

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 824**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)
A61K 39/002 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2013 PCT/FR2013/050252**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13117860**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2013 E 13706643 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2812020**

54 Título: **Proteínas GST de 28 KDa que provienen de esquistosomas para su utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunes que generan una respuesta de tipo Th1 y/o Th17**

30 Prioridad:

06.02.2012 FR 1251100

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE LILLE (25.0%)
42, rue Paul Duez
59800 Lille, FR;
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (25.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%) y
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL
UNIVERSITAIRE DE LILLE (25.0%)

72 Inventor/es:

CAPRON, MONIQUE;
EL NADY, MOHAMED;
COLOMBEL, JEAN-FRÉDÉRIC y
RIVEAU, GILLES

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 676 824 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

Proteínas GST de 28 KDa que provienen de esquistosomas para su utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunes que generan una respuesta de tipo Th1 y/o Th17

- 5 **Sector de la técnica**
- 10 La presente invención se refiere a proteínas particulares que son glutatión-S-transferasas que provienen de diferentes parásitos esquistosomas, para su utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunes tales como la enfermedad de Crohn o la esclerosis en placas. La presente invención también se refiere a los fragmentos de dichas proteínas, las secuencias obtenidas a partir de estas proteínas y homólogos de estas proteínas en la medida en la que estas secuencias y estos fragmentos puedan generar una respuesta antiinflamatoria.
- 15 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende los objetos que se han mencionado anteriormente y al menos un excipiente farmacológicamente aceptable.

Estado de la técnica

- 20 En los países desarrollados, las enfermedades inflamatorias crónicas relacionadas con una desregulación del sistema inmunitario (enfermedades inflamatorias autoinmunes) afectan a aproximadamente un 8 % de la población. Entre las enfermedades inflamatorias autoinmunes más extendidas, se pueden mencionar, las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (MICI) y la esclerosis en placas.
- 25 Las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (enfermedad de Crohn y rectocolitis hemorrágica) son cada vez más frecuentes en los llamados países « desarrollados ». Por desgracia, en estos países recientemente se encuentra un aumento de los casos pediátricos de estas patologías. Además, estas enfermedades comienzan a hacer su aparición en los llamados países « en vías de desarrollo », debido probablemente a los cambios en los hábitos alimenticios y las condiciones sanitarias. Los tratamientos clásicos de las enfermedades inflamatorias crónicas autoinmunes son a base de inmunosupresores y/o corticosteroides. Estos tratamientos no están desprovistos de efectos secundarios graves.

Por lo tanto, con respecto a la enfermedad de Crohn, azatioprina, metotrexato o ciclosporina, que son agentes inmunosupresores, presentan una eficacia variable y pueden estar asociados con efectos secundarios graves tales como síndromes linfoproliferativos o fibrosis hepáticas.

Las formas agudas de la enfermedad de Crohn se tratan con corticosteroides cuya toxicidad es elevada y que favorecen la aparición de osteoporosis, diabetes e infecciones oportunistas.

- 40 Las terapias biológicas utilizan la inhibición del TNF a través de los anticuerpos monoclonales anti-TNF. Estas terapias permiten reducir las hospitalizaciones y las intervenciones quirúrgicas pero generan riesgos de infección, linfoma o fallo cardíaco. Además, ciertos pacientes no reaccionan a este tipo de terapia que además sigue siendo, de coste muy elevado. Además, con cada recidiva de la enfermedad se corre el riesgo de generar consecuencias incapacitantes para el paciente, como por ejemplo, la colocación de una bolsa de recuperación de las heces. La calidad de vida del paciente disminuye en gran medida.

En las formas pediátricas de estas enfermedades, y en particular en el caso de la enfermedad de Crohn en la que la incidencia ha aumentado mucho durante los últimos diez años, el arsenal terapéutico es muy limitado. Los agentes inmunosupresores no se pueden utilizar.

Por lo tanto existe una necesidad real y urgente de preparar un nuevo tratamiento preventivo y/o curativo de las enfermedades inflamatorias crónicas relacionadas con una desregulación del sistema inmunitario que generan una respuesta inflamatoria de tipo Th1 y/o Th17, tal como la enfermedad de Crohn o la esclerosis en placas, por ejemplo.

Objeto de la invención

Un primer objeto de la presente invención es proponer un nuevo principio activo para su utilización en el tratamiento preventivo y/o curativo de las enfermedades inflamatorias crónicas que generan una respuesta inflamatoria de tipo Th1 y/o Th17.

Otro objeto de la presente invención es proponer un principio activo para su utilización en el tratamiento preventivo y/o curativo de las enfermedades mencionadas anteriormente que presente una baja toxicidad y pocos o ningún efecto secundario.

Otro objeto de la presente invención es proponer un principio activo para su utilización en el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente que sea de administración para niños.

Al menos uno de estos objetos se alcanza por medio de un producto elegido entre una proteína, un fragmento de dicha proteína, una secuencia derivada y una secuencia homóloga de dicha proteína. La presente solicitud describe, de forma característica, que

- 5
- dicha proteína comprende o está constituida por la proteína Glutación S-transferasa de 28 KDa de un esquistosoma elegido entre *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma bovis* representada respectivamente por las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 3;
 - dicho fragmento es un fragmento de una de dichas proteínas con la condición de que induzca una respuesta inmunitaria de tipo Th2, dicho fragmento comprendiendo, de preferencia, al menos la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3;
 - dicha secuencia derivada se obtiene a partir de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o de dichos fragmentos citados anteriormente y se obtiene en particular por supresión, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos, con la condición de que esta secuencia derivada induzca una respuesta de tipo Th2;
 - dicha secuencia homóloga es una secuencia homóloga de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o de uno de dichos fragmentos, y presenta en particular una identidad de al menos un 80 % y en particular de al menos un 85 % con una de dichas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, con la condición de que dicha secuencia homóloga induzca una respuesta de tipo Th2;

25 para su utilización en el tratamiento preventivo y/o curativo de una enfermedad inflamatoria crónica relacionada con una disregulación del sistema inmunitario que genera una respuesta inmunitaria de tipo Th1/Th17.

30 De acuerdo con un modo particular, la invención se refiere a un producto elegido entre una proteína, un fragmento de dicha proteína, una secuencia derivada y una secuencia homóloga de dicha proteína, y de forma característica:

- dicha proteína comprende o está constituida por la proteína Glutación S-transferasa de 28 KDa de un esquistosoma elegido entre *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma bovis* representada respectivamente por las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 3;
- dicho fragmento es un fragmento de una de dichas proteínas que comprende al menos una región comprendida entre las siguientes regiones: la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43, la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; ésto generando una respuesta inmunitaria de tipo Th2, caracterizada por la producción de IL-4, IL-5 o IL-13 por linfocitos que no producen IFN gamma;

45 y ésto disminuyendo la respuesta inmunitaria de tipo Th1, la respuesta inmunitaria de tipo Th1 estando caracterizada por la producción de IFN gamma y de TNF por linfocitos que no producen IL-4 o IL-5, y la producción de IL-1b por los tejidos de colon de rata;

- dicha secuencia derivada se obtiene a partir de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o de uno de dichos fragmentos citados anteriormente y se obtiene en particular por supresión, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos, en la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, dicha secuencia derivada comprendiendo al menos una región comprendida entre las siguientes regiones: la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43, la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; ésto induciendo la generación de una respuesta Th2 y/o la disminución de la respuesta Th1, caracterizadas respectivamente por la producción de IL-4, IL-5 o IL-13, y la producción de IFN gamma, TNF o IL-1b; y
- dicha secuencia homóloga es una secuencia homóloga de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o de uno de dichos fragmentos, y presenta una identidad de al menos un 80 % o de al menos un 85 % con al menos una de las regiones siguientes de dichas secuencias: la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43, la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la

posición 220, la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, y la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; o con la totalidad de una de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; ésto induciendo la generación de una respuesta Th2 y/o la disminución de la respuesta Th1, caracterizadas respectivamente por la producción de IL-4, IL-5 o IL-13, y la producción de IFN gamma, TNF o IL-1b;

para su utilización en el tratamiento preventivo y/o curativo de una enfermedad inflamatoria crónica relacionada con una desregulación del sistema inmunitario que genera una respuesta inmunitaria de tipo Th1/Th17 elegida entre las siguientes enfermedades inflamatorias autoinmunes: enfermedad de Berger, enfermedad de Basedow, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad celíaca, rectocolitis hemorrágica, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, anemias hemolíticas autoinmunes, anemia de Biermer (anemia perniciosa), lupus eritematoso, síndrome de CREST, diabetes de tipo 1, esclerodermia, pénfigo vulgar, penfigoide ampollosa, epidermólisis Ampollosa Adquirida, dermatitis herpetiforme, miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, polimiositis, síndrome de Goujerot-Sjögren, esclerosis en placas, enfermedad de Graves y psoriasis.

La presente solicitud también se refiere a un producto elegido entre una proteína, un fragmento de dicha proteína, una secuencia derivada y una secuencia homóloga de dicha proteína, y de forma característica:

- dicha proteína comprende o está constituida por la proteína Glutación S-transferasa de 28 KDa de un esquistosoma elegido entre *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma bovis* representada respectivamente por las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 3;
- dicho fragmento es un fragmento de una de dichas proteínas a condición de que induzca una respuesta inmunitaria de tipo Th2 y/o disminuye la respuesta de tipo Th1, dicho fragmento comprendiendo, al menos una región comprendida entre las siguientes regiones: la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43, la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3;
- dicha secuencia derivada se obtiene a partir de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o de uno de dichos fragmentos citados anteriormente y se obtiene en particular por supresión, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos, en la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, dicha secuencia derivada comprendiendo al menos una región comprendida entre las siguientes regiones: la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43, la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; ésto induciendo la generación de una respuesta Th2 y/o la disminución de la respuesta Th1; y
- dicha secuencia homóloga es una secuencia homóloga de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o de uno de dichos fragmentos, y presenta una identidad de al menos un 80 % y en particular de al menos un 85 % con al menos una de las regiones siguientes de dichas secuencias: la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43, la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, y la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; o con la totalidad de una de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; ésto induciendo la generación de una respuesta Th2 y/o la disminución de la respuesta Th1.

para su utilización en el tratamiento preventivo y/o curativo de una enfermedad inflamatoria crónica relacionada con una desregulación del sistema inmunitario que genera una respuesta inmunitaria de tipo Th1/Th17.

De acuerdo con la invención, el fragmento es un fragmento de una de dichas proteínas y comprende de preferencia, al menos la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3,

ésto generando una respuesta inmunitaria de tipo Th2, caracterizada por la producción de IL-4, IL-5 o IL-13 por linfocitos que no producen IFN gamma;
y ésto disminuyendo la respuesta inmunitaria de tipo Th1, la respuesta inmunitaria de tipo Th1 estando caracterizada por la producción de IFN gamma et de TNF por linfocitos que no producen IL-4 o IL-5, y la producción de IL-1b por los tejidos de colon de rata;

Quando el producto de la invención es una secuencia obtenida a partir de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, esta última puede comprender de forma ventajosa al menos la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, en particular la región comprendida por el aminoácido en la posición 180 al aminoácido en la posición 215, de preferencia, la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, ésto generando una respuesta Th2 y/o la disminución de la respuesta Th1.

Quando el producto de la invención es una secuencia homóloga tal como se ha mencionado anteriormente, esta comprende de forma ventajosa al menos la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, ésto generando una respuesta Th2 y/o la disminución de la respuesta Th1.

Por lo tanto, la secuencia homóloga puede comprender al menos una de las regiones mencionadas anteriormente o todas las regiones mencionadas anteriormente. Estas reacciones pueden ser idénticas a las regiones correspondientes de las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 o pueden presentar, cada una, una homología de al menos un 80 % y de preferencia de al menos un 85 % con la región correspondiente de una de las secuencias mencionadas anteriormente. El porcentaje de homología puede ser diferente para cada región.

De acuerdo con la presente invención, se define una respuesta de tipo Th1 que está caracterizada por la presencia de linfocitos que producen citoquinas tales como IFN gamma pero que no producen IL-4 o IL-5. Esta respuesta también conduce a la producción de TNF.

Una respuesta de tipo Th2 se caracteriza por la presencia de linfocitos que producen citoquinas tales como IL-4, IL-5 o IL-13 pero sin producción de IFN gamma.

La respuesta de tipo Th17 es una respuesta inflamatoria en la que los linfocitos producen IL-17 o IL-25, además del TNF producido por numerosos tipos celulares.

Por lo tanto el tipo de respuesta se mide evaluando las citoquinas producidas ya sea por las propias células (por citometría de flujo) cuando se tiene acceso a las células, ya sea por PCR en los tejidos. Se habla de « tipo » de respuesta; el tipo de respuesta corresponde a la respuesta mayoritaria de las células o del organismo. En la práctica, Siempre hay respuestas mixtas. Un medio para medir la respuesta Th1 con respecto a Th2 es medir la proporción de IFN gamma / IL-4.

Las patologías autoinmunes a menudo inducen respuestas mixtas y sobre todo proinflamatorias, día y la utilización de las bioterapias a base de anti-TNF.

De acuerdo con un modo de realización, dicha proteína está representada por la secuencia SEQ ID NO: 1 (28 GST glutatión transferasa de *Schistosoma haematobium*), dicho fragmento es un fragmento de dicha proteína que comprende en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211, dicha secuencia derivada se obtiene a partir de la SEQ ID NO: 1 y dicha secuencia homóloga presenta una identidad tal como se mencionó anteriormente con la secuencia SEQ ID NO: 1.

De acuerdo con otro modo de realización particular, dicho producto es el producto de expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica:

- la proteína Glutatión-S-transferasa de 28 KDa representada por la SEQ ID NO: 1; o
- un fragmento de dicha proteína representada por la SEQ ID NO: 1, dicho fragmento comprendiendo fue estando

constituido por al menos la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, en particular la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, de preferencia la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1; o

- una secuencia homóloga tal como se ha mencionado anteriormente; o
- secuencia homóloga tal como se ha mencionado anteriormente;

dicha secuencia de nucleótidos codificante correspondiendo en particular a la secuencia SEQ ID NO: 4.

De acuerdo con un modo de realización particular, la proteína es el producto de expresión de dicha secuencia codificante de SEQ ID NO: 4 en *Saccharomyces cerevisiae* o en *Escherichia coli*.

De acuerdo con la invención, la enfermedad que se ha definido anteriormente se elige entre las siguientes enfermedades inflamatorias autoinmunes: enfermedad de Berger, enfermedad de Basedow, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad celíaca, rectocolitis hemorrágica, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, anemias hemolíticas autoinmunes, anemia de Biermer (anemia perniciosa), lupus eritematoso, síndrome de CREST, diabetes de tipo 1, esclerodermia, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso, epidermólisis Ampollosa Adquirida, dermatitis herpetiforme, miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, polimiositis, síndrome de Goujerot-Sjögren, esclerosis en placas, enfermedad de Graves y psoriasis.

De acuerdo con la invención, el tratamiento de la patología que se ha mencionado anteriormente se puede aplicar a cualquier paciente, humano o animal. En particular se aplica al ser humano, adulto o niño. De acuerdo con la invención, el tratamiento puede concernir de forma más particular a un niño y de forma más particular al tratamiento preventivo en el niño.

Por « niño », se define a un individuo con una edad de 0 a 18 años, de forma más particular con una edad de 9 a 18 años.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica, dicha composición comprendiendo, como agente activo, un producto de acuerdo con la invención y un excipiente farmacológicamente aceptable, en particular para el tratamiento preventivo y/o curativo de una enfermedad inflamatoria crónica relacionada con una desregulación del sistema autoinmunitario que genera una respuesta inmunitaria de tipo Th1 y/o Th17.

Por « farmacológicamente aceptable », en el sentido de la presente invención se hace referencia a cualquier excipiente susceptible de ser inyectado, ingerido o al menos aplicado sobre la piel sin generar reacción secundaria que podría ser, de manera estadística, superior al beneficio proporcionado por el tratamiento.

De acuerdo con la invención, la composición se utiliza de forma ventajosa en el tratamiento preventivo y/o curativo de una enfermedad elegida entre las siguientes enfermedades inflamatorias autoinmunes: enfermedad de Berger, enfermedad de Basedow, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad celíaca, rectocolitis hemorrágica, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, anemias hemolíticas autoinmunes, anemia de Biermer (anemia perniciosa), lupus eritematoso, síndrome de CREST, diabetes de tipo 1, esclerodermia, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso, epidermólisis Ampollosa Adquirida, dermatitis herpetiforme, miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, polimiositis, síndrome de Goujerot-Sjögren, esclerosis en placas, poliartritis reumatoide, enfermedad de Graves y psoriasis, en particular las formas pediátricas de estas patologías, cuando existen, y en particular para el tratamiento a modo preventivo y más particularmente al tratamiento preventivo de las formas pediátricas.

La acción inmunogénica del producto y/o de la composición de acuerdo con la invención puede ser la reducción o la supresión de la reacción inflamatoria (en particular de tipo Th1) y/o la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo Th2 a través de, por ejemplo, la secreción de ciertas interleuquinas.

La presente invención también se refiere a dicha composición farmacéutica como vacuna y que se puede utilizar para el tratamiento de una enfermedad autoinmune que genera una respuesta de tipo Th1 y/o Th17 Y en particular para el tratamiento de las patologías que se han mencionado anteriormente. Esta vacuna se puede dirigir en particular a los niños.

De acuerdo con la invención, la composición puede comprender un adyuvante, en particular un adyuvante elegido entre las sales de aluminio y más particularmente hidróxido de aluminio. El hidróxido de aluminio es un adyuvante de la respuesta inmunitaria utilizado en vacunología y compatible con el uso en seres humanos. Formando una red iónica, las proteínas antigénicas se adsorben ahí después de varios minutos de incubación. Este complejo crea un depósito transitorio que permite un reclutamiento celular y que favorece la respuesta antigénica De tipo Th2.

La expresión « sales de aluminio » se refiere a todas las sales que existen o no en el estado natural del aluminio. Se trata, por ejemplo, del sulfato de aluminio (hidratado o no), fosfato de aluminio, alumbre ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), hidróxido de aluminio o de cualquier otra sal de fórmula $(Al(SO_4)_2 \cdot 12H_2O)$.

5 De acuerdo con la invención, la concentración de adyuvante está comprendida de 0,5 mg/ml a 2 mg/ml, en particular de 0,3 mg/ml a 1 mg/ml y en particular de 220 μ m/ml a 280 μ m/ml y de preferencia casi igual a 250 μ m/ml.

Como se ilustra a continuación, con hidróxido de aluminio se obtienen buenos resultados a una concentración comprendida en el intervalo de concentración que se ha mencionado anteriormente en particular de 250 μ m/ml.

10 La presente solicitud también divulga un producto elegido entre una proteína, un fragmento de dicha proteína, una secuencia derivada y una secuencia homóloga de dicha proteína, caracterizado por que:

- 15 - dicha proteína comprende o está constituida por la proteína Glutación S-transferasa de 28 KDa de *Schistosoma japonicum* o por la proteína Glutación S-transferasa de 26 KDa de *Schistosoma japonicum* representadas respectivamente por las secuencias SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6,
- por que dicho fragmento es un fragmento de una de dichas proteínas con la condición de que induzca principalmente una respuesta inmunitaria de tipo Th2,
- 20 - por que dicha secuencia derivada se obtiene a partir de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6 o de dichos fragmentos citados anteriormente y se obtiene en particular por supresión, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos, con la condición de que esta secuencia derivada induzca principalmente una respuesta de tipo Th2.
- 25 - y por que dicha secuencia homóloga es una secuencia homóloga de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6 o de uno de dichos fragmentos, y presenta en particular una identidad de al menos un 80 % y en particular de al menos un 85 % con una de dichas secuencias SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6, con la condición de que dicha secuencia homóloga induzca principalmente una respuesta de tipo Th2; para su utilización en el tratamiento preventivo y/o curativo de una enfermedad inflamatoria crónica relacionada con una desregulación del sistema inmunitario que genera una respuesta de tipo Th1 y/o Th17, en articular en un niño.

30 La enfermedad inflamatoria crónica relacionada con una desregulación del sistema inmunitario que genera una respuesta inmunitaria de tipo Th1 y/o Th17 se puede elegir entre enfermedad de Crohn, rectocolitis hemorrágica, esclerosis en placas, poliartritis reumatoide, diabetes del tipo 1 (autoinmune), enfermedad de Graves y psoriasis.

35 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende como principio activo, al menos uno de los productos tal como se han mencionado anteriormente en referencia a Sj28GST y Sj26GST y un excipiente farmacológicamente aceptable.

Esta composición también puede comprender un adyuvante tal como se ha mencionado anteriormente y en particular hidróxido de aluminio. La cantidad de ayudante puede ser tal como se ha mencionado anteriormente.

40 La proteína nativa glutación S-transferasa de 28 kDa nativa es una proteína expresada por los parásitos esquistosomas, gusanos platelmintos, responsables de la esquistosomiasis. Existen varias especies de esquistosomas. *Schistosoma mansoni* es responsable, en el ser humano, de la esquistosomiasis intestinal, en África y Brasil. *Schistosoma haematobium* es responsable, en el ser humano, de la esquistosomiasis urinaria en África y la Península Arábiga. Cada especie de esquistosoma expresa una glutación S-transferasa de 28 kDa que es propia para cada una. Por lo tanto, la especie *Schistosoma mansoni* expresa la Sm28GST, la especie *Schistosoma haematobium* expresa la Sh28GST, *Schistosoma bovis* (esquistosomas que infectan el ganado) expresa la Sb28GST y la especie *Schistosoma japonicum* (que afecta al sudeste de Asia - Filipinas y sur de China -) expresa la Sj28GST y la Sj26GST. Los genes que codifican estas proteínas se conocen y/o el experto en la materia es capaz de identificarlos. Por lo tanto el experto en la materia puede producir directamente de forma recombinante las proteínas mencionadas anteriormente y los productos de la invención.

45 Las proteínas Sh28GST, Sm28GST, Sb28GST, Sj28GST y Sj26GST tienen secuencias que se identifican y se clasifican en las bases de datos, en particular, en el sitio <http://www.uniprot.org/uniprot/P30114>. Las proteínas Sb28GST y Sh28GST son idénticas en un 97 % mientras que las proteínas Sh28GST y Sm28GST son idénticas en un 91 %.

50 Las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 que se mencionan a continuación se presentan respectivamente las secuencias de las proteínas Sh28GST, Sm28GST, Sb28GST, Sj28GST y Sj26GST.

55 Se sabe que los parásitos inducen una respuesta inmunitaria por parte del hospedador infectado. Por lo tanto, se sabe que el esquistosoma tiene una acción sobre el sistema inmunitario del hospedador al que infecta con el fin de que este último no lo rechace. La reacción inmunitaria del hospedador comienza por una reacción de tipo Th1, de corta duración que a continuación va seguida por una reacción de tipo Th2 y por último por una reacción T reguladora. Cuando se produce la respuesta T reguladora, el hospedador infectado y el parásito coexisten.

Se sabe que las enfermedades inflamatorias crónicas relacionadas con una desregulación del sistema inmunitario generan, en los pacientes, una respuesta inmunitaria anómala hacia los autoantígenos, lo que induce una inflamación. En los casos de la enfermedad de Crohn y de la rectocolitis hemorrágica, se observa una inflamación de la mucosa intestinal caracterizada por ulceraciones y una infiltración de las células inflamatorias reclutadas por citoquinas y quimioattractores de tipo Th1, entre otros.

En el caso de la esclerosis en placas, se observa una inflamación local de la vaina de mielina de los axones del cerebro y de la médula espinal que genera una desmielinización de las fibras nerviosas.

Los inventores han mostrado que, de manera sorprendente, la proteína Sh28GST permite, al generar una respuesta inflamatoria de tipo Th2, reducir la respuesta de tipo Th1. Esta disminución de la respuesta de tipo Th1 permite reducir los síntomas relacionados con la enfermedad mencionada anteriormente, en particular la inflamación. La proteína que actúa, en particular sobre las interleuquinas que están presentes en todo el organismo, permite por lo tanto tratar, de forma preventiva o curativa, una enfermedad tal como se ha mencionado anteriormente que afecta a cualquier órgano o incluso a todo el organismo. Los mismos efectos se pueden tener en cuenta para todos los productos de infección.

Además, se sabe que existe una relación entre inflamación y cáncer, la primera favoreciendo la aparición del segundo. La proteína de acuerdo con la invención por lo tanto puede, al reducir de forma directa o indirecta la inflamación crónica, reducir o incluso eliminar los cánceres inducidos por la inflamación crónica relacionada con la enfermedad inflamatoria autoinmune. Por lo tanto, la rectocolitis hemorrágica y la enfermedad de Crohn son factores de sobrerriesgo del cáncer colorrectal.

Los resultados que siguen a continuación confirman el efecto de la proteína Sh28GST en el tratamiento (en particular preventivo) de la enfermedad de Crohn que es una enfermedad inflamatoria autoinmune que genera una respuesta de tipo Th1.

La proteína de de acuerdo con la invención, sea cual sea el esquistosoma del cual proviene y sea cual sea su peso molecular, puede ser natural aislada (nativa) o recombinante.

En toda la presente solicitud de patente, las expresiones de « glutatión S-transferasa recombinante de 28 KDa » (rSh28GST) se refieren a cualquier proteína obtenida de forma recombinante por inserción en un organismo hospedador de la secuencia total que codifica la Sh28GST (SEQ NO: 4) o de una fracción de esta secuencia. Esta síntesis se puede realizar en diferentes células hospedadoras, bacterias, levaduras o células superiores, en función del vector en el que se inserta la secuencia codificante y señales de control de expresión. La proteína recombinante de acuerdo con la presente invención puede presentar una estructura primaria idéntica a la de la proteína Sh28GST nativa, presente en *Schistosoma haematobium*, pero también puede ser un derivado de ésta o una proteína Sh28GST incompleta (fragmento de proteína) pero que tenga una actividad inmunogénica. Esta proteína por este fragmento de proteína también se puede fusionar a otra proteína (o fragmento de proteína), como consecuencia de una manipulación genética de los segmentos de ADN correspondientes, con el fin de favorecer una mejor expresión de la proteína en la célula hospedadora u opcionalmente provocar su secreción fuera de la célula.

En los ejemplos, el término rSh28GST se refiere a la proteína producida en *Saccharomyces cerevisiae* mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos codificante de SEQ NO: 4.

La proteína rSh28GST se conoce bien. Por lo tanto, el artículo «Crystal structure of the 28KDa glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*» mencionado anteriormente cita un método de producción de la Sh28GST recombinante de acuerdo con la invención en *Escherichia coli*. Además, el artículo « Vaccine potential of a recombinant glutathione S-transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with an homologous challenge » publicado en la revista *Vaccine* en 1999, cita una proteína Sh28GST recombinante producida en una cepa específica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Sin embargo, la proteína recombinante de la invención no se limita a estos dos ejemplos citados anteriormente, las tecnologías que permiten la clonación y la expresión de un gene extraño o de un fragmento de gen extraño, en diferentes células hospedadoras que son conocidas por el experto en la materia.

La producción de la proteína recombinante en estas bacterias que se conoce y se domina perfectamente. De hecho, la proteína rSh28GST recombinante es el objeto de ensayos clínicos para la vacunación contra la esquistosomiasis (proyecto Bilhvax). Por lo tanto esta proteína recombinante se produce a escala industrial; su producción y su purificación, en particular con fines terapéuticos, se dominan por lo tanto perfectamente.

De hecho, como se describe con más detalles posteriormente, el producto de acuerdo con la invención permite obtener un efecto preventivo sobre la patología mencionada anteriormente. La administración de la proteína o del fragmento de proteína antes del episodio inflamatorio de la patología permite obtener una disminución de la inflamación y una transformación de la respuesta inmunitaria del organismo del paciente de una respuesta de tipo

Th1, característica de la patología, hacia una respuesta de tipo Th2, durante un desarrollo de la enfermedad. El cambio de tipo de respuesta inmunitaria observado después del tratamiento con la proteína y/o el fragmento de proteína de acuerdo con la invención es lo que permite tratar a modo preventivo las enfermedades inflamatorias crónicas de diversos órganos e incluso de las enfermedades que alcanzan a un sistema entero, como por ejemplo, el sistema nervioso. Por « tratamiento preventivo », se hace referencia a cualquier tratamiento que, administrado antes del desarrollo inflamatorio, permite suprimir un desarrollo inflamatorio o disminuir la intensidad y/o la duración de un desarrollo inflamatorio y/o que es capaz de extender el periodo de duración entre dos desarrollos inflamatorios. El efecto del tratamiento se puede evaluar con respecto al estado inflamatorio del órgano o del sistema a que se refiere.

Por tratamiento curativo, se hace referencia a cualquier tratamiento que se administra durante un desarrollo inflamatorio, permite atenuar o suprimir el desarrollo, en particular de uno de los síntomas (en particular la inflamación local, por ejemplo de la pared intestinal) relacionados con el desarrollo.

Como se explica a continuación, el producto de acuerdo con la invención actúa a través de la disminución de la secreción de interleuquinas específicas de la respuesta inflamatoria de tipo Th1 y/o el aumento de la producción de interleuquinas que corresponde a una respuesta inmune de tipo Th2. Estas interleuquinas circulan en todo el organismo y su disminución o su aumento afecta de forma potencial a todos los órganos.

A continuación se observará que el producto de acuerdo con la invención permite la producción de interleuquinas que tienen un papel regulador (IL-10) en las enfermedades crónicas inflamatorias relacionadas con una desregulación del sistema inmunitario que generan una respuesta de tipo Th1 y/o Th17. Se sabe que la infección con gusanos parasitarios de tipo *Ascaris* de los pacientes afectados con esclerosis en placas reduce la evolución de la enfermedad (véase « Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis » *Annals of Neurology* 2007). Por el contrario, nada indicaba que una proteína específica de *Schistosoma* pudiera tener un efecto curativo y/o preventivo sobre una patología que afectara a todo el sistema nervioso de un organismo. Por lo tanto, el mérito de los inventores es haber sometido a ensayo producto de acuerdo con la invención sobre una enfermedad inflamatoria crónica relacionada con una desregulación del sistema inmunitario que pertenece a las enfermedades neurológicas y que afecta a todo el sistema nervioso, cómo, en particular, la esclerosis en placas.

El paciente al que se dirige el tratamiento no está limitado de acuerdo con la invención. Se puede tratar, de un animal, de un mamífero, más particularmente de un ser humano. También se puede tratar de un niño. De hecho el proyecto Bihvax ha mostrado la perfecta inocuidad de la proteína recombinante rSh28GST de acuerdo con la invención en los niños con edades de 5 a 12 años. Por lo tanto, los productos de acuerdo con la invención se pueden utilizar para el tratamiento de los casos pediátricos de las enfermedades inflamatorias crónicas relacionadas con una desregulación del sistema inmunitario, y en particular de los casos pediátricos de estas enfermedades. Por lo tanto, en caso de fuerte sospecha de un factor genético que provoca que dicha enfermedad o que haga que el paciente sea más susceptible de desarrollar la enfermedad (caso de un niño en el que los dos padres han desarrollado la enfermedad de Crohn, por ejemplo), el producto de acuerdo con la invención se podrá administrar a modo preventivo.

De forma ventajosa, la composición se administra una dosis de proteína que varía de 50 µg/Kg a 1000 µg/Kg. La dosis puede ser igual a 50 µg/Kg, 500 µg/Kg o 1000 µg/Kg.

La concentración de proteína purificada administrada por niño es, por ejemplo, iguala 253 ug (lo que corresponde a una dosis final de 100 ug de la vacuna Bihvax que comprende la rSh28GST28 más hidróxido de aluminio a una concentración de 1 mg/ml): La dosis de proteína puede ser, por ejemplo superior o igual a 100 ug e inferior o igual a 500 ug de proteína.

El modo de administración de la composición de la invención no está limitado de acuerdo con la invención. La composición se puede inyectar por vía subcutánea o se puede administrar por vía mucosa, por ejemplo. La composición de acuerdo con la invención se puede administrar, por ejemplo, en forma de una pulverización nasal o bucal, de un supositorio, de un comprimido, de un liofilizado, de una cápsula, de un jarabe, de una solución inyectable por vía intravenosa, de subcutánea o intramuscular, de una pomada o gel para aplicación tópica.

Descripción de las figuras

La presente invención, sus características y las diferentes ventajas que proporciona aparecerán mejor con la lectura de la descripción que sigue a continuación y que hace referencia a ejemplos que se mencionan a modo no limitante y a las siguientes figuras adjuntas, en las que:

- La figura 1 representa las puntuaciones macroscópicas e histológicas obtenidas para diferentes grupos de ratas, siendo el grupo 1 el grupo tratado con la proteína de la invención antes de la inducción de colitis, siendo el grupo 2 el grupo infectado con *Schistosoma mansoni* antes de la inducción de colitis por TNBS y siendo el grupo 3 el grupo de control. El grupo 1 se presenta con el número 1 en el eje de abscisas, el grupo 2 se representa con el número 2 en el eje de abscisas y el grupo 3 se representa con el número 3 en el eje de abscisas. La puntuación

macroscópica se representa en la columna que comprende las rayas diagonales y la puntuación histológica se representa en la columna de color blanco. Las puntuaciones macroscópicas e histológicas se cuantifican con el eje de ordenadas;

- 5 - La figura 2 representa la proporción de la tasa de mieloperoxidasa (MPO) con respecto a la tasa de proteínas totales en los grupos de ratas citados en referencia a la figura 1, siendo el grupo 1 representado con el número 1 en el eje de abscisas, siendo el grupo 2 representado con el número 2 en el eje de abscisas y siendo el grupo 3 representado con el número 3 en el eje de abscisas. El eje de ordenadas representa la proporción de la tasa de MPO con respecto a la tasa de proteínas totales expresada en ng/mg;
- 10 - La figura 3 representa la cantidad de ARN mensajero que codifica las interleuquinas IL-1b, IL-13, IL-5 e IL-10 en los mismos grupos de ratas que los utilizados con referencia a la figura 1, siendo el grupo 1 representado con el número 1 en el eje de abscisas, siendo el grupo 2 representado con el número 2 en el eje de abscisas y siendo el grupo 3 representado con el número 3 en el eje de abscisas. La cantidad de ARN mensajero que codifica la interleuquina IL-1b se representa con las columnas que comprenden rayas diagonales finas, la cantidad de ARN mensajero que codifica la interleuquina IL-13 se representa con las columnas que comprenden rayas diagonales gruesas, la cantidad de ARN mensajero que codifica la interleuquina IL-5 se representa con las columnas de color blanco y la cantidad de ARN mensajero que codifica la interleuquina IL-10 se representa con las columnas que comprenden rayas verticales. El eje de ordenadas representa las cantidades de ARN mensajero en U.A.;
- 15 - La figura 4 representa la proporción de la tasa de ARN mensajero que codifica la arginasa de tipo I (Arg) con respecto a la tasa de ARN mensajero que codifica la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en los mismos grupos de ratas que los utilizados con referencia a la figura 1, siendo el grupo 1 representado con el número 1 en el eje de abscisas, siendo el grupo 2 representado con el número 2 en el eje de abscisas y siendo el grupo 3 representado con el número 3 en el eje de abscisas. El eje de ordenadas representa la proporción de la tasa de ARN mensajero que codifica la arginasa de tipo I (Arg) con respecto a la tasa de ARN mensajero que codifica la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS);
- 20 - La figura 5 representa las puntuaciones macroscópicas e histológicas obtenidas para diferentes grupos de ratones, siendo el grupo 1 el grupo de control, siendo el grupo 2 el grupo tratado con ácido 5-aminosalicílico antes de la inducción de colitis, siendo el grupo 3 el grupo tratado con la proteína de acuerdo con la invención antes de la inducción de colitis y siendo el grupo 4 el grupo que recibe una inyección de etanol antes de la inducción de colitis. El grupo 1 se representa con el número 1 en el eje de abscisas, el grupo 2 se representa con el número 2 en el eje de abscisas, el grupo 3 se representa con el número 3 en el eje de abscisas y el grupo 4 se representa con el número 4 en el eje de abscisas. La puntuación macroscópica se representa con las columnas que comprenden rayas diagonales y la puntuación histológica se representa con las columnas de color blanco. Las puntuaciones macroscópicas e histológicas se cuantifican con el eje de ordenadas;
- 25 - La figura 6 representa la proporción de la tasa de mieloperoxidasa con respecto a la tasa de proteínas totales en los grupos de ratones citados en referencia a la figura 5, siendo el grupo 1 representado con el número 1 en el eje de abscisas, siendo el grupo 2 representado con el número 2 en el eje de abscisas, siendo el grupo 3 representado con el número 3 en el eje de abscisas y siendo el grupo 4 representado con el número 4 en el eje de abscisas. El eje de ordenadas representa la proporción de la tasa de MPO con respecto a la tasa de proteínas totales expresada en ng/mg;
- 30 - La figura 7 representa la cantidad de ARN mensajero que codifica la interleuquina IL-1b en los mismos grupos de ratones que los utilizados en referencia a la figura 5, el grupo 1 se representa con el número 1 en el eje de abscisas, el grupo 2 se representa con el número 2 en el eje de abscisas, el grupo 3 se representa con el número 3 en el eje de abscisas y el grupo 4 se representa con el número 4 en el eje de abscisas. El eje de ordenadas representa la cantidad de ARN mensajero en U.A.;
- 35 - La figura 8 representa la cantidad de ARN mensajero que codifica las interleuquinas IL-5 e IL-13 en los mismos grupos de ratones que los utilizados en referencia a la figura 5. El grupo 1 se representa con el número 1 en el eje de abscisas, el grupo 2 se representa con el número 2 en el eje de abscisas, el grupo 3 se representa con el número 3 en el eje de abscisas y el grupo 4 se representa con el número 4 en el eje de abscisas. La cantidad de ARN mensajero que codifica la interleuquina IL-5 se representa con las columnas de color blanco y la cantidad de ARN mensajero que codifica la interleuquina IL-13 se representa con las columnas que comprenden rayas diagonales. El eje de ordenadas representa la cantidad de ARN mensajero en U.A.;
- 40 - La figura 9 representa la cantidad de ARN mensajero que codifica la interleuquina IL-10 en los mismos grupos de ratones que los utilizados en referencia a la figura 5. El grupo 1 se representa con el número 1 en el eje de abscisas, el grupo 2 se representa con el número 2 en el eje de abscisas, el grupo 3 se representa con el número 3 en el eje de abscisas y el grupo 4 se representa con el número 4 en el eje de abscisas. El eje de ordenadas representa la cantidad de ARN mensajero en U.A.;
- 45 - La figura 10 representa la proporción de la tasa de ARN mensajero que codifica la arginasa de tipo I con respecto a la tasa de ARN mensajero que codifica la óxido nítrico sintetasa inducible en los mismos grupos de ratones que los utilizados en referencia a la figura 5. El grupo 1 se representa con el número 1 en el eje de abscisas, el grupo 2 se representa con el número 2 en el eje de abscisas, el grupo 3 se representa con el número 3 en el eje de abscisas y el grupo 4 se representa con el número 4 en el eje de abscisas. El eje de ordenadas representa la proporción de la tasa de ARN mensajero que codifica la arginasa de tipo I con respecto a la tasa de ARN mensajero que codifica la óxido nítrico sintetasa inducible;
- 50 - La figura 11 representa el análisis de los pesos de los diferentes grupos de ratas en J35 en el estudio de encefalitis alérgica experimental (modelo de esclerosis en placas). El grupo A corresponde al grupo de ratas que han recibido dos inyecciones de 5 µg/Kg de rSh28GST en combinación con hidróxido de aluminio (alumbre)

antes de la inducción de EAE, se representa en abscisas con la letra A, el grupo B corresponde al grupo de ratas que han recibido dos inyecciones de 0,5 µg/Kg de rSh28GST en combinación con hidróxido de aluminio (alumbre) antes de la inducción de EAE, se representa en abscisas con la letra B, el grupo C corresponde al grupo de ratas que han recibido dos inyecciones de hidróxido de aluminio solo antes de la inducción de EAE, se representa en abscisas con la letra C, el grupo D corresponde al grupo de ratas que no han recibido ninguna inyección antes de la inducción de EAE, se representa en el eje de abscisas con la letra D. El eje de ordenadas representa el peso de las ratas de los diferentes grupos.

- La figura 12 representa el análisis de los pesos (en g) de los diferentes grupos de ratas citados en referencia a la Figura 11, en J42, las letras de referencia de los grupos se indican en el eje de abscisas mientras que el peso de las ratas se indica en el eje de ordenadas;
- La figura 13 representa el análisis de los pesos (en g) de los diferentes grupos de ratas citados en referencia a la Figura 11, en J48 las letras de referencia de los grupos se indican en el eje de abscisas mientras que el peso de las ratas se indica en el eje de ordenadas; y
- La figura 14 representada las puntuaciones acumuladas para los diferentes grupos de ratas citados en referencia a la Fig. 11, las letras de referencia de los grupos se indican en el eje de abscisas mientras que las puntuaciones acumuladas se indican en el eje de ordenadas; en referencia a la figura 14, las ratas de los grupos A y C recibieron tres inyecciones, respectivamente en J0, J14 y J28, de 5 µg/Kg de rSh28GST en combinación con hidróxido de aluminio (alumbre) para el grupo A y de alumbre solo para el grupo C, antes de la inducción de EAE en J35;

Para las figuras 11 a 13, los resultados se presentan en forma de representaciones de caja y bigotes. Los ensayos estadísticos de Kruskal-Wallis y de Mann Whitney se realizaron con el fin de determinar las diferencias significativas entre las ratas de los diferentes grupos. * P < 0,05.

Descripción detallada de la invención

PARTE EXPERIMENTAL

Modelo de la enfermedad de Crohn

Protocolo experimental de colitis inducida en rata con TNBS (modelo de enfermedad de Crohn)

Los animales utilizados son ratas Sprague Dawley macho (180 a 250 g). Los animales se pesan y a continuación se suprime la alimentación el día anterior con el fin de que estén en ayunas el día de la inducción de la colitis. Las ratas se duermen con pentobarbital (40 mg/kg) con inyección intraperitoneal. Por vía intra-rectal se inyectan 250 µl de una solución de TNBS (Ácido 2,4,6 TrinitroBenceno Sulfónico) diluido en etanol al 100 % (volumen a volumen) a razón de 80 mg por kg de rata. La colitis se evalúa 96 h después de la inyección de TNBS: los animales se pesan y se sacrifican con una inyección de 300 µl de T61 por vía intracardiaca. El colon se extrae para evaluar la puntuación macroscópica. Una sección transversal de colon de 4 cm del recto también se extrae y a continuación se fija sobre un trozo de corcho con el fin de sumergirlo en un baño de paraformaldehído al 4 % durante 24 horas y a continuación en un baño de etanol al 70 % antes de deshidratación e inclusión en parafina para evaluar la puntuación histológica.

Protocolo experimental de colitis inducida en ratón con TNBS (modelo de enfermedad de Crohn)

Los animales son ratones macho de mezcla genética C57BU6. Se anestesian con una mezcla de xilasina-ketamina a la dosis de 50 mg/kg cada uno por vía subcutánea. La colitis se induce por vía intra-rectal con 40 µl de solución de TNBS diluido en etanol al 100 % (volumen a volumen) a razón de 150 mg por kg de ratón. Para las inyecciones intra-rectales de etanol, se trata de etanol al 50 %. (Control de disolvente).

Protocolo experimental de infección con Schistosoma mansoni

Las ratas se anestesian con una mezcla de Valium (8 mg/kg) y de ketamina (75 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal y a continuación se rasuran al nivel del abdomen. Una solución que contiene 2000 cercarias (larvas infectantes) de *Schistosoma mansoni* se deposita durante 30 minutos en el abdomen de los animales, las cercarias penetran por vía transcutánea. Esta infección representa el « criterio de referencia » del experimento.

Protocolo de estudio de rSh28GST en esclerosis en placas (Enfermedad autoinmune de tipo Th1)

Este modelo de estudio de esclerosis en placas comprende la inyección de un péptido encefalitógeno de proteínas de la mielina (MBP,) para la inducción de una enfermedad autoinmune, denominada EAE (encefalitis alérgica experimental).

Con el fin de demostrar el carácter preventivo de la rSh28GST, en ratas Lewis de 4 semanas se inyecta una dosis de 5 µg/Kg de rSh28GST en mezcla con hidróxido de aluminio (véase el párrafo « preparación de la composición sometida a ensayo »). Cuatro semanas más tarde, se induce la EAE (J = 35). Se efectúa una puntuación clínica en

J = 44 (primer desarrollo). El pico de la EAE se sitúa en J = 48. En J = 55 se observa la recuperación más o menos completa del animal. A lo largo de todo el protocolo se mide la pérdida de peso del animal, se realiza una puntuación clínica, se cuantifican los infiltrados inflamatorios y se mide la desmielinización en puntos críticos (IHC).

5 Protocolo para mostrar el efecto curativo de la rSh28GST en el caso de esclerosis en placas

Se utiliza un modelo de rata con EAE. Las ratas Lewis se inmuniza con una composición de rSh28GST y de hidróxido de aluminio al mismo tiempo que la inducción de la EAE, opcionalmente en puntos críticos de la enfermedad. La dosis inyectada es igual a 5 µg/Kg, 50 µg/Kg, 500 µg/Kg y 1000 µg/Kg (estas cifras hacen referencia a la dosis de rSh28GST, la concentración de hidróxido de aluminio siendo siempre como se indica en el párrafo « preparación de la composición sometida a ensayo »). A continuación se analizan las diferentes poblaciones celulares de interés.

15 Protocolo de estudio de poliartritis reumatoide (PR)

Se realizan 2 inyecciones de colágeno (auto antígeno) por vía intradérmica en la base de la cola de los ratones y se mide la artritis de la pata después de 21 días de acuerdo con una puntuación clásica. A continuación se realiza el seguimiento de los parámetros inmunológicos (Anticuerpos, citoquinas, células reguladoras).

20 Para la determinación del efecto preventivo, antes de las dos inyecciones de colágeno se inyecta una dosis de 1000 µg/Kg de rSh28GST mezclada con hidróxido de aluminio (véase el párrafo « preparación de la composición sometida a ensayo »). Para demostrar el efecto curativo, se realizó una inyección de la composición sometida a ensayo (1000 µg/Kg para la proteína rSh28GST) al mismo tiempo que las dos inyecciones de colágeno mencionadas anteriormente.

25 Dosificación de la mieloperoxidasa (MPO)

30 La tasa de mieloperoxidasa contenida en los tejidos de colon se evalúa con el método inmunológico de tipo ELISA Sándwich (« Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ») y se informa con respecto a la tasa de proteínas contenidas en este mismo tejido de colon.

35 El tejido de colon (que contiene MPO en caso de inflamación) se tritura en primer lugar con el fin de obtener un homogeneizado. Éste se deposita en un pocillo de la placa ya revestida con un anticuerpo anti-MPO. La reacción de antígeno (en el presente documento MPO)-anticuerpo anti-MPO se realiza a continuación. Un segundo anticuerpo dirigido contra la molécula de MPO y marcado con biotina se añade a continuación y se revela gracias a la adición de estreptavidina (muy afín hacia con respecto a la biotina) acoplada con un cromógeno. En presencia de su sustrato, este último libera una sustancia coloreada cuya densidad óptica se evalúa con un espectrofotómetro. La densidad óptica medida es proporcional a la cantidad de proteína MPO contenida en el homogeneizado del tejido de colon.

40 Preparación de la composición sometida a ensayo (proteína rSh28GST + hidróxido de aluminio)

45 La proteína rSh28GST utilizada es la proteína recombinante producida en *Saccharomyces cerevisiae* y fabricada por la compañía Eurogentec. Se utiliza la secuencia total del gen representada por la secuencia SEQ ID NO: 4. La proteína se presenta en forma liofilizada, un vial contiene 165 µg (+ o - 5 %) de proteínas. La composición farmacéutica se reconstituye con 660 µl de gel de hidróxido de aluminio (2 %) diluido a una 10 parte del suero fisiológico en un vial de proteína de ahí una concentración de 250 µg/ml. La composición obtenida de ese modo se inyecta por vía subcutánea a los animales en la misma concentración. Esta mezcla de rSh28GST + hidróxido de aluminio es la que se inyecta a los animales en todos los protocolos experimentales. Las dosis indicadas corresponden a la dosis de proteína de rSh28GST.

50 Proporción de « Arginasa I / Óxido Nítrico Sintetasa 2 »

55 La proporción representa la tasa de ARN mensajero que codifica la arginasa I (Arg) con respecto a la tasa de ARN mensajero que codifica la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) de tipo 2 para una muestra de ensayo de colon dada. La tasa de ARN mensajero se obtiene con un método de reacción en cadena por polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Il se trata de una técnica de biología molecular de amplificación *in vitro* de ADN. A cada ciclo de amplificación, la cantidad de ADN total se mide gracias a una sonda fluorescente; la cinética del conjunto de los ciclos de amplificación permite obtener una cuantificación del ARN mensajero inicial.

60 Expresión del ARN mensajero de las interleuquinas IL-1b, IL-13, IL-5 e IL-10

65 La presencia y la cuantificación del ARN mensajero de diferentes interleuquinas en los tejidos de colon se obtienen utilizando el método de PCR en tiempo real explicado en el punto anterior.

Resultados experimentales en rata

Se forman tres grupos de ratas Sprague Dawley. El grupo 1 recibe 2 inyecciones por vía subcutánea de una composición tal como se ha mencionado anteriormente (rSh28GST + hidróxido de aluminio) a una dosis de 50 µg/kg (para la proteína rSh28GST) la primera a J = 0 y la segunda a J = 28. El grupo 2 (« criterio de referencia ») se infecta con 2000 cercarias de *Schistosoma mansoni* en J = 0. El grupo 3 es el grupo de control. En J = 35, la colitis se induce en las ratas de los tres grupos con una inyección intra-rectal de TNBS, a continuación el sacrificio se produce en J = 39.

Resultados macroscópico e histológico

Como se representa en la figura 1, se observa que la inflamación de la pared intestinal de las ratas de los grupos 1 y 2 disminuye con respecto a la de las ratas del grupo 3. Además, la puntuación histológica confirma la puntuación macroscópica.

Dosificación de la mieloperoxidasa (MPO)

La mieloperoxidasa es una enzima presente en los granulocitos neutrófilos y también un marcador de inflamación. Como se representa en la figura 2, se observa que la cantidad de MPO en los tejidos de colon de las ratas del grupo 1 y del grupo 2 se reduce con respecto a la cantidad presente en los tejidos de colon de las ratas del grupo 3. Estos resultados muestran que la inyección de la proteína rSh28GST permite reducir de manera significativa la secreción de MPO durante una colitis inflamatoria.

Interleuquinas IL-1b, IL-13, IL-5 e IL-10

La IL-1b es una interleuquina secretada durante la respuesta inmunitaria inflamatoria de tipo Th1. Como se representa en la figura 3, se observa que la cantidad de ARN mensajero que codifica esta interleuquina se reduce en los tejidos de colon de las ratas de los grupos 1 y 2 (incluso más en el grupo 1 que en el grupo 2). Estos resultados muestran que la inyección de la proteína rSh28GST reduce la respuesta inmunitaria de tipo Th1 de manera más pronunciada que la infección por *Schistosoma mansoni* en J0.

Las interleuquinas IL-5 e IL-13 se secretan durante una respuesta inmunitaria de tipo Th2. Como se representa en la figura 3, la cantidad de ARN mensajero que codifica estas dos interleuquinas aumentan los tejidos de colon de las ratas del grupo 1 con respecto a los tejidos de las ratas del grupo 3. La cantidad de ARN mensajero que codifica IL-5 e IL-13 es más importante en el grupo 1 que en el grupo 2. Estos resultados muestran que la proteína rSh28GST induce una fuerte expresión del ARN mensajero de IL-5 y de IL-13. Por lo tanto la proteína rSh28GST permite inducir una respuesta inmunitaria de tipo Th2 que contraequilibra la respuesta inmunitaria de tipo Th1 encontrada en el caso de la colitis inducida por TNBS.

Se ha demostrado que los pacientes aquejados de enfermedad de Crohn reaccionan favorablemente a un tratamiento a base de interleuquina 10 (véase Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neiryncjk S, Peppenlenbosch MP, Steidler L (junio de 2006) « A phase I trial with transgenic bacteria expressing Interleukin-10 in Crohn's disease » Clin. Gastroenterol. Hepatol. 4 (6): 754-9. doi:10.1016/j.cgh.2006.03.028. PMID 16716759). Como se representa en la figura 3, la presencia de ARN mensajero que codifica IL-10 en los tejidos de colon de las ratas del grupo 1 es más importante que las de las ratas del grupo 2. Estos resultados muestran que la proteína rSh28GST induce la producción de ARN mensajero que codifica IL-10, lo que es un factor favorable en el caso del tratamiento curativo de la enfermedad de Crohn. Además, la IL-10 se secreta durante una respuesta inmunitaria de tipo Th2 lo que está en concordancia con los resultados que se ilustran en la Figura 3.

Proporción de « Arginasa I / Óxido Nítrico Sintetasa 2 »

La arginasa de tipo I es una enzima, utilizada en el presente documento como marcador, que caracteriza los macrófagos M2 denominados alternativos, presentes en reacciones inmunitarias antiinflamatorias Th1; la óxido nítrico sintetasa de tipo 2 también es una enzima, pero que se utiliza como marcador que caracteriza los macrófagos denominados clásicos presentes en reacciones inmunitarias pro-inflamatorias Th2. La proporción entre estas dos enzimas refleja la presencia en el seno de los tejidos de colon de cualquier tipo de macrófagos, y permite observar el equilibrio entre las dos respuestas inmunitarias Th1 y Th2.

Como se representa en la figura 4, la proteína rSh28GST permite favorecer la respuesta de tipo Th2 que de ese modo viene a contraequilibrar la respuesta de tipo Th1 inducida por la colitis.

Resultados experimentales en ratón

Los 2 modelos de Roedores utilizados (ratas y ratones) son modelos experimentales clásicos y largamente descritos en la bibliografía como modelos de enfermedad de Crohn. La cepa de ratón utilizada en el presente documento (C57 BL6) es preferentemente pro-Th1 y por lo tanto la obtención de resultados que disminuyan una respuesta de tipo

Th1 en este modelo es incluso más convincente que en la rata.

Se formaron cuatro grupos de ratones. El grupo 1 no recibe ningún tratamiento, solo una colitis por TNBS en J = 35: es el grupo de control. Los ratones del grupo 2 se alimentan a partir de J = 30 con alimento seco que contiene 5-ASA: ácido 5-aminosalicílico a razón de 1 g de 5-ASA por 600 g de alimento seco, y a continuación se induce una colitis por TNBS en J = 35. Los ratones del grupo 3 reciben dos inyecciones de composición tal como se ha mencionado anteriormente (rSh28GST+ hidróxido de aluminio) a la dosis de 1000 µg/kg (para la rSh28GST) en J0 y J28, a continuación una inyección intra-rectal de TNBS. Los ratones del grupo 4 no reciben más que la inyección intra-rectal de etanol al 50 % en J35.(Control de Disolvente del TNBS). Los ratones de los cuatro grupos se sacrifican en J = 37.

Resultado macroscópico e histológico

Como se representa en la figura 5, la puntuación macroscópica que refleja la inflamación está fuertemente disminuido en los ratones del grupo 3. Los resultados obtenidos son mejores que los obtenidos con el 5-ASA. El resultado histológico confirma la puntuación macroscópica.

Dosificación de la mieloperoxidasa (MPO)

La figura 6 muestra que la rSh28GST disminuye, en el caso de una colitis, la tasa de MPO a nivel de los tejidos de colon de los ratones del grupo 3. En el caso en el que los ratones no han recibido colitis (grupo 4), la actividad de la MPO permanece invariable.

Interleuquinas IL-1b, IL-13, IL-5 e IL-10

Las figuras 7 a 9 confirman, en el ratón, los resultados obtenidos en la rata. La proteína rSh28GST reduce la tasa de ARN mensajero que codifica IL-1b y aumenta la de IL-13 y de IL-5 en casos de colitis. Por lo tanto parece que la proteína mencionada anteriormente tiene un efecto preventivo debido al aumento de la producción de IL-10.

Proporción de « Arginasa de tipo I/Óxido Nítrico Sintetasa 2 »

La figura 10 muestra, como el caso de la rata, un aumento de la proporción de la tasa de ARN mensajero que codifica la arginasa de tipo I con respecto al que codifica la óxido nítrico sintetasa 2 en el caso del grupo 3 con respecto a los grupos 1, 2 y 4. Este aumento de la proporción de « Arginasa de tipo I/Óxido Nítrico Sintetasa 2 » es significativo de un aumento de la presencia de macrófagos asociados a una respuesta Th2. Por lo tanto la composición de la invención permite favorecer una respuesta de tipo Th2 en el caso de la colitis inducida, lo que no es el caso del ácido 5-aminosalicílico (véase el grupo 2).

Además, otro grupo de ratones se sometió a las dos inyecciones de rSh28GST tal como se mencionó anteriormente una inyección sencilla intra-rectal de etanol en lugar de TNBS. Por lo tanto se somete a ensayo la influencia de la proteína sin inflamación. En este grupo, cuyos resultados no se ilustran en las figuras, la actividad de la MPO permanece invariable. La proteína de la invención reduce por lo tanto la inflamación pero no modifica las tasas de MPO cuando no hay inflamación inducida. Los resultados de este grupo también muestran que, sin inflamación inducida, la proteína sola permite aumentar el ARN mensajero que codifica IL-13, IL-5 e IL-10 y que sin inflamación inducida, la proteína se encuentra sin actividad en los macrófagos.

Modelo de esclerosis en placas

El modelo utilizado es el modelo de encefalitis alérgica experimental (EAE). En el caso presente, la EAE se induce con una inyección de proteína básica de la mielina (MBP).

Se estudió el efecto de la inmunización con la rSh28GST en el desarrollo de la EAE inducida por la MBP en un modelo de ratas Lewis.

Materiales y métodos:

1- Reactivos:

a) Preparación de rSh28GST (alumbre): (Lote: GLP. Diseñado por: L-Bix-P08/165a). El término « alumbre » se refiere a una suspensión acuosa de hidróxido de aluminio como se describe con más detalles a continuación.

Dosis de 5 µg/kg (+ alumbre):

Se disuelve 1 vial que contiene 165 µg de rSh28GST en 660 µl de agua fisiológica para obtener una solución de 250 µg/ml. A continuación se prepara una solución de 10 µg/ml: dilución a 1:25 partes en agua fisiológica. Se añade alumbre: 10 µl (« alumbre » se refiere a alhydrogel al 2 % VacGrade_50 ml cat: vac-alu-50 lote: AHG-33-427).

Dosis de 0,5 µg/kg (+ alumbre):

5 A partir de la solución de rSh28GST a 250 µg/ml, se prepara una solución a 1 µg/ml: dilución a 1:250 partes en agua fisiológica. Se añade alumbre: 10 µl (alumbre se refiere a alhydrogel al 2 % VacciGrade_50 ml cat: vac-alu-50 lote: AHG-33-427).

b) Dosis de alumbre:

10 La dosis de alumbre se obtiene diluyendo 10 µl de alumbre en 2,5 ml de agua fisiológica (alumbre se refiere a alhydrogel al 2 % VacciGrade_50 ml cat: vac-alu-50 lote: AHG-33-427).

c) Preparación de la emulsión destinada a inducir la EAE

15 Se prepara una solución de 100 µg/ml, es decir 3 ml de CFA en 2 mg/ml + 1 ml de IFA + 4 ml de una solución de MBP a 200 µg/ml en PBS. Se inyectan dos dosis de 8 ml equivalente a 50 µl/5 µg de MBP a nivel de las patas de la rata. En total, se inyectan 100 µl/10 µg de MBP por rata.

20 La solución de MBP en el PBS mencionado anteriormente se obtiene por dilución de MBP (lote 2011): 1064 µl a 940 µg/ml en 3,94 ml de perborato de sodio (PBS).

25 CFA se refiere al adyuvante completo de Freund, es decir, que comprende micobacterias (*M. tuberculosis*). IFA se refiere la forma incompleta de la adyuvante de Freund. 1 ml de adyuvante de Freund en su forma incompleta está constituido por 0,85 ml de aceite de parafina y 0,15 ml de monooleato de manida. En su forma completa, comprende además una cantidad dada de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177) termo-inactivada (muerta por vía térmica) y secada.

30 CFA a 2 mg/ml de *M. tuberculosis*: IFA Sigma (ref. F5506 lote: 070M8706) y *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA Difco (ref. 3114-25 lote: 131582 L-00535-02) con el fin de obtener la concentración de 2 mg/ml mencionada anteriormente.

Anestésicos proporcionados por la zootecnia: ketamina y xilazina

d. Animales:

35 Ratas macho Lewis con edades de 6 semanas (CERJ con cría en enero) al comienzo de los experimentos e inmunizadas con MBP a las 12 semanas (n = 10 ratas/grupo). Las inyecciones se realizan por vía subcutánea en el cuello de la rata. Se utilizan 40 ratas.

40 **Protocolo experimental**

La experimentación comienza en la séptima semana de vida de las ratas.

45 En J = 0 las 10 ratas del grupo A reciben una inyección de la solución mencionada anteriormente que contiene 5 µg/kg de rSh28GST y de alumbre. En J = 0 las 10 ratas del grupo B reciben una inyección de la solución mencionada anteriormente que contiene 0,5 µg/kg de rSh28GST y de alumbre. En J = 0 las 10 ratas del grupo C reciben una inyección de la solución de alumbre mencionada anteriormente sola; reciben una segunda inyección de alumbre sola en J = 28. En J = 0 las 10 ratas del grupo D que es el grupo de control no reciben ninguna inyección. En J = 28, las ratas de los grupos A y B reciben una 2ª inyección de rSh28GST (alumbre) a la misma dosificación que la primera inyección.

50 En J = 35, la EAE se induce mediante una inyección que contiene proteína de la base de la mielina (véase el párrafo c)). El estudio clínico comienza en J44 y se terminan en J56 con el sacrificio de los animales.

55 *Respuesta humoral de las ratas inmunizadas con la P28 GST*

60 La dosificación de los anticuerpos IgG anti-rSh28GST se realizó con las extracciones sanguíneas realizadas en J35 (día de la inducción de la EAE) y J56 (día del sacrificio) con la técnica de ELISA. Los resultados desvelan que solamente 6 ratas (con respecto a 10) del grupo A y 4 ratas (con respecto a 10) del grupo B presentaban una respuesta inmunitaria detectable a lo largo de todo el protocolo clínico. Solamente estas ratas presentan una respuesta inmune en forma de producción detectable de anticuerpos IgG anti-rSh28GST para la rSh28GST en J35 y en J56 se incluyeron en el estudio que sigue a continuación con respecto a los presos de las ratas.

Estudio de las variaciones del peso de las ratas en los cuatro grupos

65 El peso de los animales se evaluó el día de la inducción de la EAE (es decir, 35 días después de la primera inyección de rSh28GST y todos los días a partir de los primeros síntomas (J42). Los resultados obtenidos indican que en el

momento de la acmé de la enfermedad se observaba una pérdida de peso de aproximadamente un 10 % para todos los grupos. Sin embargo, se realizaron ensayos estadísticos no paramétricos con respecto a estos datos y se pusieron en evidencia diferencias significativas entre los grupos.

- 5 Por lo tanto, en J35, las ratas de los grupos A y B (sea cual sea la dosis de P28GST) presentan un peso significativamente más importante con respecto a las ratas de los grupos C y D.

Estos resultados son visibles en la fig. 11 que representa el análisis de los pesos de los diferentes grupos de ratas en J35. Los resultados se presentan en forma de representaciones de caja y bigotes. Los ensayos estadísticos de Kruskal-Wallis y Mann Whitney se realizaron con el fin de determinar las diferencias significativas entre las ratas de los diferentes grupos. * P < 0,05.

Además, parece que en J42 y en J48, las ratas enfermas del grupo D presentan una masa corporal inferior a la de las ratas de los grupos A y B.

15 La fig. 12 representa el análisis de los pesos de los diferentes grupos de ratas en J42. La fig. 13 representa el análisis de los pesos de los diferentes grupos de ratas en J48. Para las dos figuras, los resultados se presentan en forma de representaciones de caja y bigotes. Los ensayos estadísticos de Kruskal-Wallis y Mann Whitney se utilizaron para determinar las diferencias significativas entre las ratas que habían recibido 2 dosis de rSh28GST (Alum) a 5 µg/kg, 0,5 µg/kg, alumbre solo y control. * P < 0,05.

Puntuaciones Clínicas

25 Para la evaluación de la puntuación clínica, se utilizaron otros grupos de ratas (n = 22 para el grupo A, n = 24 para el grupo C y n = 8 para el grupo D). El protocolo es el mismo que se ha mencionado anteriormente con la diferencia de que las ratas del grupo A recibieron tres inyecciones (respectivamente en J0, J14 y J28) de 5 µg/Kg de rSh28GST en combinación con hidróxido de aluminio (alumbre) (con el fin de obtener una respuesta inmune) y que las ratas del grupo C recibieron tres inyecciones (en J0, J14 y J28) de alumbre solo. La EAE se indujo en J35. Las ratas se puntuaron todos los días a partir de los primeros síntomas (J44) hasta el fin de la fase de remisión (J55). Los resultados clínicos se asignaron de acuerdo con la siguiente escala de referencia: puntuación de 0 = ningún síntoma; puntuación de 0,5 = debilidad muscular en la cola; puntuación de 1 = cola hipotónica; puntuación de 2 = cola hipotónica + debilidades musculares en los miembros posteriores; puntuación de 3 = 1 miembro posterior paralizado; puntuación de 4 = 2 miembros posteriores paralizados, puntuación 5 = los 2 miembros posteriores paralizados + una incapacidad para limpiarse y puntuación de 6 = muerte del animal. Por lo tanto, la Fig. 14 representa las puntuaciones acumuladas observadas para los diferentes grupos de ratas mencionados anteriormente en función de la duración después de la inmunización con la rSh28GST. Los grupos se representan en la abscisa mientras que la puntuación acumulada se indica en la ordenada. Las ratas del grupo A comienzan el desarrollo en J44 con una acmé alcanzada en J46 siguiendo la misma cinética de los grupos C y D pero las puntuaciones acumuladas a partir de J45 son menos importantes que las de los grupos C y D, en particular entre J45 y J55. Las disminuciones de la puntuación acumulada son significativas en J45 y J48. Las ratas que han desarrollado una respuesta de anticuerpo a la dosis de 5 µg/kg (grupo A) manifiestan por lo tanto una disminución de las puntuaciones clínicas acumuladas. Además, la mortalidad en el grupo A es nula, mientras que una rata del grupo de control D muere así como tres ratas del grupo C (alumbre solo).

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Université LILLE 2
CAPRON, Monique

50 <120> Proteína GST de 28 KDa que provienen de esquistosomas para su utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunes que generan una respuesta de tipo Th1 y/o Th17

55 <130> IFB 12

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

60 <210> 1

<211> 212

<212> PRT

<213> Schistosoma haematobium Sh28GST

65 <400> 1

ES 2 676 824 T3

Met Met Thr Gly Asp His Ile Lys Val Ile Tyr Phe Asn Gly Arg Gly
 1 5 10 15

Arg Ala Glu Ser Ile Arg Met Thr Leu Val Ala Ala Gly Val Asn Tyr
 20 25 30

Glu Asp Glu Arg Ile Ser Phe Gln Asp Trp Pro Lys Ile Lys Pro Thr
 35 40 45

Ile Pro Gly Gly Arg Leu Pro Ala Val Lys Ile Thr Asp Asn His Gly
 50 55 60

His Val Lys Trp Met Val Glu Ser Leu Ala Ile Ala Arg Tyr Met Ala
 65 70 75 80

Lys Lys His His Met Met Gly Gly Thr Glu Glu Glu Tyr Tyr Asn Val
 85 90 95

Glu Lys Leu Ile Gly Gln Ala Glu Asp Leu Glu His Glu Tyr Tyr Lys
 100 105 110

Thr Leu Met Lys Pro Glu Glu Glu Lys Gln Lys Ile Ile Lys Glu Ile
 115 120 125

Leu Asn Gly Lys Val Pro Val Leu Leu Asp Ile Ile Cys Glu Ser Leu
 130 135 140

Lys Ala Ser Thr Gly Lys Leu Ala Val Gly Asp Lys Val Thr Leu Ala
 145 150 155 160

Asp Leu Val Leu Ile Ala Val Ile Asp His Val Thr Asp Leu Asp Lys
 165 170 175

Glu Phe Leu Thr Gly Lys Tyr Pro Glu Ile His Lys His Arg Glu Asn
 180 185 190

Leu Leu Ala Ser Ser Pro Arg Leu Ala Lys Tyr Leu Ser Asp Arg Ala
 195 200 205

Ala Thr Pro Phe
 210

<210> 2
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Schistosoma mansoni Sm28GST

ES 2 676 824 T3

<400> 2

Met Ala Gly Glu His Ile Lys Val Ile Tyr Phe Asp Gly Arg Gly Arg
 1 5 10 15

Ala Glu Ser Ile Arg Met Thr Leu Val Ala Ala Gly Val Asp Tyr Glu
 20 25 30

Asp Glu Arg Ile Ser Phe Gln Asp Trp Pro Lys Ile Lys Pro Thr Ile
 35 40 45

Pro Gly Gly Arg Leu Pro Ala Val Lys Val Thr Asp Asp His Gly His
 50 55 60

Val Lys Trp Met Leu Glu Ser Leu Ala Ile Ala Arg Tyr Met Ala Lys
 65 70 75 80

Lys His His Met Met Gly Glu Thr Asp Glu Glu Tyr Tyr Ser Val Glu
 85 90 95

Lys Leu Ile Gly Gln Ala Glu Asp Val Glu His Glu Tyr His Lys Thr
 100 105 110

Leu Met Lys Pro Gln Glu Glu Lys Glu Lys Ile Thr Lys Glu Ile Leu
 115 120 125

Asn Gly Lys Val Pro Val Leu Leu Asn Met Ile Cys Glu Ser Leu Lys
 130 135 140

Gly Ser Thr Gly Lys Leu Ala Val Gly Asp Lys Val Thr Leu Ala Asp
 145 150 155 160

Leu Val Leu Ile Ala Val Ile Asp His Val Thr Asp Leu Asp Lys Gly
 165 170 175

Phe Leu Thr Gly Lys Tyr Pro Glu Ile His Lys His Arg Glu Asn Leu
 180 185 190

Leu Ala Ser Ser Pro Arg Leu Ala Lys Tyr Leu Ser Asn Arg Pro Ala
 195 200 205

Thr Pro Phe
 210

5 <210> 3
 <211> 211

ES 2 676 824 T3

<212> PRT
 <213> Schistosoma bovis Sb28GST

<400> 3

5

```

Met Thr Gly Asp His Ile Lys Val Ile Tyr Phe Asn Gly Arg Gly Arg
1           5           10           15

Ala Glu Ser Ile Arg Met Thr Leu Val Ala Ala Gly Val Asn Tyr Glu
          20           25           30

Asp Glu Arg Ile Ser Phe Gln Asp Trp Pro Lys Ile Lys Pro Thr Ile
          35           40           45

Pro Gly Gly Arg Leu Pro Ala Val Lys Ile Thr Asp Asn His Gly His
50           55           60

Val Lys Trp Met Leu Glu Ser Leu Ala Ile Ala Arg Tyr Met Ala Lys
65           70           75           80

Lys His His Met Met Gly Glu Thr Asp Glu Glu Tyr Tyr Asn Val Glu
          85           90           95

Lys Leu Ile Gly Gln Val Glu Asp Leu Glu His Glu Tyr His Lys Thr
          100          105          110

Leu Met Lys Pro Glu Glu Glu Lys Gln Lys Ile Thr Lys Glu Ile Leu
          115          120          125

Asn Gly Lys Val Pro Val Leu Leu Asp Ile Ile Cys Glu Ser Leu Lys
130          135          140

Ala Ser Thr Gly Lys Leu Ala Val Gly Asp Lys Val Thr Leu Ala Asp
145          150          155          160

Leu Val Leu Ile Ala Val Ile Asp His Val Thr Asp Leu Asp Lys Glu
          165          170          175

Phe Leu Thr Gly Lys Tyr Pro Glu Ile His Lys His Arg Glu Asn Leu
          180          185          190

Leu Ala Ser Ser Pro Arg Leu Ala Lys Tyr Leu Ser Asp Arg Ala Ala
195          200          205

Thr Pro Phe
210
  
```

ES 2 676 824 T3

<210> 4
 <211> 803
 <212> ADN
 5 <213> Schistosoma haematobium SH28GST

<400> 4

```
tctgtctgac tgtatgatga ctggtgatca tatcaaggtt atctatttta acggacgcgg      60
acgagctgaa tcgatccgga tgacacttgt ggcagctggt gtgaactacg aagatgagag      120
aattagtttc caagattggc cgaaaatcaa accaactatt ccgggcggac gattgcctgc      180
agtgaaaatc accgataatc atgggcacgt gaaatggatg gtagagagtt tggctattgc      240
acggtatatg gcgaagaagc atcatatgat gggaggaaca gaagaggagt attataatgt      300
tgagaagttg attggtcagg ctgaagatct agaacatgaa tattacaaaa ctttgatgaa      360
gccagaagaa gagaaacaga agataatcaa agagatactg aacggcaaag taccagttct      420
tctcgatatt atctgcgaat ctctgaaagc gtccacaggc aagctggctg ttggggataa      480
agtgactcta gccgacttag ttctgattgc tgtcattgac catgtgactg atctggataa      540
agaatttcta actggcaagt atcctgagat ccataaacat agagaaaatc tactagccag      600
ttcaccgaga ttggcgaaat atttatcaga cagggtgca actcccttct agaactgtca      660
acagaatgct ggggtgtgacg agattgaaga tactgatagt agtgcactgg tgcgaccttt      720
ttactaagac gtcatttgtt ttatggtatt ttttttcgca atcgttatta aaataaactt      780
agttttctgt ttaaaaaaaaa aaa                                             803
```

10
 <210> 5
 <211> 211
 <212> PRT
 15 <213> Schistosoma japonicum Sj28GST

<400> 5

```
Met Ala Cys Gly His Val Lys Leu Ile Tyr Phe Asn Gly Arg Gly Arg
 1           5           10           15

Ala Glu Pro Ile Arg Met Ile Leu Val Ala Ala Gly Val Glu Phe Glu
 20           25           30
```

ES 2 676 824 T3

Asp Glu Arg Ile Glu Phe Gln Asp Trp Pro Lys Ile Lys Pro Thr Ile
 35 40 45

Pro Gly Gly Arg Leu Pro Ile Val Lys Ile Thr Asp Lys Arg Gly Asp
 50 55 60

Val Lys Thr Met Ser Glu Ser Leu Ala Ile Ala Arg Phe Ile Ala Arg
 65 70 75 80

Lys His Asn Met Met Gly Asp Thr Asp Asp Glu Tyr Tyr Ile Ile Glu
 85 90 95

Lys Met Ile Gly Gln Val Glu Asp Val Glu Ser Glu Tyr His Lys Thr
 100 105 110

Leu Met Lys Pro Pro Glu Glu Lys Glu Lys Ile Ser Lys Glu Ile Leu
 115 120 125

Asn Gly Lys Val Pro Ile Leu Leu Gln Ala Ile Cys Glu Thr Leu Lys
 130 135 140

Glu Ser Thr Gly Asn Leu Thr Val Gly Asp Lys Val Thr Leu Ala Asp
 145 150 155 160

Val Val Leu Ile Ala Ser Ile Asp His Ile Thr Asp Leu Asp Lys Glu
 165 170 175

Phe Leu Thr Gly Lys Tyr Pro Glu Ile His Lys His Arg Lys His Leu
 180 185 190

Leu Ala Thr Ser Pro Lys Leu Ala Lys Tyr Leu Ser Glu Arg His Ala
 195 200 205

Thr Ala Phe
 210

<210> 6
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Schistosoma japonicum Sj26GST

<400> 6

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30

5

10

ES 2 676 824 T3

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys
 210 215

REIVINDICACIONES

1. Producto elegido entre una proteína, un fragmento de dicha proteína, una secuencia derivada y una secuencia homóloga de dicha proteína, **caracterizado por que:**

5 - dicha proteína comprende o está constituida por la proteína Glutación S-transferasa de 28 KDa de un esquistosoma elegido entre *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma bovis* representada respectivamente por las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 3;

10 - dicho fragmento es un fragmento de una de dichas proteínas que comprende, al menos una región comprendida entre las siguientes regiones: la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43, la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; ésto generando una respuesta inmunitaria de tipo Th2, **caracterizada por** la producción de IL-4, IL-5 o IL-13 por linfocitos que no producen IFN gamma;

20 y ésto disminuyendo la respuesta inmunitaria de tipo Th1, la respuesta inmunitaria de tipo Th1 estando **caracterizada por** la producción de IFN gamma y de TNF por linfocitos que no producen IL-4 o IL-5, y la producción de IL-1b por los tejidos de colon de rata;

25 - dicha secuencia derivada se obtiene a partir de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o de uno de dichos fragmentos citados anteriormente y se obtiene en particular por supresión, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos, en la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, dicha secuencia derivada comprendiendo al menos una región comprendida entre las siguientes regiones: la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43, la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; ésto induciendo la generación de una respuesta Th2 y/o la disminución de la respuesta Th1, caracterizadas respectivamente por la producción de IL-4, IL-5 o IL-13, y la producción de IFN gamma, TNF o IL-1b; y

30 - dicha secuencia homóloga es una secuencia homóloga de una de dichas secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o de uno de dichos fragmentos, y presenta una identidad de al menos un 80 % o de al menos un 85 % con al menos una de las regiones siguientes de dichas secuencias: la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43, la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, y la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; o con la totalidad de una de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; ésto induciendo la generación de una respuesta Th2 y/o la disminución de la respuesta Th1, caracterizadas respectivamente por la producción de IL-4, IL-5 o IL-13, y la producción de IFN gamma, TNF o IL-1b;

35 para su utilización en el tratamiento preventivo y/o curativo de una enfermedad inflamatoria crónica relacionada con una desregulación del sistema inmunitario que genera una respuesta inmunitaria de tipo Th1 y/o Th17 elegida entre las enfermedades inflamatorias autoinmunes que comprenden enfermedad de Berger, enfermedad de Basedow, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad celíaca, rectocolitis hemorrágica, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, anemias hemolíticas autoinmunes, anemia de Biermer (anemia perniciosa), lupus eritematoso, síndrome de CREST, diabetes de tipo 1, esclerodermia, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso, epidermólisis Ampollosa Adquirida, dermatitis herpetiforme, miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, polimiositis, síndrome de Goujerot-Sjögren, esclerosis en placas, poliartritis reumatoide, enfermedad de Graves y psoriasis.

40 2. Producto para su utilización de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado por que** dicha proteína está representada por la secuencia SEQ ID NO: 1 (28 GST glutación transferasa de *Schistosoma haematobium*), dicho fragmento es un fragmento de dicha proteína que comprende la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, o la región comprendida por el aminoácido 20 al aminoácido 50, o la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, o la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, o la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211, dicha secuencia derivada se obtiene a partir de la SEQ ID NO: 1 y dicha secuencia homóloga presenta una identidad de al menos un 80 % o de al menos un 85 % con la secuencia SEQ ID NO: 1.

3. Producto para su utilización de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** es el producto de expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica:
- la proteína Glutación-S-transferasa de 28 KDa representada por la SEQ ID NO: 1; o
 - 5 - un fragmento de dicha proteína representada por la SEQ ID NO: 1, dicho fragmento comprendiendo o estando constituido por al menos la región comprendida por el aminoácido de la posición 15 al aminoácido en la posición 60, o la región comprendida por el aminoácido de la posición 20 al aminoácido en la posición 50, o la región comprendida por el aminoácido de la posición 24 al aminoácido en la posición 43 y la región comprendida por el aminoácido de la posición 170 al aminoácido en la posición 220, o la región comprendida por el aminoácido de la posición 180 al aminoácido en la posición 215, o la región comprendida por el aminoácido de la posición 190 al aminoácido en la posición 211 de la secuencia SEQ ID NO: 1; o
 - 10 - una de dichas secuencias derivadas; o
 - una de dichas secuencias homólogas;
- 15 dicha secuencia de nucleótidos correspondiendo a la secuencia SEQ ID NO: 4 que codifica para SEQ ID NO: 1.
4. Producto para su utilización de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** es el producto de expresión de dicha secuencia codificante SEQ ID NO: 4 en *Saccharomyces cerevisiae* o en *Escherichia coli*.
- 20 5. Producto para su utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización en un niño.
6. Composición farmacéutica para su utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5, dicha composición comprendiendo, como agente activo, un producto tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un excipiente farmacológicamente aceptable.
- 25 7. Composición farmacéutica para su utilización de acuerdo con la reivindicación 6, para el tratamiento preventivo y/o curativo de una enfermedad elegida entre las enfermedades inflamatorias autoinmunes que comprenden enfermedad de Berger, enfermedad de Basedow, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad celíaca, rectocolitis hemorrágica, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, anemias hemolíticas autoinmunes, anemia de Biermer (anemia perniciosa), lupus eritematoso, síndrome de CREST, diabetes de tipo 1, esclerodermia, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso, epidermólisis Ampollosa Adquirida, dermatitis herpetiforme, miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, polimiositis, síndrome de Goujerot-Sjögren, esclerosis en placas, poliartritis reumatoide, enfermedad de Graves y psoriasis y las formas pediátricas posibles de estas enfermedades.
- 30 8. Composición para su utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 6, **caracterizada por que** comprende un adyuvante elegido entre las sales de aluminio.
- 40 9. Composición farmacéutica para su utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 7, **caracterizada por que** comprende hidróxido de aluminio como adyuvante.
10. Composición para su utilización de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizada por que** la concentración de adyuvante está comprendida de 0,5 mg/ml a 2 mg/ml.
- 45 11. Composición para su utilización de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada por que** la concentración de adyuvante está comprendida de 0,3 mg/ml a 1 mg/ml.
12. Composición para su utilización de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada por que** la concentración de adyuvante está comprendida de 220 µg/ml a 280 µg/ml.
- 50 13. Composición para su utilización de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada por que** la concentración de adyuvante es casi igual a 250 µg/ml.

FIGURA 1

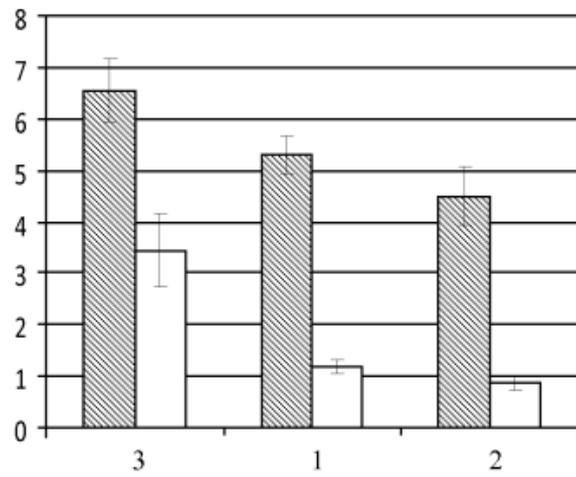


FIGURA 2

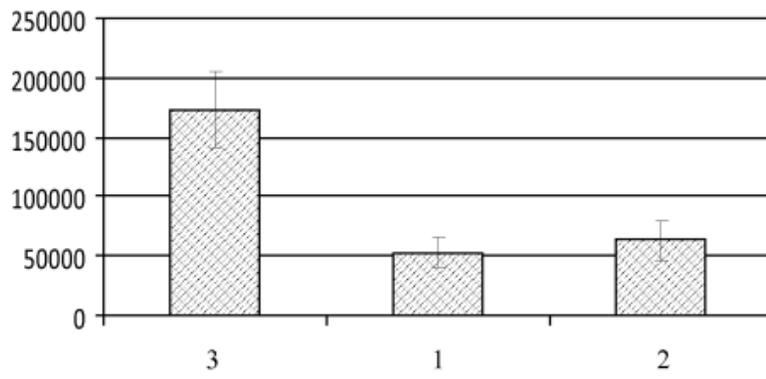


FIGURA 3

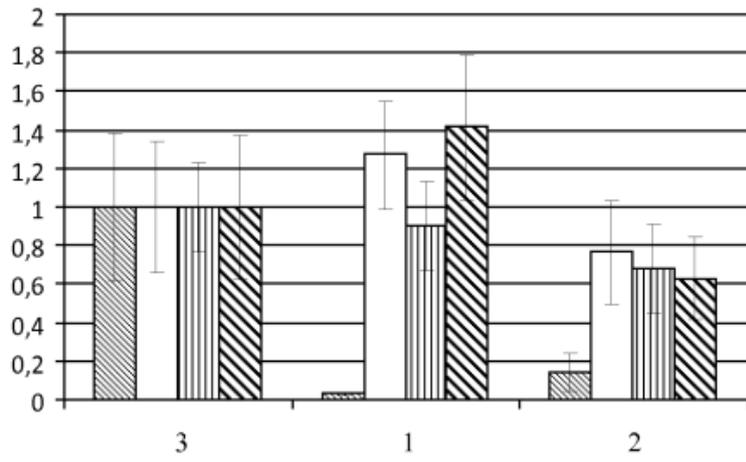


FIGURA 4

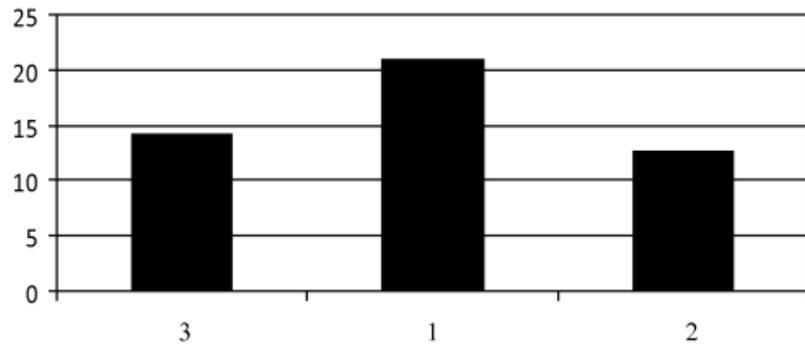


FIGURA 5

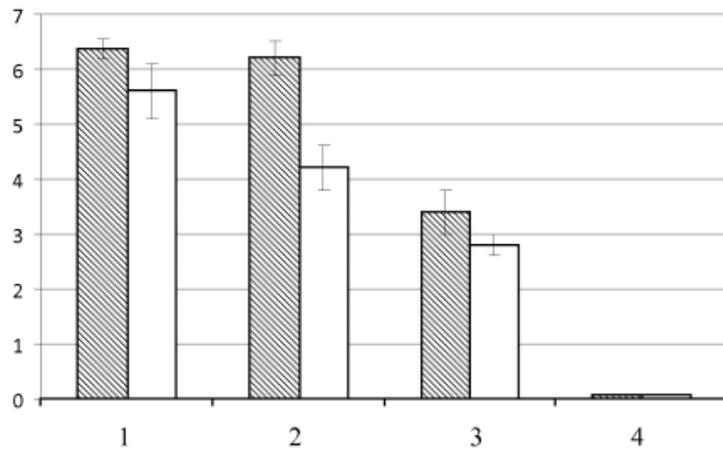


FIGURA 6

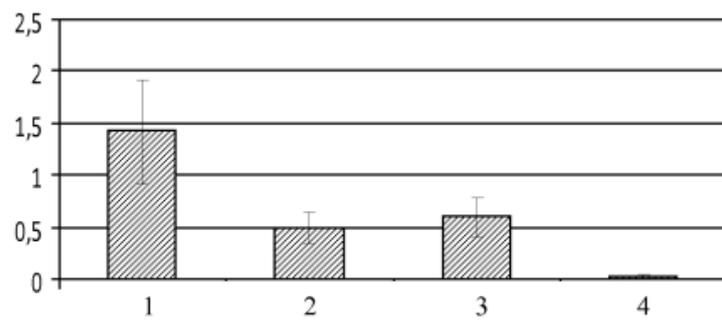


FIGURA 7

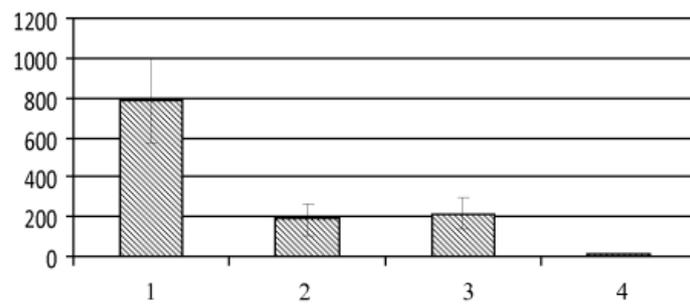


FIGURA 8

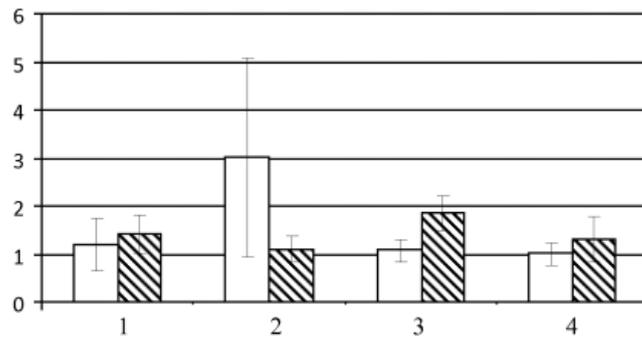


FIGURA 9

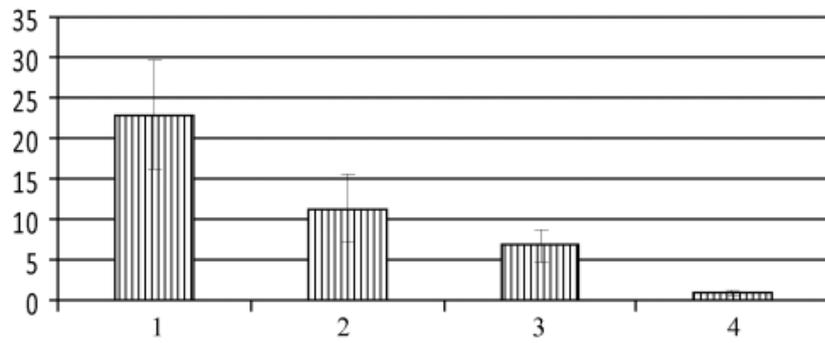


FIGURA 10

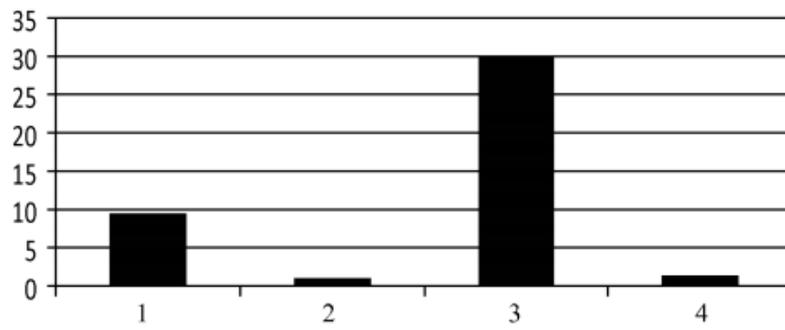


FIGURA 11

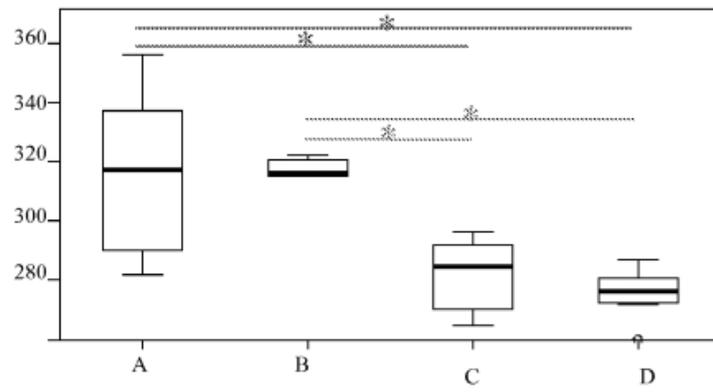


FIGURA 12

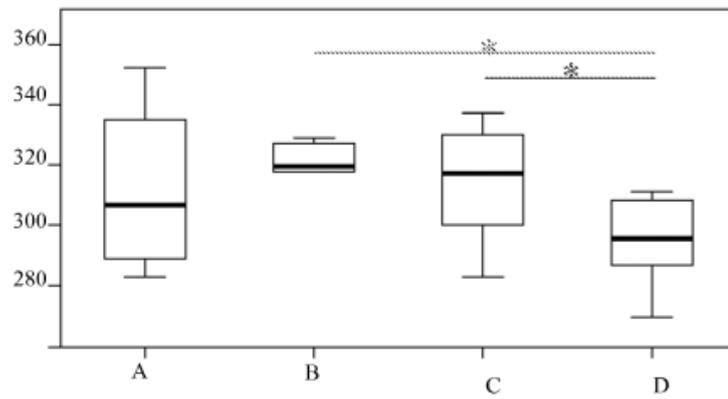


FIGURA 13

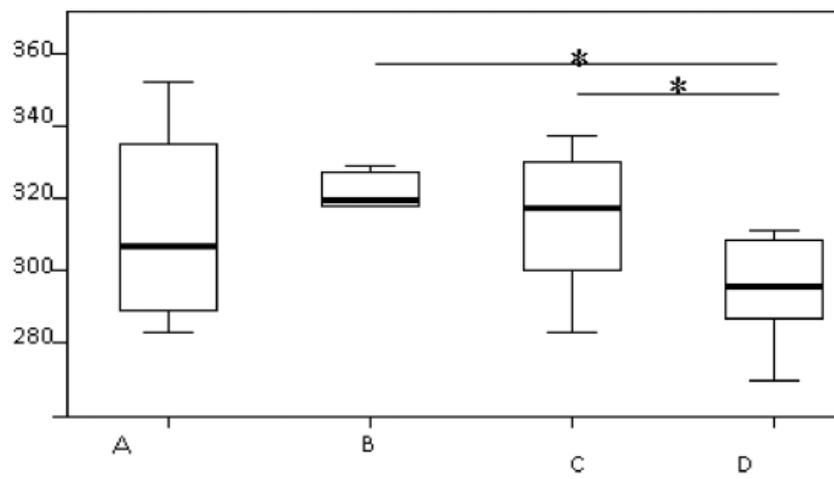


FIGURA 14

