

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 237**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/AU2013/000247**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13134822**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13761358 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2849778**

54 Título: **Ac-TMP-2 para su uso en el tratamiento de la inflamación**

30 Prioridad:

13.03.2012 AU 2012900999

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2018

73 Titular/es:

**JAMES COOK UNIVERSITY (100.0%)
Townsville, Queensland 4811, AU**

72 Inventor/es:

**LOUKAS, ALEX y
NAVARRO, SEVERINE**

74 Agente/Representante:

CAMPello ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 664 237 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

Ac-TMP-2 para su uso en el tratamiento de la inflamación

5 CAMPO DE LA INVENCION

ESTA INVENCION se refiere a Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2 para uso terapéutico para reducir, aliviar o prevenir la inflamación en un sujeto, en la que la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, así como a una composición farmacéutica que comprende: (a) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2, en donde la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y (b) al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes anti-citocinas o del receptor anti-citocina seleccionados de agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17, y agentes anti-IL-6R, antibióticos y combinaciones de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 La inflamación es una reacción no específica orquestada por el sistema inmune en respuesta a una lesión o amenaza percibida. Es una respuesta defensiva innata, que se distingue de las respuestas adaptativas adaptadas con mayor precisión del sistema inmune. La inflamación puede funcionar de manera cooperativa con las respuestas adaptativas del sistema inmunitario, que se desarrollan más lentamente pero están más dirigidas precisamente a un agente dañino, tal como un patógeno, que pueda estar causando una lesión localizada.

25 Aunque se asocia con infección, la inflamación se produce en respuesta a muchos tipos de lesiones, incluyendo traumatismo físico, quemaduras (por ejemplo, de radiación, calor o materiales corrosivos), irritantes químicos o particulados, patógenos bacterianos o virales, y privación localizada de oxígeno (isquemia). La inflamación también se asocia con enfermedades autoinmunes y reacciones alérgicas. La inflamación incluye los síntomas clásicos de enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor, y puede estar acompañada de una función disminuida del órgano o tejido inflamado. El documento WO 93/23063 A1 divulga composiciones enriquecidas para el factor inhibidor de neutrófilos que inhiben la actividad de neutrófilos incluyendo la adhesión a células endoteliales vasculares, que son útiles en la terapia de afecciones que implican respuestas inflamatorias anormales o no deseadas.

35 Aunque se conocen varios métodos para tratar la inflamación, todos ellos tienen limitaciones, particularmente con respecto a la amplia eficacia de base. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos métodos para reducir, aliviar y/o prevenir la inflamación asociada con una diversidad de causas.

RESUMEN DE LA INVENCION

40 La presente invención se dirige a compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la inflamación y/o enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación como se define en las reivindicaciones. En una forma amplia, la divulgación se refiere al uso de una o más proteínas inhibidoras de metaloproteasas tisulares derivables u obtenibles a partir de anquilostomas, incluyendo, pero sin limitación, *Ancylostoma caninum*, para reducir, aliviar y/o prevenir la inflamación y/o enfermedades o afecciones asociadas con inflamación tales como el asma y/o enfermedad inflamatoria del intestino.

50 La presente invención se refiere a Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2 para uso terapéutico para reducir o aliviar la inflamación en un sujeto, en la que la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

La presente invención se refiere también a Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2 para uso terapéutico para prevenir la inflamación en un sujeto, en la que la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

55 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende: (a) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2, en donde la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y (b) al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en

fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes anti-citocinas o del receptor anti-citocina seleccionados de agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17, y agentes anti-IL-6R, antibióticos y combinaciones de los mismos.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona un método para reducir o aliviar la inflamación en un sujeto, incluyendo el método la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) *Ac-TMP-1* (SEQ ID NO:1) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-1*, (b) *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2*, o (c) una combinación de (a) y (b).

10 En un ejemplo divulgado en el presente documento, este aspecto incluye además la etapa de administrar al sujeto al menos un agente adicional.

De manera adecuada, de acuerdo con el ejemplo anterior, el al menos un agente adicional se selecciona del grupo que consiste en fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, 15 inmunosupresores, agentes de agentes anti-citocinas/de citocinas (por ejemplo, agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17, y agentes anti-IL-6R), antibióticos y combinaciones de los mismos.

En algunos ejemplos divulgados en el presente documento, la inflamación está asociada con o es secundaria a una enfermedad, trastorno y/o afección en el sujeto, particularmente una enfermedad, trastorno y/o afección 20 inmunológica.

En ciertos ejemplos divulgados en el presente documento, la enfermedad es una enfermedad del tracto digestivo o del sistema respiratorio.

25 En otro ejemplo divulgado en el presente documento, la enfermedad, trastorno y/o afección son refractarios a una terapia basal.

De manera adecuada, de acuerdo con los ejemplos anteriores, la terapia basal comprende la administración de al menos un agente inicial seleccionado del grupo que consiste en fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), 30 aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes de agentes anti-citocinas/de citocinas (por ejemplo, agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17, y agentes anti-IL-6R), antibióticos y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para prevenir la inflamación en un sujeto, incluyendo el 35 método la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) *Ac-TMP-1* (SEQ ID NO:1) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-1*, (b) *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2*, o (c) una combinación de (a) y (b).

En un ejemplo divulgado en el presente documento, este aspecto incluye además la etapa de administrar al sujeto al 40 menos un agente adicional.

En aún otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar y/o prevenir una enfermedad inflamatoria del intestino en un sujeto, incluyendo el método la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz 45 de: (a) *Ac-TMP-1* (SEQ ID NO:1) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-1*, (b) *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2*, o (c) una combinación de (a) y (b).

En un ejemplo divulgado en el presente documento, este aspecto incluye además la etapa de administrar al sujeto al menos un agente adicional.

50 De manera adecuada, de acuerdo con el ejemplo anterior, el al menos un agente adicional se selecciona del grupo que consiste en fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes de agentes anti-citocinas/de citocinas (por ejemplo, agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17, y agentes anti-IL-6R), antibióticos y combinaciones de los mismos.

55 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para tratar y/o prevenir el asma en un sujeto, incluyendo el método la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) *Ac-TMP-1* (SEQ ID NO:1) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-1*, (b) *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2*, o (c) una combinación de (a) y (b).

En un ejemplo divulgado en el presente documento, este aspecto incluye además la etapa de administrar al sujeto al menos un agente adicional.

De manera adecuada, de acuerdo con el ejemplo anterior, el al menos un agente adicional se selecciona del grupo que consiste en fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes de agentes anti-citocinas/de citocinas (por ejemplo, agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17, y agentes anti-IL-6R), antibióticos y combinaciones de los mismos.

Preferiblemente, el sujeto es un mamífero.

10

Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) *Ac-TMP-1* (SEQ ID NO:1) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-1*, (b) *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2*, o (c) una combinación de (a) y (b) junto con un vehículo diluyente de excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunos ejemplos divulgados en el presente documento, la composición farmacéutica puede comprender además al menos un agente adicional.

20

El al menos un agente adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes de agentes anti-citocinas/de citocinas (por ejemplo, agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17, y agentes anti-IL-6R), antibióticos y combinaciones de los mismos.

25

De manera adecuada, la composición farmacéutica es para prevenir o tratar la inflamación y/o para prevenir o tratar una enfermedad o afección asociada con la inflamación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30

Figura 1. Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:1) de *Ac-TMP-1* (Zhan et al., Am. J. Trop. Med. Hyg. 66: 238-44, 2002).

Figura 2. Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de *Ac-TMP-2* (Zhan et al., Mol. Biochem. Parasitology 162: 142-48, 2008).

35

Figura 3. La *Ac-TMP-1* recombinante purificada protege contra la pérdida de peso inducida por TNBS. Brevemente, los ratones recibieron el día 0 una sola inyección intraperitoneal con 20 μ g de *Ac-TMP-1* (TIMP), o una inyección simulada de PBS (TNBS). Cinco horas más tarde, recibieron una inyección intrarrectal con 2,5 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (comúnmente denominado TNBS) en etanol al 45 %, bajo anestesia suave. Desde el día 0 hasta el día 3, los ratones se monitorizaron monitoreados a diario para determinar la pérdida de peso. El grupo de control (Control) no recibió ninguna inyección y no se les administró TNBS. *Ac-TMP-1* protegió significativamente a los ratones de la pérdida de peso mostrada como media para cada grupo de ratones en comparación con el grupo TNBS que recibió la inyección simulada.

40

Figura 4. *Ac-TMP-2* protege a los ratones contra el modelo de colitis inducida por TNBS. Los ratones se trataron con *Ac-TMP-2* o vehículo (PBS) el día 0. Cinco horas más tarde, se anestesiaron y se les inyectó intra-rectalmente una dosis de 2,5 mg de TNBS en etanol al 45 %. El peso, la apariencia general, las heces y la movilidad se controlaron a diario. Los ratones tratados con *Ac-TMP-2* perdieron significativamente menos peso que el grupo de control de vehículo. La puntuación clínica (que combina los otros parámetros monitorizados) de los ratones tratados con *Ac-TMP-2* también se vio significativamente menos afectada que los controles (***) P <0,001).

50

Figura 5. La *Ac-TMP-2* recombinante purificada protege contra una patología intestinal inducida por TNBS. Brevemente, los ratones recibieron el día 0 una sola inyección intraperitoneal con 20 μ g de *Ac-TMP-2* (TIMP-2), o una inyección simulada de PBS (TNBS). Cinco horas más tarde, recibieron una inyección intrarrectal con 2,5 mg de TNBS en etanol al 45 %, bajo anestesia suave. El día 3, los ratones se sacrificaron y se midieron la puntuación clínica, la puntuación macroscópica y la longitud del colon (véase, Ruysers et al., Inflamm. Bowel Dis. 15: 491-500, 2009 para métodos). El grupo de control (Control) no recibió ninguna inyección y no se les administró TNBS.

55

Figura 6. La desnaturalización de *Ac-TMP-2* con tratamiento de calor y proteasa elimina sus propiedades protectoras en un modelo murino de colitis TNBS. La desnaturalización de *Ac-TMP-2* mediante tratamiento

con tripsina y la ebullición aboga la protección inducida por Ac-TMP-2 en un modelo murino de colitis inducida por TNBS como se muestra aquí con la puntuación macroscópica (combinación de adhesión de colon, ulceración, edema y engrosamiento de la pared).

Figura 7. Ac-TMP-1 protege contra la inflamación en un modelo de ratón de asma alérgica. La infiltración del lavado broncoalveolar (BAL) se disminuye en AcES (proteínas excretoras/secretoras de *Ancylostoma caninum*) y ratones tratados con Ac-TMP-1 recombinante. Los ratones se sensibilizaron con dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 20 µg de BSA en 2 mg de hidróxido de aluminio (alumbre) los días 0 y 7. Los días 14 a 21, a los ratones se les inyectaron i.p. 20 µg de BSA, AcES o Ac-TMP-1 (TIMP). Desde el día 18 hasta el 21, a los ratones se les inyectó por vía intranasal (i.n.) 50 µg de BSA con un anestésico suave. El día 24, los ratones se sacrificaron y se recogieron BAL y pulmones. Brevemente, los ratones se desangraron y se insertó una cánula en la tráquea. Los pulmones se lavaron tres veces con 1 ml de PBS. Para recuentos diferenciales de células de BAL, las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CCR3, anti-Gr1, anti-CD3 y anti-CD19 y se analizaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando un citómetro de flujo FACS canto II y el software Diva FACS. Los eosinófilos se definieron como CCR3⁺ CD3⁻ CD19⁻, los neutrófilos como Gr-1^{high} CCR3⁻ CD3⁻ CD19⁻, los linfocitos como CD3⁺ CD19⁺.

Figura 8. Las citocinas Th2 de IL-5 e IL-13 disminuyen en AcES y ratones tratados con Ac-TMP-1 recombinante. Las muestras de pulmón se homogeneizaron en solución salina equilibrada de Hanks libre de calcio y magnesio que contenía suero fetal de ternera al 5 %. Las células se reestimularon *in vitro* con 1 mg/ml de AcES o Ac-TMP-1, o se dejaron sin estimular durante tres días a 37 °C. Se realizaron múltiples análisis de IL-5 e IL-13 con matriz citométrica de microesferas usando matriz FACS.

Figura 9. Experimento repetido que muestra la solidez de la protección mediada por Ac-TMP-1 en un modelo de ratón de asma alérgica. La infiltración del lavado broncoalveolar (BAL) disminuye en ratones tratados con Ac-TMP-1. Las células BAL se recogieron y se analizaron mediante (FACS). Los eosinófilos se definieron como CCR3⁺ CD3⁻ CD19⁻, los neutrófilos como Gr-1^{high} CCR3⁻ CD3⁻ CD19⁻, los linfocitos como CD3⁺ CD19⁺. El tratamiento con Ac-TMP-1 reduce significativamente la infiltración de células Th2 tales como los eosinófilos y los linfocitos en las vías respiratorias.

Figura 10. Las citocinas proinflamatorias IL-6, TNFα e IFNγ disminuyen en ratones tratados con Ac-TMP-1 recombinante. Las muestras de pulmón se homogeneizaron en solución salina equilibrada de Hanks libre de calcio y magnesio que contenía suero fetal de ternera al 5 %. Las células se reestimularon *in vitro* con 1 mg/ml de AcES o Ac-TMP-1, o se dejaron sin estimular durante tres días a 37 °C. Se realizaron múltiples análisis de IL-6, IL-12, TNFα, e IFNγ con matriz citométrica de microesferas usando matriz FACS.

Figura 11. IL-17A disminuye en ratones tratados con Ac-TMP-1 recombinante. Las muestras de pulmón se homogeneizaron en solución salina equilibrada de Hanks libre de calcio y magnesio que contenía suero fetal de ternera al 5 %. Las células se estimularon de nuevo *in vitro* con 1 mg/ml de AcES o Ac-TMP-1, o se dejaron sin estimular durante 3 días a 37 °C. Se analizaron múltiples IL-17A y MCP-1 usando matriz citométrica de microesferas.

Figura 12. Ac-TMP-1 previene la infiltración celular de pulmón inducida por OVA en un modelo de ratón con asma. Las muestras de lavado broncoalveolar de ratones expuestos a OVA sin tratar demuestran una elevación significativa en el número de células en comparación con los ratones sin tratar (PBS). El tratamiento con Ac-TMP-1, sin embargo, reduce significativamente la infiltración celular total en muestras de lavado broncoalveolar de ratones expuestos a OVA. De acuerdo con los recuentos de células totales elevados, los recuentos de células diferenciales de las muestras de BAL de ratones expuestos a OVA no tratados presentan una elevación significativa en eosinófilos y linfocitos. El tratamiento con Ac-TMP-1, sin embargo, previno esta infiltración eosinófila y linfocítica en los pulmones de ratones expuestos a OVA. No hubo aumento en el número total de células, eosinófilos, linfocitos o neutrófilos de los lavados peritoneales de ratones expuestos a OVA. A diferencia de en el pulmón, Ac-TMP-1 no alteró los recuentos totales de células peritoneales. Sin embargo, causó una reducción significativa en los eosinófilos peritoneales. Se proporcionan datos de experimentos duplicados para BAL y recuentos de células totales de lavado peritoneal.

Figura 13. Las citocinas Th2 disminuyen en el pulmón de ratones tratados con Ac-TMP-1. Se prepararon extractos de proteína completa a partir de los pulmones de ratones individuales y se analizaron para determinar el contenido de IL-5, IL-10 e IL-13 mediante matriz citométrica de microesferas (CBA). Los niveles de IL-5, IL-10 e IL-13 se reducen significativamente tras el tratamiento con Ac-TMP-1. El tratamiento con Ac-TMP-1 redujo los niveles de estas citocinas confirmando una disminución de la inflamación como se ve en la Figura 12.

Figura 14. Las citocinas proinflamatorias disminuyen en el pulmón de ratones tratados con Ac-TMP-1. Se prepararon extractos de proteína completa a partir de los pulmones de ratones individuales y se analizaron para determinar el contenido de MCP-1 e IL-17A mediante matriz citométrica de microesferas (CBA).

Ambas citocinas se redujeron en presencia de Ac-TMP-1.

Figura 15. Ac-TMP-2 previene la infiltración celular de pulmón inducida por OVA en un modelo de ratón con asma. Las muestras de lavado broncoalveolar de ratones expuestos a OVA no tratados demuestran una elevación significativa en eosinófilos, linfocitos y neutrófilos en comparación con ratones sin tratar (PBS). Por el contrario, no se observa tal elevación en las muestras de lavado peritoneal de estos ratones. El tratamiento con Ac-TMP-2 impidió significativamente esta infiltración eosinófila, linfocítica y neutrófila en los pulmones de ratones expuestos a OVA. Sin embargo, Ac-TMP-2 no tuvo un efecto significativo sobre los recuentos de células diferenciales de muestras de lavado peritoneal.

Figura 16. Ac-TMP-2 protege a los ratones contra la infiltración celular pulmonar inducida por OVA. (A) y (B) Recuento celular diferencial en los fluidos de lavado broncoalveolar (A) y peritoneal (B) obtenidos. Se obtuvieron BALF después de insertar una cánula en la tráquea y lavar con 3 x 1 ml de PBS. Los lavados peritoneales se obtuvieron inyectando 3 x 5 ml de RPMI complementado con FCS al 5 % en el peritoneo. Las células se tiñeron con anticuerpos y se analizaron mediante citometría de flujo (FACSCanto II). El número de eosinófilos (E) y linfocitos (L) en el líquido de lavado broncoalveolar (BALF) se redujo significativamente ($P < 0,001$) en ratones tratados con Ac-TMP-2 antes de las exposiciones con aerosol de OVA. (B) No se detectaron tales diferencias en el número de células en el sitio de la inyección de Ac-TMP-2 (peritoneo), lo que resalta el hecho de que la protección contra la infiltración celular se limita a los sitios de inflamación. Se proporcionan datos de experimentos duplicados para BAL y recuentos de células totales de lavado peritoneal.

Figura 17. Las citocinas Th2 disminuyen en el pulmón de ratones tratados con Ac-TMP-2. Se prepararon extractos de proteína completa a partir de los pulmones de ratones individuales y se analizaron para determinar el contenido de IL-5 e IL-13 mediante matriz citométrica de microesferas (CBA). Los niveles de tanto IL-5 como de IL-13 se reducen significativamente tras el tratamiento con Ac-TMP-2.

Figura 18. Las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-17A disminuyen en ratones tratados con Ac-TMP-2 recombinante. Se prepararon extractos de proteína completa a partir de los pulmones de ratones individuales y se analizaron para determinar el contenido de IFN- γ , IL-6 e IL-17A mediante matriz citométrica de microesferas (CBA). No se observó ningún cambio en los niveles de IFN- γ , lo cual es de esperar en nuestro modelo de asma, sin embargo, ambos niveles de IL-6 e IL-17A disminuyeron significativamente con el tratamiento con Ac-TMP-2.

Figura 19. Ac-TMP-2 disminuye la infiltración de las vías respiratorias en un modelo de ratón de asma crónica. Con el fin de investigar la protección a largo plazo y la eficacia de Ac-TMP-2 en la inflamación crónica de las vías respiratorias, los ratones se sensibilizaron con respecto a OVA y se estimularon dos veces con 5 aerosoles diarios de OVA, con un período de reposo de 3 semanas entre estimulaciones. (A) Infiltración celular total de las vías respiratorias obtenida como se ha descrito anteriormente. (B) Recuento celular diferencial. Si Ac-TMP-2 se administró durante la primera exposición (+/-) o ambos conjuntos de exposiciones (+/+), los ratones se protegieron significativamente de la infiltración eosinófila de las vías respiratorias ($P < 0,001$).

Figura 20. Tratamiento preventivo y curativo de Ac-TMP-2 en el asma inducida por OVA. Para evaluar si Ac-TMP-2 podría administrarse por vía local (a través de inyecciones intranasales) y si se podría prevenir el desarrollo de inflamación al administrarse de forma preventiva (antes de las exposiciones a OVA) o de una forma curativa (después de las exposiciones a OVA), los ratones se sensibilizaron con respecto a OVA y se trataron con 4 inyecciones i.n. de Ac-TMP-2 una semana antes de exponer los ratones a aerosoles de OVA (preventivos) o con 4 inyecciones i.n. de Ac-TMP-2 dos días después de que comenzasen las exposiciones (curativo). (A) Infiltración celular total de las vías respiratorias obtenida como se ha descrito anteriormente. (B) Recuento celular diferencial. Si los ratones se trataron con Ac-TMP-2 de forma preventiva o curativa, ambos grupos estuvieron significativamente protegidos de la infiltración eosinófila de las vías respiratorias ($P < 0,001$).

Figura 21. Las citocinas Th2 se reducen en BALF en el tratamiento preventivo y curativo Ac-TMP-2. Se prepararon extractos de proteína completa a partir de los pulmones de ratones individuales y se analizaron para determinar el contenido de interleucina-5 e IL-13 mediante matriz citométrica de microesferas (CBA). Los niveles tanto de IL-5 como de IL-13 se redujeron significativamente tanto tras el tratamiento preventivo como tras el curativo con Ac-TMP-2 ($P < 0,01$ y $P < 0,001$).

Figura 22. Ac-TMP-2 induce la generación de linfocitos T reguladores que se acumulan en la mucosa. Los ratones sin tratar se trataron con inyecciones i.p. de Ac-TMP-2 o PBS (vcl) durante 6 días y los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), bazo y la lámina propia del intestino delgado se analizaron para determinar la presencia de Tregs. (A) Las células se prepararon a partir de los nódulos linfáticos mesentéricos, bazo y lámina propia de intestino delgado de ratones tratados o no con Ac-TMP-2. (B) Las células de MLN, bazo, ganglio linfático pilórico (PLN) y lámina propia del intestino delgado (LP) se tiñeron con anticuerpos CCR9, un marcador expresado exclusivamente en las células generadas en MLN, y se analizaron mediante

citometría de flujo. Los datos muestran que Ac-TMP-2 induce una acumulación significativa de Tregs en la mucosa del intestino delgado y que la expresión de CCR9 en los Tregs que se encuentran en la lámina propia sugiere que se originan en los ganglios linfáticos mesentéricos (P <0,05).

Figura 23. La protección mediada por Ac-TMP-2 contra la inflamación depende de los linfocitos T reguladores (Tregs). Para investigar la importancia de los Tregs en la protección inducida por Ac-TMP-2 en este modelo de asma experimental, se agotaron selectivamente los Tregs usando toxina diftérica (DT) en ratones transgénicos (ratones DEREK) diseñados para expresar el receptor DT bajo el promotor Foxp3, que es el factor de transcripción para Tregs. Los controles de tipo silvestre (C57B1/6) y los ratones DEREK se sensibilizaron y expusieron a OVA. Los ratones tratados con Ac-TMP-2 que recibieron inyecciones de DT para agotar los Tregs (ratones DEREK) tenían niveles comparables de inflamación de las vías respiratorias y de infiltración BAL en ratones no tratados expuestos a OVA y expuestos a DT. Estos resultados sugieren que los Tregs desempeñan un papel esencial en la supresión de la inflamación por Ac-TMP-2 en este modelo de asma de ratón.

Figura 24. Los Tregs son importantes en la supresión de citocinas Th2 en ratones tratados con Ac-TMP-2. Se prepararon extractos de proteína completa a partir de los pulmones de ratones individuales y se analizaron para determinar el contenido de IL-5, IL-10 e IL-13 mediante matriz citométrica de microesferas (CBA). Los niveles de IL-5, IL-10 e IL-13 se redujeron significativamente después del tratamiento con Ac-TMP-2 en los ratones de tipo salvaje, mientras que no hubo diferencias significativas en los ratones DEREK en los que los Tregs se agotaron tratados con Ac-TMP-2 (** P <0,0 y *** P <0,001).

Figura 25. Los Tregs inducidos por Ac-TMP-2 son importantes en la supresión de citocinas proinflamatorias. Se prepararon extractos de proteína completa a partir de los pulmones de ratones individuales y se analizaron para determinar el contenido de IFN- γ , interleucina-6, IL-9 e IL-17A, IL-23, y MCP-1 mediante matriz citométrica de microesferas (CBA). Los niveles de IFN- γ estaban por debajo de los niveles de detección (datos no mostrados) y solo IL-6 se reguló negativamente en los ratones de tipo salvaje en presencia de Ac-TMP-2. Como se esperaba, los niveles de citocinas Th-1 y Th-17 permanecieron bajos o inalterados en este modelo de asma de ratón.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos y composiciones para uso terapéutico en la reducción, alivio y/o prevención de inflamación y/o enfermedades o afecciones inflamatorias tales como asma y/o enfermedad inflamatoria del intestino, como se define en las reivindicaciones. La invención se basa, al menos parcialmente, en el descubrimiento inesperado de que una o más proteínas inhibidoras de metaloproteasas tisulares derivables u obtenibles de anquilostomas incluyendo, pero sin limitación, *Ancylostoma caninum*, pueden ser útiles para reducir, aliviar y/o prevenir la inflamación y/o enfermedades o afecciones inflamatorias tales como asma y/o enfermedad inflamatoria del intestino en un sujeto.

En aspectos particulares, la invención contempla Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2, en donde la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, para uso terapéutico en la reducción, alivio y/o prevención de la inflamación y/o enfermedad o afecciones inflamatorias tales como asma y/o enfermedad inflamatoria del intestino.

A lo largo de toda la memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, las palabras "comprender", "comprende" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Como se usa en esta memoria descriptiva, los artículos indefinidos "un" y "una" pueden referirse a una entidad o a una pluralidad de entidades (por ejemplo, proteínas) y no deben leerse ni entenderse como limitados a una sola entidad.

En un aspecto, la invención proporciona Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2, en donde la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 para uso terapéutico en un método para reducir o aliviar la inflamación en un sujeto, incluyendo el método la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de: Ac-TMP-2 (SEQ ID NO: 2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2.

En otro aspecto, la invención proporciona Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2, en donde la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 para su uso en un método para prevenir la inflamación en un sujeto,

incluyendo el método la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o una fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2.

Por "reducción", como en reducción de la inflamación en un sujeto, se refiere a una disminución o un acortamiento de un síntoma, aspecto o característica que se asocia con la inflamación (por ejemplo, enrojecimiento, calor, hinchazón y/o dolor), o del tiempo que un sujeto experimenta un síntoma, aspecto o característica asociada con la inflamación. Dicha reducción no necesita ser absoluta para ser beneficiosa para el sujeto. Por "alivio", como en el alivio de la inflamación en un sujeto, se refiere a una reducción de la gravedad o seriedad de un síntoma, aspecto o característica asociada con la inflamación (por ejemplo, enrojecimiento, calor, hinchazón y/o dolor). Dicho alivio no necesita ser absoluto para ser beneficioso para el sujeto. La reducción y/o el alivio de la inflamación en un sujeto se puede determinar usando cualquier método o estándar conocido por el experto en la materia, incluyendo métodos y estándares tanto cualitativos como cuantitativos.

Debe entenderse que la reducción o el alivio de la inflamación en un sujeto es un método para tratar la inflamación en el sujeto. Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (o "tratar") se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de inflamación después de que ha comenzado a desarrollarse. El término "mejora", con referencia a la inflamación, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso se puede determinar usando cualquier método o estándar conocido por el experto en la técnica.

Como se usa en el presente documento, "prevención" (o "prevenir") se refiere a un transcurso de acción (tal como administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de Ac-TMP-1/Ac-TMP-2 o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo) que se inicia antes de la aparición de un síntoma, aspecto o característica de la inflamación a fin de prevenir o reducir el síntoma, aspecto o característica. Debe entenderse que dicha prevención no necesita ser absoluta para ser beneficiosa para un sujeto. Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de inflamación o presenta solamente signos tempranos con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar un síntoma, aspecto o característica de inflamación.

Como se usa en el presente documento, "inflamación" se refiere a la respuesta localizada bien conocida a diversos tipos de lesión o infección, que se caracteriza por enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor, y que a menudo también incluye disfunción o movilidad reducida. La inflamación representa un mecanismo de defensa temprano para contener una infección y evitar su propagación desde el enfoque inicial. Los principales eventos inflamatorios incluyen la dilatación de los capilares para aumentar el flujo sanguíneo, cambios en la estructura de la microvasculatura, lo que conduce al escape de plasma y proteínas y leucocitos de la circulación, y emigración de leucocitos de los capilares y acumulación en el sitio de lesión o infección.

La inflamación a menudo está asociada con, o es secundaria a, una enfermedad, trastorno y/o afección en un sujeto, incluyendo una enfermedad inmunológica, trastorno y/o afección (tal como una enfermedad autoinmune, trastorno y/o afección) y reacciones alérgicas. Las enfermedades, trastornos y/o afecciones inmunológicas ejemplares incluyen, sin limitación, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, enfermedad celíaca, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), osteomielitis crónica multifocal recurrente (CRMO), enfermedad de Crohn, neuropatías desmielinizantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, hipogammaglobulinemia, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), diabetes insulino dependiente (tipo 1), artritis juvenil, síndrome de Kawasaki, esclerosis múltiple, miastenia gravis, síndrome de post-infarto de miocardio, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso sistémico (SLE), púrpura trombocitopénica (TTP), colitis ulcerosa, vasculitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

Como entenderá un experto en la técnica, las enfermedades del tracto digestivo (por ejemplo, gastritis crónica o una enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa) y enfermedades del sistema respiratorio (por ejemplo, asma, enfisema, bronquitis crónica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)) tienen un componente inflamatorio y, por lo tanto, son particularmente modificables para el tratamiento usando los métodos divulgados.

Por consiguiente, en aún otro aspecto, la invención proporciona Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2, en donde la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 para su uso en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad inflamatoria del intestino en un sujeto, incluyendo el método la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o una fragmento biológicamente activo o

variante de Ac-TMP-2.

En una realización, la enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

5 En un aspecto adicional, la invención proporciona Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2, en donde la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 para su uso en un método para tratar y/o prevenir el asma en un sujeto, incluyendo el método la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o una fragmento biológicamente activo o variante de Ac-TMP-2.

10

Como también se entenderá por un experto en la técnica, la inflamación que está asociada con, o es secundaria a, una enfermedad, trastorno y/o afección en un sujeto, a menudo se produce cuando la enfermedad, trastorno y/o afección es refractaria a una terapia basal, por ejemplo, una terapia basal que comprende fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes de receptores anti-citocinas/de citocinas (por ejemplo, agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17, y agentes anti-IL-6R), antibióticos y combinaciones de los mismos. Por "refractario" se entiende la resistencia al tratamiento, particularmente el tratamiento de primera línea.

15

20 El término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios. Por ejemplo, la administración a un sujeto puede incluir la administración a un sujeto humano o un sujeto veterinario. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Sin embargo, los usos terapéuticos de acuerdo con la invención también pueden ser aplicables a mamíferos tales como animales domésticos y de compañía, animales de productividad tales como caballos, ganado y animales de laboratorio.

25 Por "administración" se entiende la introducción de una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende Ac-TMP-1/Ac-TMP-2, o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo) en un sujeto por una ruta elegida.

30 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" describe una cantidad de un agente especificado suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que se trata con ese agente. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad de una composición que comprende Ac-TMP-1 y/o Ac-TMP-2 (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo) necesaria para reducir, aliviar y/o prevenir la inflamación. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" puede ser suficiente para reducir o eliminar un síntoma de inflamación. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" también puede ser una cantidad suficiente para lograr un efecto biológico deseado, por ejemplo, una cantidad que sea eficaz para disminuir el enrojecimiento, el calor, la hinchazón y/o el dolor asociados con la inflamación.

35

Idealmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente es una cantidad suficiente para inducir el resultado deseado sin causar un efecto citotóxico sustancial en el sujeto. La cantidad eficaz de un agente, por ejemplo, Ac-TMP-1 y/o Ac-TMP-2 (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo), útil para reducir, aliviar y/o prevenir la inflamación dependerá del sujeto que se trata, el tipo y la gravedad de cualquier enfermedad, trastorno y/o afección asociada, y la forma de administración de la composición terapéutica.

40

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende Ac-TMP-1 y/o Ac-TMP-2 (o un fragmento biológicamente activo o variante de la misma) se puede administrar en una sola dosis, o en varias dosis, por ejemplo, a diario, durante un transcurso de tratamiento. Sin embargo, la frecuencia de administración depende de la preparación aplicada, el sujeto que se trata, la gravedad de la inflamación, y la forma de administración de la terapia o composición.

45

50 Por "Ac-TMP-1" se refiere al inhibidor de la metaloproteasa tisular 1, un inhibidor tisular de la metaloproteasa de *Ancylostoma caninum* (anquilostoma del perro). Ac-TMP-1 (UniProtKB/Swiss-Prot: # Q96318) es un polipéptido de 140 aminoácidos.

55 Por "Ac-TMP-2" se entiende el inhibidor de metaloproteasa tisular 2, un inhibidor tisular adicional de la metaloproteasa de *Ancylostoma caninum*. Ac-TMP-2 (UniProtKB/Swiss-Prot: # B1Q143) es un polipéptido de 244 aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, "fragmento biológicamente activo" describe una porción o subsecuencia de Ac-TMP-1 o Ac-TMP-2, que incluye un dominio de la misma, que tiene no menos del 10 %, preferiblemente no menos del 25 %, más preferiblemente no menos del 50 %, e incluso más preferiblemente no menos del 75 %, 80 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.

85 %, 90 %, o del 95 % de una actividad biológica de Ac-TMP-1 o Ac-TMP-2. Dicha actividad puede evaluarse usando métodos de ensayo estándar y bioensayos reconocibles por los expertos en la técnica en el campo como generalmente útiles para identificar dicha actividad.

5 Un fragmento de Ac-TMP-1 puede constituir menos de 120, menos de 110, menos de 100, menos de 75, o menos de 50 aminoácidos contiguos de una secuencia de Ac-TMP-1 madura. Un fragmento de Ac-TMP-2 puede constituir menos de 220, menos de 200, menos de 150, menos de 120, menos de 110, menos de 100, menos de 75, o menos de 50 aminoácidos contiguos de una secuencia de Ac-TMP-2 madura. Se contemplan también múltiples fragmentos de Ac-TMP-1 y/o Ac-TMP-2.

10

Por "dominio" (de una proteína) se entiende aquella parte de una proteína que comparte características estructurales, fisicoquímicas y funcionales comunes, por ejemplo, dominios, o propiedades, hidrófobos, polares, globulares, helicoidales o de tipo netrina (NTR), por ejemplo, un dominio de unión a proteínas, un dominio de unión a receptores, un dominio de unión a cofactor, y similares.

15

También se contemplan variantes de Ac-TMP-1 y Ac-TMP-2 que comprenden una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en Ac-TMP-1 (o un fragmento de la misma) o Ac-TMP-2 (o fragmento de la misma), en comparación con Ac-TMP-1/Ac-TMP-2 de tipo salvaje.

20 Típicamente, y en relación con las proteínas, una proteína "variante" tiene uno o más aminoácidos que se han reemplazado por diferentes aminoácidos. Se entiende bien en la técnica que algunos aminoácidos pueden cambiarse por otros con propiedades ampliamente similares sin cambiar la naturaleza de la actividad de la proteína (es decir, sustituciones conservativas).

25 Se apreciará también que uno o más residuos de aminoácidos de una secuencia de referencia, tal como Ac-TMP-1/Ac-TMP-2 (o un fragmento de las mismas), pueden modificarse o eliminarse, o pueden añadirse secuencias adicionales, sin alterar sustancialmente la actividad biológica de Ac-TMP-1/Ac-TMP-2 (o un fragmento de las mismas). Dicha actividad puede evaluarse usando métodos de ensayo estándar y bioensayos reconocibles por los expertos en la técnica en el campo como generalmente útiles para identificar dicha actividad.

30

El término "variante" incluye peptidomiméticos y ortólogos de Ac-TMP-1 y Ac-TMP-2. Por "peptidomimético" se entiende una molécula que contiene elementos estructurales no peptídicos que son capaces de imitar o antagonizar la acción o acciones biológicas de un péptido parental natural. Los ejemplos de peptidomiméticos incluyen compuestos peptídicos en los que la estructura peptídica está sustituida con una o más moléculas de benzodiazepina (véase, por ejemplo, James et al., Science 260: 1937-42, 1993) y péptidos "retro-inversos" (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 4.522.752). El término también se refiere a un resto, distinto de un aminoácido de origen natural, que sirve conformacional y funcionalmente como un sustituto de un aminoácido particular en una proteína sin interferir de forma adversa en un grado significativo con la función de la proteína. Los ejemplos de miméticos de aminoácidos incluyen D-aminoácidos. Las proteínas sustituidas con uno o más D-aminoácidos pueden prepararse usando procedimientos de síntesis de péptidos bien conocidos. Las sustituciones adicionales incluyen análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales variantes con grupos funcionales, tales como, por ejemplo, b-cianoalanina, canavanina, ácido djenkólico, norleucina, 3-fosfoserina, homoserina, dihidroxifenilalanina, 5-hidroxitriptófano, 1-metilhistidina y 3-metilhistidina.

45 Por "ortólogos" de Ac-TMP-1 y Ac-TMP-2 se entienden ortólogos de TMP de otros helmintos intestinales (es decir, anquilostomas, tricocéfalos y ascárides), incluyendo anquilostomas humanos, tales como, por ejemplo, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale* y *Ancylostoma ceylanicum*, y tricocéfalos de cerdo, tales como, por ejemplo, *Trichuris suis* y *Trichuris trichiura*.

50 En una realización, una variante de proteína u ortólogo comparte al menos un 90 %, 95 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, tal como SEQ ID NO:2.

Preferiblemente, la identidad de secuencia se mide sobre al menos un 60 %, más preferiblemente sobre al menos un 75 %, más preferiblemente sobre al menos un 90 % o más preferiblemente sobre al menos un 95 %, 98 % o

55 sustancialmente la longitud completa de la secuencia de referencia.

Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia, el alineamiento óptimo de las secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos se puede realizar mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (programa Geneworks de Intelligenetics; GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Edición 7.0,

Genetics Computer Group, WI, Estados Unidos) o mediante inspección y el mejor alineamiento (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generado por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST según se divulga, por ejemplo, por Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25: 3389-402, 1997.

5

Un análisis detallado del análisis de secuencia se puede encontrar en la Unidad 19.3 de CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al. (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-1999).

Las proteínas variantes se pueden producir mediante una diversidad de procedimientos mutagénicos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Una mutación puede implicar la modificación de la secuencia de nucleótidos de un solo gen, bloques de genes o un cromosoma completo, con la posterior producción de una o más proteínas mutantes. Los cambios en genes individuales pueden ser la consecuencia de mutaciones puntuales, que implican la eliminación, adición o sustitución de una única base de nucleótidos dentro de una secuencia de ADN, o pueden ser la consecuencia de cambios que implican la inserción o eliminación de un gran número de nucleótidos.

15

Las mutaciones se producen después de la exposición a mutágenos químicos o físicos. Dichos agentes inductores de mutaciones incluyen radiación ionizante, luz ultravioleta y una diversidad de agentes químicos, tales como agentes alquilantes e hidrocarburos aromáticos policíclicos, todos los cuales son capaces de interactuar directa o indirectamente (generalmente después de algunas biotransformaciones metabólicas) con ácidos nucleicos. Las lesiones de ADN inducidas por dichos agentes ambientales pueden conducir a modificaciones de la secuencia de bases cuando el ADN afectado se replica o repara y, por lo tanto, a una mutación, que posteriormente puede reflejarse a nivel de proteína. La mutación también puede dirigirse al sitio a través del uso de métodos de direccionamiento particulares.

Los procedimientos mutagénicos de uso en la producción de *Ac-TMP-1* y *Ac-TMP-2* que comprenden una o más mutaciones incluyen, pero sin limitación, mutagénesis aleatoria (por ejemplo, mutagénesis por inserción basada en la inactivación de un gen a través de la inserción de un fragmento de ADN conocido, mutagénesis química, mutagénesis por radiación, PCR propensa a error (Cadwell y Joyce, PCR Methods Appl. 2: 28-33, 1992)) y mutagénesis de sitio dirigido (por ejemplo, usando secuencias de cebador de oligonucleótidos específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada. Se divulgan métodos adicionales de mutagénesis de sitio dirigido en la Pat. de Estados Unidos N.º 5.220.007; 5.284.760; 5.354.670; 5.366.878; 5.389.514; 5.635.377; y 5.789.166.

Se pueden preparar *Ac-TMP-1* y *Ac-TMP-2* aisladas (incluyendo fragmentos y variantes) mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica.

Ac-TMP-1 y *Ac-TMP-2* (incluyendo fragmentos y variantes) pueden producirse por síntesis química. Las técnicas de síntesis química se conocen bien en la técnica, aunque los expertos en la técnica pueden consultar el Capítulo 18 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et. al., John Wiley & Sons NY (1995-2001) para ejemplos de metodología adecuada.

Ac-TMP-1 y *Ac-TMP-2* (incluyendo fragmentos y variantes) también se pueden preparar como proteínas recombinantes.

Aunque la producción de proteínas recombinantes se conoce bien en la técnica, el experto puede referirse a protocolos estándar como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), en particular las Secciones 16 y 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), en particular los Capítulos 10 y 16; y CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), en particular los Capítulos 1, 5 y 6.

Las diversas combinaciones de uno o más agentes adicionales según se conoce por un experto en la técnica para reducir, aliviar y/o prevenir la inflamación (y/o para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno y/o afección asociada con la inflamación) pueden administrarse a un sujeto que lo necesite además de una cantidad terapéuticamente eficaz de *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo). Es decir, uno o más agentes adicionales tradicionalmente usados para el tratamiento y/o prevención de la inflamación se pueden administrar a un sujeto además de una cantidad terapéuticamente eficaz de *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo).

Por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes de receptores anti-citocinas/de citocinas (por ejemplo, agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17 y agentes anti-IL-6R) particularmente anticuerpos de receptores anti-citocinas/de citocinas, antibióticos, y combinaciones de los mismos pueden administrarse con *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo) para reducir, aliviar y/o prevenir la inflamación.

El uno o más agentes adicionales pueden proporcionar un efecto conservador sobre *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo). La *Ac-TMP-1* y/o el *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o una variante del mismo) pueden proporcionar un efecto conservador sobre el uno o más agentes adicionales. El uno o más agentes adicionales pueden proporcionar además un efecto complementario a la acción de *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o una variante del mismo), preferiblemente eliminando o reduciendo la frecuencia o gravedad de (y/o prevenir) uno o más síntomas asociados con la inflamación.

Como es bien sabido por un experto en la técnica, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), también denominados agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES), son fármacos con efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios, e incluyen salicilatos (por ejemplo, aspirina) y derivados del ácido propiónico (por ejemplo, ibuprofeno y naproxeno).

Los aminosalicilatos se conocen bien en la técnica para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino (particularmente colitis ulcerosa) e incluyen, por ejemplo, balsalazida, mesalazina, olsalazina y sulfasalazina.

Como se sabe bien por los expertos en la técnica, los corticosteroides son fármacos que se parecen mucho al cortisol, una hormona producida por las glándulas suprarrenales. Los corticosteroides ejemplares incluyen, sin limitación, cortisona, prednisona, prednisolona y metilprednisolona.

Los inmunosupresores se conocen bien en la técnica para su uso en el tratamiento de la inflamación asociada con ciertas enfermedades o afecciones, e incluyen, por ejemplo, los fármacos ciclosporina, azatioprina y micofenolato.

Como se conoce bien por un experto en la técnica, los agentes de receptores anti-citocinas/de citocinas (por ejemplo, agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17, y agentes anti-IL-6R) incluyen, sin limitación, inhibidores de molécula pequeña y anticuerpos.

La combinación de *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o una variante de la misma) y uno o más agentes adicionales puede producir un efecto sinérgico en el tratamiento y/o prevención de la inflamación. Por consiguiente, la presente divulgación también incluye un método para mejorar la eficacia terapéutica de un agente en el tratamiento de cualquier afección para la que se usan dichos agentes (por ejemplo, inflamación y cualquier enfermedad, trastorno y/o afección asociada).

La *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o una variante del mismo) se pueden administrar antes de la administración de uno o más agentes adicionales. La *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o una variante del mismo) también pueden administrarse después de la administración de uno o más agentes adicionales. La *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o una variante del mismo) se pueden administrar además simultáneamente con la administración de uno o más agentes adicionales. La administración de *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o una variante del mismo) y la administración de uno o más agentes adicionales (ya sea de forma secuencial o concurrente) pueden dar como resultado la reducción o el alivio de la inflamación que es mayor que dicha reducción o alivio de la administración de *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo) o uno o más agentes adicionales en ausencia del otro.

La *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o una variante del mismo) y uno o más agentes adicionales se pueden administrar mediante cualquier método/ruta convencional disponible para su uso junto con composiciones terapéuticas, como se conoce bien por un experto en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, la administración mediante inyección de microagujas en sitios tisulares específicos, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 6.090.790, cremas tópicas, lociones o apósitos sellantes aplicados a sitios de inflamación, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 6.054.122 o implantes que liberan la *Ac-TMP-1* y/o *Ac-TMP-2* (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo) tal como se describe en la publicación internacional WO 99/47070.

A este respecto, las composiciones que comprenden Ac-TMP-1 y/o Ac-TMP-2 (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo) y, opcionalmente, uno o más agentes adicionales, se pueden administrar junto con, o como un componente de, un biomaterial, biopolímero, material inorgánico tal como hidroxiapatita o derivados de la misma, implante quirúrgico, prótesis, apósitos para heridas, compresa, vendaje o similar adecuadamente impregnado, revestido o que comprende de otro modo la composición.

De forma adecuada, la composición comprende un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado.

Preferiblemente, el vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable es adecuado para su administración a mamíferos, y más preferiblemente, a seres humanos.

Por "vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende una carga sólida o líquida, diluyente o sustancia de encapsulación que se puede usar de forma segura en la administración sistémica. Dependiendo de la ruta particular de administración, se puede usar una diversidad de vehículos bien conocidos en la técnica. Estos vehículos pueden seleccionarse de un grupo que incluye azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido alginico, soluciones tamponadas con fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica y sales tales como sales de ácidos minerales, incluyendo clorhidratos, bromuros y sulfatos, ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos y malonatos, y agua libre de pirógenos.

Una referencia útil que describe vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables es Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. NJ USA, 1991).

Se puede emplear cualquier ruta segura de administración para proporcionar a un sujeto composiciones que comprendan Ac-TMP-1 y/o Ac-TMP-2 (o un fragmento biológicamente activo o una variante del mismo) y, opcionalmente, uno o más agentes adicionales. Por ejemplo, puede emplearse por vía oral, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intravenosa, intraarticular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, inhalatoria, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmica, y similares.

Las formas de dosificación incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes, pastillas, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos, y similares. Estas formas de dosificación también pueden incluir inyectar o implantar dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este propósito u otras formas de implantes modificados para actuar adicionalmente de esta manera. La liberación controlada de Ac-TMP-1 y/o Ac-TMP-2 (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo) y, opcionalmente, uno o más agentes adicionales, se puede efectuar recubriendo la misma, por ejemplo, con polímeros hidrófobos, incluyendo resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos poliláctico y poliglicólico, y ciertos derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetil celulosa. Además, la liberación controlada puede verse afectada por el uso de otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas.

Las composiciones anteriores se pueden administrar de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea farmacéutica/terapéuticamente eficaz. La dosis administrada a un sujeto, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para realizar una respuesta beneficiosa (por ejemplo, una reducción de la inflamación) en un sujeto durante un período de tiempo apropiado. La cantidad de Ac-TMP-1 y/o Ac-TMP-2 (o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo) a administrar puede depender del sujeto a tratar, incluida la edad, el sexo, el peso y el estado general de salud de los mismos, factores que dependerán del criterio de un experto en la técnica.

Las composiciones que se describen en el presente documento también pueden incluir vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, vaccinia, adenovirus y adenovirus asociados a adenovirus (AAV), vectores retrovirales y lentivirales, y vectores derivados del virus del herpes simple y citomegalovirus. La terapia génica también es aplicable a este respecto, tal como de acuerdo con los métodos expuestos en la Patente de Estados Unidos 5.929.040 y la Patente de Estados Unidos 5.962.427.

Para que la invención pueda entenderse fácilmente y ponerse en práctica, se proporcionan los siguientes Ejemplos no limitantes.

Ejemplos**EJEMPLO 1****5 La Ac-TMP-1 y la Ac-TMP-2 recombinante suprimen IBD (modelo TNBS)**Animales y colitis inducida por TNBS

Se permitió que los ratones suizos C57B1/6 machos de seis semanas (peso 20-25 g, Animal Resources Centre, Perth, Australia Occidental) se adaptaran durante siete días antes de que se usaran en los experimentos. Se alojaron de acuerdo con los estándares australianos de derechos y normas animales. Todos los procedimientos que implican ratones se aprobaron por el James Cook University Animal Ethics Committee.

La colitis se indujo por inyección intraluminal de TNBS como se describe por Neurath et al. (J Exp Med. 182: 1281-90, 1995). Brevemente, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 24 horas con acceso libre al agua potable. Se anestesiaron i.p. mediante una mezcla de ketamina (50 µg/kg) y xilazina (5 µg/kg). A continuación, se inyectaron 100 µl de 2,5 mg de TNBS en solución de etanol al 45 % por vía intrarrectal a través de un catéter flexible de 3,2 cm de longitud. Después de la inyección de TNBS, los ratones se mantuvieron boca abajo en una posición de 45° durante un minuto para evitar fugas de la solución de TNBS y se reemplazaron en sus jaulas con acceso libre a comida y agua posteriormente.

Protocolo experimental

El día 0, los ratones recibieron una única inyección intraperitoneal con 20 µg de AcES, Ac-TMP-1, Ac-TMP-2, Ac-TMP-2 desnaturalizada o una inyección simulada de PBS. Cinco horas más tarde, recibieron una inyección intrarrectal con 2 a 2,5 mg de TNBS en etanol al 45 %, bajo anestesia suave. Desde el día 0 hasta el día 3, los ratones se monitorizaron diariamente para determinar la pérdida de peso, movilidad, apariencia general y presencia de diarrea. El día 3, los ratones se sacrificaron y se recogieron los colones para la evaluación de la inflamación (longitud del colon, engrosamiento de la pared, edema y ulceración).

Resultados

La Ac-TMP-1 y la Ac-TMP-2 recombinantes proporcionaron una excelente protección contra la pérdida de peso en dos experimentos separados de colitis TNBS (Figuras 3 a 6). La Ac-TMP-2 se evaluó adicionalmente para determinar las puntuaciones clínicas y macroscópicas y la longitud del colon y, a este respecto, proporcionó una reducción significativa en la patología intestinal (Figuras 4 a 6). De forma interesante, la desnaturalización de Ac-TMP-2 por la tripsina y el calentamiento anularon su actividad protectora en nuestro modelo murino de colitis inflamatoria según se evaluó mediante puntuación macroscópica (Figura 6).

40 Ejemplo 2 (no forma parte de la invención)***Regulación de asma experimental con Ac-TMP-1 recombinante***Animales y asma inducida por BSA

Los ratones se sensibilizaron con dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 20 µg de BSA en 2 mg de hidróxido de aluminio (alumbre) los días 0 y 7. Los días 14 a 21, a los ratones se les inyectaron i.p. 20 µg de AcES o Ac-TMP-1. Desde los días 18 a 21, a los ratones se les inyectó por vía intranasal (i.n.) 50 µg de BSA con un anestésico suave. El día 24, los ratones se sacrificaron y las muestras de tejido se recogieron.

Resultados

Para investigar si AcES o Ac-TMP-1 podrían prevenir la inflamación alérgica de las vías respiratorias en ratones, los ratones BALB/c se trataron a diario con AcES o Ac-TMP-1 (20 µg i.p.) durante cuatro días consecutivos antes de la exposición y cuatro días más en concomitancia a la exposición. En comparación con el grupo de inyección simulada de PBS, los ratones tratados con AcES y Ac-TMP-1 presentaron una infiltración eosinófila, perivascular y celular peribronquial significativamente reducida de los pulmones (Figuras 7 y 9). En comparación con el grupo sin tratar, los ratones expuestos a BSA tratados con PBS presentaron niveles aumentados de citocinas Th2 tales como interleucina (IL)-5 e IL-13, así como marcadores de inflamación tales como IL-6 (Figuras 8 y 10). Se encontró que los

tratamientos con AcES y Ac-TMP-1 dieron como resultado de una a cinco veces menos (respectivamente) de IL-5, y 2 veces menos de IL-13 en los pulmones (Figura 8). La citocina inflamatoria IL-6 también disminuyó de 2 a 3 veces en los ratones tratados con AcES o Ac-TMP-1 (Figura 10). Curiosamente, mientras que las citocinas proinflamatorias TNF α o IFN γ no están directamente asociadas con la inflamación inducida por asma, los niveles se aumentaron 3 y 5 veces (respectivamente) en ratones tratados con AcES (Figura 10). Sin embargo, los niveles no se vieron afectados por el tratamiento con Ac-TMP-1, lo que sugiere que Ac-TMP-1 se tolera bien y no induce respuestas inflamatorias. Los niveles de IL-12 y MCP-1 no se vieron afectados por los tratamientos con AcES o Ac-TMP-1, lo que significa que la prevención de la inflamación inducida por BSA no requiere la inducción de la respuesta Th1 y no afecta la quimiotaxis de monocitos (Figuras 10 y 11). Sorprendentemente, los tratamientos con AcES o Ac-TMP-1 indujeron una disminución de 2 a 3 veces en los niveles de IL-17A en los pulmones, que en niveles elevados se ha indicado que se encontraban asociados con una inflamación grave inducida por asma y una hiperreactividad de las vías respiratorias (Figura 11). Tomados en conjunto, estos resultados ilustran que AcES y Ac-TMP-1 reducen significativamente la infiltración de eosinófilos y linfocitos en las vías respiratorias inducida por BSA, pero también las respuestas Th2 y Th17, así como las citocinas proinflamatorias, tal como la IL-6.

15

EJEMPLO 3

Regulación del asma experimental con Ac-TMP-1/2 recombinante

20 Animales y asma inducida por OVA

La sensibilización se realizó mediante dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 20 μ g de OVA en 2 mg de hidróxido de aluminio (alumbre) (Pierce) el día 0 y 7. Los días 14 a 21, a los ratones se les inyectaron i.p. 20 μ g de Ac-TMP-1 o Ac-TMP-2. Desde el día 18 al 22, los ratones se expusieron a aerosoles de OVA (0,25 %) durante 20 minutos usando un nebulizador ultrasónico. Los ratones se analizaron el día 24.

El día 24, los ratones se sacrificaron y se recogieron los lavados broncoalveolares. Las células se contaron y se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-Siglec F o anti-CCR3, anti-Gr1, anti-CD3 y anti-CD19 y se analizaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando un citómetro de flujo FACS canto II y el software Diva FACS. Los eosinófilos se definieron como CCR3⁺ o SiglecF⁺ CD3⁻CD19⁻; los neutrófilos como Gr-1^{high} SiglecF⁻ CD3⁻ CD19⁻; los linfocitos como CD3⁺ CD19⁺.

El día 24, los ratones se sacrificaron y se recogieron los lavados peritoneales. Brevemente, el peritoneo se lavó dos veces con 5 ml de HBSS enfriado con hielo implementado con FCS al 5 %. Para recuentos diferenciales de células de PL, las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CCR3, anti-Gr1, anti-CD3 y anti-CD19 y se analizaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando un citómetro de flujo FACS canto II y el software Diva FACS.

Las muestras de pulmón de cada ratón individual se tomaron y se homogeneizaron en solución salina equilibrada de Hanks libre de calcio y magnesio que contenía suero fetal de ternera al 5 %. Las células se estimularon de nuevo *in vitro* con 1 mg/ml de Ac-TMP-1 o se dejaron sin estimular durante tres días a 37 °C. Se recogieron los sobrenadantes de estos cultivos y se evaluaron los niveles de IL-5, IL-10, IL-13, MCP-1 e IL-17A mediante matriz citométrica de microesferas y análisis FACS. Como alternativa, se preparó extracto de proteína completa a partir de pulmones congelados instantáneamente de ratones individuales en solución salina equilibrada de Hanks libre de calcio y magnesio que contenía un inhibidor de cóctel de proteinasa. El contenido del extracto se analizó por CBA.

Resultados

Los resultados previos generados en el laboratorio revelaron que la composición compleja de AcES induce una diversidad de respuestas de linfocitos T, incluyendo una fuerte respuesta Th2 asociada con una infiltración peritoneal de eosinófilos. Con el fin de verificar que Ac-TMP-1 o Ac-TMP-2 no indujeron una señal quimiotáctica más fuerte en el peritoneo que las vías respiratorias, en paralelo a los lavados broncoalveolares, lavados peritoneales de ratones sin tratamiento previo, ratones tratados con inyecciones simuladas de PBS, Ac-TMP-1, o Ac-TMP-2 se recogieron y se analizaron mediante FACS (Figuras 12, 15 y 16). Mientras que los ratones tratados con Ac-TMP-1 y Ac-TMP-2 mostraron una eosinofilia significativamente disminuida en las vías respiratorias en comparación con el grupo de inyección simulada, no hubo infiltración de eosinófilos en el peritoneo (Figuras 12, 15 y 16), lo que indica que Ac-TMP-1 y Ac-TMP-2 evitan la inducción de eosinófilos solamente en sitios de respuesta alérgica o inflamatoria.

Las células de pulmón de ratones expuestos a OVA demostraron niveles aumentados de secreción de IL-5, IL-10 e

IL-13 con estimulación de OVA *in vitro* (Figura 13). Los niveles de sobrenadante de MCP-1 e IL-17A, por otro lado, se elevaron de forma similar tanto en las células de pulmón de ratón simuladas de PBS como expuestas a OVA cuando se estimularon con OVA (Figura 14). De acuerdo con los hallazgos del lavado broncoalveolar, los niveles de citocinas Th2, IL-5, IL-10 e IL-13, y las citocinas proinflamatorias, MCP-1 e IL-17A, se redujeron en las células de pulmón estimuladas por OVA de ratones tratados con Ac-TMP-1 (Figuras 13 y 14). De forma similar, el contenido de citocina pulmonar disminuyó significativamente en los ratones tratados con Ac-TMP-2 (Figuras 17 y 18), lo que sugiere que Ac-TMP-2 suprime eficazmente Th2 y las citocinas proinflamatorias tales como IL-6 e IL-17A.

EJEMPLO 4

10

Regulación del asma crónica experimental con Ac-TMP-2 recombinante

Animales y asma crónica inducida por OVA

15 La sensibilización se realizó mediante dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 20 µg de OVA en 2 mg de hidróxido de aluminio (alumbre) (Pierce) el día 0 y 7. Los días 14 a 18, a los ratones se les inyectó i.p. 20 µg de Ac-TMP-2 o una solución de control de PBS. Desde los días 17 a 20, y los días 36 a 40, los ratones se expusieron a aerosoles de OVA (0,25 %) durante 20 minutos usando un nebulizador ultrasónico. Los días 36 a 40, a un grupo de ratones tratados con Ac-TMP-2 previamente se les inyectó de nuevo i.p. 20 µg de Ac-TMP-2. A los ratones restantes, ya sea
20 tratados previamente con Ac-TMP-2 o no, se les inyectó i.p. con una solución de control de PBS. Los ratones se analizaron el día 42 para determinar la inflamación de las vías respiratorias.

Resultados

25 Para evaluar si Ac-TMP-2, administrado solamente durante la primera exposición a OVA (+/-) o durante ambos conjuntos de exposiciones a OVA (+/+), disminuyó la inflamación de las vías respiratorias en un modelo de ratón de asma crónica, los lavados broncoalveolares de ratones sin tratamiento previo, ratones tratados con inyecciones simuladas de PBS, o ratones tratados con Ac-TMP-2 (+/- y +/+) se recogieron y se analizaron mediante FACS (Figura 19). Independientemente de si Ac-TMP-2 se administró durante la primera exposición (+/-) o ambas
30 exposiciones (+/+), los ratones tratados demostraron una reducción significativa tanto en la infiltración celular como eosinófila total de las vías respiratorias en comparación con los ratones tratados con inyecciones simuladas de PBS, en este modelo de asma crónica inducida por OVA (Figura 19).

EJEMPLO 5

35

Regulación de asma experimental con Ac-TMP-2 recombinante

Animales y asma inducida por OVA

40 La sensibilización se realizó mediante dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 20 µg de OVA en 2 mg de hidróxido de aluminio (alumbre) (Pierce) el día 0 y 7. Los días 14 a 18, a una cohorte de ratones sensibilizados con OVA se le inyectó por vía intranasal (i.n.) 20 µg de Ac-TMP-2 (tratamiento preventivo). Desde el día 22 al 26, los ratones sensibilizados con OVA se expusieron a aerosoles de OVA (0,25 %) durante 20 minutos usando un nebulizador ultrasónico. Los días 24 a 28, a una segunda cohorte de ratones sensibilizados con OVA se le inyectó por vía
45 intranasal (i.n.) 20 µg de Ac-TMP-2 (tratamiento curativo). Los ratones se analizaron el día 30 para determinar la inflamación de las vías respiratorias.

Resultados

50 Para determinar si Ac-TMP-2 administrado por vía local mediante inyecciones intranasales podría atenuar la inflamación de las vías respiratorias al administrarse de forma preventiva (Tp, antes de la exposición a OVA) o curativa (Tc, después de la exposición a OVA), los lavados broncoalveolares de ratones sin tratamiento previo, ratones expuestos a OVA tratados con inyecciones simuladas de PBS, o ratones expuestos a OVA tratados con Ac-TMP-2 (Tc y Tp) se recogieron y se analizaron mediante FACS a partir de lo cual se derivaron los recuentos de
55 células totales y diferenciales (Figura 20). Independientemente de si los ratones se trataron de forma preventiva o curativa, Ac-TMP-2 intranasal atenuó significativamente tanto la infiltración celular total como eosinófila (Figura 20). De forma importante, estos datos destacan que Ac-TMP-2 también se puede administrar por vía local y no solo por vía parenteral para prevenir la inflamación de las vías respiratorias en este modelo murino de asma.

Se prepararon extractos de proteína completa de los pulmones de ratones sin tratamiento previo, ratones expuestos a OVA tratados con inyecciones simuladas de PBS, o ratones expuestos a OVA tratados con Ac-TMP-2 (Tc y Tp) y se analizaron las citocinas Th2, IL-5 e IL-13, por matriz citométrica de microesferas (CBA). En comparación con el grupo sin tratamiento previo, los ratones expuestos a OVA tratados con PBS demostraron niveles significativamente elevados tanto de IL-5 como de IL-13 (Figura 21). Se encontró que el tratamiento con Ac-TMP-2, de forma preventiva o curativa, redujo significativamente los niveles de IL-5 e IL-13 (Figura 21). Tomados en conjunto, estos hallazgos ilustran que Ac-TMP-2 al administrarse por vía intranasal redujo significativamente la infiltración eosinófila de las vías respiratorias inducida por OVA y la respuesta inflamatoria Th2 asociada.

10 EJEMPLO 6

Regulación de linfocitos T reguladores (Tregs) con Ac-TMP-2 recombinante

Animales y linfocitos T reguladores

15 A los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal Ac-TMP-2 (20 µg) o PBS durante 6 días y se recogieron los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), bazo y lámina propia de intestino delgado (LP) y se analizó la presencia de Tregs. Se aislaron células individuales de cada tejido y se tiñeron para los marcadores de Treg CD4, CD25 y Foxp3 y posteriormente se analizaron por citometría de flujo. Los Tregs de MLN, bazo y ganglio linfático pilórico (PLN) y LP se tiñeron adicionalmente con anticuerpo CCR9 y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar su tejido de origen.

Resultados

25 La administración de Ac-TMP-2 a ratones sin tratamiento previo indujo significativamente el reclutamiento de Tregs en la lámina propia del intestino delgado (Figura 22). Por el contrario, se observó una disminución significativa en la frecuencia de Tregs de los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) con el tratamiento con Ac-TMP-2 (Figura 22). Estos datos sugieren un patrón de migración de Tregs desde el MLN hacia la mucosa del intestino. En apoyo de esto, el sesenta por ciento de los Tregs de la lámina propia expresó el receptor de quimiocinas CCR9, lo que indica que se han impreso en los ganglios linfáticos de drenaje asociados al intestino (es decir, MLN) (Figura 22). Esta observación coincide con los datos que sugieren que los Tregs generados en el MLN se acumulan en la mucosa para mantener la tolerancia a los antígenos ubicuos (Navarro et al. Mucosal Immunol. 4: 53-65 2011).

EJEMPLO 7

35 ***Regulación de los linfocitos T reguladores (Tregs) en el asma experimental con Ac-TMP-2 recombinante***

Animales y asma inducida por OVA

40 Para investigar la contribución de los Tregs a la protección inducida por Ac-TMP-2 en este modelo de asma experimental inducida por OVA, se agotaron selectivamente los Tregs en ratones antes de la sensibilización con y exposición a OVA. Este agotamiento se logró usando toxina diftérica (DT) en ratones transgénicos modificados para expresar el receptor DT bajo el promotor Foxp3 específico de Treg (ratones DEREK, Lahl y Sparwasser Methods Mol Biol. 707: 157-72 2011). Los ratones de tipo salvaje y DEREK se sensibilizaron entonces mediante dos inyecciones i.p. de 20 µg de OVA en 2 mg de hidróxido de aluminio (alumbre) (Pierce) los días 0 y 7. Los días 14 a 21, a ratones sensibilizados de tipo salvaje y DEREK se les inyectó i.p. 20 µg de Ac-TMP-2 o una solución de control de PBS. Desde el día 18 al 22, los ratones sensibilizados con OVA se expusieron a aerosoles de OVA (0,25 %) durante 20 minutos usando un nebulizador ultrasónico. Los ratones se analizaron el día 24 para determinar la inflamación de las vías respiratorias. Se recogieron lavados broncoalveolares de ratones sin tratar de tipo salvaje y ratones sensibilizados de tipo salvaje y DEREK tratados con inyecciones simuladas de PBS o Ac-TMP-2, y se analizaron mediante FACS de los que se derivaron recuentos de células diferenciales (Figura 23). Se prepararon extractos de proteína completa a partir de los pulmones de ratones de cada cohorte de tratamiento y se analizaron para determinar la expresión proteica de las citocinas asociadas a Th2 (Figura 24) y las citocinas proinflamatorias (Figura 25).

55 Resultados

Similar al Ejemplo 3 anterior, el tratamiento con Ac-TMP-2 redujo significativamente la inflamación de las vías respiratorias en ratones de tipo salvaje expuestos a OVA (Figura 23). Por el contrario, los ratones DEREK expuestos

a OVA tratados con Ac-TMP-2 demostraron niveles comparables de infiltración broncoalveolar en ratones DEREГ no tratados expuestos a OVA (Figura 23). En consonancia con estos hallazgos, los niveles de las citocinas Th2, IL-5, IL-10 e IL-13, y la IL-6 proinflamatoria se redujeron significativamente en los ratones de tipo salvaje expuestos a OVA, pero no en los ratones DEREГ expuestos a OVA, tras el tratamiento con Ac-TMP-2 (Figuras 24 y 25).
 5 Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los Tregs desempeñan un papel integral en la acción antiinflamatoria de Ac-TMP-2 en nuestro modelo de asma de ratón.

LISTA DE SECUENCIAS

- 10 <110> James Cook University
- <120> MÉTODO PARA TRATAR LA INFLAMACIÓN
- <130> 25345UC2
- 15
- <150> AU2012900999
- <151> 13-03-2012
- <150> PCT/AU2013/000247
- 20 <151> 13-03-2013
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25
- <210> 1
- <211> 140
- <212> PRT
- <213> Ancylostoma caninum
- 30
- <400> 1

ES 2 664 237 T3

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

<210> 2
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Ancylostoma caninum
 <400> 2

5

ES 2 664 237 T3

Met Ile Ser Leu Ile Val Phe Ile Ala Cys Leu Thr Thr Thr Gln Ala
 1 5 10 15

Ala Cys Ser Cys Lys Pro Phe Gly Thr Leu Lys Glu Ala Phe Cys Gln
 20 25 30

Ser Asp Tyr Val Leu Leu Ala Lys Val Leu Ser Val Asn Ser Lys Tyr
 35 40 45

Gly Glu Ser Ser Arg Asn Glu Ala Asn Asp Met Ser Thr Thr Ala Asn
 50 55 60

Gly Thr Trp Ser Tyr His Val Trp His Met Arg Thr Trp Lys Gly Pro
 65 70 75 80

Val Val Asp Thr Ser Val Leu Thr Thr Ser Tyr Ser Glu Cys Gly Val
 85 90 95

Thr Gly Leu Leu Lys Asn Trp Asp Tyr Phe Leu Thr Gly Lys Gln Gly
 100 105 110

Lys Asp Gly Glu Ile Thr Ile Thr Ser Cys Asp Phe Val Met Pro Ser
 115 120 125

Thr Asp Val Thr Pro Glu Glu His Asp Leu Leu Met Asp Leu Met Gly
 130 135 140

Asp Pro Lys Lys Cys Glu Glu Lys Asp Asp Glu Arg Asp Val Lys Glu
 145 150 155 160

Asn Glu Asn Ser Val Glu Glu Asn Asp Glu Lys Asp Glu Glu Glu Asn
 165 170 175

Gly Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn Asp Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn
 180 185 190

Asp Glu Lys Val Glu Glu Glu Asn Gly Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn
 195 200 205

Asp Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn Asp Glu Lys Asp Glu Glu Glu Asn
 210 215 220

Gly Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn Asp Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn
 225 230 235 240

Asp Glu Gln Glu

5

<210> 3
 <211> 519
 <212> ADN

ES 2 664 237 T3

<213> Ancylostoma caninum

<400> 3

agcatatcag catgagagtc gctattgttt tcattgcatg cttcgcagta gcacacgcat 60
gcaagtgcga aaagaaacct cgtcctccat tggagaaact gctttgcaa tcacaatttg 120
ttactcacgc gaaagtgacg aagaagagaa ttgatggta cttcatctat tacgacttgg 180
agcataagga agtttataag cccaagata ggagatccc aatcgaactc ttctcatgga 240
gggaaaagga aaattgtggt gttccggatc tcgaagaagg caaagaatac ctgataggag 300
gtaaagtgac ggattatggc gacggtgatt tggaatttc tgtttcacg tgcgaccttc 360
tccgaaactg gacagacgtc tctggagagg agaagaaatt gctcggaacg ttcaaagtg 420
aaaatcagtc ataacgcgcg attatatata attgaaagaa gagaaatgaa catttttcac 480
gcgaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 519

5

<210> 4

<211> 870

<212> ADN

<213> Ancylostoma caninum

10

<400> 4

cctcgtgccg aatggcacga gggtttgagg tacagaaggg cgccgaagt atactaaacc 60
catgatttct ctcatagttt tcattgcatg ctcacaacg acgcaggcag catgctcttg 120
caaaccgttc ggaacactga aggaagcttt ctgccaatca gattacgtgc ttctggcaaa 180
agtgttgtca gtaaatagta aatatggtga atcgtcgaga aatgaagcaa atgatatgag 240
cacgaccgct aacggaacat ggagttacca tgtatggcac atgcggactt ggaagggtcc 300
tgtcgttgat actagtgttc tcaccacgtc atatagcgag tgtggtgtaa ctggtctctt 360
gaaaaattgg gattattttc taacaggcaa gcaaggaaa gatggcgaaa tcaccatcac 420
aagctgcgac tttgtaatgc catcaactga tgtcacacca gaagagcatg atcttttgat 480
ggacctcatg ggggaccgga aaaaatgtga agaaaaagat gatgagaggg acgttaaaga 540
aaacgagaat agcgtagaag agaatgatga gaaagatgaa gaagaaaatg gtgagaaaac 600
agtagaagag aatgacgaga aaactgtgga agaaaacgat gagaaagttg aagaagaaaa 660
tggtgagaaa acagtagaag agaatgacga gaaaactgtg gaagaaaacg atgagaaaaga 720
tgaagaagaa aatggtgaga aaacagtaga ggagaatgac gagaaaactg tggaagaaaa 780
cgatgaacag gagtgatctg aacactgcaa tttctcgtaa ccaagtggga ataaaattct 840
gacgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 870

15

REIVINDICACIONES

1. *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2* para uso terapéutico para reducir o aliviar la inflamación en un sujeto, en la que la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
2. *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2* para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inflamación está asociada con, o es secundaria a, una enfermedad, trastorno o afección en el sujeto.
3. *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2* para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la enfermedad, trastorno y/o afección es refractaria a una terapia basal.
4. *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2* para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la terapia basal comprende la administración de al menos un agente inicial seleccionado del grupo que consiste en medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes anti-citocinas o agentes del receptor anti-citocina seleccionados de agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes de IL-17, y agentes anti-IL-6R, antibióticos y combinaciones de los mismos.
5. *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2* para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en la que, al menos inicialmente, *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2), o un fragmento biológicamente activo del mismo, se administra de manera complementaria con la terapia basal.
6. *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2* para uso terapéutico para prevenir la inflamación en un sujeto, en la que la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
7. La *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2* para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inflamación está asociada con, o es secundaria a, una enfermedad, trastorno o afección en el sujeto.
8. La *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2*, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o la reivindicación 7, en la que la enfermedad, trastorno y/o afección es una enfermedad, trastorno y/o afección inmunológica, en donde la enfermedad, trastorno y/o afección inmunológica se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, enfermedad celíaca, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), osteomielitis crónica multifocal recurrente (CRMO), enfermedad de Crohn, neuropatías desmielinizantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, hipogammaglobulinemia, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), diabetes insulino dependiente (tipo 1), artritis juvenil, síndrome de Kawasaki, esclerosis múltiple, miastenia gravis, síndrome de post-infarto de miocardio, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso sistémico (SLE), púrpura trombocitopénica (TTP), colitis ulcerosa, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.
9. *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o la reivindicación 7, en la que la enfermedad es una enfermedad del tracto digestivo, en la que la enfermedad es preferiblemente gastritis crónica o una enfermedad inflamatoria del intestino, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal es preferiblemente enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.
10. *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o la reivindicación 7, en la que la enfermedad es una enfermedad del sistema respiratorio, en la que la enfermedad se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en asma, enfisema, bronquitis crónica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).
11. *Ac-TMP-2* (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac-TMP-2* para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que incluye además al menos un agente adicional.

12. *Ac*-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac*-TMP-2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el al menos un agente adicional se selecciona del grupo que consiste en medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes anti-citocinas o agentes del receptor anti-citocina seleccionados de agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, 5 agentes anti-IL-13, agentes de IL-17, y agentes anti-IL-6R, antibióticos y combinaciones de los mismos.

13. Una composición farmacéutica que comprende: (a) *Ac*-TMP-2 (SEQ ID NO:2) o un fragmento biológicamente activo o variante de *Ac*-TMP-2, en donde la variante tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, junto con un vehículo, diluyente o 10 excipiente farmacéuticamente aceptable, y (b) al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, agentes anti-citocinas o del receptor anti-citocina seleccionados de agentes anti-TNF α , agentes anti-IL-5, agentes anti-IL-13, agentes anti-IL-17, y agentes anti-IL-6R, antibióticos y combinaciones de los mismos.

```

1           M R V A I V F I A C F A V A H A C
1 AGCATATCAGCATGAGAGTCGCTATTGTTTCATTGCATGCTTCGCAGTAGCACACGCAT
18  K C E K K P R P P L E K L L C Q S Q F V
61 GCAAGTGCGAAAAGAACCTCGTCTCCATTGGAGAACTGCTTTGCCAATCACAATTTG
38  T H A K V T K K R I D G Y F I Y Y D L E
121 TTACTCACGCGAAAGTGACGAGAAGAGAATTGATGGTTACTTCATCTATTACGACTTGG
58  H K E V Y K P K D R S I P I E L F S W R
181 AGCATAAGGAAGTTTATAAGCCCAAAGATAGGAGTATCCCAATCGAACTCTTCTCATGGA
48  E K E N C G V P D L E E G K E Y L I G G
241 GGGAAAAGGAAAATTGTGGTGTCCGGATCTCGAAGAAGGCAAAGAATACCTGATAGGAG
98  K V T D Y G D G D L V I S V S R C D L L
301 GTAAAGTGACGGATTATGGCGACGGTGTATTGGTAATTTCTGTTTACGGTGCACCTTC
118 R N W T D V S G E E K K L L G T F K C E
361 TCCGAACTGGACAGACGTCTCTGGAGAGGAGAAGAAATGCTCGGAACGTTCAAATGTG
138 N Q S * (SEQ ID NO:1)
421 AAAATCAGTCATAAACGCCGATTATATATAATTGAAAGAGAGAARTGAACATTTTTTTCAC
481 GCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 1

```

1 CCTCGTGCCGAATGGCAGGAGGTTTGAGGTACAGAAGGGCGCCGAAGTTATACTAAACC
1 M I S L I V F I A C L T T T Q A A C S C
61 CATGATTTCTCTCATAGTTTTTCATTGCATGCCTCACAACGACGCGAGGCAGCATGCTCTTG
21  K P F G T L K E A F C Q S D Y V L L A K
121 CAAACCGTTCCGAACACTGAAGGAAGCTTTCTGCCAATCAGATTACGTGCTTCTGGCAA
41  V L S V N S K Y G E S S R N E A N D M S
181 AGTGTGTGTCAGTAAATAGTAAATATGGTGAATCGTTCGAGAAATGAAGCAAATGATATGAG
61  T T A N G T W S Y H V W H M R T W K G P
241 CACGACCGCTAACGGAAACATGGAGTTACCATGTATGGCACATGCGGACTTGGGAAGGGTCC
81  V V D T S V L T T S Y S E C G V T G L L
301 TGTCGTTGATACTAGTGTCTCACCACGTCAATAGCGAGTGTGGTGAAGTGGTCTCTT
101 K N W D Y F L T G K Q G K D G E I T I T
361 GAAAAATTGGGATTATTTTCTAACAGGCAAGCAAGAAAAAGATGGCGAAATCACCATCAC
121 S C D F V M P S T D V T P E E H D L L M
421 AAGCTGCGACTTTGTAATGCCATCAACTGATGTCACACCAGAAGAGCATGATCTTTTGAT
141 D L M G D P K K C E E K D D E R D V R E
481 GGACCTCATGGGGACCCGAAAAAATGTGAAGAAAAAGATGATGAGAGGGACGTTAAAGA
161 N E N S V E E N D E K D E E E N G E K T
541 AAACGAGAATAGCGTAGAAGAGAATGATGAGAAAGATGAAGAAGAAAATGGTGAGAAAAC
181 V E E N D E K T V E E N D E K V E E E N
601 AGTAGAAGAGAATGACGAGAAAACGTGGAAGAAAACGATGAGAAAGTTGAGAAGAAAA
201 G E K T V E E N D E K T V E E N D E K D
661 TGGTGAGAAAACAGTAGAAGAGAATGACGAGAAAACGTGGAAGAAAACGATGAGAAAGA
221 E E E N G E K T V E E N D E K T V E E N
721 TGAAGAAGAAAATGGTGAGAAAACAGTAGAGGAGAATGACGAGAAAACGTGGAAGAAAA
241 D E Q E * (SEQ ID NO:2)
781 CGATGAACAGGAGTATCTGAACACTGCAATTTCTCGTAACCAAGTGGGAATAAAATCT
841 GACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 2

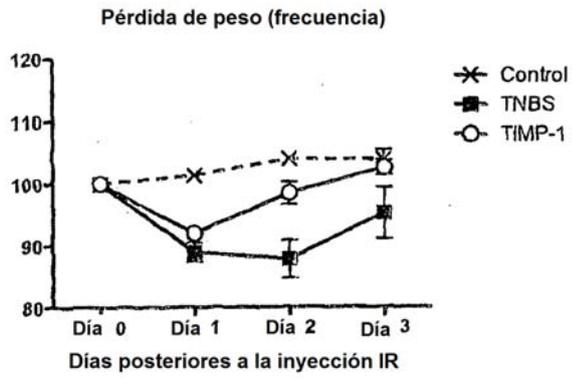


Figura 3

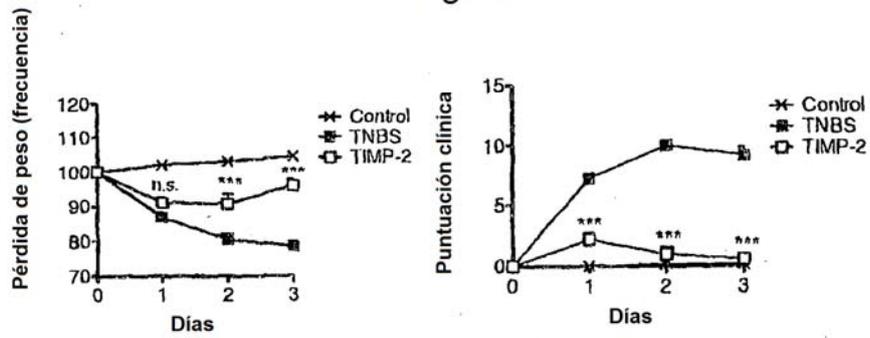


Figura 4

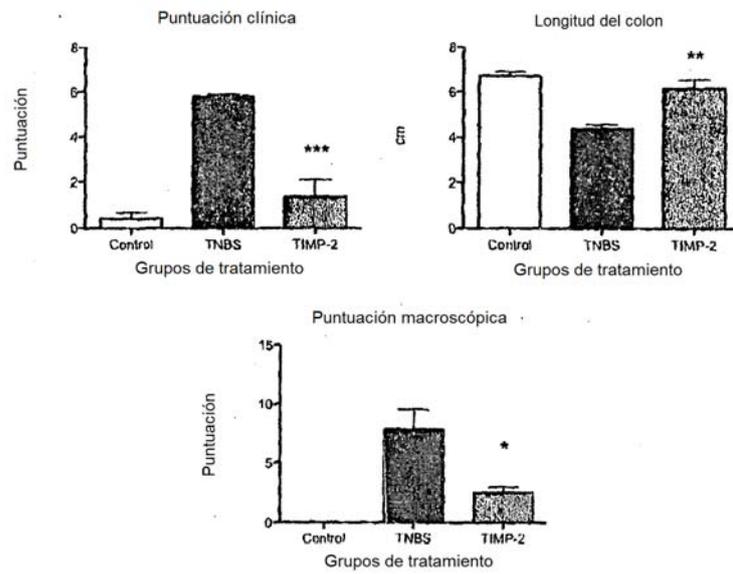


Figura 5

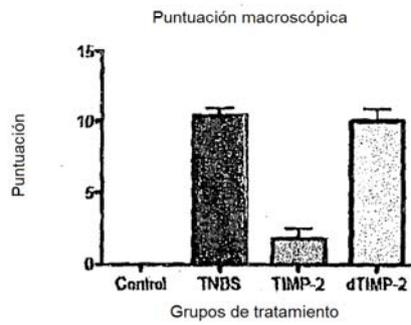


Figura 6

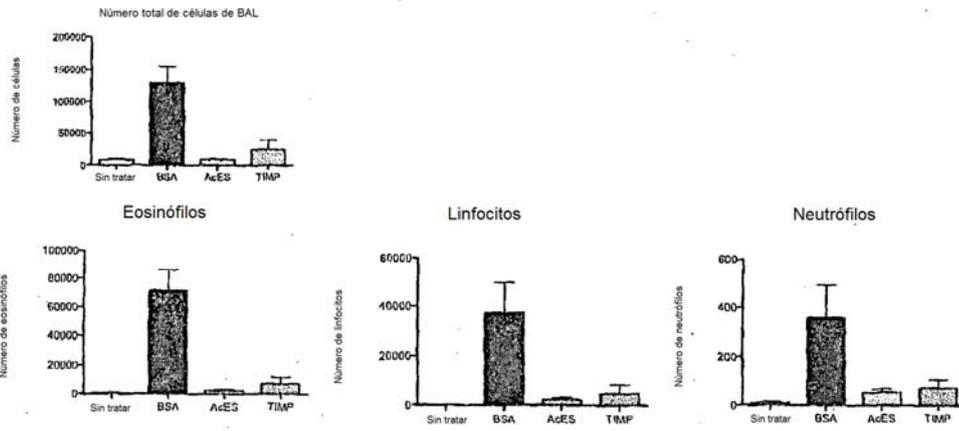


Figura 7

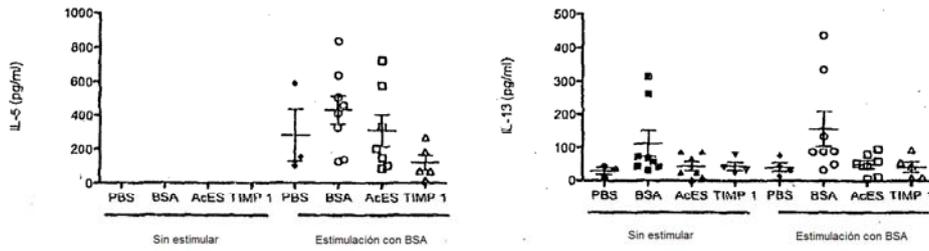


Figura 8

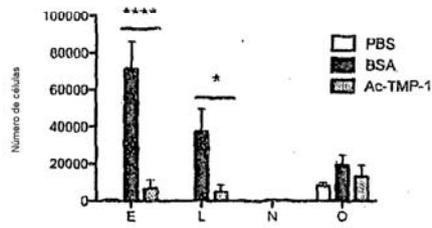


Figura 9

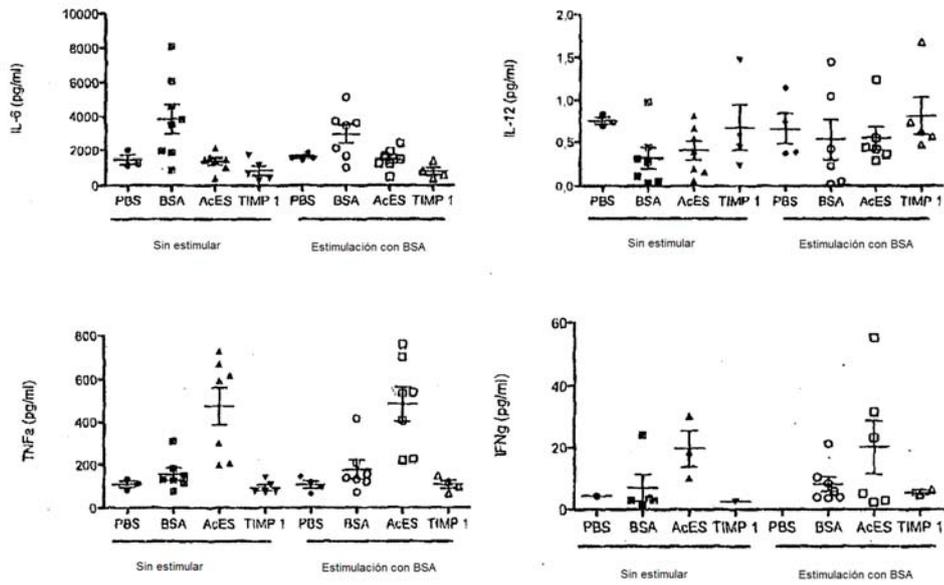


Figura 10

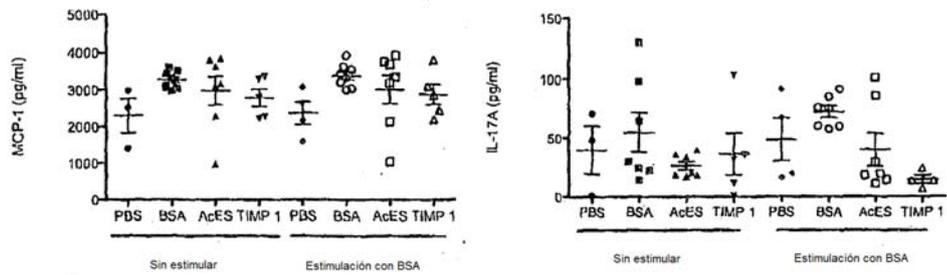


Figura 11

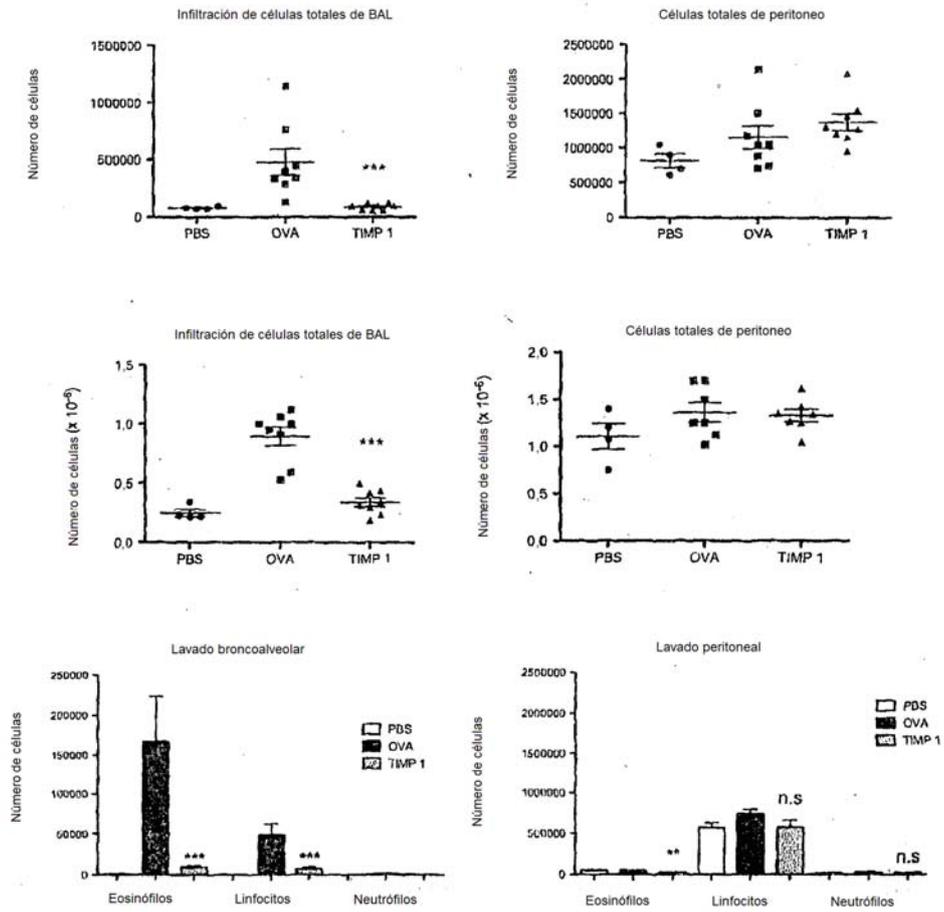


Figura 12

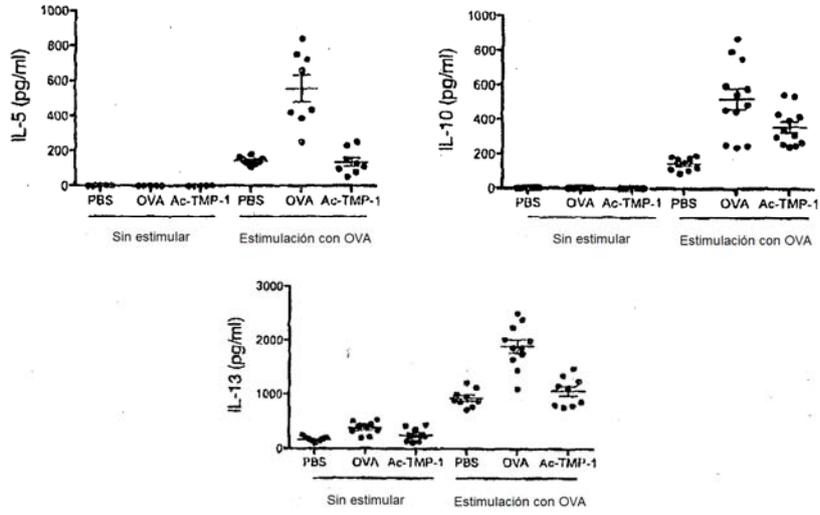


Figura 13

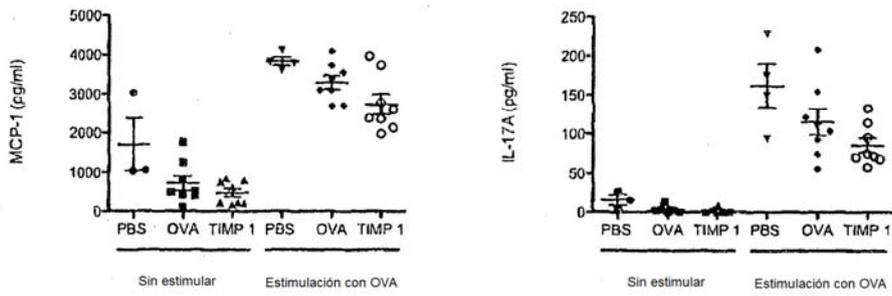


Figura 14

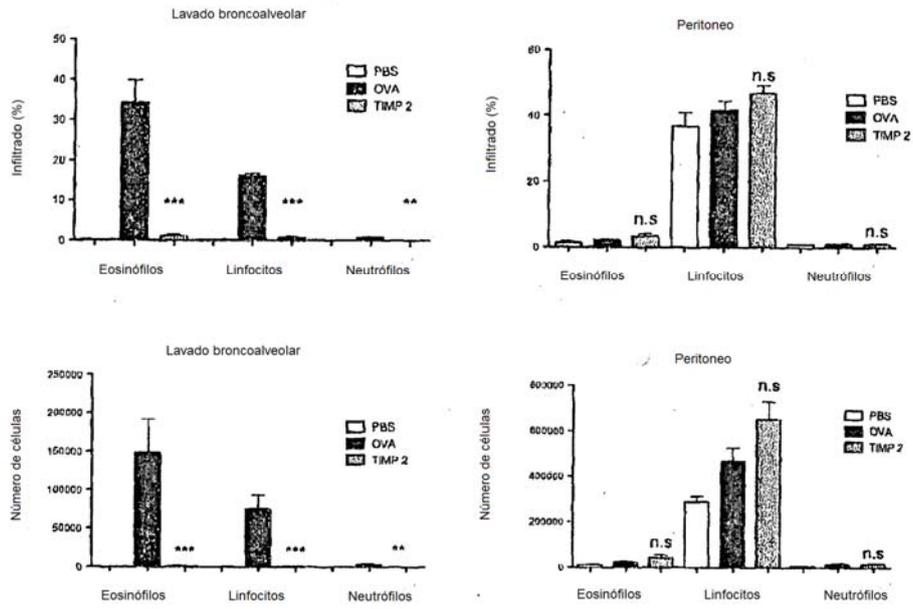


Figura 15

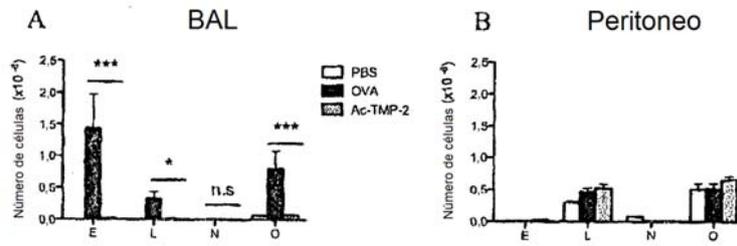


Figura 16

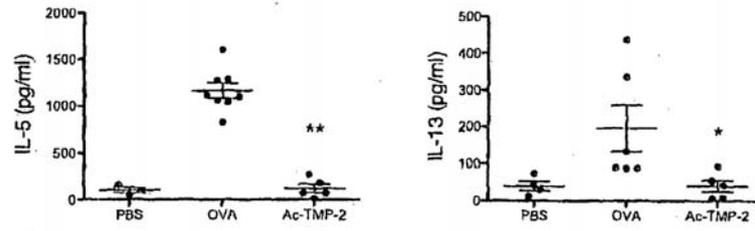


Figura 17

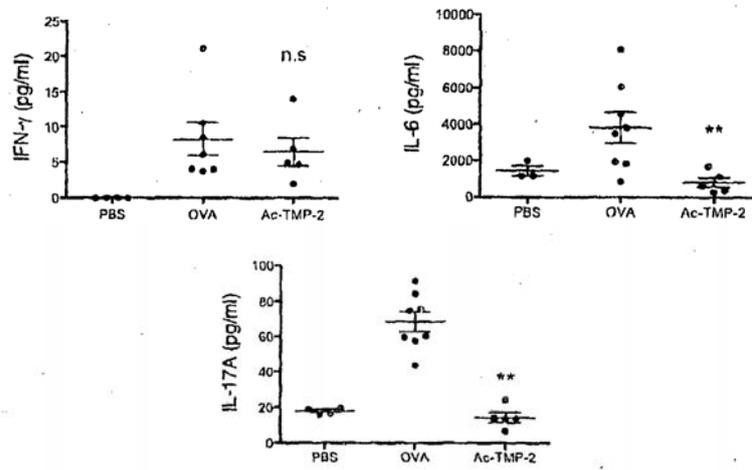


Figura 18

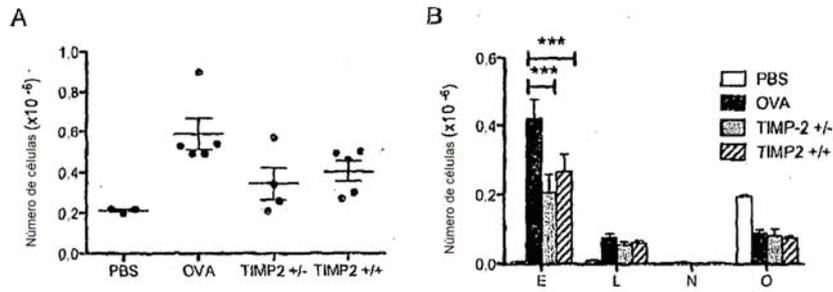


Figura 19

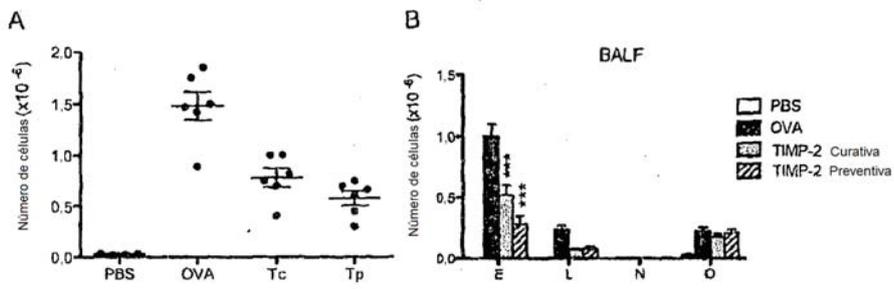


Figura 20

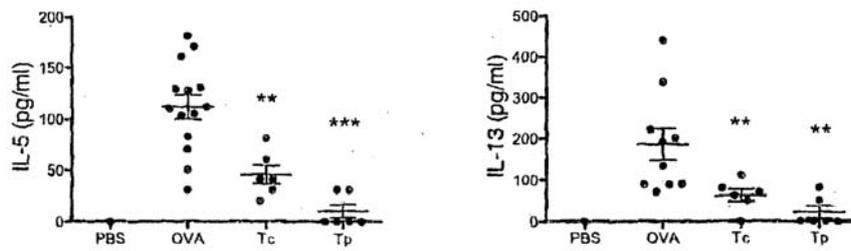
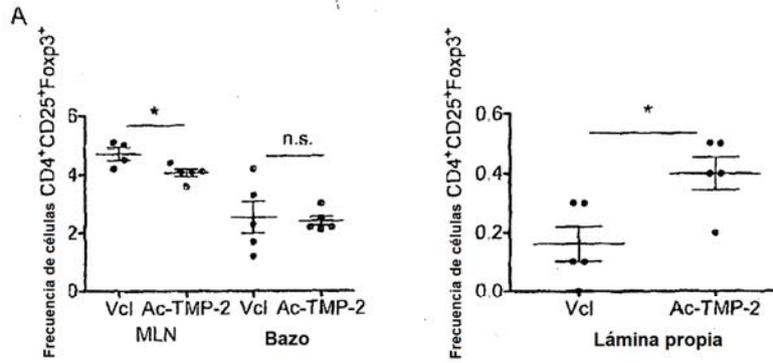


Figura 21



B

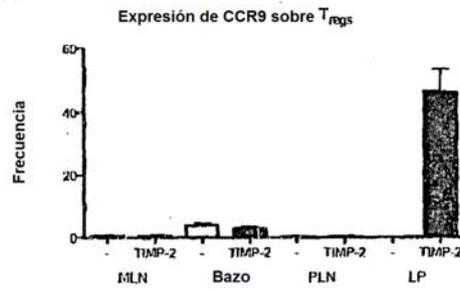


Figura 22

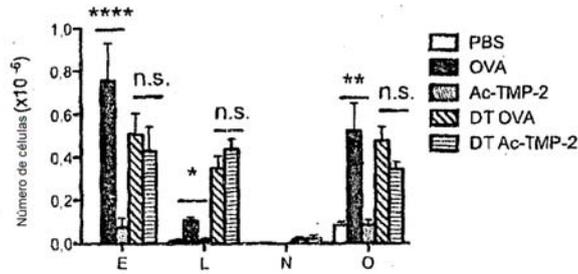


Figura 23

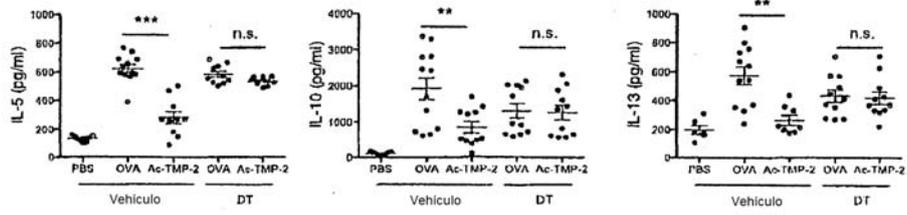


Figura 24

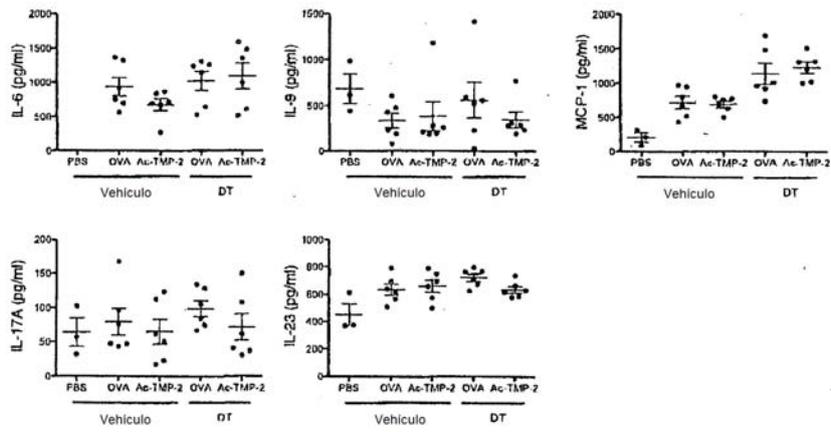


Figura 25