incluir porciones tanto de un polisacárido como de un polipéptido, por ejemplo, un péptido glicosilado.

"Epítipo autoantigénico" se refiere a un epítipo de un autoantígeno que provoca una respuesta inmune patogénica.

"Epítipo que provoca alergia" se refiere a un epítipo de un alergeno que provoca una respuesta inmune patogénica.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido de origen natural, así como a polímeros de origen natural de aminoácidos y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

"Autoproteína", "autopolipéptido", o "autopéptido" se usan en este documento de forma intercambiable y se refieren a cualquier proteína, polipéptido, o péptido, o un fragmento o derivado del mismo que: se codifica en el genoma del animal; se produce o genera en el animal; puede ser modificado después de la traducción en algún momento durante la vida del animal, y, está presente en el animal no fisiológicamente. El término "no fisiológico" o "no fisiológicamente"

cuando se utiliza para describir la(s) autoproteína(s), - polipéptido(s), o -péptido(s) de esta invención significa una salida o desviación del papel o proceso normal en el animal para la autoproteína, -polipéptido, o -péptido. Cuando se hace referencia a la autoproteína, -polipéptido o -péptido como "asociado con una enfermedad" o "implicado en una enfermedad" se entiende en el sentido de autoproteína, -polipéptido, o -péptido puede ser modificado en la forma o estructura y por lo tanto ser incapaz de realizar su papel o proceso fisiológico o pueden estar implicados en la fisiopatología de la afección o enfermedad, ya sea mediante la inducción de la fisiopatología; mediando o facilitando un proceso fisiopatológico; y/o siendo el objetivo de un proceso fisiopatológico. Por ejemplo, en la enfermedad autoinmune, el sistema inmune ataca de forma aberrante autoproteínas, causando daño y disfunción de las células y tejidos en los que se expresa y/o presente la auto-proteína. Como alternativa, la autoproteína, -polipéptido o -péptido pueden en sí mismos ser expresados en niveles no fisiológicos y/o función no fisiológicamente. Por ejemplo, en las enfermedades neurodegenerativas, las auto-proteínas se expresan de forma aberrante, y se agregan en lesiones en el cerebro, lo que provoca la disfunción neuronal. En otros casos, la autoproteína agrava una condición o proceso no deseado. Por ejemplo, en la osteoartritis, las autoproteínas incluyendo colagenasas y metaloproteinasas de la matriz de forma aberrante degradan el cartílago que cubre la superficie articular de las articulaciones. Ejemplos de modificaciones después de la traducción de autoproteína(s), - polipéptido(s) o -péptido(s) son glicosilación, adición de grupos de lípidos, fosforilación reversible, adición de residuos de dimetilarginina, citrulinación, y proteólisis, y más específicamente citrulinación de filagrina y fibrina por peptidil arginina deiminasa (PAD), fosforilación alfa beta-cristalina, citrulinación de MBP, y proteólisis de autoantígeno LES por caspasas y granzimas. Inmunológicamente, auto-proteína, -polipéptido o -péptido todos serían considerados auto-antígenos huéspedes y en condiciones fisiológicas normales son ignorados por el sistema inmune del huésped a través de la eliminación, inactivación, o falta de activación de las células inmunes que tienen la capacidad de reconocer auto-antígenos a través de un proceso denominado "tolerancia inmunológica". Una autoproteína, -polipéptido, o -péptido no incluye proteínas, polipéptidos o péptidos inmunes, que son moléculas expresadas fisiológicamente exclusivamente por las células del sistema inmune a los efectos de la regulación de la función inmune. El sistema inmunológico es el mecanismo de defensa que proporciona los medios para producir respuestas rápidas, muy específicas, y de protección contra un sinnúmero de microorganismos potencialmente patógenos que habitan en el mundo de los animales. Ejemplos de proteína(s), polipéptido(s) o péptido(s) inmune(s) son proteínas que comprende(n) el receptor de células T, inmunoglobulinas, citoquinas, incluyendo interleucinas de tipo I y citoquinas de tipo II, incluyendo los interferones e IL-10, TNF, linfoxina, y las quimiocinas, tales como proteína-1 alfa y beta inflamatoria de macrófagos, proteína quimiotáctica de monocitos y RANTES, y otras moléculas implicadas directamente en la función inmune, tales como el ligando Fas. Existen cierta(s) proteína(s), polipéptido(s) o péptido(s) inmune(s), que se incluyen en la autoproteína, -polipéptido o -péptido de la invención y estas son: glicoproteínas de membrana MHC clase I, glicoproteínas de MHC clase II y osteopontina. Auto-proteína, -polipéptido, o -péptido no incluye proteínas, polipéptidos y péptidos que están ausentes en el sujeto, ya sea total o sustancialmente, debido a una deficiencia genética o adquirida que causa un trastorno metabólico o funcional, y se sustituyen mediante ya sea la administración de dicha proteína, polipéptido o péptido o mediante la administración de un polinucleótido que codifica dicha proteína, polipéptido o péptido (terapia génica). Ejemplos de tales trastornos incluyen distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, fibrosis quística, fenilcetonuria, galactosemia, enfermedad orina de olor del jarabe de arce, y homocistinuria.

"Modulación de", "modular", o "alterar una respuesta inmune", como se usa en este documento se refiere a cualquier alteración de respuestas inmunes existentes o potenciales contra un epítipo autoinmune o que provoca alergia, incluyendo, por ejemplo, ácidos nucleicos, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, autopolipéptidos, complejos de proteínas o complejos de ribonucleoproteínas, que se produce como resultado de la administración de un complejo inmunomodulador o polinucleótido que codifica un complejo inmunomodulador. Dicha modulación incluye cualquier alteración en presencia, capacidad, o función de cualquier célula inmune implicada en, o capaz de estar implicada en, una respuesta inmune. Las células inmunes incluyen células B, células T, células NK, células T NK, células presentadoras de antígeno profesional, células presentadoras de antígeno no profesionales, células inflamatorias, o cualquier otra célula capaz de ser involucrado en, o que influyen en una respuesta inmune. "Modulación" incluye cualquier cambio realizado en una respuesta inmune existente, una respuesta inmune en desarrollo, una respuesta inmune potencial o la capacidad de inducir, regular, influenciar o responder a una respuesta inmune. Modulación incluye cualquier alteración en la expresión y/o función de genes, proteínas y/u otras moléculas en las células inmunes como parte de una respuesta inmune.

"Modulación de una respuesta inmune" incluye, por ejemplo, los siguientes: eliminación, delección, o secuestro de las células inmunes; inducción o generación de las células inmunes que puede modular la capacidad funcional de otras células tales como linfocitos autorreactivos, células presentadoras de antígeno, o células inflamatorias; inducir de un estado insensible en las células inmunes (esto es, anergia); aumentar, disminuir, o cambiar la actividad o función de las células inmunes o la capacidad para hacerlo, incluyendo, pero no limitando a, alterar el patrón de las proteínas expresadas por estas células. Los ejemplos incluyen producción alterada y/o secreción de ciertas clases de moléculas tales como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores de transcripción, quinasas, moléculas coestimuladoras, u otros receptores de la superficie de células; o cualquier combinación de estos eventos moduladores.

Por ejemplo, la administración de un complejo inmunomodulador o un polinucleótido que codifica un complejo inmunomodulador puede modular una respuesta inmune mediante la eliminación, secuestro, o inactivación de las células inmunes que median o capaces de mediar una respuesta inmune no deseada; inducir, generar o activar las

células inmunes que median o son capaces de mediar una respuesta inmune protectora; cambiar propiedades físicas o funcionales de las células inmunes; o una combinación de estos efectos. Ejemplos de medidas de la modulación de una respuesta inmune incluyen, pero no se limitan al, examen de presencia o ausencia de las poblaciones de células inmunes (utilizando citometría de flujo, inmunohistoquímica, histología, microscopía electrónica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)); medida de la capacidad funcional de las células inmunes, incluyendo capacidad o resistencia a proliferar o dividir en respuesta a una señal (tal como, utilizando ensayos de proliferación de células T y el análisis de peptidos basado en la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina después de la estimulación con anticuerpo anti-CD3, anticuerpo receptor de las células anti-T, el anticuerpo anti-CD28, ionóforos de calcio, PMA, células presentadoras de antígeno cargadas con un antígeno de péptido o proteína, ensayos de proliferación de células B); medición de la capacidad de matar o lisar otras células (tales como ensayos citotóxicos de células T); mediciones de las citocinas, quimiocinas, moléculas de superficie de células, anticuerpos y otros productos de las células (por ejemplo, por citometría de flujo, ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas, análisis de transferencia Western, análisis de micromatrices de proteínas, análisis de inmunoprecipitación); medición de marcadores bioquímicos de activación de las células inmunes o las vías de señalización dentro de las células inmunes (por ejemplo, transferencia de Western y análisis de inmunoprecipitación de fosforilación en tirosina, serina o treonina, escisión del polipéptido, y formación o disociación de complejos de proteínas, análisis de matriz de proteínas; transcripcional de ADN, perfiles utilizando matrices de ADN o hibridación sustractiva); mediciones de la muerte celular por apoptosis, necrosis, u otros mecanismos (por ejemplo, tinción de anexina V, ensayos de TUNEL, electroforesis en gel para medir encadenamiento de ADN, histología; ensayos fluorogénicos de caspasa, análisis de transferencia de Western de sustratos de caspasa); medición de los genes, proteínas y otras moléculas producidas por células inmunes (por ejemplo, análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa, micromatrices de ADN, micromatrices de proteínas, electroforesis en gel 2-dimensional, análisis de transferencia de Western, ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas, citometría de flujo); y medición de los síntomas o los resultados clínicos, tales como mejora de enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y otras enfermedades que implican autoproteínas o autopolipéptidos (puntuaciones clínicas, requisitos para el uso de terapias adicionales, estado funcional, estudios de formación de imágenes), por ejemplo, mediante la medición de la tasa de recaída o gravedad de la enfermedad (utilizando las puntuaciones clínicas conocidas para el experto en el arte) en el caso de la esclerosis múltiple, la medición de glucosa en sangre en el caso de la diabetes tipo I, o inflamación de las articulaciones en el caso de la artritis reumatoide.

"Sujetos" se entenderá cualquier animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, primate no humano, caballo, vaca, perro, gato, ratón, rata, cobaya o conejo.

"Tratar", "tratamiento" o "terapia" de una enfermedad o trastorno significa ralentizar, detener o invertir la progresión de la enfermedad, como se evidencia por la disminución, interrupción o eliminación de cualquiera de los síntomas clínicos o de diagnóstico, mediante la administración de un complejo inmunomodulador o un polinucleótido que codifica un complejo inmunomodulador, ya sea solo o en combinación con otro compuesto como se describe en este documento.

"Tratar", "tratamiento" o "terapia" también significa una disminución en la gravedad de los síntomas en una enfermedad o trastorno agudo o crónico o una disminución en la tasa de recaída como, por ejemplo, en el caso de una recaída o curso de enfermedad autoinmune remitente o una disminución de la inflamación en el caso de un aspecto inflamatorio de una enfermedad autoinmune. En la realización preferida, el tratamiento de una enfermedad significa revertir o detener o mitigar la progresión de la enfermedad, a ser posible hasta el punto de eliminar la enfermedad por sí misma.

Como se usa en este documento, mejorar una enfermedad y tratar una enfermedad son equivalentes.

"Prevenir", "profilaxis", o "prevención" de una enfermedad o trastorno como se utiliza en el contexto de esta invención se refiere a la administración de un complejo inmunomodulador o un polinucleótido que codifica un complejo inmunomodulador, ya sea solo o en combinación con otro compuesto como se describe en este documento, para prevenir la aparición o inicio de una enfermedad o trastorno o algunos o todos los síntomas de una enfermedad o trastorno o para disminuir la probabilidad del inicio de una enfermedad o trastorno.

Una "cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz" de un complejo inmunomodulador se refiere a una cantidad del complejo inmunomodulador que es suficiente para tratar o prevenir la enfermedad como, por ejemplo, mediante la mejora o eliminación de síntomas y/o la causa de la enfermedad. Por ejemplo, cantidades terapéuticamente eficaces están comprendidas en un(os) rango(s) amplio(s) y se determinan mediante los ensayos clínicos, y para un paciente particular se determina en función de factores conocidos para el médico experto, incluyendo, por ejemplo, la gravedad de la enfermedad, peso del paciente, edad y otros factores.

#### Descripción de los dibujos

Figura 1. Construcción de ADN que codifica el complejo inmunomodulador, K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD

El plásmido pCTA1-DD contiene el gen A1 de la toxina del cólera (aa 1-194) clonado en HindIII-BamHI y dos fragmentos D del gen de la proteína A estafilocócica bajo el control del promotor trp. Se insertó el péptido de colágeno entre CTA1 y el fragmento DD para dar pCTA1-COL-DD. Las mutaciones R7K y C187A se construyeron mediante mutagénesis in vitro dando p K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD. Ptrc = promotor Ptrc. COL2A1 = péptido colágeno, D = elemento de unión de Ig de la proteína A de *S. aureus*.

Figura 2. Comparación de los efectos terapéuticos de CTA1-R7K-COL-DD y K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD en el modelo de CIA en ratones.

A. Índice artrítico B. Frecuencia de artritis.

- ■- CTA1-R7K-COL-DD, - ◆ - K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD, - □ - control de PBS.

5 Figura 3. Comparación de los efectos terapéuticos de CTA1-R7K-COL-DD y K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD en el modelo CAIA en ratones.

Índice artrítico. - ■- CTA1-R7K-COL-DD, - ◆ - K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD, - □ - control de PBS.

Figura 4. Formación de dímeros de CTA1-R7K-COL-DD y K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD analizados, utilizando el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

10 A. CTA1-R7K-COL-DD, B. K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD

Figura 5. Comparación de la pureza de CTA1-R7K-COL-DD y K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD por SDS-PAGE.

Carril 1. Estándar de peso molecular; Carril 2. K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD (1.3 µg);

Carril 3. CTA1-R7K-COL-DD (1.1 µg).

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a la mejora de complejos inmunomoduladores y las composiciones que los comprenden, así como usos de las mismas para la producción de los medicamentos y en métodos para la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad en un sujeto asociado con uno o más autoproteína(s), -polipéptido(s), o -péptido(s) presente(s) en el sujeto y que participan en un estado no fisiológico. Los complejos inmunomoduladores mejorados de acuerdo con la invención son proteínas de fusión que comprenden una subunidad de una subunidad A1 mutante de la toxina del cólera (CTA1), un péptido capaz de unirse a un receptor celular específico, y uno o más epítomos asociados con la enfermedad. Ciertas realizaciones de la invención se refieren más particularmente a métodos y composiciones para la profilaxis, prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes asociadas con uno o más autopolipéptido(s) presente(s) en un sujeto en un estado no fisiológico tal como en múltiples esclerosis, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de insulina, uveitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, miastenia gravis, síndrome de Sjögren, pénfigo vulgar, esclerodermia, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de graves. La presente invención proporciona métodos mejorados para la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune que comprende administrar a un sujeto un complejo inmunomodulador que comprende uno o más epítomos autoantigénicos asociados con la enfermedad. La administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del complejo inmunomodulador que comprende uno o más epítomos autoantigénicos a un sujeto provoca la supresión de una respuesta inmune contra un autoantígeno asociado a la enfermedad autoinmune, de este modo tratando o previniendo la enfermedad.

Enfermedades autoinmunes

Varios ejemplos de enfermedades autoinmunes autoantígenos asociados se exponen en la Tabla 1, y ejemplos particulares se describen con más detalle a continuación, en este documento.

35 Tabla 1. Ejemplos de enfermedades autoinmunes y autoantígenos asociados

Enfermedad autoinmune	Tejido diana	Autoantígeno(s) asociado(s) con la enfermedad autoinmune
Artritis reumatoide	articulaciones sinoviales	inmunoglobulina, fibrina, filagrina, colágenos Tipo I, II, III, IV, V, IX, y XI, GP-39, hnRNPs
Esclerosis Múltiple	sistema nervioso central	proteína básica de la mielina, proteína proteolipídica, glicoproteína asociada a la mielina, fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, glicoproteína asociada a la mielina, proteína básica de oligodendrocitos asociados a la mielina, glicoproteína de oligodendrocitos de mielina, alfa-B-cristalina
Diabetes Mellitus dependiente de insulina	células β dependientes en islotes de páncreas	tirosina fosfatasa IA2, IA-2β; ácido glutámico descarboxilasa (formas 65 y 67 kDa), carboxipeptidasa H, insulina, proinsulina, preproinsulina, proteínas de choque térmico, glima 38, antígeno de células de islotes de 69 kDa, p52, transportador de glucosa de células de los islotes GLUT-2

Síndrome Sjögren	de	glándulas exocrinas	proteína de choque térmico HSP60, fodrina, ribonucleoproteínas Ro60 (SSA), Ro52 (SSA), y La (SSB), poli (ADP-ribosa) polimerasa, lipocalina, alfa amilasa
Síndrome Guillain Barre		sistema nervioso periférico	proteína de la mielina periférica I y otros
Uveítis autoinmune		ojo, úvea	antígeno S, proteína de unión de retinoides interfotorreceptora (IRBP), rodopsina, recoverina
Cirrosis primaria	biliar	árbol biliar del hígado	complejos piruvato deshidrogenasa (2-oxoácido deshidrogenasa)
Hepatitis autoinmune		hígado	antígenos de hepatocitos, citocromo P450
Pénfigo vulgar		piel	desmogleína-1, -3, y otros
Miastenia grave		uniones de músculos nerviosos	receptor de acetilcolina
Gastritis autoinmune		célula parietal/ estómago	H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa, factor intrínseco
anemia perniciosa		estómago	factor intrínseco
Polimiositis		músculo	histidil ARNt sintetasa, otras sintetasa, otros antígenos nucleares
Tiroiditis autoinmune		tiroides	tiroglobulina, peroxidasa tiroidea
Enfermedad Graves	de	tiroides	receptor de la hormona estimulante la tiroides
Psoriasis		piel	desconocido
Vitiligo		piel	tirosinasa, proteína-2 relacionada con tirosinasa
lupus eritematoso sistémico		sistémico	antígenos nucleares: ADN, histonas, ribonucleoproteínas
Enfermedad Celíaca		Intestino delgado	transglutaminasa

Artritis reumatoide. La artritis reumatoide (RA) es una sinovitis inflamatoria autoinmune crónica que afecta al 0.8% de la población mundial. Se caracteriza por una sinovitis inflamatoria crónica que causa la destrucción de las articulaciones erosiva. RA está mediada por células T, células B y macrófagos.

5 La evidencia de que las células T juegan un papel crítico en RA incluye el (1) predominio de infiltración de las células T CD4+ en la membrana sinovial, (2) mejora clínica asociada con la supresión de la función de las células T con fármacos tales como ciclosporina, y (3) la asociación de RA con ciertos alelos HLA-DR. Los alelos HLA-DR asociados a RA contienen una secuencia similar de aminoácidos en las posiciones 67-74 en la tercera región hipervariable de la cadena β que están implicados en la unión de péptidos y presentación a las células T. RA está mediada por las células T autorreactivas que reconocen una autoproteína, o autoproteína modificada, presente en las articulaciones sinoviales.

10 Los autoantígenos que están dirigidos en RA comprenden, por ejemplo, epitopos de colágeno de tipo II; hnRNP; A2/RA33; Sa; filagrina; queratina; citrulina; proteínas del cartílago, incluyendo gp39; colágenos tipo 15 III, IV, V, IX, XI; HSP-65/60; IgM (factor reumatoide); ARN polimerasa; hnRNP-B1; hnRNP-D; cardiolipina; aldolasa A; filagrina citrulina-modificado y fibrina. Los autoanticuerpos que reconocen péptidos de filagrina que contienen un residuo de arginina modificado (deiminado para formar citrulina) se han identificado en el suero de una alta proporción de los pacientes con RA. Las respuestas de las células T y B autorreactivas ambas son dirigidas contra el mismo péptido colágeno de tipo II

15 inimmunodominante (CII) 257-270 en algunos pacientes.

20 Esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple (MS) es el trastorno desmielinizante más frecuente del CNS y afecta a 350,000 estadounidenses y un millón de personas en todo el mundo. El inicio de los síntomas se produce normalmente entre 20 y 40 años y se manifiesta como un ataque agudo o subagudo de deterioro unilateral visual, debilidad muscular, parestesias, ataxia, vértigo, incontinencia urinaria, disartría, o trastorno mental (con el fin de disminuir la frecuencia).

Tales síntomas son el resultado de lesiones focales de desmielinización que causan tanto alteraciones de la conducción tanto negativas debidas a la conducción axonal lenta, como trastornos de la conducción positivos debido a la generación de impulsos ectópicos (por ejemplo, síntoma de Lhermitte). El diagnóstico de MS se basa en una historia que incluye al menos dos ataques distintos de disfunción neurológica que están separados en el tiempo, producir evidencia clínica objetiva de disfunción neurológica, e implicar áreas separadas de la materia blanca del CNS. Los estudios de laboratorio que proporcionan evidencia objetiva adicional apoyando el diagnóstico de MS incluyen imágenes por resonancia magnética (MRI) de lesiones de la sustancia blanca del sistema nervioso central, bandas oligoclonales del líquido cefalorraquídeo (CSF) de IgG, y respuestas evocadas anormales. Aunque la mayoría de los pacientes experimentan un curso gradualmente progresivo de la enfermedad remitente de reincidencia, el curso clínico de MS varía mucho entre individuos y puede variar de limitarse a varios ataques leves durante toda la vida a la enfermedad crónica progresiva fulminante. Un incremento cuantitativo en las células T autorreactivas de la mielina con capacidad de secretar IFN-gamma se asocia con la patogénesis de MS y EAE.

Los objetivos de autoantígenos de la respuesta autoinmune en las enfermedades desmielinizantes autoinmunes, tales como esclerosis múltiple y encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE), puede comprender epítomos de proteína proteolípidos (PLP); proteína básica de mielina (MBP); glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG); nucleótidos cíclicos de fosfodiesterasa (CNPase); glicoproteína asociada a la mielina (MAG) y proteína básica de oligodendrocitos asociada a la mielina (MBOP); alfa-B-cristalina (una proteína de choque térmico); péptidos mimetismo virales y bacterianas, por ejemplo, influenza, virus del herpes, virus de la hepatitis B, etc.; OSP (proteína específicos de oligodendrocitos); MBP modificada con citrulina (la isoforma C8 de MBP en la que 6 argininas han sido deiminadas a citrulina), etc. La proteína de membrana integral PLP es un autoantígeno dominante de la mielina. Determinantes de la antigenicidad de PLP se han identificado en varias cepas de ratón, e incluyen los residuos 139-151, 103-116, 215-232, 43-64 y 178-191. Al menos 26 epítomos de MBP se han reportado (Meinl et al., J Clin Invest 92, 2633-43, 1993). Son notables los residuos 1-11, 59-76 y 87-99. Los epítomos MOG inmunodominantes que se han identificado en varias cepas de ratón incluyen los residuos 1-22, 35-55, 64-96.

En los pacientes con MS humanos, las siguientes proteínas y epítomos de la mielina fueron identificados como objetivos de la respuesta autoinmune de células T y B. El anticuerpo se eluyó a partir de placas cerebrales MS reconocidos del péptido 83-97 de la proteína básica de mielina (MBP) (Wucherpfennig et al., J Clin Invest 100: 1114-1122, 1997). Otro estudio encontró aproximadamente 50% de los pacientes con MS que tienen reactividad de células T linfocitos de sangre periférica (PBL) contra la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG) (control 6-10%), 20% reactivos contra MBP (control 8-12%), 8% reactivos contra PLP (control 0%), 0% reactivos contra MAG (control 0%). En este estudio, 7 de 10 pacientes reactivos a MOG tenían respuestas proliferativas de células T enfocados en uno de 3 epítomos de péptidos, incluyendo MOG 1 -22, MOG 34-56, MOG 64-96 (Kerlero de Rosbo et al., Eur J Immunol 27: 3059-69, 1997). La respuesta de células T y B (Ab eluida de la lesión cerebral) enfocada en MBP 87-99 (Oksenberg et al., Nature 362: 68-70, 1993). En MBP 87-99, el motivo de aminoácidos HFFK es un objetivo dominante de la respuesta de tanto las células T como B (Wucherpfennig et al., J Clin Invest 100: 1114-22, 1997). Otro estudio observó reactividad de los linfocitos contra asociada a proteína básica de los oligodendrocitos asociados con la mielina (MOBP), incluyendo residuos MOBP 21-39 y 37-60 MOBP (Holz et al., J Immunol 164: 1103-9, 2000). El uso de conjugados de inmuno-oro de péptidos de MOG y MBP para teñir MS y cerebros control, ambos péptidos MBP y MOG fueron reconocidos por Abs unido a la placa MS (Genain and Hauser, Methods 10: 420-34, 1996).

Diabetes mellitus dependiente de la insulina. La diabetes mellitus dependiente de insulina o tipo I humana (IDDM) se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  en los islotes pancreáticos de Langerhans. El agotamiento de células  $\beta$  resulta en una incapacidad para regular los niveles de glucosa en la sangre. La diabetes manifiesta se produce cuando el nivel de glucosa en la sangre se eleva por encima de un nivel específico, por lo general aproximadamente 250 mg/dl. En los seres humanos, un período presintomático largo precede a la aparición de la diabetes. Durante este período, se produce una pérdida gradual de la función de las células beta del páncreas. El desarrollo de la enfermedad está implicado por la presencia de autoanticuerpos contra la insulina, descarboxilasa del ácido glutámico, y la fosfatasa de la tirosina IA2 (IA2).

Los marcadores que pueden ser evaluados en la fase presintomática son la presencia de insulitis en el páncreas, el nivel y la frecuencia de anticuerpos de células de los islotes, anticuerpos de la superficie de células de los islotes, la expresión aberrante de moléculas MHC de clase II en las células beta pancreáticas, la concentración de glucosa en la sangre, y la concentración plasmática de insulina. Un aumento en el número de linfocitos T en el páncreas, anticuerpos de células de los islotes y glucosa en sangre es indicativo de la enfermedad, como es una disminución en la concentración de insulina.

El ratón diabético (NOD) no obeso es un modelo animal con muchas características clínicas, inmunológicas e histopatológicas en común con IDDM humana. Los ratones NOD desarrollan espontáneamente una inflamación de los islotes y la destrucción de las células beta, lo que conduce a la hiperglucemia y la diabetes manifiesta. se requieren las células T tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> para para desarrollar la diabetes, aunque las funciones de cada una siguen sin estar claras. Se ha demostrado que la administración de insulina o GAD5 como proteínas, en condiciones tolerizantes a ratones NOD previene la enfermedad e inhibe la expresión de las respuestas a los otros autoantígenos.



- La presencia de combinaciones de autoanticuerpos con diversas especificidades en el suero es altamente sensible y específico para la diabetes mellitus tipo I humana. Por ejemplo, la presencia de autoanticuerpos contra GAD y/o IA-2 es de aproximadamente 98% de sensibilidad y 99% de especificidad para identificar la diabetes mellitus tipo I a partir de suero de control. En los parientes de primer grado no diabéticos de pacientes con diabetes tipo I, la presencia de autoanticuerpos específicos para dos de los tres autoantígenos incluyendo GAD, insulina e IA-2 transmite un valor predictivo positivo de >90% para el desarrollo del tipo de IDM dentro de los 5 años.
- Autoantígenos dirigidos en la diabetes mellitus dependiente de la insulina humana puede incluir, por ejemplo, tirosina fosfatasa IA-2; IA-2[beta]; descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), tanto la formas de 65 kDa y 67 kDa; carboxipeptidasa H; insulina; proinsulina; proteínas de choque térmico (HSP); glima 38; antígeno de células de los islotes de 69 KDa (ICA69); p52; dos antígenos gangliósidos (GT3 y GM2-1); proteína relacionada con la glucosa 6 fosfatasa específica del islote (IGRP); y un transportador de glucosa células de los islotes (GLUT 2).
- IDDM humana es tratada actualmente mediante el control de los niveles de glucosa en sangre para guiar la inyección, o la entrega basada en una bomba, de la insulina recombinante. Los regímenes de dieta y de ejercicio contribuyen a la consecución de un apropiado control de la glucosa en sangre.
- Uveítis autoinmune. La uveítis autoinmune es una enfermedad autoinmune del ojo que se estima que afecta a 400,000 personas, con una incidencia de 43,000 nuevos casos por año en los Estados Unidos. La uveítis autoinmune se trata actualmente con esteroides, agentes inmunosupresores tal como metotrexato y ciclosporina, inmunoglobulina intravenosa, y antagonistas de TNF- $\alpha$ .
- Uveítis autoinmune experimental (EAU) es una enfermedad autoinmune mediada por células T que se dirige a la retina neural, úvea, y tejidos relacionados en el ojo. EAU comparte muchas características clínicas e inmunológicas con uveítis autoinmune humana, y es inducida por la administración periférica de péptido uveitogénico emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA).
- Los autoantígenos dirigidos por la respuesta autoinmune en la uveítis autoinmune humana puede incluir antígeno S, proteína interfotorreceptora de unión de retinoides (IRBP), rodopsina, y recoverina.
- Cirrosis biliar primaria. La Cirrosis biliar primaria (PBC) es una enfermedad autoinmune específica de órgano que afecta principalmente a mujeres entre 40-60 años. La prevalencia reportada en este grupo se aproxima a 1 por 1,000. PBC se caracteriza por la destrucción progresiva de las células epiteliales biliares intrahepáticas (IBEC) que recubren los pequeños conductos biliares intrahepáticos. Esto conduce a la obstrucción e interferencia con la secreción de bilis, causando eventual cirrosis. Se ha reportado la asociación con otras enfermedades autoinmunes caracterizadas por un daño del revestimiento del epitelio/sistema secretor, incluyendo el síndrome de Sjögren, síndrome de CREST, enfermedad tiroidea autoinmune y artritis reumatoide. Atención en relación con el antígeno(s) de conducción se ha enfocado en la mitocondria para más de 50 años, que conduce al descubrimiento de los anticuerpos antimitocondriales (AMA) (Gershwin et al., Immunol Rev 174:210-225, 2000; Mackay et al., Immunol Rev 174:226-237, 2000). AMA pronto se convirtió en una piedra angular para el diagnóstico de laboratorio de PBC, presente en el suero de 90-95% de los pacientes mucho antes de que aparezcan los síntomas clínicos. Reactividades autoantigénicas en las mitocondrias fueron designados como M1 y M2. La reactividad M2 se dirige contra una familia de componentes de 48-74 kDa. M2 representa múltiples subunidades autoantigénicas de enzimas del complejo deshidrogenasa 2-oxoácido (2- OADC) y es otro ejemplo de la autoproteína, -polipéptido, o -péptido de la presente invención. Los estudios que identifican el papel de complejo de los antígenos de la piruvato deshidrogenasa (PDC) en la etiopatogenia de la PBC apoyan el concepto de que PDC juega un papel central en la inducción de la enfermedad (Gershwin et al., Immunol Rev 174:210-225, 2000; Mackay et al., Immunol Rev 174:226-237, 2000). La reactividad más frecuente en 95% de los casos de PBC es la subunidad E2 de 74 kDa, perteneciente a la PDC-E2. Existen complejos relacionados pero distintos, incluyendo: complejo de 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDC) y cadena ramificada (BC) 2-OADC. Tres enzimas constituyentes (E1, 2,3) contribuyen a la función catalítica, que es transformar el sustrato 2-oxoácido para acil coenzima A (CoA), con reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH. Los mamíferos PDC contiene un componente adicional, denominada proteína X o proteína de unión E-3: (E3BP). En pacientes con PBC, la respuesta antigénica importante se dirige contra PDC-E2 y E3BP. El polipéptido E2 contiene dos dominios lipoil repetidas en tándem, mientras que E3BP tiene un único dominio lipoil. El dominio lipoil se encuentra en una serie de objetivos de autoantígeno de PBC y se denomina en este documento como el "dominio lipoil PBC". PBC se trata con agentes glucocorticoides e inmunosupresores, incluyendo metotrexato y ciclosporina A.
- Síndrome de Sjögren. El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune crónica que afecta a las glándulas salivares y lagrimales principalmente, dando lugar a sequedad ocular (queratoconjuntivitis seca) y sequedad de boca (xerostomía). Otros órganos que pueden estar implicadas incluyen el árbol bronquial, riñones, hígado, vasos sanguíneos, nervios periféricos y el páncreas. De particular interés es la doble presentación de SS: ya sea solo como un trastorno primario en mujeres en los cuarenta y los cincuenta (SS primario), o en el contexto de otras enfermedades autoinmunes (SS secundario); glandulares (síntomas de sicca) y manifestaciones clínicas sistémicas (extraglandulares) pueden estar presentes. Característica de SS es la presencia de factores reumatoides, autoanticuerpos antinucleares y precipitantes. Las partículas ribonucleoproteicos nucleares/citoplasmáticas (Ro/SSA y La/SSB) tienen un papel destacado en la respuesta autoinmune de las SS. Otros antígenos que participan en el patrón nuclear positiva por

inmunofluorescencia incluyen los siguientes: Ku, NOR-90 (región organizadora nucleolar), p-80 coilin, HMG-17 (grupo de alta movilidad), Ki/SL. Adicionalmente, los autoanticuerpos específicos de órganos también son reconocidos, incluyendo antitiroglobulina, antieritrocito y los anticuerpos del epitelio de la glándula antisaliva. (Revisado en Clio et al., *Int Arch Allergy Immunol* 123:46-57, 200). Un autoantígeno específico de órgano de 120-kD ha sido identificado como la proteína del citoesqueleto  $\alpha$ -fodrina (Haneji et al., *Science* 276:604-607, 1997). HSP60 es otro autoantígeno sugerido que está implicado en SS. La inmunización con HSP60 o un péptido derivado de HSP60 (residuos de aminoácidos 437 a 460) han demostrado reducir características histopatológicas relacionadas con SS en un modelo animal de SS (Dalaleu et al., *Arthritis Rheum* 58:2318-2328, 2008). Los principales antígenos diana Ro/SSA, La/SSB y sus anticuerpos cognados han sido ampliamente definidos a nivel molecular. Ro/SSA es una ribonucleoproteína que contiene ARN citoplásmicos pequeños. El componente de proteína del antígeno Ro/SSA, una proteína de 60-kD (60-kD Ro/SSA, Ro60), se une a una de varias moléculas de ARN citoplásmico pequeñas. Un péptido de 52-kD es otro componente de antígeno Ro/SSA (52-kD Ro/SSA; Ro52). antígeno La/SSB se compone de un polipéptido que consiste en 408 aminoácidos. Ambas proteínas 60-kD Ro/SSA y La/SSB son miembros de una familia de proteínas de unión a ARN que contienen una secuencia de 80 aminoácidos conocidos como el motivo de reconocimiento de ARN (RNP). El mapeo de epítomos de células B de moléculas 60-kD Ro/SSA, 52-kD Ro/SSA y La/SSB utilizando varias estrategias han revelado epítomos específicos en varios estudios. Los epítomos de células B de autoantígeno 60-kD Ro/SSA parecen estar situados en la región central y la parte carboxi-terminal de la molécula. Dos epítomos específicos de la enfermedad: la región TKYKQRNGWSHKDLLRSHLKP (169-190) (SEQ ID NO:6) y la ELYKEKALSVETEKLLKYLEAV (211-232) (SEQ ID NO:7) se han identificado (Routsias et al., *Eur J Clin Invest* 26:514-521, 1996). Los determinantes antigénicos de la proteína 52-kD Ro/SSA son principalmente lineales y se encuentran en la parte central de la molécula. Se ha informado que cuatro péptidos (aminoácidos 2-11, 107-126, 277-292 y 365-382) se reconocen por sueros anti-Ro/SSA (Ricchiuti et al., *Clin Exp Immunol* 95:397-407, 1994). Se han reportado, cuatro péptidos altamente reactivos con IgG purificada, que abarcan las regiones 145-164, 289-308, 301-320 y 349-368 de la proteína La/SSB (Tzioufas et al., *Clin Exp Immunol* 108:191-198, 1997).

Otras enfermedades autoinmunes y autoantígenos asociados. Los autoantígenos para miastenia gravis pueden incluir epítomos dentro del receptor de acetilcolina. Los autoantígenos específicos en pénfigo vulgar pueden incluir desmogleína-3. Paneles para la miositis pueden incluir ARNt sintetasas (por ejemplo, treonil, histidil, alanil, isoleucil, y gricil); Ku; Scl; SSA; proteína ribonuclear UI Sn; Mi-I; Mi-I; Jo-I; Ku; y SRP. Paneles para esclerodermia pueden incluir Scl-70; centrómero; proteínas ribonucleares IU; y fibrilarina. Paneles para la anemia perniciosa pueden incluir el factor intrínseco; y subunidad beta de la glicoproteína H/K gástrica ATPasa. Los antígenos del epítomo para el lupus eritematoso sistémico (LES) pueden incluir ADN; fosfolípidos; antígenos nucleares; Ro; La; ribonucleoproteína UI; Ro60 (SS-A); Ro52 (SS-A); La (SS-B); calreticulina; Grp78; Scl-70; histona; proteínas Sm; y cromatina, etc. Para la enfermedad de Graves, los epítomos pueden incluir simportador Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>; receptor de tirotropina; Tg; y TPO.

Enfermedad injerto contra huésped. Una de las mayores limitaciones de los tejidos y órganos en los seres humanos es el rechazo del trasplante de tejido por el sistema inmune del receptor. Está bien establecido que a mayor coincidencia de los alelos de MHC clase I y II (HLA-A, HLA-B y HLA-DR) entre donante y receptor mejor será la supervivencia del injerto. Enfermedad injerto contra huésped (GVHD) causa morbilidad y mortalidad significativas en pacientes que reciben trasplantes que contienen células hematopoyéticas alogénicas. Las células hematopoyéticas están presentes en los trasplantes de médula ósea, trasplante de células madre y otros trasplantes. Aproximadamente el 50% de los pacientes que reciben un trasplante de un hermano HLA compatible va a desarrollar moderada a severa GVHD, y la incidencia es mucho mayor en los injertos no compatibles con HLA. Un tercio de los pacientes que desarrollan GVHD moderada a severa morirá como resultado. Los linfocitos T y otras células inmunes en el ataque del injerto donante de células de los receptores que expresan variaciones de polipéptido en sus secuencias de aminoácidos, en particular variaciones en las proteínas codificadas en el complejo del gen del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) en el cromosoma 6 en humanos. Las proteínas más influyentes para GVHD en trasplantes que implican células hematopoyéticas alogénicas son las proteínas de clase I (HLA-A, -B, y -C) altamente polimórficas (variación amplia de aminoácidos entre las personas) y las proteínas de clase II (DRB1, DQB1 y DPBI) (Appelbaum, *Nature* 411, 385-389, 2001). Aun cuando los alelos de MHC clase I son serológicamente 'compatibles' entre donante y receptor, la secuenciación del ADN revela que hay incompatibilidad a nivel de alelo en el 30% de los casos que proporcionan una base para GVHD dirigido a la clase I, incluso en parejas donante-receptor compatibles (Appelbaum, *Nature* 411, 385-389, 2001). Los autoantígenos de menor histocompatibilidad en GVHD con frecuencia causan daño a la piel, intestino, hígado, pulmón y páncreas. GVHD se trata con glucocorticoides, ciclosporina, metotrexato, fludarabina y OKT3.

Rechazo de trasplantes de tejidos. El rechazo inmunológico de los trasplantes de tejidos, incluyendo pulmón, corazón, hígado, riñón, páncreas y otros órganos y tejidos, está mediado por la respuesta inmune en el receptor del trasplante dirigidos contra el órgano trasplantado. Los órganos alogénicos trasplantados contienen proteínas con variaciones en sus secuencias de aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos del receptor del trasplante. Debido a que las secuencias de aminoácidos del órgano trasplantado difieren de las del receptor del trasplante con frecuencia provocan una respuesta inmune en el receptor contra el órgano trasplantado. El rechazo de los órganos trasplantados es una complicación importante y limitación de trasplante de tejido, y puede causar el fallo del órgano trasplantado en el receptor. La inflamación crónica que resulta de rechazo, con frecuencia conduce a la disfunción en el órgano trasplantado. Los receptores de trasplantes se tratan actualmente con una variedad de agentes inmunosupresores para prevenir y evitar el rechazo. Estos agentes incluyen glucocorticoides, ciclosporina A, Cellcept, FK-506, y OKT3.

## Composiciones y métodos para el tratamiento

- 5 La presente invención proporciona complejos de inmunomoduladores mejorados y composiciones que los comprenden, así como usos de los mismos para la producción de medicamentos y, en métodos para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de enfermedades autoinmunes o alérgicas. Los complejos inmunomoduladores mejorados de acuerdo con la presente invención son proteínas de fusión que comprenden una subunidad mutante de la subunidad A1 de ribosilación de ADP de la toxina del cólera (CTA1) un péptido capaz de unirse a un receptor específico como se define en las reivindicaciones, y uno o más epítopos asociados con la enfermedad autoinmune o alérgica. El método mejorado de la presente invención incluye la administración de un complejo inmunomodulador que comprende uno o más epítopos asociados con la enfermedad.
- 10 La presente divulgación proporciona métodos mejorados para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de la enfermedad autoinmune diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) que comprende administrar a un sujeto un complejo inmunomodulador que comprende uno o más epítopos autoantigénicos asociados con IDDM.
- 15 El complejo inmunomodulador se administra para tratar o prevenir IDDM pueden incluir epítopos autoinmunes derivados de una o más de las auto-proteínas, por ejemplo, preproinsulina, proinsulina, decarboxilasa del ácido glutámico (GAD) - 65 y -67; tirosina fosfatasa IA-2; proteína relacionada con la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP); y/o antígeno de las células de los islotes 69 kD. Alternativamente, el complejo inmunomodulador se administra para tratar o prevenir IDDM puede incluir múltiples epítopos autoinmunes derivados de la misma o diferente(s) autoproteína(s), -polipéptido(s), o -péptido(s). En realizaciones preferidas, el complejo inmunomodulador administrado para tratar o prevenir IDDM pueden incluir epítopos autoinmunes derivados de la preproinsulina o proinsulina del autopolipéptido.
- 20 En esta divulgación se proporcionan métodos mejorados para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de esclerosis múltiple (MS) que comprende administrar a un sujeto un complejo inmunomodulador que comprende uno o más epítopos autoantigénicos asociados con MS. El complejo inmunomodulador administrado para tratar MS puede incluir un epítipo autoantígeno derivado de uno o más auto-polipéptidos, incluyendo, pero no limitando a: proteína básica de mielina (MBP), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína proteolipídica (PLP), proteína básica de oligodendrocitos asociada a la mielina (MOBP), glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), y/o glicoproteína asociada a la mielina (MAG). Alternativamente, un complejo inmunomodulador que comprende múltiples epítopos autoantigénicos derivados de la misma o diferente autoproteína(s), -polipéptido(s), o -péptido(s) asociado(s) con la enfermedad.
- 25 En esta divulgación, se proporcionan métodos mejorados para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de la artritis reumatoide (RA) que comprende administrar a un sujeto un complejo inmunomodulador de acuerdo con la invención que comprende uno o más epítopos autoantigénicos asociados con RA. En algunas realizaciones, el epítipo autoantigénico es un epítipo derivado del grupo que consiste en colágeno tipo I, II, III, IV, V, IX, y XI, GP-39, filagrina, y fibrina. En una realización preferida, el epítipo se deriva de colágeno tipo II, preferiblemente el epítipo es el péptido de colágeno II inmunodominante compartido que comprende los aminoácidos 260-273 (CII260-273), SEQ ID NO: 5.
- 30 Alternativamente, se pueden administrar múltiples complejos inmunomoduladores que comprenden epítopos autoantigénicos derivados de diferentes autopolipéptidos.
- 35 Por lo tanto, el efecto terapéutico del complejo inmunomodulador de acuerdo con la presente invención, como se demuestra en los ejemplos (en particular en los modelos de artritis reumatoide, CIA en el ejemplo 2 y CAIA en el ejemplo 3, y se indica en el modelo EAE), no es limitado específicamente a la artritis reumatoide (RA), sino que es un efecto terapéutico ventajoso asociado con el tratamiento, profilaxis y prevención de enfermedades autoinmunes y alérgicas en general, dependiendo de la elección del epítipo de un autoantígeno asociado a la enfermedad alérgica o autoinmune específica. Por lo tanto, los ejemplos de la presente invención están destinados a ilustrar y apoyar el concepto inventivo general de la utilización de los complejos inmunomoduladores de acuerdo con la invención que comprende el inmunomodulador CTA1-R7K/C187A en conexión con un epítipo inmunodominante para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y alérgicas en general.
- 40 El epítipo inmunodominante compartido se puede seleccionar de cualquier autoantígeno apropiado conocido por estar asociado con una enfermedad alérgica o autoinmune. El epítipo puede, por ejemplo, ser seleccionado a partir de cualquiera de los autoantígenos asociados con las enfermedades de la Tabla 1. Sin embargo, los epítopos con un alto contenido de cisteína puede contrarrestar el efecto ventajoso proporcionado por la sustitución del aminoácido 187, cisteína por una alanina en CTA1-R7K/C187A del complejo inmunomodulador de acuerdo con la invención en comparación con CTA1-R7K. Por lo tanto, es preferible que los epítopos de acuerdo con la presente invención se eligen de tal manera como para evitar un alto contenido de cisteína.
- 45 En otra realización más, la presente invención proporciona secuencias de ácido nucleico, incluyendo secuencias de ADN y ARN, que codifican los complejos inmunomoduladores de acuerdo con la invención, así como plásmidos, vectores y sistemas de expresión que comprenden tales secuencias de ácido nucleico.
- 50
- 55

Los complejos inmunomoduladores de acuerdo con la invención se pueden producir mediante tecnología de ADN recombinante.

5 Las técnicas para la construcción de plásmidos, vectores y sistemas de expresión y transfección de células son bien conocidas en la técnica, y el experto en la técnica estarán familiarizados con los materiales de recurso estándar que describen condiciones y procedimientos específicos.

10 La construcción del sistema de plásmidos, vectores y expresión de la invención emplea técnicas de ligación y restricción estándar que son bien conocidos en la técnica (véase, en general, por ejemplo, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, 1989; Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 3rd ed. 2001). Los plásmidos aislados, secuencias de ADN, o los oligonucleótidos sintetizados se escinden, adaptan y se vuelven a ligar en la forma deseada. Las secuencias de las construcciones de ADN se pueden confirmar utilizando, por ejemplo, métodos estándar para el análisis de secuencia de ADN (véase, por ejemplo, Sanger et al. (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 5463-5467).

15 Sin embargo, otro método conveniente para aislar moléculas de ácido nucleico específicas es mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Mullis et al., *Methods Enzymol* 155:335-350, 1987) o PCR de transcripción inversa (RT-PCR). Secuencias de ácido nucleico específicas se pueden aislar a partir de ARN por RT-PCR. ARN se aisló a partir de, por ejemplo, células, tejidos u organismos completos mediante técnicas conocidas para un experto en el arte. A continuación, se genera ADN complementario (ADNc) utilizando cebadores poli-dT o hexámeros aleatorios, desoxinucleótidos, y una enzima transcriptasa inversa apropiada. El polinucleótido deseado entonces se puede amplificar a partir del ADNc generado por PCR. Alternativamente, el polinucleótido de interés se puede amplificar  
20 directamente a partir de una biblioteca de ADNc apropiada. Los cebadores que se hibridan con ambos los extremos 5' y 3' de la secuencia de polinucleótidos de interés son sintetizados y utilizados para la PCR. Los cebadores también pueden contener sitios de enzimas de restricción específicos en el extremo 5' para facilitar la digestión y ligación de la secuencia amplificada en un vector del plásmido digerido por restricción de manera similar.

Entrega de complejos inmunomoduladores

25 Las cantidades terapéutica y profilácticamente eficaz de un complejo inmunomodulador están en el intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg. Una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz preferida de un complejo inmunomodulador está en el intervalo de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 1 mg. Una cantidad terapéutica más preferida de complejo inmunomodulador se encuentra en el intervalo de aproximadamente 10 µg a 100 µg. En ciertas realizaciones, el complejo inmunomodulador se administra mensualmente durante 6-12 meses, y después  
30 cada 3-12 meses como una dosis de mantenimiento. Los regímenes de tratamiento alternativos pueden ser desarrollados y pueden variar de día, a la semana, a cada dos meses, a anual, a una administración de una sola vez, dependiendo de la severidad de la enfermedad, la edad del paciente, siendo administrado el complejo inmunomodulador, y otros factores que serían examinados por el médico tratante normal.

35 El complejo inmunomodulador se puede suministrar por vía intranasal. En otras variaciones, el complejo inmunomodulador se puede administrar por vía oral, sublingual, subcutánea, transcutánea, intradérmica, por vía intravenosa, por vía mucosa o por vía intramuscular.

Formulación

El complejo inmunomodulador se puede administrar en combinación con otras sustancias, tales como, por ejemplo, agentes farmacológicos, adyuvantes, citoquinas, o complejos inmunoestimulantes (ISCOMS).

40 Tabla 2. Secuencias

CTA1-R7K/C187A	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO: 1
K-CTA1-R7K/C187A	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:2
K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD	Secuencia de ADN	SEQ ID NO:3
K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:4
COL, colágeno II aminoácidos 260-273	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:5
60-kD Ro/SSA aminoácidos 169-190	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:6
60-kD Ro/SSA aminoácidos 211-232	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:7

60-kD Ro/SSA aminoácidos 274-290	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:8
CTA1-R7K/C187A-COL-DD	Secuencia de ADN	SEQ ID NO:9
CTA 1-R7K/C187A-COL-DD	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:10
K-CTA1-R7K/C187A-Ro169-DD	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:11
K-CTA1-R7K/C187A-Ro211-DD	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:12
K-CTA1-R7K/C187A-Ro274-DD	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:13
Bet v 1 aminoácidos 140-151	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:14
Phl p 1 aminoácidos 150-164	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:15
Phl p 5 aminoácidos 216-233	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:16
K-CTA1-R7K/C187A-Betv1-DD	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:17
K-CTA1-R7K/C187A-Ph1 p1-DD	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:18
K-CTA1-R7K/C187A-Phl p5-DD	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:19

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos son realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solamente para fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

#### 5 Ejemplo 1. Complejo inmunomodulador K-CTA1-R7K1C187A-COL-DD

Construcción de mutantes CTA1-DD, expresión y purificación de proteínas de fusión se realizaron esencialmente como se describe por Agren (J Immunol 1999, 162: 2432-2440).

10 El plásmido pCTA1-DD contiene el gen A1 de la toxina del cólera (aa 1-194) clonado en HindIII-BamHI y ADN que codifica dos fragmentos D del gen de la proteína A estafilocócica bajo el control del promotor trp. Se insertó el ADN que codifica un péptido de colágeno, el péptido II de colágeno inmunodominante compartido (CII260-273), entre el ADN que codifica la CTA1 y las unidades estructurales DD dando el plásmido pCTA1-COL-DD. Las mutaciones R7K y C187A se construyeron por mutagénesis in vitro dando el plásmido pK-CTA1-R7K/C187A-COL-DD (Figura 1).

Ejemplo 2. Comparación de los efectos terapéuticos de CTA1-R7K-COL-DD y K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD en el modelo de CIA en ratones.

15 El modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratón de RA se utilizó para comparar los tratamientos intranasales con el CTA1-R7K-COL-DD y el tolerógeno K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD. El modelo de CIA comparte una serie de características clínicas, histológicas, e inmunológicas con RA, y por lo tanto es el modelo más utilizado para probar potenciales agentes terapéuticos contra RA. Ratones DBA1 (Taconic, Dinamarca) se administraron con una  
20 inmunización primaria con 100 µg de colágeno de tipo II pollo/bovino (Sigma/MDBioSciences) en adyuvante completo de Freund (CFA) seguido por una dosis de refuerzo con adyuvante incompleto de Freund (IFA) en el día 21. Los ratones fueron tratados por vía intranasal con 3-8 dosis de PBS, CTA1-R7K-COL-DD o K-CTA1-R7K/C187ACOL-DD de todo el tiempo de y/o después de la inmunización de refuerzo. Los ratones fueron seguidos con respecto a la incidencia y severidad de la artritis utilizando un sistema de puntuación para la artritis.

25 Se utilizó un sistema de puntuación clínica de 0-3 puntos por cada extremidad: 0 = sin inflamación, 0,5 = hinchazón del dedo del pie o el dedo, 1 = leve hinchazón o enrojecimiento, 2 = hinchazón y enrojecimiento, y 3 = marcado hinchazón, enrojecimiento y/o anquilosis. El índice de la artritis se calculó sumando las puntuaciones de las cuatro extremidades de cada animal.

30 El efecto terapéutico de K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD fue significativamente mejor que el efecto terapéutico de CTA1-R7K-COL-DD, como se ve en la disminución de la gravedad (figura 2A) y la incidencia (Figura 2B) de CIA en comparación con el grupo de control (PBS).

El índice de artritis en el grupo de control PBS aumentó drásticamente tres semanas después de las inmunizaciones de colágeno y alcanzó un pico a las 6 semanas. En el grupo CTA1-R7K-COL-DD, una ligera disminución en el índice de la artritis podría ser visto. Por el contrario, en el grupo K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD, el índice de la artritis fue significativamente menor, y muchos animales no tuvieron ningún síntoma en absoluto.

- 5 Ejemplo 3 Comparación de los efectos terapéuticos de CTA1-R7K-COL-DD y K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD en el modelo CAIA de ratones.

Se indujo artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) en ratones Balb/c (Taconic, Dinamarca) día 0 por una inyección intravenosa de un cóctel de anticuerpos monoclonales para colágeno II (cóctel ArthritoMab: D1, F10, A2 y D8; MD Biosciences, Zurich, Suiza) a un nivel de dosis de 2 mg/ratón. En el día 3, lipopolisacárido (LPS) (kit ArthritoMab, MD Biosciences) se inyectó por vía intraperitoneal para mejorar la incidencia y la gravedad de la enfermedad (50 µg/ratón).

Los ratones se trataron por vía intranasal en el día 2, 0, +3 con 5 µg de K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD o CTA1-R7KCOL-DD en 20 µl de PBS. Los ratones fueron seguidos con respecto a la incidencia y severidad de la artritis utilizando el mismo sistema de puntuación para la artritis como para CIA (véase el Ejemplo 2).

- 15 En el día 4, todos los ratones comenzaron a mostrar signos de la enfermedad (datos no mostrados). En el grupo de control PBS y en el grupo tratado con CTA1-R7K-COL-DD, el índice artrítico aumentó dramáticamente 7 días después de la inmunización de anticuerpos. Sin embargo, en el grupo tratado con K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD el aumento en el índice de artritis fue significativamente menor en todo el curso del experimento.

Ejemplo 4. Complejos inmunomoduladores para el tratamiento de la enfermedad de Sjögren (SS).

- 20 Las secuencias de ADN que codifican epítopos derivados de 60 kDa Ro, Ro169, con la secuencia de aminoácidos TKYKQRNGWSHKDLLRSHLKP (SEQ ID NO:6), y Ro 211, con la secuencia de amino ELYKEKALSVETEKLLKYLEAV (SEQ ID NO:7), y Ro274, con secuencia de aminoácidos QEMPLTALLRNLGKMT (SEQ ID NO:8), se clonó en el vector K-CTA1-R7K/C187A, dando como resultado vectores que comprenden construcciones de ADN que codifican los complejos inmunomoduladores K-CTA1-R7K/C187A-Ro169-DD (SEQ ID NO:11), K-CTA1-R7K/C187A-Ro211-DD (SEQ ID NO:12), y K-CTA1-R7K/C187ARo274-DD (SEQ ID NO:13), respectivamente.

Los vectores de expresión se transfectaron en E. coli y los complejos inmunomoduladores expresados se purifican utilizando técnicas estándar.

Ejemplo 5. Efectos terapéuticos de complejos inmunomoduladores para el tratamiento de la enfermedad de Sjögren (SS).

- 30 Recientemente, fue creado un modelo murino novedoso que muestra notable similitud con muchas características de la enfermedad humana (Scofield R.H. et al., J Immunol, 2005, 175 (12), 8409-12), en el que los ratones BALB/c se inmunizaron durante un periodo de tiempo con un péptido corto de la RNP Ro humana (Ro274-290, designado Ro274) que tiene una homología de 100% con la secuencia de ratón. Se determinó que los ratones inmunizados con este péptido se desarrollan autoanticuerpos IgG de alta titulación contra Ro52, Ro60 y La, infiltración de las glándulas salivales de linfocitos CD19<sup>+</sup> B y CD4<sup>+</sup>/8<sup>+</sup>, y disminución del flujo salival. Este modelo es por lo tanto apropiado para el estudio de los efectos terapéuticos de complejos inmunomoduladores para el tratamiento de la enfermedad de Sjögren (SS).

40 En resumen, los animales son inmunizados con un péptido correspondiente a los aminoácidos 274-290 de la proteína Ro de 60-kDa, QEMPLTALLRNLGKMT (SEQ ID NO:8). La inmunización se llevó a cabo utilizando 100 µg de péptido monómero en PBS emulsionado 1:1 en CFA para la inmunización inicial, con la inmunización subsiguiente en IFA en los días 14, 35, 63, y 51. Enfermedad es seguida por medición de la producción salival de la siguiente manera: En resumen, los animales se mantuvieron en ayunas durante 16-18 h antes del procedimiento. Una inyección i.p. de 2.5% de 2,2,2-tribromoetanol en 0.01 mL/g de peso corporal es administrada a cada animal como anestesia. La secreción de saliva es entonces estimulada con una inyección i.p. de 0.020 mg de isoproterenol/100 g de peso corporal y 0.05 mg de pilocarpina/100 g de peso corporal en la misma jeringa. La saliva total se obtiene entonces de la cavidad oral durante un periodo de 10 min utilizando tubos capilares. Los ratones se trataron con tres dosis administradas intranasalmente de complejos inmunomoduladores que se van a ensayar en el momento de la enfermedad. El efecto del tratamiento se evalúa comparando el nivel de la producción de saliva en los ratones tratados y no tratados.

Ejemplo 6. Complejos inmunomoduladores para el tratamiento de enfermedades alérgicas.

- 50 Bet v1 se ha identificado como uno de los principales alérgenos de abedul, y Phl p1 y Phl p5 han sido identificados como dos principales alérgenos de polen de pasto. El epítipo péptido inmunodominante de Bet v1 se ha identificado como que tiene la secuencia de péptido MGETLLRAVESY (SEQ ID NO: 14). El epítipo péptido inmunodominante de Phi p1 ha sido identificado como que tiene la secuencia del péptido AGELELQFRRVKCKY (SEQ ID NO:15), y el epítipo péptido inmunodominante de Phl p5 se ha identificado como que tiene la secuencia de péptido

TVATAPEVKYTVFETALK (SEQ ID NO: 16). ADN que codifica estos epítomos peptídicos se clonó en el vector CTA1-R7K/C187A, dando como resultado los vectores que comprenden construcciones de ADN que codifican los complejos inmunomoduladores K-CTA1-R7K/C187A-Betv1-DD (SEQ ID NO:17), K-CTA1-R7K/C187A-Phl p1-DD (SEQ ID NO:18), y K-CTA1-R7K/C187A-Phl p5-DD (SEQ ID NO:19), respectivamente. Los vectores de expresión se transfectaron en E. coli y los complejos inmunomoduladores expresados se purifican utilizando técnicas estándar.

Ejemplo 7. Efectos terapéuticos de complejos inmunomoduladores para el tratamiento de enfermedades alérgicas.

Un modelo apropiado para estudiar los efectos terapéuticos de los complejos de inmunomoduladores para el tratamiento de enfermedad alérgica es, por ejemplo, el modelo de ratón de poli-sensibilización alérgica a los alérgenos principales de polen de abedul y de gramíneas Bet v1, Phl p1 y Phl p5 establecidos por Hufnagl et al. (Clin Exp Allergy, 2008, 38, 1192-1202).

En resumen, la sensibilización se lleva a cabo por tres inmunizaciones intraperitoneales (i.p.) (días 22, 36 y 50) de Bet v1, Phl p1 y Phl p5 recombinantes (5 mg cada uno) o una mezcla de uno o más de estos alérgenos adsorbidos en hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>) a intervalos de 14 días. Como tratamiento, uno o más de los complejos inmunomoduladores que se van a ensayar se administran (5 mg cada uno) por vía intranasal (i.n.) en 30 mL de 0.9% de NaCl tres veces a intervalos de 7 días (días 0, 7 y 14) antes de la sensibilización. Una semana después de la última inmunización i.p., un desafío de aerosoles con un 1% p/v de polen de abedul y/o extracto de phleum se lleva a cabo en 2 días consecutivos. Dos días después de la exposición de aerosol (día 60), los ratones se mataron, y se recogieron lavados broncoalveolares (BAL). La inflamación de las vías respiratorias se determina por el número de células inflamatorias (macrófagos, linfocitos, eosinófilos) y niveles de IL-5 en los fluidos de BAL. El efecto de tratamiento se ve como eosinófilos reducidos significativamente e IL-5 en BAL en ratones tratados con complejos inmunomoduladores en comparación con los ratones control.

Ejemplo 8. Formación de dímeros de CTA1-R7K-COL-DD y K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD.

La formación de dímeros de CTA1-R7K-COL-DD y K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD fue estudiada mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC). Se utilizó un sistema de AKTAFPLC (GE Healthcare) equipado con una columna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) para el estudio. A medida que la fase móvil, solución reguladora de fosfato de Na 10 mM pH 7.4, NaCl 0.4 M, a una velocidad de flujo de 0.4 mL/min a temperatura ambiente. Las muestras fueron CTA1-R7K-COL-DD (Lote 091118, 2.4 mg/mL) y K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD (Lote 091118, 5.6 mg/mL). Las muestras se descongelaron de -80°C y se diluyeron a 1.5 mg/mL en solución reguladora antes del análisis. 50 µl se inyectaron en la columna. La pureza de las preparaciones se analizó mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie en un NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen) en condiciones reductoras.

Resultados

Como se ve a partir del análisis SEC, se había formado una cantidad significativa de dímeros y podría ser identificado en la muestra CTA1-R7K-COL-DD (Figura 4A). Los dímeros se pueden ver como un pico de elución a 12.61 ml, y monómeros como un pico a 14,29 ml. En comparación, ningún dímero podría ser detectado en la muestra K-CTA1-R7K/C187A-COL-DD (Figura 4B), indicado como un único pico de monómeros eluyendo a 14.16 ml. Como puede verse en la Figura 5, las dos preparaciones son puras igualmente y compuestas de un solo componente en condiciones de reducción, esto es, el complejo de la inmunomodulación monomérica.

Ejemplo 9. Comparación de los niveles de productividad.

El rendimiento de material purificado a partir de 1 g de pellet bacteriano después del cultivo de cepas de E. coli recombinantes que llevan plásmidos que codifican diferentes complejos inmunomoduladores de acuerdo con la invención se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de los niveles de productividad

Complejo	Rendimiento
CTA1-R7K-DD	0.94 mg
K-CTA1-R7K/C187A-DD	4.03 mg
CTA1-R7K-COL-DD	0.88 mg
K-CTA1-R9K/C187A-COL-DD	4.47 mg

Como se puede ver en la Tabla 3, la productividad es significativamente mayor para los complejos que comprenden la inserción de K y la mutación C187A.

Listado de secuencias

<110> Desarrollo MIVAC AB

5 <120> NUEVAS COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y AUTOINMUNES

<130> 142722

<150> SE 1051122-8

<151> 2010-10-28

10 <150> US 61/409,135

<151> 2010-11-02

<150> US 61/488,818

<151> 2011-05-23

<160> 19

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 194

<212> PRT

<213> vibrio cholerae

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> MUTACIÓN ARG-LYS

<220>

25 <221> VARIANTE

<222> (187)..(187)

<223> MUTACIÓN CYS-ALA

<400> 1



ES 2 578 711 T3

Asn Asp Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr Phe Asp  
 20 25 30  
 Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg Gly Thr  
 35 40 45  
 Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr Ser Ile  
 50 55 60  
 Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser Gly His  
 65 70 75 80  
 Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met Phe Asn  
 85 90 95  
 Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu Gln Glu  
 100 105 110  
 Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly Trp Tyr  
 115 120 125  
 Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn Arg Gly  
 130 135 140  
 Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Pro Trp Ile His His Ala Pro Pro Gly Ala Gly Asn Ala Pro Arg  
 180 185 190

Ser Ser

<210> 2

<211> 195

<212> PRT

5 <213> vibrio cholerae

<220>

<221> variante

<222> (1)..(1)

<223> INSERCIÓN LYS

<220>

<221> variante

<222> (8)..(8)

5 <223> MUTACIÓN ARG-LYS

<220>

<221> variante

<222> (188)..(188)

<223> MUTACIÓN CYS-ALA

10 <400> 2

```

Lys Asn Asp Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp Glu
 1          5          10          15
Ile Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr Phe
          20          25          30
Asp Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg Gly
          35          40          45
Thr Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr Ser
 50          55          60
Ile Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser Gly
65          70          75          80
His Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met Phe
          85          90          95
    
```

ES 2 578 711 T3

Asn Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu Gln  
100 105 110  
Glu Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly Trp  
115 120 125  
Tyr Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn Arg  
130 135 140  
Gly Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala Ala  
145 150 155 160  
Asp Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp Arg  
165 170 175  
Glu Glu Pro Trp Ile His His Ala Pro Pro Gly Ala Gly Asn Ala Pro  
180 185 190  
Arg Ser Ser  
195

<210> 3

<211> 1056

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> PROTEÍNA DE FUSIÓN SINTÉTICA

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1056)

<400> 3

ES 2 578 711 T3

atg	aaa	aat	gat	gat	aag	tta	tat	aag	gca	gat	tct	aga	cct	cct	gat	48
Met	Lys	Asn	Asp	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Ala	Asp	Ser	Arg	Pro	Pro	Asp	
1				5					10					15		
gaa	ata	aag	cag	tca	ggt	ggt	ctt	atg	cca	aga	gga	cag	agt	gag	tac	96
Glu	Ile	Lys	Gln	Ser	Gly	Gly	Leu	Met	Pro	Arg	Gly	Gln	Ser	Glu	Tyr	
			20					25					30			
ttt	gac	cga	ggt	act	caa	atg	aat	atc	aac	ctt	tat	gat	cat	gca	aga	144
Phe	Asp	Arg	Gly	Thr	Gln	Met	Asn	Ile	Asn	Leu	Tyr	Asp	His	Ala	Arg	
		35					40					45				
gga	act	cag	acg	gga	ttt	ggt	agg	cac	gat	gat	gga	tat	ggt	tcc	acc	192
Gly	Thr	Gln	Thr	Gly	Phe	Val	Arg	His	Asp	Asp	Gly	Tyr	Val	Ser	Thr	
	50					55					60					
tca	att	agt	ttg	aga	agt	gcc	cac	tta	gtg	ggt	caa	act	ata	ttg	tct	240
Ser	Ile	Ser	Leu	Arg	Ser	Ala	His	Leu	Val	Gly	Gln	Thr	Ile	Leu	Ser	
65					70					75				80		
ggt	cat	tct	act	tat	tat	ata	tat	ggt	ata	gcc	act	gca	ccc	aac	atg	288
Gly	His	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Val	Ile	Ala	Thr	Ala	Pro	Asn	Met	
			85					90						95		
ttt	aac	ggt	aat	gat	gta	tta	ggg	gca	tac	agt	cct	cat	cca	gat	gaa	336
Phe	Asn	Val	Asn	Asp	Val	Leu	Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	His	Pro	Asp	Glu	

ES 2 578 711 T3

100					105					110						
caa	gaa	gtt	tct	gct	tta	ggt	ggg	att	cca	tac	tcc	caa	ata	tat	gga	384
Gln	Glu	Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	Tyr	Ser	Gln	Ile	Tyr	Gly	
		115					120					125				
tgg	tat	cga	ggt	cat	ttt	ggg	gtg	ctt	gat	gaa	caa	tta	cat	cgt	aat	432
Trp	Tyr	Arg	Val	His	Phe	Gly	Val	Leu	Asp	Glu	Gln	Leu	His	Arg	Asn	
	130					135					140					
agg	ggc	tac	aga	gat	aga	tat	tac	agt	aac	tta	gat	att	gct	cca	gca	480
Arg	Gly	Tyr	Arg	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Leu	Asp	Ile	Ala	Pro	Ala	
145					150					155					160	
gca	gat	ggt	tat	gga	ttg	gca	ggt	ttc	cct	ccg	gag	cat	aga	gct	tgg	528
Ala	Asp	Gly	Tyr	Gly	Leu	Ala	Gly	Phe	Pro	Pro	Glu	His	Arg	Ala	Trp	
				165					170					175		
agg	gaa	gag	ccg	tgg	att	cat	cat	gca	ccg	ccg	ggt	gct	ggg	aat	gct	576
Arg	Glu	Glu	Pro	Trp	Ile	His	His	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Gly	Asn	Ala	
			180					185					190			
cca	aga	tca	tcg	gga	tct	ggt	att	gct	ggc	ttc	aaa	ggt	gaa	caa	ggc	624
Pro	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ile	Ala	Gly	Phe	Lys	Gly	Glu	Gln	Gly	
		195					200					205				
ccc	aag	gga	gaa	cct	ggc	gga	tcc	ggg	aag	aca	ccc	gag	gct	gat	gcg	672
Pro	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Pro	Glu	Ala	Asp	Ala	
	210					215					220					
caa	caa	aat	aac	ttc	aac	aaa	gat	caa	caa	agc	gcc	ttc	tat	gaa	atc	720
Gln	Gln	Asn	Asn	Phe	Asn	Lys	Asp	Gln	Gln	Ser	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	
225					230					235					240	
ttg	aac	atg	cct	aac	tta	aac	gaa	gcg	caa	cgt	aac	ggc	ttc	att	caa	768
Leu	Asn	Met	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Ala	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	
				245					250					255		
agt	ctt	aaa	gac	gac	cca	agc	caa	agc	act	aac	ggt	tta	ggt	gaa	gct	816
Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Thr	Asn	Val	Leu	Gly	Glu	Ala	
			260					265					270			
aaa	aaa	tta	aac	gaa	tct	caa	gca	ccc	aaa	ccc	gag	gct	gat	gcg	caa	864
Lys	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Pro	Glu	Ala	Asp	Ala	Gln	
		275					280					285				
caa	aat	aac	ttc	aac	aaa	gat	caa	caa	agc	gcc	ttc	tat	gaa	atc	ttg	912
Gln	Asn	Asn	Phe	Asn	Lys	Asp	Gln	Gln	Ser	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	
	290					295					300					
aac	atg	cct	aac	tta	aac	gaa	gcg	caa	cgt	aac	ggc	ttc	att	caa	agt	960
Asn	Met	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Ala	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	
305					310					315					320	
ctt	aaa	gac	gac	cca	agc	caa	agc	act	aac	ggt	tta	ggt	gaa	gct	aaa	1008
Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Thr	Asn	Val	Leu	Gly	Glu	Ala	Lys	
				325					330					335		
aaa	tta	aac	gaa	tct	caa	gca	ccc	aaa	ccc	gag	gta	gca	ggt	cag	aat	1056
Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Pro	Glu	Val	Ala	Gly	Gln	Asn	
			340					345					350			

<210> 4

<211> 352

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

ES 2 578 711 T3

<400> 4

Met Lys Asn Asp Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp  
 1 5 10 15  
 Glu Ile Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr  
 20 25 30  
 Phe Asp Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg  
 35 40 45  
 Gly Thr Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr  
 50 55 60  
 Ser Ile Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met  
 85 90 95  
 Phe Asn Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu  
 100 105 110  
 Gln Glu Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly  
 115 120 125  
 Trp Tyr Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn  
 130 135 140  
 Arg Gly Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp  
 165 170 175  
 Arg Glu Glu Pro Trp Ile His His Ala Pro Pro Gly Ala Gly Asn Ala  
 180 185 190  
 Pro Arg Ser Ser Gly Ser Gly Ile Ala Gly Phe Lys Gly Glu Gln Gly  
 195 200 205  
 Pro Lys Gly Glu Pro Gly Gly Ser Gly Lys Thr Pro Glu Ala Asp Ala  
 210 215 220  
 Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile  
 225 230 235 240  
 Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
 245 250 255  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala

ES 2 578 711 T3

260 265 270

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu Ala Asp Ala Gln  
 275 280 285

Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
 290 295 300

Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser  
 305 310 315 320

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys  
 325 330 335

Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu Val Ala Gly Gln Asn  
 340 345 350

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido derivado de colágeno II

<400> 5

Ile Ala Gly Phe Lys Gly Glu Gln Gly Pro Lys Gly Glu Pro  
 1 5 10

10 <210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Péptido derivado de Ro/SSA

<400> 6

Thr Lys Tyr Lys Gln Arg Asn Gly Trp Ser His Lys Asp Leu Leu Arg  
 1 5 10 15

Ser His Leu Lys Pro  
 20

<210> 7

<211> 22

ES 2 578 711 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Ro/SSA

5 <400> 7

Glu Leu Tyr Lys Glu Lys Ala Leu Ser Val Glu Thr Glu Lys Leu Leu  
1 5 10 15

Lys Tyr Leu Glu Ala Val  
20

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Ro/SSA

<400> 8

Gln Glu Met Pro Leu Thr Ala Leu Leu Arg Asn Leu Gly Lys Met Thr  
1 5 10 15

15 <210> 9

<211> 1050

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> PROTEÍNA DE FUSIÓN SINTÉTICA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1050)

<400> 9



ES 2 578 711 T3

atg Met 1	gat Asp	gat Asp	aag Lys	tta Leu 5	tat Tyr	aag Lys	gca Ala	gat Asp	tct Ser 10	aga Arg	cct Pro	cct Pro	gat Asp	gaa Glu 15	ata Ile	48
aag Lys	cag Gln	tca Ser	ggt Gly 20	ggt Gly	ctt Leu	atg Met	cca Pro	aga Arg 25	gga Gly	cag Gln	agt Ser	gag Glu	tac Tyr 30	ttt Phe	gac Asp	96
cga Arg	ggt Gly	act Thr 35	caa Gln	atg Met	aat Asn	atc Ile	aac Asn 40	ctt Leu	tat Tyr	gat Asp	cat His	gca Ala 45	aga Arg	gga Gly	act Thr	144
cag Gln	acg Thr 50	gga Gly	ttt Phe	ggt Val	agg Arg	cac His 55	gat Asp	gat Asp	gga Gly	tat Tyr	ggt Val 60	tcc Ser	acc Thr	tca Ser	att Ile	192
agt Ser 65	ttg Leu	aga Arg	agt Ser	gcc Ala 70	cac His 70	tta Leu	gtg Val	ggt Gly	caa Gln 75	act Thr 75	ata Ile	ttg Leu	tct Ser	ggt Gly 80	cat His 80	240
tct Ser	act Thr	tat Tyr	tat Tyr	ata Ile 85	tat Tyr	ggt Val	ata Ile	gcc Ala 90	act Thr 90	gca Ala	ccc Pro	aac Asn	atg Met	ttt Phe 95	aac Asn 95	288
ggt Val	aat Asn	gat Asp	gta Val 100	tta Leu	ggg Gly	gca Ala	tac Tyr	agt Ser 105	cct Pro	cat His	cca Pro	gat Asp	gaa Glu 110	caa Gln	gaa Glu	336
ggt Val	tct Ser	gct Ala 115	tta Leu	ggt Gly	ggg Gly	att Ile	cca Pro 120	tac Tyr	tcc Ser	caa Gln	ata Ile	tat Tyr 125	gga Gly	tgg Trp	tat Tyr	384
cga Arg 130	ggt Val	cat His	ttt Phe	ggg Gly	gtg Val	ctt Leu 135	gat Asp	gaa Glu	caa Gln	tta Leu	cat His 140	cgt Arg	aat Asn	agg Arg	ggc Gly	432
tac	aga	gat	aga	tat	tac	agt	aac	tta	gat	att	gct	cca	gca	gca	gat	480

ES 2 578 711 T3

Tyr 145	Arg	Asp	Arg	Tyr	Tyr 150	Ser	Asn	Leu	Asp	Ile 155	Ala	Pro	Ala	Ala	Asp 160	
ggt Gly	tat Tyr	gga Gly	ttg Leu	gca Ala 165	ggt Gly	ttc Phe	cct Pro	ccg Pro	gag Glu 170	cat His	aga Arg	gct Ala	tgg Trp	agg Arg 175	gaa Glu	528
gag Glu	ccg Pro	tgg Trp	att Ile 180	cat His	cat His	gca Ala	ccg Pro	ccg Pro 185	ggt Gly	gct Ala	ggg Gly	aat Asn 190	gct Ala 190	cca Pro	aga Arg	576
tca Ser	tcg Ser	gga Gly 195	tct Ser	ggt Gly	att Ile	gct Ala	ggc Gly 200	ttc Phe	aaa Lys	ggt Gly	gaa Glu	caa Gln 205	ggc Gly	ccc Pro	aag Lys	624
gga Gly 210	gaa Glu	cct Pro	ggc Gly	gga Gly	tcc Ser	ggg Gly 215	aag Lys	aca Thr	ccc Pro	gag Glu	gct Ala 220	gat Asp	gcg Ala	caa Gln	caa Gln	672
aat Asn 225	aac Asn	ttc Phe	aac Asn	aaa Lys	gat Asp 230	caa Gln	caa Gln	agc Ser	gcc Ala	ttc Phe 235	tat Tyr	gaa Glu	atc Ile	ttg Leu	aac Asn 240	720
atg Met	cct Pro	aac Asn	tta Leu	aac Asn 245	gaa Glu	gcg Ala	caa Gln	cgt Arg	aac Asn 250	ggc Gly	ttc Phe	att Ile	caa Gln	agt Ser 255	ctt Leu	768
aaa Lys	gac Asp	gac Asp	cca Pro 260	agc Ser	caa Gln	agc Ser	act Thr	aac Asn 265	ggt Val	tta Leu	ggt Gly	gaa Glu	gct Ala 270	aaa Lys	aaa Lys	816
tta Leu	aac Asn 275	gaa Glu	tct Ser	caa Gln	gca Ala	ccc Pro	aaa Lys 280	ccc Pro	gag Glu	gct Ala	gat Asp	gcg Ala 285	caa Gln	caa Gln	aat Asn	864
aac Asn 290	ttc Phe	aac Asn	aaa Lys	gat Asp	caa Gln	caa Gln 295	agc Ser	gcc Ala	ttc Phe	tat Tyr	gaa Glu 300	atc Ile	ttg Leu	aac Asn	atg Met	912
cct Pro 305	aac Asn	tta Leu	aac Asn	gaa Glu	gcg Ala 310	caa Gln	cgt Arg	aac Asn	ggc Gly	ttc Phe 315	att Ile	caa Gln	agt Ser	ctt Leu	aaa Lys 320	960
gac Asp	gac Asp	cca Pro	agc Ser	caa Gln 325	agc Ser	act Thr	aac Asn	ggt Val	tta Leu 330	ggt Gly	gaa Glu	gct Ala	aaa Lys	aaa Lys 335	tta Leu	1008
aac Asn	gaa Glu	tct Ser	caa Gln 340	gca Ala	ccc Pro	aaa Lys	ccc Pro	gag Glu 345	gta Val	gca Ala	ggt Gly	cag Gln	aat Asn 350			1050

<210> 10

<211> 350

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 10

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

Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr Phe Asp  
20 25 30

ES 2 578 711 T3

Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg Gly Thr  
 35 40 45  
 Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr Ser Ile  
 50 55 60  
 Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser Gly His  
 65 70 75 80  
 Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met Phe Asn  
 85 90 95  
 Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu Gln Glu  
 100 105 110  
 Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly Trp Tyr  
 115 120 125  
 Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn Arg Gly  
 130 135 140  
 Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Pro Trp Ile His His Ala Pro Pro Gly Ala Gly Asn Ala Pro Arg  
 180 185 190  
 Ser Ser Gly Ser Gly Ile Ala Gly Phe Lys Gly Glu Gln Gly Pro Lys  
 195 200 205  
 Gly Glu Pro Gly Gly Ser Gly Lys Thr Pro Glu Ala Asp Ala Gln Gln  
 210 215 220  
 Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu  
 245 250 255  
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys  
 260 265 270  
 Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu Ala Asp Ala Gln Gln Asn  
 275 280 285  
 Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met  
 290 295 300

ES 2 578 711 T3

Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
305 310 315 320

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu  
325 330 335

Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu Val Ala Gly Gln Asn  
340 345 350

<210> 11

<211> 357

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PROTEÍNA DE FUSIÓN SINTÉTICA

<400> 11

ES 2 578 711 T3

Met Lys Asn Asp Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Phe Asp Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg  
 35 40 45

Gly Thr Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr  
 50 55 60

Ser Ile Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser  
 65 70 75 80

Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met  
 85 90 95

Phe Asn Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu  
 100 105 110

Gln Glu Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly  
 115 120 125

Trp Tyr Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn  
 130 135 140

Arg Gly Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala  
 145 150 155 160

Ala Asp Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp  
 165 170 175

ES 2 578 711 T3

Arg Glu Glu Pro Trp Ile His His Ala Pro Pro Gly Ala Gly Asn Ala  
 180 185 190

Pro Arg Ser Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Lys Gln Arg Asn Gly Trp Ser  
 195 200 205

His Lys Asp Leu Leu Arg Ser His Leu Lys Pro Gly Ser Gly Lys Thr  
 210 215 220

Pro Glu Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser  
 225 230 235 240

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg  
 245 250 255

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn  
 260 265 270

Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro  
 275 280 285

Glu Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala  
 290 300

Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn  
 305 310 315 320

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val  
 325 330 335

Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu  
 340 345 350

val Ala Gly Gln Asn  
 355

<210> 12

<211> 358

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PROTEÍNA DE FUSIÓN SINTÉTICA

<400> 12

ES 2 578 711 T3

Met Lys Asn Asp Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr  
20 25 30

Phe Asp Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg  
35 40 45

ES 2 578 711 T3

Gly Thr Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr  
50 55 60

Ser Ile Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser  
65 70 75 80

Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met  
85 90 95

Phe Asn Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu  
100 105 110

Gln Glu Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly  
115 120 125

Trp Tyr Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn  
130 135 140

Arg Gly Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala  
145 150 155 160

Ala Asp Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp  
165 170 175

Arg Glu Glu Pro Trp Ile His His Ala Pro Pro Gly Ala Gly Asn Ala  
180 185 190

Pro Arg Ser Ser Gly Ser Glu Leu Tyr Lys Glu Lys Ala Leu Ser Val  
195 200 205

Glu Thr Glu Lys Leu Leu Lys Tyr Leu Glu Ala Val Gly Ser Gly Lys  
210 215 220

Thr Pro Glu Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln  
225 230 235 240

Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln  
245 250 255

Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr  
260 265 270

Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
275 280 285

Pro Glu Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser  
290 300

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg  
305 310 315 320



ES 2 578 711 T3

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn  
325 330 335

Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro  
340 345 350

Glu Val Ala Gly Gln Asn  
355

<210> 13

<211> 352

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PROTEÍNA DE FUSIÓN SINTÉTICA

<400> 13

ES 2 578 711 T3

Met Lys Asn Asp Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Phe Asp Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg  
 35 40 45

Gly Thr Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr  
 50 55 60

Ser Ile Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser  
 65 70 75 80

Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met  
 85 90 95

Phe Asn Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu  
 100 105 110

Gln Glu Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly  
 115 120 125

Trp Tyr Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn  
 130 135 140

Arg Gly Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala  
 145 150 155 160

Ala Asp Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp  
 165 170 175

Arg Glu Glu Pro Trp Ile His His Ala Pro Pro Gly Ala Gly Asn Ala  
 180 185 190

ES 2 578 711 T3

Pro Arg Ser Ser Gly Ser Gln Glu Met Pro Leu Thr Ala Leu Leu Arg  
 195 200 205

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

Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile  
 225 230 235 240

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
 245 250 255

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala  
 260 265 270

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu Ala Asp Ala Gln  
 275 280 285

Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
 290 295 300

Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser  
 305 310 315 320

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys  
 325 330 335

Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu Val Ala Gly Gln Asn  
 340 345 350

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bet v 1

<400> 14

Met Gly Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr  
 1 5 10

10 <210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Phl p 1

<400> 15

Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr  
1 5 10 15

<210> 16

5 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Phl p 5

10 <400> 16

Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala  
1 5 10 15

Leu Lys

<210> 17

<211> 348

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PROTEÍNA DE FUSIÓN SINTÉTICA

<400> 17

ES 2 578 711 T3

Met Lys Asn Asp Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Phe Asp Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg  
 35 40 45

Gly Thr Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr  
 50 55 60

Ser Ile Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser  
 65 70 75 80

Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met  
 85 90 95

Phe Asn Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu  
 100 105 110

Gln Glu Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly  
 115 120 125

Trp Tyr Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn  
 130 135 140

Arg Gly Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala  
 145 150 155 160

Ala Asp Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp

ES 2 578 711 T3

				165					170					175			
Arg	Glu	Glu	Pro	Trp	Ile	His	His	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Gly	Asn	Ala		
			180					185					190				
Pro	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Met	Gly	Glu	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Val	Glu		
		195					200					205					
Ser	Tyr	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Pro	Glu	Ala	Asp	Ala	Gln	Gln	Asn	Asn		
	210					215					220						
Phe	Asn	Lys	Asp	Gln	Gln	Ser	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Asn	Met	Pro		
225					230					235					240		
Asn	Leu	Asn	Glu	Ala	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp		
				245					250					255			
Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Thr	Asn	Val	Leu	Gly	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn		
			260					265					270				
Glu	Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Pro	Glu	Ala	Asp	Ala	Gln	Gln	Asn	Asn	Phe		
		275					280					285					
Asn	Lys	Asp	Gln	Gln	Ser	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Asn	Met	Pro	Asn		
	290					295					300						
Leu	Asn	Glu	Ala	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp		
305					310					315					320		
Pro	Ser	Gln	Ser	Thr	Asn	Val	Leu	Gly	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Glu		
				325					330					335			
Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Pro	Glu	Val	Ala	Gly	Gln	Asn						
			340					345									

<210> 18

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PROTEÍNA DE FUSIÓN SINTÉTICA

<400> 18

ES 2 578 711 T3

Met Lys Asn Asp Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp  
1 5 10 15  
Glu Ile Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr  
20 25 30  
Phe Asp Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg  
35 40 45

ES 2 578 711 T3

Gly Thr Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr  
50 55 60

Ser Ile Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser  
65 70 75 80

Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met  
85 90 95

Phe Asn Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu  
100 105 110

Gln Glu Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly  
115 120 125

Trp Tyr Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn  
130 135 140

Arg Gly Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala  
145 150 155 160

Ala Asp Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp  
165 170 175

Arg Glu Glu Pro Trp Ile His His Ala Pro Pro Gly Ala Gly Asn Ala  
180 185 190

Pro Arg Ser Ser Gly Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg  
195 200 205

Val Lys Cys Lys Tyr Gly Ser Gly Lys Thr Pro Glu Ala Asp Ala Gln  
210 215 220

Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
225 230 235 240

Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser  
245 250 255

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys  
260 265 270

Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu Ala Asp Ala Gln Gln  
275 280 285

Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn  
290 295 300

Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu  
305 310 315 320

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys  
325 330 335

Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu Val Ala Gly Gln Asn  
340 345 350



ES 2 578 711 T3

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> PROTEÍNA DE FUSIÓN SINTÉTICA

<400> 19

Met Lys Asn Asp Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Phe Asp Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg  
 35 40 45

Gly Thr Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr  
 50 55 60

Ser Ile Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser  
 65 70 75 80

Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met  
 85 90 95

Phe Asn Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu  
 100 105 110

Gln Glu Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly  
 115 120 125

Trp Tyr Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn  
 130 135 140

Arg Gly Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala  
 145 150 155 160

Ala Asp Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp  
 165 170 175

Arg Glu Glu Pro Trp Ile His His Ala Pro Pro Gly Ala Gly Asn Ala  
 180 185 190

Pro Arg Ser Ser Gly Ser Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr  
 195 200 205

ES 2 578 711 T3

Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Gly Ser Gly Lys Thr Pro Glu Ala  
 210 215 220

Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr  
 225 230 235 240

Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe  
 245 250 255

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly  
 260 265 270

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu Ala Asp  
 275 280 285

Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu  
 290 295 300

Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile  
 305 310 315 320

Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu  
 325 330 335

Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Pro Glu Val Ala Gly  
 340 345 350

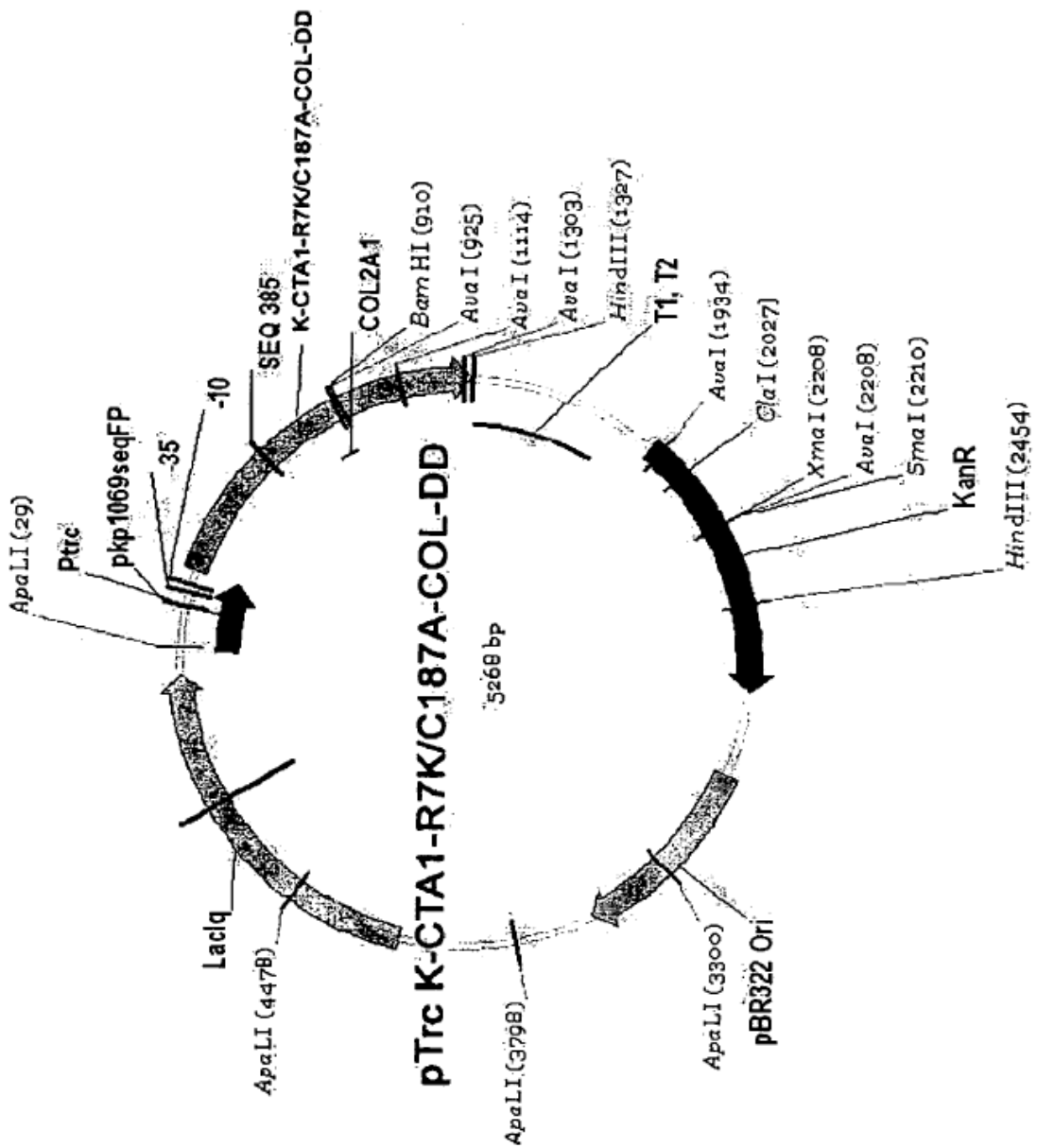
Gln Asn

Reivindicaciones

1. Un complejo inmunomodulador que es una proteína de fusión que comprende:
  - (a) una subunidad mutante de la ribosilación de ADP de subunidad A1 de la toxina del cólera (CTA1),
  - (b) un péptido capaz de unirse a un receptor celular específico en donde dicho péptido es un dímero de subunidad D de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, y
  - (c) uno o más epítopos asociados con una enfermedad autoinmune o alérgica,
 en donde, en la subunidad CTA1 mutante, los aminoácidos que corresponden al aminoácido 7, arginina y aminoácidos 187, cisteína, en la CTA1 nativa han sido reemplazados con lisina en el aminoácido 7 y alanina en el aminoácido 187.
2. El complejo inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la subunidad CTA1 mutante es el mutante CTA 1-R7K/C 187 A, SEQ ID NO: 1.
3. El complejo inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el aminoácido lisina además se ha insertado en el terminal N de la subunidad CTA1 mutante.
4. El complejo inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la subunidad CTA1 mutante es el mutante K-CTA1-R7K/C187A, SEQ ID NO: 2.
5. El complejo inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el uno o más epítopos son epítopos autoinmunes asociados con una enfermedad autoinmune.
6. El complejo inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en diabetes mellitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, uveitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, miastenia gravis, síndrome de Sjögren, pénfigo vulgar, esclerodermia, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Graves.
7. El complejo inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el uno o más epítopos son epítopos que provocan alergia asociados con una enfermedad alérgica.
8. El complejo inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la enfermedad alérgica se selecciona del grupo que consiste en asma alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica e hipersensibilidad alimentaria.
9. El complejo inmunomodulador de la reivindicación 1, en donde el complejo se selecciona de:
  - el complejo de la SEQ ID NO:4;
  - el complejo de la SEQ ID NO: 10;
  - el complejo de la SEQ ID NO: 11;
  - el complejo de la SEQ ID NO: 12;
  - el complejo de la SEQ ID NO: 13;
  - el complejo de la SEQ ID NO: 17;
  - el complejo de la SEQ ID NO: 18; y
  - el complejo de la SEQ ID NO: 19.
10. Un ácido nucleico aislado que codifica un complejo inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un sistema de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Una célula transfectada que comprende un sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Una composición farmacéutica que comprende un complejo inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

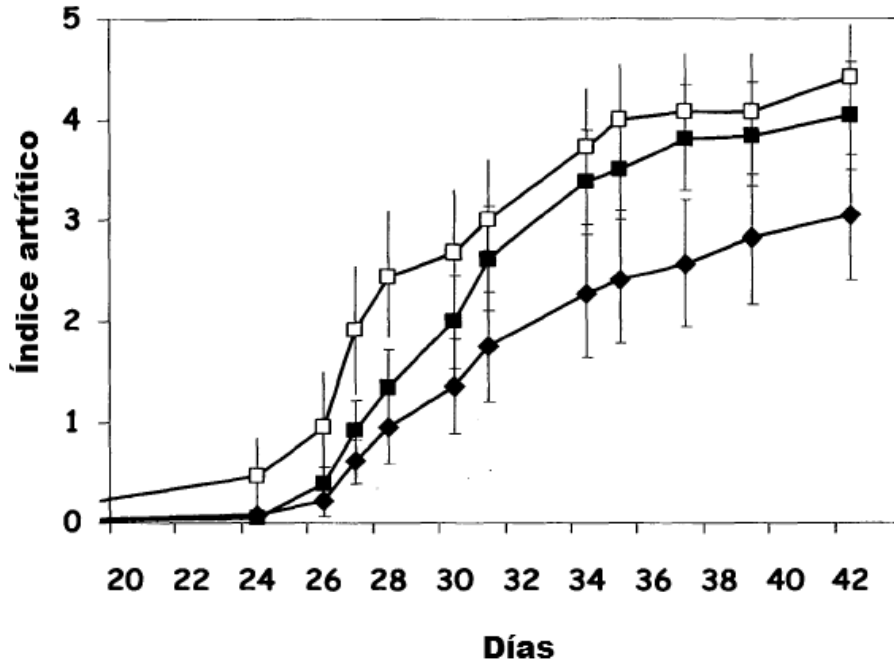
14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el uno o más epítomos están asociados con una enfermedad autoinmune, para su uso en la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune.
- 5 15. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, para uso en la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en diabetes mellitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, uveitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, miastenia gravis, síndrome de Sjögren, pénfigo vulgar, esclerodermia, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Graves.
- 10 16. Uso de un complejo inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde el uno o más epítomos están asociados con una enfermedad autoinmune, para la producción de un medicamento para la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune.
- 15 17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en diabetes mellitus dependiente de la insulina, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, uveitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, miastenia gravis, síndrome de Sjögren, pénfigo vulgar, esclerodermia, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Graves.
18. Un complejo inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el uno o más epítomos están asociados con una enfermedad autoinmune para su uso en profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune en un sujeto.
- 20 19. El complejo inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en diabetes mellitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, uveitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, miastenia gravis, síndrome de Sjögren, pénfigo vulgar, esclerodermia, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Graves.

**Figura 1**

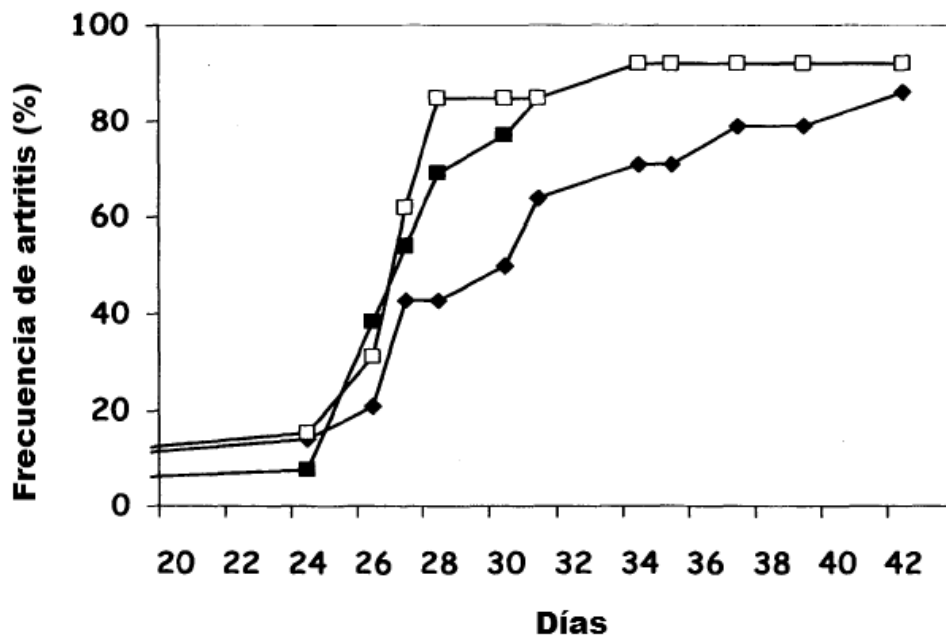


**Figura 2**

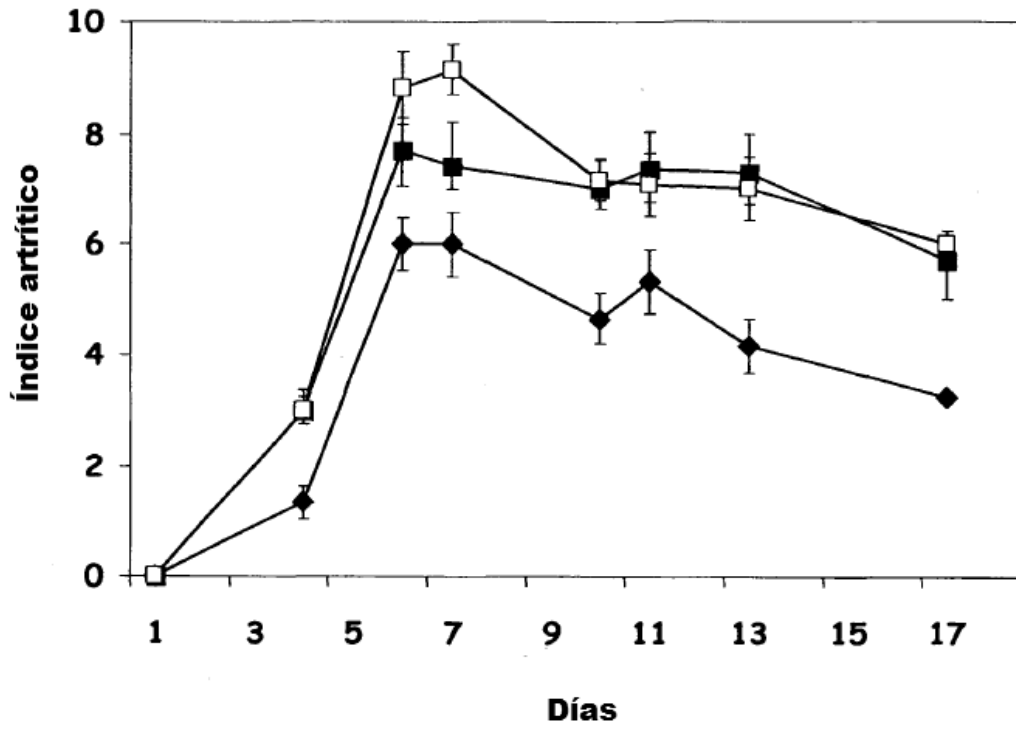
**A**



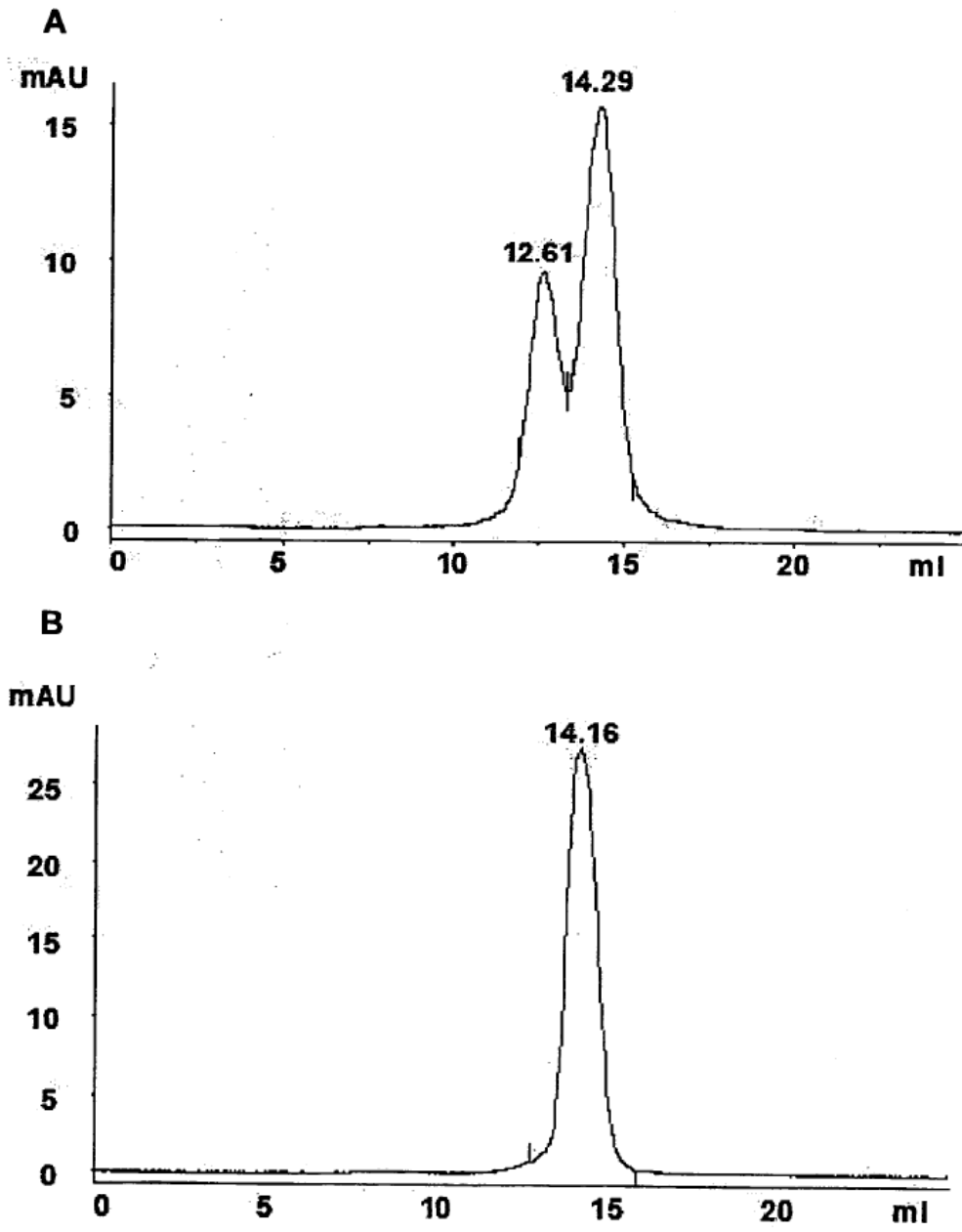
**B**



**Figura 3**



**Figura 4**





**Figura 5**

