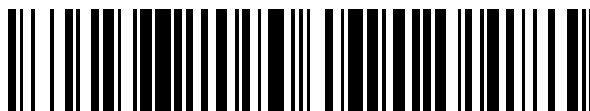


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 641**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2001** **E 05077510 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016** **EP 1693068**

54 Título: **Uso de la chaperonina 60.1 de M. tuberculosis para el tratamiento de la artritis**

30 Prioridad:

17.11.2000 GB 0028122

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

07.10.2016

73 Titular/es:

PEPTINNOVATE LIMITED (100.0%)

90 High Holborn

London WC1V 6XX, GB

72 Inventor/es:

COATES, ANTHONY ROBERT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 585 641 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

Uso de la chaperonina 60.1 de *M. tuberculosis* para el tratamiento de la artritis

5 La presente invención se refiere al uso de un polipéptido de aproximadamente 60 kDa (o su molécula de ácido nucleico codificante) o a moléculas o fragmentos de los mismos funcionalmente equivalentes de *Mycobacterium tuberculosis* o procariotas relacionados en la prevención y/o tratamiento de la artritis reumatoide.

10 La autoinmunidad refleja la pérdida de la tolerancia a lo "propio" dando como resultado la destrucción inapropiada de células o tejidos normales. En muchas dolencias se detectan autoanticuerpos, pero esto puede reflejar un efecto más que la causa de una enfermedad. Sin embargo, en algunas enfermedades, los autoanticuerpos son la primera, más importante o única anomalía detectada. En este sentido, una clase de moléculas que están implicadas son las chaperoninas que son muy inmunogénicas. Las chaperoninas pertenecen a un grupo de proteínas denominadas chaperonas moleculares que se unen a proteínas no nativas y que las ayudan, en un proceso catalítico dependiente de ATP, a plegarse en la forma tridimensional correcta requerida para que una proteína sea funcional.

15 Se cree que las chaperoninas estimulan al sistema inmunitario a muchos niveles simultáneamente, incluyendo a los monocitos, los macrófagos, las células similares a los fibroblastos, quizás otro tipo de células y los linfocitos T. Las defensas inmunitarias en mamíferos pueden dividirse en la defensa "innata" y la defensa "adaptativa". Las que se encuentran listas en todo momento, tales como los fagocitos, los linfocitos citolíticos naturales y el complemento, se consideran innatas. Cuando existe estimulación, se activa la inmunidad adaptativa en la forma de linfocitos B y linfocitos T. Se sabe que las chaperoninas actúan directamente sobre los mecanismos de la defensa innata, particularmente sobre los fagocitos. También estimulan una poderosa respuesta inmunitaria adaptativa, concretamente, mediante la producción de anticuerpos y la estimulación de los linfocitos T que, en algunos casos, puede ser protectora. Hay que señalar que inducen la secreción de citocinas, las cuales se cree que son importantes para las defensas del hospedador. Sin embargo, en ciertos casos, se piensa que la presencia de las chaperoninas puede resultar dañina para el hospedador.

20 El papel de las chaperoninas en las enfermedades autoinmunitarias es controvertido. Aunque la infección/inmunidad por organismos que contienen chaperoninas es universal y las personas sanas poseen respuestas de linfocitos T a las chaperoninas propias, incluyendo la producción de anticuerpos específicos de las chaperoninas, la enfermedad autoinmunitaria clásica es bastante rara. Por tanto, la ocurrencia de reacciones inmunitarias a las chaperoninas puede ser incidental y poco importante.

25 Sin embargo, la teoría del mimetismo molecular sugiere que las chaperoninas se encuentran involucradas en la enfermedad autoinmunitaria y se basa en el alto nivel de conservación de la secuencia de aminoácidos que se observa entre las chaperoninas de origen microbiano y las de mamíferos. La teoría propone que, durante la infección con un amplio espectro de microorganismos, los epítomos de las chaperoninas que son compartidos entre los microorganismos y los mamíferos estimulan los linfocitos T. De acuerdo con esta teoría, un elevado nivel de presentación por parte de las chaperoninas de epítomos de chaperoninas compartidos rompe la tolerancia a las chaperoninas propias y como resultado se desarrolla la enfermedad autoinmunitaria.

30 Se ha encontrado que las chaperoninas obtenidas a partir de tumores producen efectos necróticos sobre dichos tumores. Se ha sugerido que esto pueda deberse a la estimulación del reconocimiento inmunológico de los antígenos tumorales aunque se desconocen los mecanismos que intervienen. Por tanto, aparentemente, las chaperoninas inducen la inmunidad adaptativa protectora contra las infecciones bacterianas y el cáncer.

35 Las reacciones alérgicas, como el asma, están relacionadas proporcionalmente con respuestas inmunitarias inapropiadas o mal dirigidas. Por ejemplo, la incidencia del asma se ha incrementado y no se han encontrado aún terapias efectivas para tratar todos los casos. Los tratamientos actuales con frecuencia utilizan glucocorticoides inmunosupresores, agonistas beta, cromoglicato, modificadores de leucotrienos, etc., que poseen numerosos efectos secundarios.

40 En dichas reacciones alérgicas aparecen altos niveles de IgE y predominan las respuestas inmunitarias de los linfocitos T cooperadores 2 (Th2) sobre las respuestas Th1, lo cual da como resultado una respuesta inflamatoria. Se piensa que las respuestas Th1 son esencialmente protectoras contra las infecciones microbianas y son promovidas por citocinas, en particular la interleucina 12 (IL-12), IL-2 y el interferón-γ. Por otro lado, las respuestas Th2, con la base genética adecuada, están asociadas con daños alérgicos nocivos para los tejidos.

45 Sin embargo, se ha sugerido que, en otras dolencias, como las enfermedades autoinmunitarias, p. ej., la artritis adyuvante, las respuestas Th1 hiperreactivas son las causantes de este trastorno. La conversión de las respuestas Th1 a Th2, o de las respuestas Th2 a Th1 puede, por tanto tener utilidad en el tratamiento de los trastornos antes descritos.

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

Lo que sugiere el conocimiento actual, sin embargo, es que se encuentra implicada una proteína de choque térmico, hsp65, de *M. leprae* que es capaz de inducir las respuestas Th1 (Lowrie et al., 1999, Nature, 400, p269-271; Bonato et al., 1998, Infect. Immun., 66, p169-175). El homólogo de hsp65 de *M. tuberculosis*, tiene la capacidad de estimular los monocitos humanos para sintetizar citocinas proinflamatorias y activar los monocitos y las células del endotelio vascular humano (Friedland et al., 1993, Clin. Exp. Immunol., 91, p5862; Peetermans et al., 1995, Infect. Immun., 63, p3454-3458; Verdegaal, et al., 1996, J. Immunol., 157, p369-376).

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que otra proteína que no se sabe si es una proteína de choque térmico o una chaperonina es capaz de afectar la inmunidad de un individuo y se puede utilizar para tratar o prevenir dolencias no cancerosas, como los trastornos o dolencias autoinmunitarias de inmunoactivación, dolencias alérgicas tales como el asma y/o dolencias caracterizadas por una respuesta inmunitaria de tipo Th2 asociada con eosinofilia.

Esta proteína de función desconocida se ha identificado en *Mycobacterium tuberculosis* y se ha secuenciado (Kong et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90, p2608-2612). Se sabe que existen proteínas comparables en otras bacterias, incluyendo *M. bovis* y *Legionella*. Esta proteína se ha denominado chaperonina 60.1 (cpn 60.1), pero la adopción de esta nomenclatura se basa simplemente en su identidad de secuencia de aminoácidos con otras chaperonas.

La chaperonina 60.2 (de la misma fuente) exhibe un 59,60 % de identidad de la secuencia de aminoácidos y un 65,6 % de identidad de la secuencia de ácido nucleico con la cpn 60.1 utilizando los métodos de alineación que se describen a continuación. No se han confirmado las propiedades de chaperonina de cpn 60.2 ni de cpn 60.1. Se cree que las chaperoninas funcionan mediante la formación de 2 anillos heptámeros (compuestos de monómeros de aproximadamente 60 kDa) que se enfrentan entre sí y están limitados por un anillo heptámero compuesto por monómeros de aproximadamente 10 kDa (formado por la cpn 10s). La ayuda en el plegamiento se consigue una vez que la proteína diana ha entrado en el núcleo central, después de lo cual se libera. Por lo tanto la formación de los heptámeros parece ser esencial para la funcionalidad actualmente conocida de las chaperoninas. Sin embargo, a diferencia de las cpn 60 de otras especies, no ha sido posible producir de heptámeros de cpn 60.1 de *M. tuberculosis*. Además, a diferencia de la maquinaria de plegado de la chaperonina GroE, ni el gen de la cpn 60.1 ni el gen de la cpn 60.2 están en el mismo operón que el gen de chaperonina cpn 10 y por lo tanto la transcripción de los componentes que son necesarios para la formación de un complejo de chaperonina no está bajo el mismos mecanismos de control.

También se ha observado que la proteína cpn 60.1 tiene una secuencia rica en histidina única en el extremo C-terminal a diferencia de las cpn 60 de otras especies que tienen generalmente una secuencia rica en glicina y metionina. La proteína 60.2 es una conocida proteína de choque térmico y tiene una homología muy alta con proteínas de choque térmico relacionadas en otras especies, por ejemplo, 95 % de identidad con la misma proteína de *M. leprae*. Como se mencionó anteriormente, cpn 60.2 se encuentra distante de cpn 60.1 en el genoma de *M. tuberculosis* y está bajo un control transcripcional distinto. Como consecuencia de ello no hay datos que sugieran que cpn 60.1 sea una proteína de choque térmico o una chaperonina. Estos hechos sugieren fuertemente diferentes papeles funcionales para las proteínas cpn 60 de *M. tuberculosis*.

Kong et al. (1993) PNAS USA 90 pp2608-2612 identified and characterises a second chaparonin-60 homolog In *Mycobacterium tuberculosis* (Cpn 60.1).

Quayle et al. (1992) Euro. J. Immunol. 22 pp1315-1322 identifies T cell clones that interact with shared epitopes on human hsp 60 and *Mycobacterium* 65-kDa hsp.

Anderton et al. (1995) J. Exp. Med. 181 pp943-952 report that a peptide containing the 256-270 epitope from hsp65 was able to induce cross-reactive T cells that conferred protection against adjuvant arthritis.

Cobelens et al. (2000) Arthritis and Rheumatism 43 pp2694-2702 investigate the treatment of adjuvant induced arthritis by the oral administration of hsp65 during ongoing disease.

Documento WO 00/27870 (Hadasit Medical Research) relates to peptides homologous to heat shock protein and DNA sequences encoding such peptides. The invention also relates to vaccines comprising such peptides.

Documento WO 95/25744 (Rijksuniversiteit Utrecht) provides peptides for protection against or treatment of an inflammatory disease; the peptides are derived from microbial stress proteins.

Prakken et al. (1997) PNAS USA 94 pp3284-3289 investigated whether tolerance for an adjuvant arthritis associated T cell epitope from mycobacterial heat shock protein 60 can be obtained after intranasal administration of a peptide containing the hsp60 epitope.

Prakken et al. (1998) Biotherapy 10 pp205-211 investigated nasal administration of arthritis related T cell epitopes of hsp60 as a treatment for chronic arthritis.

Lewthwaite et al. (2001) *Infection and Immunity* 69 pp7349-7355 investigated the induction of cytokine synthesis by Cpn 60.1 and Cpn 60.2 from *M. tuberculosis*.

Baird et al. (1989) *J. Gen. Microbiol* 135 pp931-939 characterises the 10 kDa antigen gene of *M. tuberculosis*.

Por consiguiente, la invención proporciona moléculas tales como cpn 60.1, que tienen propiedades mejoradas en el tratamiento o la prevención de la artritis reumatoide.

Las aplicaciones terapéuticas y/o profilácticas pueden lograrse utilizando moléculas de ácidos nucleicos o péptidos/proteínas, como se describirá en más detalle a continuación.

Por lo tanto, en un primer aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o tratamiento de la artritis reumatoide, en el que la composición farmacéutica comprende una molécula de ácido nucleico que comprende

(i) la secuencia de nucleótidos de la Figura 1, o

(ii) una secuencia que tiene más de 70, por ejemplo, 75 %, preferiblemente más de 80 %, por ejemplo más de 90 o 95 % de identidad con la secuencia (i) (de acuerdo con la prueba descrita más adelante) o una secuencia que hibrida con la secuencia (i) en condiciones de 2 x SSC, 65 °C (en la que SSC = NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M, pH 7,2) que codifica una proteína funcionalmente equivalente a la secuencia codificada por la secuencia de nucleótidos de la Figura 1, o

(iii) un fragmento de la secuencia (i) o (ii) que codifica un fragmento de proteína funcionalmente equivalente y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se ha mencionado anteriormente, los efectos terapéuticos y/o profilácticos pueden lograrse utilizando moléculas de ácido nucleico o moléculas de péptido/proteína. Así, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o tratamiento de la artritis reumatoide, en el que la composición farmacéutica comprende un polipéptido que comprende

(i) la secuencia de aminoácidos de la Figura 1, o

(ii) una secuencia que tiene más de 80 %, por ejemplo más de 90 o 95 % de homología con la secuencia (i) (de acuerdo con la prueba descrita más adelante) que proporciona una proteína funcionalmente equivalente, o

(iii) un fragmento funcionalmente equivalente de la secuencia (i) o (ii); y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las "moléculas de ácido nucleico" de acuerdo con la invención pueden ser ADN monocatenario o bicatenario, ADNc, o ARN, preferiblemente ADN. Los derivados de las secuencias nucleotídicas capaces de codificar para polipéptidos funcionalmente equivalentes pueden obtenerse mediante el uso de métodos convencionales, bien conocidos en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico para su uso en la invención pueden consistir solamente en secuencias derivadas de la Figura 1 (o secuencias relacionadas, funcionalmente equivalentes), o pueden incluir secuencias adicionales, tales como secuencias estructurales o funcionales, p. ej., secuencias que controlan la transcripción y/o la expresión (particularmente en células de mamíferos), o secuencias que comprenden la secuencia para un componente proteico adicional que puede formar una proteína de fusión que puede poseer propiedades específicas, p. ej., actuar como una señal para la secreción. Por tanto, por ejemplo, la secuencia puede encontrarse en la forma de un vector que contenga las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. Los vectores apropiados incluyen plásmidos y virus.

"Polipéptidos", tal como se usa en la presente memoria, incluye tanto proteínas de longitud completa, como secuencias peptídicas menores, p. ej., fragmentos proteicos, según se describe en la presente memoria. Tales polipéptidos pueden prepararse mediante cualquier medio conveniente, p. ej., mediante aislamiento a partir del organismo procariota que constituye la fuente de los mismos, o mediante métodos recombinantes, mediante la expresión de la molécula de ácido nucleico apropiada en una célula hospedadora, unida de forma operativa a una secuencia de control de la expresión, o un vehículo de clonaje de ADN recombinante, o un vector que contenga tal molécula de ADN recombinante, o mediante síntesis química o bioquímica (*ex vivo*).

La expresión "identidad de secuencia", como se usa en la presente memoria en relación con secuencias nucleotídicas, hace referencia al valor obtenido al evaluar la secuencia utilizando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994, *Nucl. Acids Res.*, 22, p4673-4680) usando los parámetros siguientes:

Parámetros de los alineamientos de pares de secuencias, Método: riguroso,

Matriz: JUB, Penalización por apertura de hueco: 15,00, Penalización por la extensión de hueco: 6,66;

Parámetros del alineamiento múltiple, Matriz: IUB, Penalización por apertura de hueco: 15,00, porcentaje de identidad por retraso: 30, Matriz negativa: no, Penalización por extensión de hueco: 6,66, Peso de las transiciones en el ADN: 0,5.

Con relación a las secuencias de aminoácidos, la expresión “identidad de secuencia” hace referencia a las secuencias que poseen el valor mencionado cuando la misma se evalúa utilizando el programa ClustalW (Thompson et al., 199a, supra) utilizando los parámetros siguientes: Parámetros de los alineamientos de pares de secuencias, Método: riguroso,

Matriz: PAM, Penalización por apertura de hueco: 10,00, Penalización por extensión de hueco: 0.10; Parámetros del alineamiento múltiple, Matriz: PAM, Penalización por apertura de hueco: 10,00, porcentaje de identidad por retraso: 30, Penalización por huecos en los extremos: sí, Distancia de separación entre huecos: 0, Matriz negativa: no, Penalización por extensión de hueco: 0,20, Penalizaciones por apertura de hueco en residuos específicos: sí, Penalización por apertura de huecos hidrófilos: sí, Residuos hidrófilos: GPSNDQEKR. La identidad de secuencia en un residuo determinado prevé incluir residuos idénticos que solo han sido derivatizados.

Las proteínas o fragmentos de proteínas “funcionalmente equivalentes” hace referencia a proteínas o fragmentos relacionados con, o derivados de, la secuencia de aminoácidos de la Figura 1, donde la secuencia de aminoácidos ha sido modificada mediante la sustitución, adición y/o delección de un único o múltiples aminoácidos (p. ej., entre 1 y 50, p. ej., entre 10 y 30, de preferencia de 1 a 5 bases) pero que, no obstante, mantiene su actividad funcional, p. ej., suprime la eosinofilia inducida mediante ovoalbúmina, por ejemplo, mediante la reducción del número de eosinófilos en más de 10 %, p. ej., más de 25 %, con preferencia particular, más de 50 % y/o un incremento en la producción de citocinas específicas, tales como la interleucina-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, el receptor de la IL-12, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), el interferón- γ y el factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) p. ej., en más de 10 veces, preferiblemente, más de 100 veces de incremento por encima de los niveles normales y/o estimulación de las respuestas Th1. La estimulación de citocinas se puede medir por una variedad de métodos. Por ejemplo, la sangre de la capa leucocítica se diluye 3 veces con PBS-suero de ternera fetal (FCS) 2 %. Se depositan 30 ml sobre 15 ml de Lymphoprep (Histopaque 1077) y se centrifuga a temperatura ambiente durante 30 min a 700 g (1800 rpm, centrífuga Eppendorf). La capa de células mononucleares se aspira cuidadosamente y las células se lavan dos veces en PBS. Por último, las células se resuspenden a 2×10^6 células/ml. Posteriormente se siembran CMSP a 2×10^6 células/pocillo en medio RPMI con FCS 2 %, glutamina y penicilina/estreptomicina y se incuban durante 1 h para permitir que los monocitos se adhieren a la superficie de la placa. Las placas se lavan una vez con PBS.

Las CMSP empobrecidas para linfocitos T se obtienen de la misma manera con la única diferencia de que se hace una incubación inicial con el reactivo RosetteSep (Stemcell) durante 20 min a temperatura ambiente.

Los ensayos de citocinas están dentro del conocimiento de los expertos. Por ejemplo, la producción de IL6 e IL8 se puede medir después de diluir el sobrenadante celular 1/10 y 1/100, respectivamente. Los anticuerpos y los patrones emparejados se pueden obtener del Instituto Nacional de Patrones y Controles Biológicos y se utilizan como se recomienda.

La preparación de la muestra puede ser de la siguiente manera: Cpn 60.1 y Cpn 60.2 se pueden obtener de Lionex (Alemania). Ambas proteínas se diluyeron a una concentración de 200 μ g/ml en PBS antes de la ebullición o esterilización en autoclave. Las muestras hervidas se obtienen por incubación a 100 °C durante 20 min y después se colocan directamente en hielo. La muestra tratada en autoclave se obtiene por tratamiento en autoclave a 120 °C durante 20 min dos veces. El SDS-PAGE se puede realizar en geles de gradiente del 4-20 % (Invitrogen, Holanda). El marcador de la proteína previamente teñida es la escalera de proteína preteñida de referencia de Gibco/BRL. El análisis FACS se puede realizar en un aparato FACScan (Becton Dickinson) y los datos se analizan usando el programa WinMDI Versión 2.8.

Dentro del significado de variantes de “adición” se incluyen aminoácidos y/o proteínas de fusión en el carboxilo terminal o polipéptidos, que comprenden una proteína o polipéptido adicional fusionado a la secuencia polipeptídica.

De preferencia particular son los equivalentes que existen en la naturaleza, tales como variaciones biológicas, p. ej., variantes alélicas, geográficas o alotípicas y derivados preparados mediante las técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden prepararse proteínas o fragmentos funcionalmente equivalentes, ya sea mediante síntesis química de péptidos, o por vía recombinante utilizando las técnicas conocidas de mutagénesis dirigida, mutagénesis aleatoria o escisión enzimática y/o ligación de ácidos nucleicos.

La invención se refiere, de modo particular, a los homólogos y moléculas relacionadas, obtenidas a partir de diferentes procariontes, p. ej., a partir de géneros, especies, o cepas bacterianas, en particular a partir del género *Mycobacterium*, p. ej., homólogos obtenidos a partir del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que incluye a *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*. Tales secuencias pueden estar a su vez, modificadas, en particular, derivatizadas, siempre que sigan manteniendo su funcionalidad.

Pueden prepararse derivados de las proteínas mediante modificaciones posteriores a la síntesis/aislamiento o mediante modificaciones durante la síntesis, p. ej., empleando residuos modificados, o la expresión de moléculas de ácido nucleico modificadas, cuando sea apropiado.

Los fragmentos funcionalmente equivalentes de acuerdo con la invención pueden obtenerse mediante truncamiento, p. ej., mediante la eliminación de los extremos N y/o C terminal de un péptido, o mediante selección de una región apropiada de un dominio activo, p. ej., una región epitópica que mantenga su funcionalidad. Tales fragmentos pueden producirse a partir de la secuencia de la Figura 1 o pueden derivarse a partir de una proteína funcionalmente

equivalente a la que se muestra en la Figura 1.

Se apreciará que, cuando se seleccionan fragmentos funcionales, estos no mostrarán todas las funciones atribuidas a las moléculas de origen. Por lo tanto, proteínas o fragmentos funcionalmente equivalentes se refiere a la conservación de propiedades funcionales relevantes, de tal manera que el fragmento conserve la utilidad de acuerdo con la invención, por ejemplo, reduce la eosinofilia, aumenta la producción de citocina específica y/o estimula la respuesta inmunitaria Th1, como se ha mencionado anteriormente.

Preferiblemente, los fragmentos tienen entre 6 y 400 residuos de longitud, por ejemplo, de 6 a 100 o de 15 a 100 residuos, preferiblemente de 6 a 30, de 10 a 25, de 15 a 50 o de 15 a 30 residuos. Los fragmentos particularmente preferidos son los derivados de, o que consisten en, los residuos:

1-8	MSKLIEYD, (8)
14-21	AMEVGMDK, (8)
40-48	AKAFGGPTV, (9)
64-71	PFEDLGAQ, (8)
96-105	QALIKGGLRL, (11)
110-129	VNPIALGVGIGKAADAVSEA, (20)
132-143	ASATPVSGKTGI, (12)
144-155	AQVATVSSRDEQ, (12)
160-175	VGEAMSKVGHGTVSV, (16)
179-200	STLGTELEFTEGIGFDKGFLSA, (22)
195-219	KGFLSAYFVTDFDNQQAVLEDALIL, (25)
206-219	FDNQQAVLEDALIL, (14)
221-229	HQDKISSLP, (9)
264-271	AIRKTLKA, (8)
276-293	GPYFGDRRKAFLEDLAVV, (18)
299-314	VNPDAGMVLREVGLEV, (16)
315-326	LGSARRVVVSKD, (12)
327-342	DTVIVDGGGTAEAVAN, (16)
343-363	RAKHLRAEIDK, (11)
379-391	VGAATETALKERK, (13)
392-400	ESVEDAVAA, (9)
411-433	PGGGASLIHQARKALTELASLT, (23)
434-449	GPEVLGVDFVSEALAA, (16)
450-463	PLFWIAANAGLDGS, (14)
464-471	VVVKVSE, (8)
480-494	VNTLSYGDLAADGVI, (15)
501-526	RSAVLNASSVARMVLTETVVVDKPA, (15)
526-539	KAEDHDHHHGHAAH, (14)

En las composiciones de la invención también se utilizan secuencias/fragmentos de ácido nucleico funcionalmente equivalentes, comparables a la secuencia presentada en la Figura 1. Estas secuencias se definen en referencia a las proteínas/péptidos funcionalmente equivalentes (como se definió con anterioridad) para los que codifican.

"Hibridización" como se usa en la presente memoria se refiere a aquellas secuencias que se unen en condiciones no estrictas (6 x SSC/formamida 50 % a temperatura ambiente) y se lavan en condiciones estrictas p. ej., 2 x SSC, 65 °C (donde SSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M, pH 7,2).

"Farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a componentes que son compatibles con otros componentes de las composiciones, así como fisiológicamente aceptables para el receptor.

Las composiciones farmacéuticas, de acuerdo a la invención, pueden formularse de manera convencional utilizando componentes fácilmente accesibles. Por tanto, el principio activo (p. ej., la molécula de ácido nucleico o la proteína/péptido) puede incorporarse, opcionalmente, junto a otros principios activos, con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes convencionales, para producir preparaciones farmacéuticas convencionales, tales como comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (sólidos o en un medio líquido), pomadas, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, y otros similares.

Como se mencionó anteriormente, las composiciones pueden incluir, además moléculas que ayudan o incrementan la acción de las moléculas de ácido nucleico o polipéptidos descritos anteriormente en la presente invención, p. ej., talidomida (y análogos de la misma), ciclofosfamida en dosis bajas, LPS, citocinas, quimiocinas, oligodesoxirribonucleótidos CpG y otros agentes inmunomoduladores y/o antiinflamatorios, tales como antagonistas de citocinas o glucocorticosteroides.

Así, por ejemplo, las composiciones pueden utilizarse junto con principios activos para inmunoterapias específicas. Las preparaciones apropiadas para inmunoterapia/vacunas que pueden incluir moléculas de ácido nucleico/polipéptidos, como se describe en la presente memoria, incluyen vacunas de subunidades o tratamientos basados en antígenos específicos celulares o antígenos o anticuerpos asociados, anticuerpos antiidiotípicos o preparaciones de células enteras para la vacunación o la terapia. Cuando se usan para la terapia o la vacunación, las moléculas de ácido nucleico o polipéptidos descritos en la presente memoria pueden proporcionar (o codificar para) un antígeno que produzca como resultado una respuesta inmunitaria específica dirigida a dicho antígeno y/o tenga como resultado una respuesta inmunitaria general y no específica. En el último caso, en el que se utilizan composiciones que contienen otros principios activos, las moléculas de ácido nucleico/polipéptidos descritos en la presente memoria actúan como adyuvantes y pueden utilizarse para dicho propósito.

Se pueden formular preparaciones preventivas o terapéuticas que incluyan uno o más adyuvantes adecuados, p. ej., Adyuvante Incompleto de Freund, BCG, Montanide, hidróxido de aluminio, saponina, Quil A, o formas más purificadas de los mismos, muramil dipéptido, aceites minerales o vegetales, Novasome o copolímeros de bloques no iónicos, o DEAE dextrano, en la presencia de uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos aceptables incluyen medios líquidos tales como solución salina.

Ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados son lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, goma tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, agua, agua/etanol, agua/glicol, agua/polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa, hidroxibenzoatos de metilo, hidroxibenzoatos de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral o sustancias grasas tales como grasa gruesa o mezclas adecuadas de las mismas. Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agente saborizantes y similares. Las composiciones de la invención pueden formularse de manera que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de su administración al paciente, mediante el empleo de procedimientos bien conocidos en la técnica.

Las composiciones pueden presentarse en una forma farmacéutica apropiada, por ejemplo, como emulsiones, o en liposomas, niosomas, microesferas, nanopartículas o similares.

Si es necesario, las composiciones pueden contener también porciones unidas al principio activo dirigidas a una diana, p. ej., un ligando que se une específica y selectivamente a un receptor endógeno para permitir su direccionamiento a un tipo celular o una localización particular, tal como un direccionamiento a linfocitos, monocitos, macrófagos, células endoteliales, células epiteliales, células sanguíneas, eritrocitos, plaquetas, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos citotóxicos naturales, células dendríticas, células del cerebro, células del corazón, células pulmonares, células de islotes, células renales, células de glándulas hormonales, la piel, los huesos, las articulaciones, la médula ósea, la mucosa gástrica, los ganglios linfáticos, los grupos de Peyer, el omentum y otros tejidos inmunológicos.

Tal como se define en la presente memoria "tratamiento" se refiere a la reducción, alivio o eliminación uno o más síntomas de la enfermedad que se está tratando, en relación con los síntomas antes del tratamiento.

"Prevención" de una dolencia se refiere a retrasar o prevenir la aparición de una dolencia o la reducción de su gravedad, según la evaluación de la aparición o la extensión de uno o más síntomas de dicha dolencia.

En particular, las dolencias no cancerosas que se pueden tratar incluyen la artritis reumatoide.

Los pacientes que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, en particular, primates, animales domésticos y ganado. Por lo tanto, los animales preferidos para tratamiento incluyen ratones, ratas, cobayas, gatos, perros, cerdos, cabras, ovejas, caballos y, con particular preferencia, humanos.

Como se mencionó anteriormente, en los métodos de la invención se pueden utilizar tanto moléculas de ácido nucleico como polipéptidos. En los casos en los que se emplean moléculas de ácido nucleico, estas son aplicadas de forma conveniente de una manera que permita su expresión en el paciente, proporcionando, de esa manera, una forma de terapia génica. Por tanto, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria que contienen una molécula de ácido nucleico pueden usarse en métodos de terapia génica.

Así, por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico pueden proveerse en un liposoma, micela u otro vehículo portador adecuado que puede comprender porciones de direccionamiento que permitan dirigir el mismo a las células de interés.

Como alternativa, las moléculas se pueden empaquetar en otros "vehículos" tales como virus, plásmidos o células (en particular células transfectadas compatibles con la especie) que son bien conocidos en la técnica para este fin, lo que permite la expresión de la molécula residente.

Las técnicas adecuadas para la transfección son bien conocidas e incluyen la electroporación, la microinyección, la lipofección, la adsorción, la transfección viral y la fusión de protoplastos.

La administración de las composiciones de la invención puede llevarse a cabo a través de cualquiera de las vías convencionales, p. ej., mediante inhalación, por vía nasal, por vía oral, por vía rectal o por vía parenteral, ya sea por inyección intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, o intravenosa. También es posible el tratamiento o la profilaxis mediante la aplicación tópica de una composición, p. ej., una pomada en la piel. Opcionalmente, se puede realizar la administración a intervalos, p. ej., 2 o más aplicaciones, p. ej., 2-4 aplicaciones a intervalos de una hora, un día, una semana, o un mes, p. ej., varias veces al día, o cada 3-5 días, o cada dos semanas, cada mes o cada tres meses.

En un trabajo realizado sobre la molécula relacionada cpn 60.2, se ha observado que la vía de administración puede afectar la respuesta inmunitaria que se genera. Por ejemplo, cuando Mtcpn 60.2 se administra por vía intranasal, se estimula un cambio de Th2 a Th1, observándose el cambio contrario cuando se administra por vía intraperitoneal. Por lo tanto, para la vía de administración debe tenerse en cuenta el trastorno que se vaya a tratar/prevenir y, así, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, puede ser adecuada la administración intraperitoneal, mientras que en el tratamiento o la prevención de enfermedades alérgicas particulares puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante administración por vía intranasal.

En los métodos profilácticos de la invención, la administración (convenientemente oral o mediante inhalación o mediante inyección subcutánea o intramuscular) se realiza preferiblemente a intervalos más extendidos, p. ej., intervalos de 2-12 semanas. Para fines terapéuticos, la administración (convenientemente oral o mediante inhalación o mediante inyección subcutánea o intramuscular) se realiza de 1 a 4 veces durante un mismo día o a lo largo de 2 días.

El principio activo de la composición de la invención puede incluir desde aproximadamente 0,01 % hasta aproximadamente 99 % en peso de la formulación, preferiblemente desde aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 50 %, por ejemplo 10 %. Las composiciones preferiblemente se formulan en forma de una dosis unitaria, p. ej., cada dosis contiene desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 1 g del principio activo, p. ej., 0,05 mg hasta 0,5 g, para un ser humano, p. ej., 1-100 mg.

La dosificación exacta del compuesto activo a ser administrado y la duración del ciclo del tratamiento dependerá, desde luego, de un número de factores que incluyen, por ejemplo, la edad y el peso del paciente, la dolencia específica que requiere tratamiento y su gravedad y la vía de administración. Por lo general, sin embargo, una dosis efectiva puede estar en el intervalo desde aproximadamente 0,1 µ/kg hasta aproximadamente 14 mg/kg, preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg, p. ej., desde aproximadamente 1 mg hasta 1 g de polipéptido por día, dependiendo del animal que se esté tratando, y de la forma farmacéutica, tomada como una dosis única. Así, por ejemplo una dosis diaria adecuada para un adulto puede ser desde 7 µg hasta 1 g, p. ej., 10 mg hasta 1 g por día, p. ej., de 25 a 500 mg del polipéptido por día.

Dosificaciones similares o menores pueden utilizarse cuando se emplean las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria, p. ej., desde aproximadamente 0,2 ng/kg hasta aproximadamente 2,5 mg/kg (p. ej., desde aproximadamente 0,2 ng/kg hasta aproximadamente 2 ng/kg o desde aproximadamente 1,5 ng/kg hasta aproximadamente 2,5 mg/kg), como desde aproximadamente 14 ng hasta aproximadamente 175 mg para un adulto. Sin embargo, en los casos en que las moléculas de ácido nucleico están empaquetadas en células o vectores, se pueden requerir cantidades proporcionalmente superiores o inferiores, dependiendo de la longitud del ADN que no codifica para la cpn y las secuencias que ejercen influencia sobre el nivel de la expresión, p. ej., en cantidades 5 o 10 veces superiores, p. ej., las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria, empaquetadas en un vector, pueden utilizarse desde aproximadamente 1,0 ng/kg hasta aproximadamente 12,5 mg/kg.

Como se mencionó anteriormente, la familia de polipéptidos definida en la presente memoria y las moléculas de ácido nucleico que las codifican estimulan la producción de un conjunto de citocinas. Esto permite, por tanto, el uso de estos compuestos con el propósito expreso de estimular la producción de estas citocinas ya sea en una situación terapéutica o profiláctica.

Preferiblemente, las citocinas que se incrementan, por ejemplo más de 10 o 100 veces en relación con los niveles normales, se seleccionan del grupo que consiste en IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNFα, interferón-γ y GM-CSF.

Definiciones

“**ADYUVANTE**”. Este término se destina a cubrir cualquier sustancia que, cuando se incorpora en o se administra simultáneamente con el antígeno, potencia la respuesta inmunitaria.

“**MT60.1**”, “**Mtcpn60.1**”, “**cpn 60.1**”, “**60,1**” se utilizan indistintamente en toda la memoria para referirse a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1.

Descripción de las figuras

Figura 1: muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de cpn 60.1 de *M. tuberculosis*;

Figura 2: muestra los efectos *in vitro* de la cpn 60.1 y 60.2 de *M. tuberculosis* en la producción de citocinas; A) IL-1 β , B) IL-6, C) IL-8, D) IL-10, E) IL-12, F) TNF α y G) GM-CSF, en el que los círculos rellenos representan cpn 60.1 y los círculos en blanco representan cpn 60.2;

Figura 3: muestra los resultados del ensayo ELISA que indican una generación significativa de anticuerpos en ratas tratadas con chaperonina (es decir, animales tratados con 60.1 y 60.2), pero no en animales no tratados o tratados con PBS. Leyenda: Naïve (sin inmunización); El antígeno utilizado en el ELISA es cpn 60.2 ("65"); cpn 60.1 ("cpn") o cpn 10 ("10"). Por ejemplo, en el eje y "Naïve/65" indica que el animal no fue inmunizado y el antígeno utilizado en el ELISA fue 60.2. Del mismo modo, "cpn/cpn" indica que el animal se inmunizó con 60.1 y que el antígeno utilizado en el ELISA fue 60.1.

Figura 4: muestra el efecto, en términos de puntuación clínica para la artritis del tratamiento con y sin cpn60.1, 60.2 o 10.

Figura 5: muestra el efecto, en términos de puntuación de rayos X para la artritis del tratamiento con y sin cpn60.1, 60.2 o 10. Leyenda: "Ost" = osteoporosis; "Peri" = perioditis y "Ero" = erosión.

Figura 5(a): muestra el efecto del tratamiento con cpn60.1 de la artritis reumatoide inducida por adyuvante en la rata Wistar. La artritis fue inducida por una sola inyección intra-dérmica en la cola de *Mycobacterium tuberculosis* destruido térmicamente en aceite (adyuvante). El tratamiento fue mediante inyección de CPN 60.1 (50 μ g en solución salina tamponada con fosfato) en los días 4, 5 y 6 después de la inducción. La progresión de la enfermedad, evaluada por la inflamación de la pata, se controló diariamente. Se tomaron radiografías cuando la artritis era máxima (> 9 días después del tratamiento). Imagen superior: pata trasera de la rata tratada con CPN 60.1 después de la inducción con adyuvante, que muestra la densidad ósea y la fisiología articular indistinguibles de las ratas normales. Imagen inferior: pata trasera de ratas que muestra las lesiones reumatoides típicas de la artritis inducida por adyuvante: erosión ósea, osteoporosis, cambios y oclusión de las articulaciones. Estos son mostrados en la Figura 5b.

EJEMPLO 1: La cpn 60.1 de *Mycobacterium tuberculosis* es un potente inductor de citocinas

En este experimento se examinó mediante un ensayo ELISA la actividad inductora de citocinas de las proteína recombinantes cpn 60.1 de *M. tuberculosis* purificada.

Métodos

Expresión y purificación de las proteínas chaperonina 60 de *M. tuberculosis*. Las cpn 10, 60.1 y 60.2 fueron preparadas por el Prof. M. Singh (Centro Colaborador de la OMS, Alemania) utilizando cromatografía convencional como se describe a continuación.

Purificación de la cpn 60.2 recombinante:

La proteína se obtuvo a partir de células K12 de *E. coli* recombinantes inducidas por calor (42 °C) que llevan un plásmido que codifica cpn 60.2 de *M. tuberculosis*. Las células se lisaron por sonicación. El sobrenadante se sometió a cromatografía sobre una columna de cromatografía de intercambio aniónico. Después de la diálisis, las fracciones que contienen cpn 60.2 se purificaron adicionalmente en una segunda columna de cromatografía de intercambio aniónico diferente. Finalmente la solución de proteína se dializó contra bicarbonato de amonio 10 mM antes de su distribución en alícuotas y liofilización.

Se tuvo mucho cuidado en comprobar cada lote de proteína para evitar la contaminación por LPS, utilizando el ensayo de Limulus (Tasbona et al., 1998, J. Immunol., 161, 1414-1421). Cuando se detectaba contaminación por LPS, la misma se eliminaba en una columna de afinidad con polimixina B y se volvían a determinar las concentraciones de LPS. La chaperoninas recombinantes, con bajos niveles de LPS se continuaron purificando en una columna de rojo reactivo para eliminar las proteínas y los péptidos contaminantes (Tabona et al., 1998, supra).

Los efectos *in vitro* de cpn 60.1 y cpn 60.2 sobre la producción de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α y GM-CSF en CMSP humana se determinó utilizando ELISA de 2 sitios como se describe por Tabona et al., 1998, supra.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 2. Sorprendentemente, la proteína cpn 60.1 resultó ser un inductor de citocinas mucho más potente que la perfectamente estudiada cpn 60.2 o hsp65. Además de ser dos órdenes log más potente que cpn 60.2, la proteína cpn 60.1 estimula una respuesta máxima en monocitos humanos significativamente mayor que la cpn 60.2 o LPS. Es interesante señalar que, ambas chaperoninas estimulan la producción de IL-12 pero no promueven la formación de la citocina anti-micobacteriana IFN- γ . En este contexto, hemos examinado una serie de péptidos derivados de cpn 60. El supuesto péptido epítopo de linfocitos T de cpn 60.1, 195-219, ha demostrado ser un potente inductor de la síntesis de citocinas, incluyendo IFN- γ (datos no

mostrados). Los mismos péptidos en cpn 60.2 de *M. tuberculosis* y en la proteína cpn 60 de *E. coli*, groEL, no mostraban actividad inductora de citocinas (Lewthwaite, Henderson y Coates, datos no publicados). Estos resultados confirman la acción de cpn 60.1 de *M. tuberculosis* en monocitos/macrófagos y por tanto su uso en la prevención o el tratamiento de ciertas dolencias.

EJEMPLO 2: Enfermedad autoinmunitaria: 60.1 suprime la artritis en la rata.

Este ejemplo muestra por primera vez que en un modelo de rata de artritis la proteína cpn 60.1 de *M. tuberculosis* inhibía las erosiones óseas de la osteoporosis y la periostitis en ratas inmunizadas. Estos datos contribuyen a demostrar que Mtcpn 60.1 modula la artritis en la rata y, por lo tanto, tiene importantes implicaciones para el tratamiento y la prevención de la artritis.

Métodos

Aunque el adyuvante/*M. tuberculosis* no es un estímulo que se observe frecuentemente en sujetos con artritis, las respuestas Th1 observadas en modelos de rata de inflamación son análogas a las observadas en la artritis reumatoide.

El perfil de citocinas Th1 generado por ambos alérgenos son similares. La ventaja de utilizar este adyuvante es que está fácilmente disponible y la actividad específica de este estímulo no cambia entre los lotes y, por tanto, se puede controlar para la dosis adyuvante entre lotes.

Protocolo general para la inducción de la artritis adyuvante

Las cepas humanas C, DT y PN de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) destruidas por calor se trituran finamente en un mortero y se suspenden en aceite de parafina ligero a una concentración final de 10 mg/ml.

Las ratas se inocularon en la base de la cola con un total de 100 µl de la suspensión de Mtb (Andrews et al, 1987). Los animales se observan diariamente durante 3-4 semanas, evaluando los pesos corporales y las puntuaciones clínicas. Al final del experimento, los animales se sacrificaron por asfixia en CO₂ y se recogieron muestras de sangre y tejido.

Puntuaciones clínicas

El día de la inducción de la artritis es designado como el día 0 y la artritis se evaluó utilizando el siguiente sistema de puntuación estándar (adaptado de la obra de Currey y Ziff, 1968).

0. Sin inflamación.

1. Ligero enrojecimiento e hinchazón de los pies.
2. Hinchazón de los pies de tal manera que los tendones ya no son visibles.
3. La inflamación se extiende a la articulación del tobillo.
4. Inflamación extensa y deformidad de la articulación del tobillo

Las puntuaciones se suman para cada animal, lo que da un máximo posible de 16.

Además, la cola se puede puntuar de 0 a 1 de acuerdo con la ausencia o presencia de nódulos cutáneos y las orejas puntuaban de 0-1 de acuerdo con la ausencia o presencia de enrojecimiento. La cola y las orejas no se puntuaron en el experimento de la chaperonina.

Referencias

Andrews FJ, Morris CJ, Kondratowicz B, Bake DR: Effect of iron chelation on inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 327-33.

Currey HLF, Ziff M. Suppression of adjuvant disease in the rat by heterologous antilymphocyte globulin. *J Exp Med* 1968; 127: 185-203.

Detalles experimentales

Especie: rata Wistar de 160-200 g al inicio del experimento

Raza: Bath - bom y destetados

Sexo: hembra

Número en la jaula: 6

Preparaciones de la proteína de choque térmico (chaperonina):

Cpn 10 (hsp 10): suministrada a 1 mg/ml en fosfato de potasio 20 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM (1 ml)

Cpn 60.1 (hsp60.1): suministrada a 2,25 mg/ml en bicarbonato de amonio 10 mM (0,3 ml)

Cpn 60.2 (hsp65): suministrada a 3,33 mg/ml en bicarbonato de amonio 10 mM (0,45 ml)

Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

PBS de Dulbecco estéril con o sin Ca y Mg usado (Gibco)

Se añadieron 720 µl de PBS a la preparación de Cpn 60.1, 570 µl a la preparación de Cpn 60.2 y 120 µl a la preparación de hsp 10 (en volumen) para completar 1 mg/ml; las preparaciones de cpn se distribuyeron en alícuotas (320 µl) en tubos Eppendorf y se conservaron en la nevera hasta el momento de la inyección. El resto se volvió a congelar a - 70 °C para los ensayos ELISA.

Cinco grupos de 6 ratas fueron inoculados con 100 µl de Mtb pulverizado destruido por calor (10 mg/ml) en aceite de parafina ligero (adyuvante) en la cola (día 0). Un grupo de 6 ratas no recibió tratamiento (naïve). Se pesaron todos los animales. En los días 4, 5 y 6, los 5 grupos que recibieron adyuvante fueron tratados de la manera siguiente:

Grupo 1: sin tratamiento (AA solo)

Grupo 2: cada rata se inyectó con 50 µl de PBS en la cola (AA + vehículo)

Grupo 3: cada rata se inyectó con 50 µl de hsp 10 en la cola (AA + hsp 10)

Grupo 4: cada rata se inyectó con 50 µl de cpn60.1 en la cola (AA + cpn60.1)

Grupo 5: cada rata se inyectó con 50 µl de hsp65 (cpn60.2) en la cola (AA + hsp65)

Grupo 6: Naïve

Diariamente se puntuó a todos los animales y se pesaron en los días 0, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18 y 21.

Resultados

La Figura 3 muestra una generación de anticuerpos significativa en las ratas tratadas con chaperonina, pero no en los animales no tratados o tratados con PBS.

La Figura 3 también muestra que la inmunización de ratas tratadas con adyuvantes con cpn60.1 provoca la mayor cantidad de anticuerpos, lo que sugiere la inducción de una respuesta Th2.

La Figura 4 muestra los resultados obtenidos con y sin tratamiento con cpn 60.1, 60.2 o 10. El tratamiento con vehículo solo dio una puntuación clínica de 12 después de 21 días. Este se incrementó con 60.2 hasta 14 y se redujo con cpn 10 hasta 9. El tratamiento con 60.1 era indistinguible del vehículo solo. Esto proporciona evidencia de que la respuesta inflamatoria se incrementa con 60.2, disminuye con 10, mientras que 60.1 no tiene ningún efecto.

Los solicitantes también han examinado las articulaciones por rayos X (Figura 5, 5(a) y 5(b)). En 10 se observó un aumento de las puntuaciones de rayos X para la osteoporosis, erosiones óseas y periostitis; 60.2 no fue diferente al vehículo solo.

Estos datos demuestran por primera vez que Mtcpn 60.1 puede suprimir la osteoporosis, las erosiones óseas y la periostitis en un modelo de artritis en rata. Esto muestra que esta proteína tiene el potencial de modular la artritis en la rata, lo que tiene importantes implicaciones para el tratamiento y prevención de enfermedades autoinmunitarias y alérgicas.

Se cree que las enfermedades autoinmunitarias, tales como la artritis, actúan por un mecanismo (hiperreactividad de los linfocitos Th-1) diferente al de las dolencias alérgicas (hiperreactividad de los linfocitos Th-2). Es particularmente sorprendente, por tanto, que 60.1 suprime *tanto* el asma (Th2) como la artritis (Th1).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Helperby Therapeutics Limited

<120> Materiales biológicos y usos de los mismos

<130> HELBH/P25182EPdiv1

<140> EP05077510.5

<141> 16 de noviembre de 2001

<150> GB0028122.0

<151> 17 de noviembre de 2000

<160> 30

5 <170> SeqWin99

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
10 <213> Desconocida

<220>
<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*
<400> 1

15 Met Ser Lys Leu Ile Glu Tyr Asp
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Desconocida

<220>
<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

25 <400> 2

Ala Met Glu Val Gly Met Asp Lys
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Desconocida

<220>
35 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 3

Ala Lys Ala Phe Gly Gly Pro Thr Val
1 5

40 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
45 <213> Desconocida

<220>
<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 4

50 Pro Phe Glu Asp Leu Gly Ala Gln
1 5

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
55 <213> Desconocida

<220>

<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 5

Gln Ala Leu Ile Lys Gly Gly Leu Arg Leu
1 5 10

5

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Desconocida

<220>

<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

15 <400> 6

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

Val Ser Glu Ala
20

20

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Desconocida

<220>

25 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 7

Ala Ser Ala Thr Pro Val Ser Gly Lys Thr Gly Ile
1 5 10

30

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

35 <213> Desconocida

<220>

<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 8

40

Ala Gln Val Ala Thr Val Ser Ser Arg Asp Glu Gln
1 5 10

<210> 9

<211> 16

45 <212> PRT

<213> Desconocida

<220>

<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

50

<400> 9

Val Gly Glu Ala Met Ser Lys Val Gly His Asp Gly Val Val Ser Val
1 5 10 15

<210> 10
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Desconocida
 5
 <220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*
 <400> 10
 10
 Ser Thr Leu Gly Thr Glu Leu Glu Phe Thr Glu Gly Ile Gly Phe Asp
 1 5 10 15
 Lys Gly Phe Leu Ser Ala
 20
 <210> 11
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Desconocida
 15
 <220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*
 20
 <400> 11
 Lys Gly Phe Leu Ser Ala Tyr Phe Val Thr Asp Phe Asp Asn Gln Gln
 1 5 10 15
 Ala Val Leu Glu Asp Ala Leu Ile Leu
 20 25
 25
 <210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Desconocida
 30
 <220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*
 <400> 12
 Phe Asp Asn Gln Gln Ala Val Leu Glu Asp Ala Leu Ile Leu
 1 5 10
 35
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocida
 40
 <220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*
 45
 <400> 13
 His Gln Asp Lys Ile Ser Ser Leu Pro
 1 5
 50
 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Desconocida

<220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

5 <400> 14

Ala Ile Arg Lys Thr Leu Lys Ala
 1 5

<210> 15
 <211> 18
 10 <212> PRT
 <213> Desconocida

<220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

15 <400> 15

Gly Pro Tyr Phe Gly Asp Arg Arg Lys Ala Phe Leu Glu Asp Leu Ala
 1 5 10 15

Val Val

20 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Desconocida

25 <220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 16

Val Asn Pro Asp Ala Gly Met Val Leu Arg Glu Val Gly Leu Glu Val
 1 5 10 15

30 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Desconocida

<220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

40 <400> 17

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

45 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Desconocida

<220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

50 <400> 18

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

55

5 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocida
 <220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*
 <400> 19
 Arg Ala Lys His Leu Arg Ala Glu Ile Asp Lys
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Desconocida
 <220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*
 <400> 20
 Val Gly Ala Ala Thr Glu Thr Ala Leu Lys Glu Arg Lys
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocida
 <220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*
 <400> 21
 Glu Ser Val Glu Asp Ala Val Ala Ala
 1 5
 <210> 22
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Desconocida
 <220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*
 <400> 22
 Pro Gly Gly Gly Ala Ser Leu Ile His Gln Ala Arg Lys Ala Leu Thr
 1 5 10 15
 Glu Leu Arg Ala Ser Leu Thr
 20
 <210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Desconocida
 <220>
 <223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 23

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

5 <210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Desconocida

10 <220>
<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 24

Pro Leu Phe Trp Ile Ala Ala Asn Ala Gly Leu Asp Gly Ser
1 5 10

15 <210> 25
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Desconocida

<220>
<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

25 <400> 25

Val Val Val Asn Lys Val Ser Glu
1 5

30 <210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Desconocida

35 <220>
<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 26

Val Asn Thr Leu Ser Tyr Gly Asp Leu Ala Ala Asp Gly Val Ile
1 5 10 15

40 <210> 27
<211> 26
<212> PRT
45 <213> Desconocida

<220>
<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 27

50 Arg Ser Ala Val Leu Asn Ala Ser Ser Val Ala Arg Met Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Glu Thr Val Val Val Asp Lys Pro Ala
20 25

<210> 28

<211> 13
<212> PRT
<213> Desconocida

5 <220>
<223> Polipéptidos derivados de diversas especies de *Mycobacterium*

<400> 28

Lys Ala Glu Asp His Asp His His His Gly His Ala His
1 5 10

<210> 29
<211> 1620
<212> ADN

15 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 29

atgagcaagc	tgatcgaata	cgacgaaacc	gcgcgtcgcg	ccatggaggt	cggcattggac	60
aagctggccg	acaccgtgcg	ggtgacgtcg	gggccgcgcg	gccggcatgt	ggtgctggcc	120
aaggcggttg	gcggaaccac	ggttaccac	gacggcgctca	cggtggcacg	tgagatcgag	180
ctggaagatc	cgtttgaaga	cttgggcgcc	cagctggtga	agtcggtggc	caccaagacc	240
aacgatgtgg	ccggtgacgg	caccaccacc	gcaaccatct	tggcgagggc	actgatcaag	300
ggcggcctga	ggctagtggc	cgccggcgctc	aaccgatcg	cgctcggcgt	gggaatcggc	360
aaggccgcgc	acgcggtatc	cgaggcgctg	ctggcatcgg	ccacgccggt	gtccggcaag	420
accggcatcg	cgcaggtggc	gacggtgtcc	tcgcgcgacg	agcagatcgg	tgacctggtt	480
ggcgaagcga	tgagcaaggt	cggccacgac	ggcgtggtca	gcgtcgaaga	atcctcgacg	540
ctgggcaccg	agttggagtt	caccgagggc	atcggttcg	acaagggtt	cttgtcgcca	600
tacttcgtta	ccgacttcga	taaccagcag	gcggtgctcg	aggacgcgtt	gatcctgctg	660
caccaagaca	agatcagctc	gcttcccgat	ctgttgccat	tgctggaaaa	ggttgcagga	720
acgggtaagc	cactactgat	cgtggctgaa	gacgtggagg	gcgaagcggt	ggcgacgctg	780
gtcgtcaacg	cgattcgcaa	gacgttgaaa	gcggtcgcg	tcaagggg	gtacttcggt	840
gaccgcccga	aggcggttct	tgaggacctg	gcggtggtga	cggtgggcca	ggtggtcaac	900
cccgcgcgcg	gcatggtgct	gcgcgaggtg	ggcttgagg	tgctgggctc	ggcccgcgc	960
gtggtggtca	gcaaggacga	cacggtcatt	gtcgacggcg	gcggcaccgc	agaagcggtg	1020
gccaaaccggg	cgaagcactt	gcgtgccgag	atcgacaaga	gcgattcgga	ttgggatcgg	1080
gaaaagcttg	gcgagcggt	ggccaaactg	gccggcgggg	ttgctgtcat	caagggtggg	1140
gccgccaccg	agaccgcact	caaggagcgc	aaggaaaagc	tcgaggatgc	ggtcgcggcc	1200
gccaaaggccg	cggtcgagga	gggcatcgct	cctggtgggg	gagcctcgct	catccaccag	1260
gcccgcgaagg	cgctgaccga	actgcgtgcg	tcgctgaccg	gtgacgaggt	cctcggtgtc	1320
gacgtgttct	ccgaagccct	tgccgcgcgc	ttgttctgga	tcgccgcca	cgctggcttg	1380
gacggctcgg	tggtggtcaa	caaggtcagc	gagctaccgc	ccgggcatgg	gctgaacgtg	1440
aacaccctga	gctatggtga	cttggccgct	gacggcgctca	tcgaccgggt	caagggtgact	1500
aggtcggcgg	tggtgaacgc	gtcatcggtt	gcccggatgg	tactcaccac	cgagacggtc	1560
gtggtcgaca	agccggccaa	ggcagaagat	cacgaccatc	accacgggca	cgcgactga	1620

20 <210> 30
<211> 539
<212> PRT
25 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 30

ES 2 585 641 T3

Met	Ser	Lys	Leu	Ile	Glu	Tyr	Asp	Glu	Thr	Ala	Arg	Arg	Ala	Met	Glu
1				5					10					15	
Val	Gly	Met	Asp	Lys	Leu	Ala	Asp	Thr	Val	Arg	Val	Thr	Leu	Gly	Pro
			20					25					30		
Arg	Gly	Arg	His	Val	Val	Leu	Ala	Lys	Ala	Phe	Gly	Gly	Pro	Thr	Val
		35					40					45			
Thr	Asn	Asp	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Arg	Glu	Ile	Glu	Leu	Glu	Asp	Pro
	50					55					60				

ES 2 585 641 T3

Phe	Glu	Asp	Leu	Gly	Ala	Gln	Leu	Val	Lys	Ser	Val	Ala	Thr	Lys	Thr	65	70	75	80
Asn	Asp	Val	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Ile	Leu	Ala	Gln	85	90	95	
Ala	Leu	Ile	Lys	Gly	Gly	Leu	Arg	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Val	Asn	Pro	100	105	110	
Ile	Ala	Leu	Gly	Val	Gly	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	Asp	Ala	Val	Ser	Glu	115	120	125	
Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Lys	Thr	Gly	Ile	Ala	130	135	140	
Gln	Val	Ala	Thr	Val	Ser	Ser	Arg	Asp	Glu	Gln	Ile	Gly	Asp	Leu	Val	145	150	155	160
Gly	Glu	Ala	Met	Ser	Lys	Val	Gly	His	Asp	Gly	Val	Val	Ser	Val	Glu	165	170	175	
Glu	Ser	Ser	Thr	Leu	Gly	Thr	Glu	Leu	Glu	Phe	Thr	Glu	Gly	Ile	Gly	180	185	190	
Phe	Asp	Lys	Gly	Phe	Leu	Ser	Ala	Tyr	Phe	Val	Thr	Asp	Phe	Asp	Asn	195	200	205	
Gln	Gln	Ala	Val	Leu	Glu	Asp	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	His	Gln	Asp	Lys	210	215	220	
Ile	Ser	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Val	Ala	Gly	225	230	235	240
Thr	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Ala	Glu	Asp	Val	Glu	Gly	Glu	Ala	245	250	255	
Leu	Ala	Thr	Leu	Val	Val	Asn	Ala	Ile	Arg	Lys	Thr	Leu	Lys	Ala	Val	260	265	270	
Ala	Val	Lys	Gly	Pro	Tyr	Phe	Gly	Asp	Arg	Arg	Lys	Ala	Phe	Leu	Glu	275	280	285	
Asp	Leu	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Gly	Gln	Val	Val	Asn	Pro	Asp	Ala	Gly	290	295	300	
Met	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	Arg	Arg	305	310	315	320
Val	Val	Val	Ser	Lys	Asp	Asp	Thr	Val	Ile	Val	Asp	Gly	Gly	Gly	Thr	325	330	335	
Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Asn	Arg	Ala	Lys	His	Leu	Arg	Ala	Glu	Ile	Asp	340	345	350	
Lys	Ser	Asp	Ser	Asp	Trp	Asp	Arg	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	355	360	365	
Lys	Leu	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Ile	Lys	Val	Gly	Ala	Ala	Thr	Glu	370	375	380	

ES 2 585 641 T3

Thr	Ala	Leu	Lys	Glu	Arg	Lys	Glu	Ser	Val	Glu	Asp	Ala	Val	Ala	Ala
385					390					395					400
Ala	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Gly	Ile	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser
				405					410					415	
Leu	Ile	His	Gln	Ala	Arg	Lys	Ala	Leu	Thr	Glu	Leu	Arg	Ala	Ser	Leu
			420					425					430		
Thr	Gly	Asp	Glu	Val	Leu	Gly	Val	Asp	Val	Phe	Ser	Glu	Ala	Leu	Ala
		435					440					445			
Ala	Pro	Leu	Phe	Trp	Ile	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Leu	Asp	Gly	Ser	Val
	450					455					460				
Val	Val	Asn	Lys	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	His	Gly	Leu	Asn	Val
465					470					475					480
Asn	Thr	Leu	Ser	Tyr	Gly	Asp	Leu	Ala	Ala	Asp	Gly	Val	Ile	Asp	Pro
				485					490					495	
Val	Lys	Val	Thr	Arg	Ser	Ala	Val	Leu	Asn	Ala	Ser	Ser	Val	Ala	Arg
			500					505					510		
Met	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Thr	Val	Val	Val	Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Ala
	515						520					525			
Glu	Asp	His	Asp	His	His	His	Gly	His	Ala	His					
530						535									

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o tratamiento de la artritis reumatoide, en la que la composición farmacéutica comprende una molécula de ácido nucleico que comprende

(i) la secuencia de nucleótidos de la Figura 1, o

(ii) una secuencia que tiene más de 70, por ejemplo, 75 %, preferiblemente más de 80 %, por ejemplo más de 90 o 95 % de identidad con la secuencia (i) o una secuencia que hibrida con la secuencia (i) en condiciones de 2 x SSC, 65 °C (en la que SSC = NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M, pH 7,2) que codifica una proteína funcionalmente equivalente a la secuencia codificada por la secuencia de nucleótidos de la Figura 1, o

(iii) un fragmento de la secuencia (i) o (ii) que codifica un fragmento de proteína funcionalmente equivalente y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

2. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o tratamiento de la artritis reumatoide, en la que la composición farmacéutica comprende un polipéptido que comprende

(i) la secuencia de aminoácidos de la Figura 1, o

(ii) una secuencia que tiene más de 80 %, por ejemplo más de 90 o 95 % de homología con la secuencia (i) que proporciona una proteína funcionalmente equivalente, o

(iii) un fragmento funcionalmente equivalente de la secuencia (i) o (ii); y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que los fragmentos tienen entre 6 y 400 residuos de longitud.

4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que las longitudes del fragmento son de 6 a 100 o 15 a 100 residuos.

5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que las longitudes del fragmento son de 6 a 30, de 10 a 25, de 15 a 50 o de 15 a 30 residuos.

6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que los fragmentos derivan de, o consisten en, al menos una de las siguientes secuencias

1-8	MSKLIEYD, (8)
14-21	AMEVGMDK, (8)
40-48	AKAFGGPTV, (9)
64-71	PFEDLGAQ, (8)
96-105	QALIKGGLRL, (11)
110-129	VNPIALGVGIGKAADAVSEA, (20)
132-143	ASATPVSGKTGI, (12)
144-155	AQVATVSSRDEQ, (12)
160-175	VGEAMSKVGHHDGVSV, (16)
179-200	STLGTELEFTEGIGFDKGFLSA, (22)
195-219	KGFLSAYFVTDNDQAVLEDAALIL, (25)
206-219	FDNQQAVLEDAALIL, (14).
221-229	HQDKISSLP, (9)
264-271	AIRKTLKA, (8)
276-293	GPYFGDRRKAFLEDLAVV, (18)
299-314	VNPDAGMVLREVGLEV, (16)
315-326	LGSARRVVVSKD, (12)
327-342	DTVVDGGGTAEAVAN, (16)
343-353	RAKHLRAEIDK, (11)
379-391	VGAATETALKERK, (13)
392-400	ESVEDAVAA, (9)
411-433	PGGGASLIHQARKALTELRLASLT, (23)
434-449	GPEVLGVDFSEALAA, (16)
450-463	PLFWIAANAGLDGS, (14)
464-471	VVVNVKSE, (8)
480-494	VNTLSYGDLAADGVI, (15)
501-526	RSAVLNASSVARMVLTETVVVDKPA, (15)
526-539	KAEDHDDHHHGHAAH, (14)

7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que se administra una dosis, o una pluralidad de dosis, terapéutica o profilácticamente eficaz, de la composición farmacéutica.

Figura 1

1	ATGAGCAAGCTGATCGATTACGACGAAACCGCGCTCGCGCCATGAGGTCGGCATGGAC	50
	H S K L I E Y D E T R R R A M E V G M D	
61	AAGCTGGCCGACACCGCTGCGGGTGACGCTGGGGCCGCGCGCGCGCATGTGGTCTGGCC	120
	K L A D T V R V T L G P R G R R V V L A	
121	AAGGCGTTTGGCGSACCLACGGTTACCAACGACGCGCTCACGGTGGCAGGTGAGATCGAG	180
	K R F G G P T V T N D G V T V A R E I E	
181	CTGGAAGATCCGTTTGAAGACTTGGGCGCCGAGCTGGTGAAGTCGGTGGCCACCAAGACC	240
	L E D P F E D L G A Q L V K S V A T K T	
241	AACGATGTGGCGGCTGACGGCACCACCAACCGCAACCATCTTGGCGCAGGCACTGATCRAG	300
	N D V A G D G T T T A T I L A Q A D I X	
301	GGCGGCTTGGGCTAGTGGCGCGCGGCTCAACCGATCGCGGCTCGGCTGGGATCGGC	360
	E G L R L V A A G V N E I A L G V G I G	
361	AAGGCGCGGACGCGGCTATCCGAGGCGCTGCTGGCATCGGCGACGCGGCTGTCGGCAAG	420
	E A A D A V S E A L L A S A T F V S G K	
421	ACCGGCTTGGCGGCTGCGGACGGTGTCTCGCGCGACGAGCAGATCGGTCACCTCGGT	480
	T G I A Q V A T V S S R D E Q I G D L V	
481	GGCGAAGCGTGAAGAGTTCGGCCAGCAGCGCGGCGGTCAGCGCTCAAGATCTCTGAGC	540
	G E A H S K V G H D G V V S V E E S S T	
541	CTGGGCAACGAGTTGAGTTCAACGAGGCTATCGGCTTCGACAGGCGTTCTTGTGCGCA	600
	L G T E L E F T E G I G F D K G F L S R	
601	TACTTCGTTACCGACTTCGATAACGAGCGCGGCTGCTCGAGGACCGGTTGATCTCTGCTG	660
	X F V T D F D N Q Q A V L E D A L I L L	
661	CACCAAGACAGATCGCTGCTTCCCGCTCTGTTGCGCATGCTGCAAGAGGTTGCGAGG	720
	H Q D K I S S L P D L L P L L E K V A G	
721	ACGGSTAAGCTACTACTGATCTGCTGAGGACGCTGAGGGCGAGCGTTGGCGACGCTG	780
	Z G K P L L I V A E D V E G E A L A T L	
781	GTCGTCAACGCGATTGCGAAGAGGTTGAAGCGGTCGCGGTCAGGGCGGCTACTTCGGT	840
	V V N A I R K T L K A V A V K G P Y F G	
841	GACCGCGCTAGGCGTTCTTGAAGCTGCGCGGTCGAGCGGTCGCGAGGTCGCTCAAC	900
	D R R A F A P L E D L A V V T G G Q V V N	
901	CCCGCGCGCGCATGCTGCTGCGCGAGGTTGGGCTTGAAGGTGCTGGGCTCGCGCGGACGC	960
	P D A G M V L R E V G L E V L G S A R R	
961	GTCGTGCTCAGCAAGGACACACCGTCTTGTGTCAGCGCGCGGCAACCGCAGAGCGGTC	1020
	V V V S K D D T V I V D G G G T A E A V	
1021	GCCAACCGCGCGAAGCACTTGCTGCTGAGATCACAAGAGCGATTGCGATTGCGATCGG	1080
	A N R A K H L R A E I D K S D S D M D R	
1081	GAPAAAGCTTSSCGAGCGGCTGCGCAACTGCGCGCGGCGGTTGCTGTCTCAGGTTGGGT	1140
	E K L G E R L A K L A G G V A V I K V S	
1141	GCCGCGCTCGAGACCGCACTCAAGGAGCGCAAGGAAAGCGTCAAGGATCGGTCGCGGCGC	1200
	A A T E T A L K E R K E S V E D A V A A	
1201	GCCAAAGGCGCGGTCGAGGAGGGCATCTCTCTGCTGGGGAGCGCTCGCTCATCAACAG	1260
	A K A A V E E G I V P G G G A S L I H Q	

Figura 1 (cont)

1261	GCCCCCAAGCGCTGACCSAACTGCCGTGCGCTGACCGGTGACGAGGTCCCTCGGTGTC	1320
	A R R A L T E L R A S L T G D E V L G V	
1321	GACGTGTTCTCCGAAGCCCTTGCCGCGCGGTTGTTCTGGAATCGCCGCCAAGCGTGCCTG	1380
	D V F S E R L R A P L F W I A A W A G L	
1381	GACGGCTCGGTGGTGGTCAACAAGGTCAAGCGAGCTACCCGCGGGCATGSGGTGACCTG	1440
	D C S V V V N K V S E L P A G H G L N V	
1441	AACACCCCTGAGCTATGGTGAAGTGGCCGCTGACGGGCTGATCGACCCGCTCAGGTGACT	1500
	N T L S Y G D L A A D G V I D P V K V T	
1501	AGGTGCGCGGTGTTGAACGCGTCATCGTTGCCCGGATGGTACTACCCACCGAGACGGTC	1560
	R S A V L N A S S V A R H V L T T E T V	
1561	CTGGTCGACAGCCCGCCAGGCGAGAGATCAGACCATCACCACGGGCGACCGCACTGA	1620
	V V D F P A K A E D H D H H H G H A H	

Figura 2

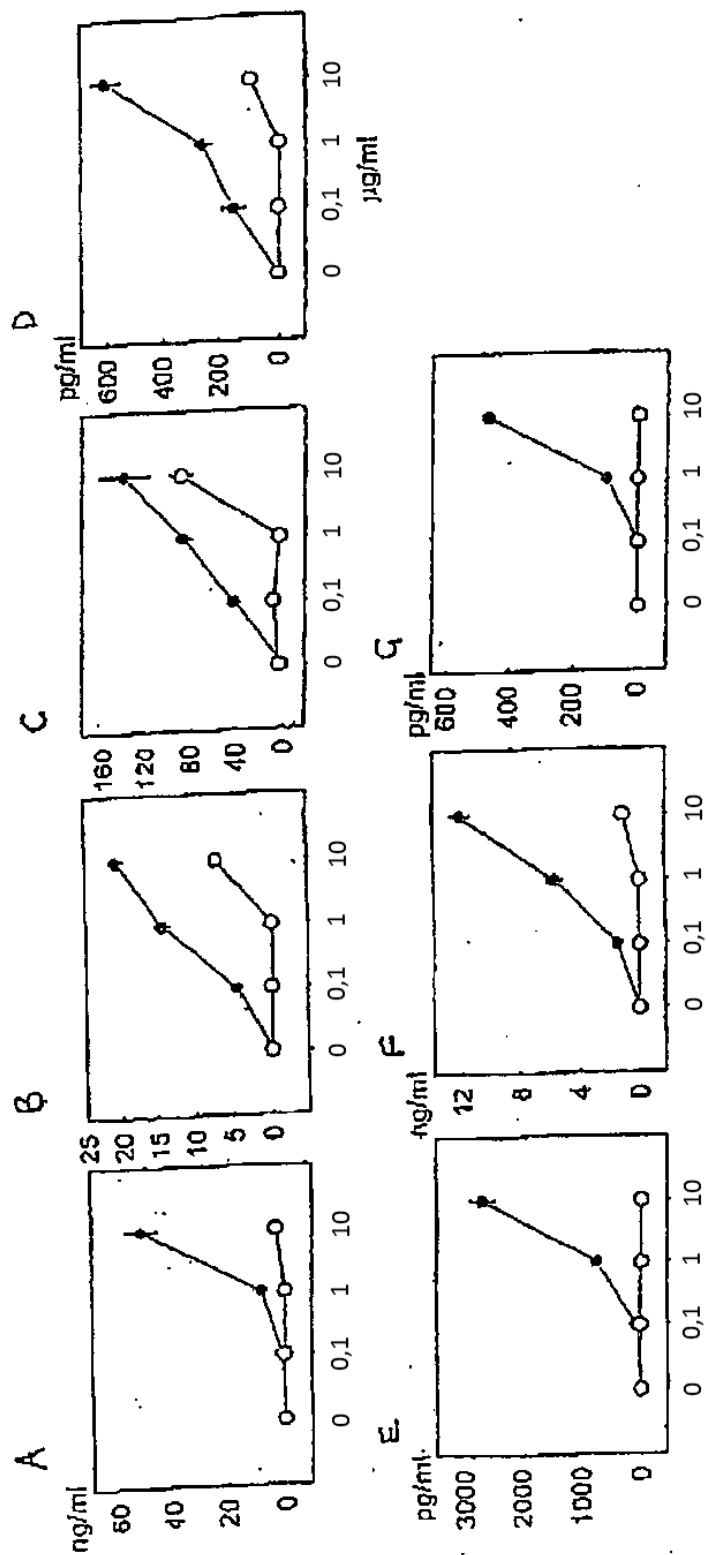


Figura 3

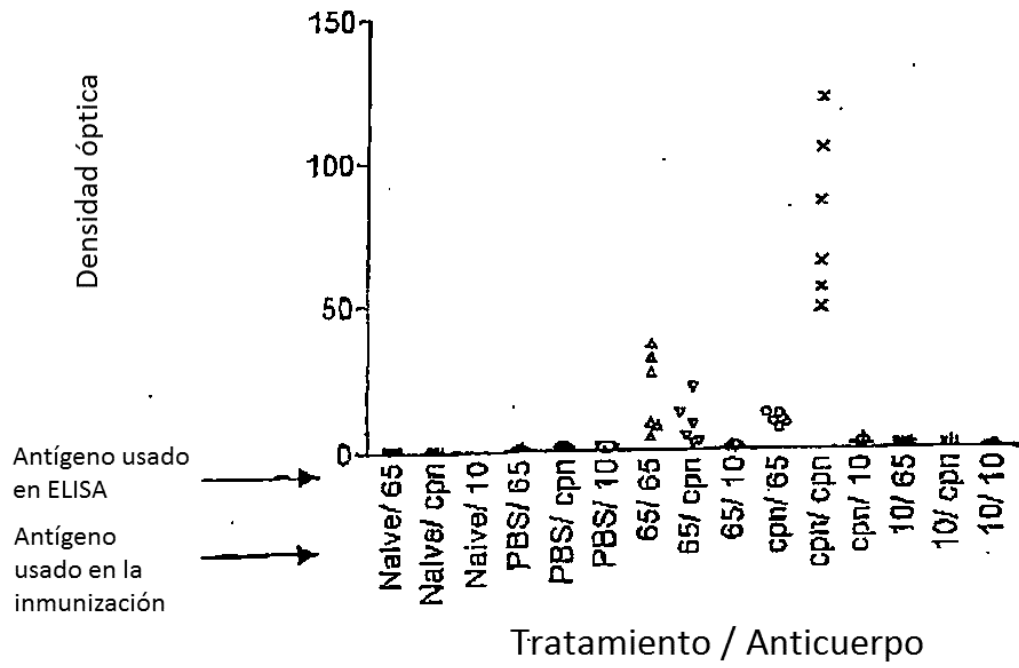


Figura 4

Efecto de las chaperoninas sobre
AA en ratas Wistar

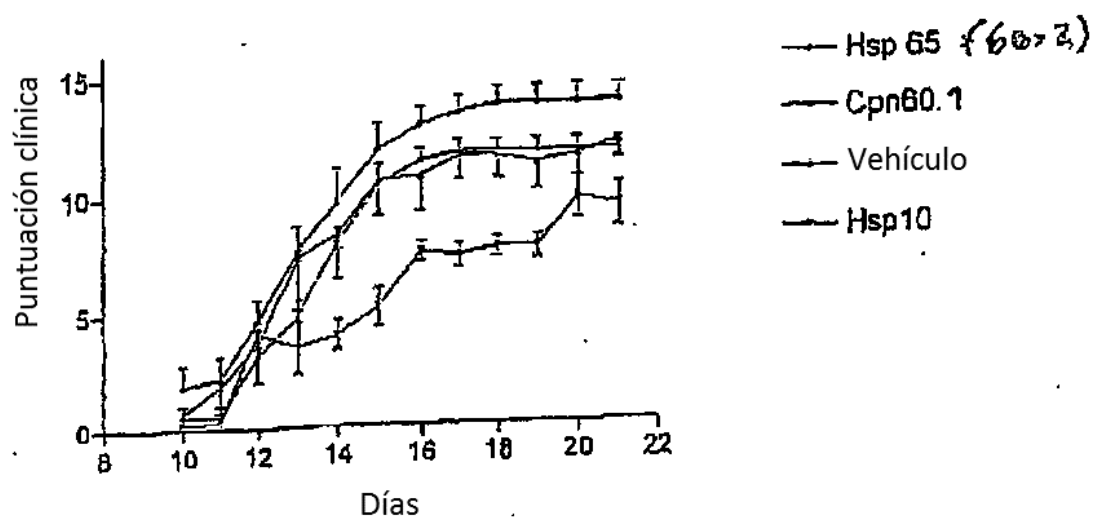


Figura 5

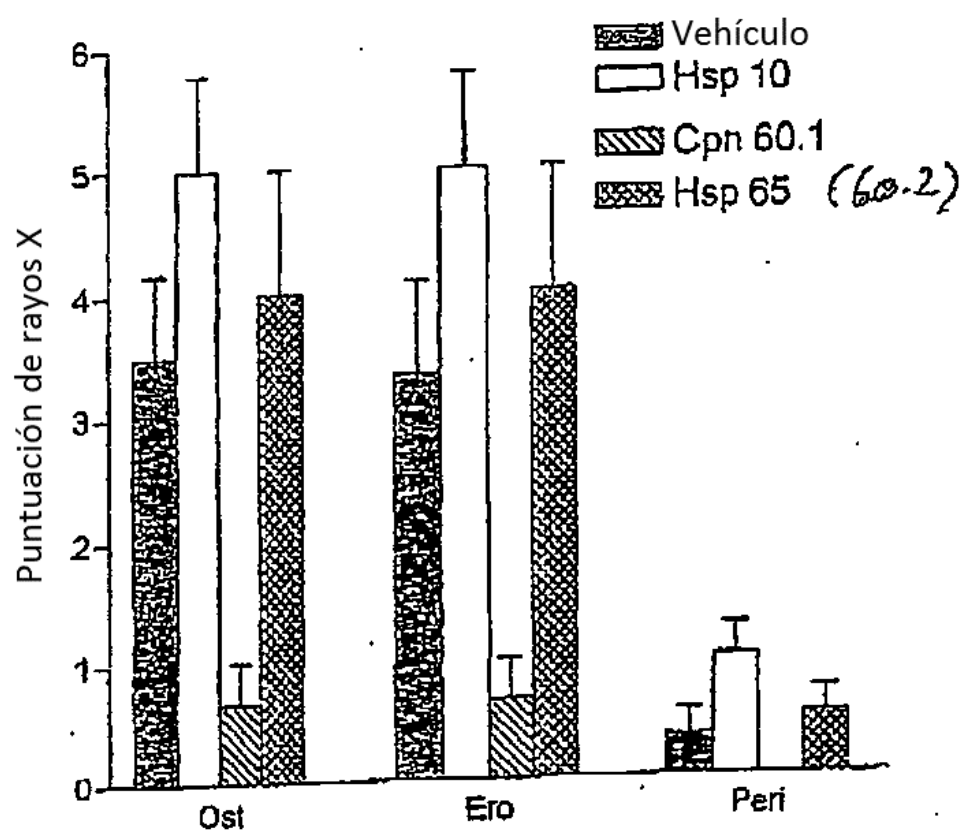


FIGURA 5a



Figura 5b

