

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 253**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2014 PCT/US2014/071844**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15095863**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2014 E 14873056 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3082863**

54 Título: **Anticuerpos específicos de la alfa-enolasa y método de uso en enfermedades inmunitarias**

30 Prioridad:

**20.12.2013 US 201361919391 P**

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

**11.11.2019**

73 Titular/es:

**DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY  
(50.0%)**

**No. 101 Lane 169 Kangning St.**

**New Taipei City 221, TW y**

**NATIONAL HEALTH RESEARCH INSTITUTES**

**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**TSAI, SHIH-CHONG;**

**CHANG, MINGL;**

**YUAN, TA-TUNG;**

**TSENG, SHIH-CHI;**

**CHEN, SHYI-JOU;**

**CHIA, WEI-TSO;**

**WANG, HSIN-YUN;**

**SHIH, NENG-YAO;**

**LIU, KO-JIUNN y**

**CHEN, LI-TZONG**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 730 253 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

Anticuerpos específicos de la alfa-enolasa y método de uso en enfermedades inmunitarias

5 **Antecedentes de la invención****Referencia a solicitudes relacionadas**

10 Esta solicitud reclama el beneficio sobre la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/919.391, presentada el 20 de diciembre de 2013.

**Campo de la invención**

15 La presente invención se refiere a tratamientos de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso y trastornos inmunitarios relacionados, incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, alergia, psoriasis, diabetes mellitus de tipo 1 y osteoporosis, por medio de anticuerpos específicos frente a la alfa-enolasa.

20 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central. En la esclerosis múltiple se destruyen las vainas de mielina, es decir, las fibras nerviosas se desmielinizan por acción de los autoanticuerpos. Los síntomas de la esclerosis múltiple son relativamente inespecíficos y, por ejemplo, son recurrencia y remisión de fatiga, entumecimiento, problemas con la marcha y de coordinación, disfunción intestinal/vejiga urinaria, disfunción cognitiva y dolores. Hasta ahora, las causas y la fisiopatología son poco conocidas y puede deberse a un trasfondo gen  
25 deficiencia de vitamina D y geografía. La prevalencia de la EM es variable geográficamente. Europa occidental y Norteamérica tienen las tasas epidémicas más altas del mundo, con 100 pacientes de EM con síntomas por cada 100.000 en EE.UU. y 118/100.000 en Inglaterra. La prevalencia en Japón y Taiwán es 8,57/100.00 y 1,9/100.000, respectivamente (Amino, MJ. et al. 2009) New York: McGraw Hill Medical., pp. 848-911; Tsai, C-P. et al. (2004), Chinese Med. Assoc., 67: 500-505). El trasfondo genético también está implicado en la patogenia de la EM. Si un miembro de la familia se ve afectado por EM, el riesgo de que sus familiares la desarrollen es proporcional a la similitud  
30 genética entre ellos y la persona afectada. Entre los factores ambientales, se confirma que la vitamina D y la infección por el virus de Epstein-Barr son factores que se vinculan con la EM. Recientemente, se ha propuesto que los virus del herpes tipo V y VI están involucrados en la EM en Taiwán. Al principio de la comprensión de la patología de la EM, se pensó que los linfocitos T CD4+ específicos de la mielina migran de la sangre al cerebro, se unen a los péptidos antigénicos presentados por las células presentadoras de antígenos (incluida la microglía en el cerebro), se expanden clonalmente, atacan y dañan a los oligodendrocitos y destruyen la mielina. Una hipótesis reciente sugiere que las células T CD4+ de mielina solo participan en la fase temprana de la EM. Los monocitos circulantes, inducidos por MCP-1 en el SNC, son responsables de la fase media y tardía de la progresión de la enfermedad. Los ratones deficientes en el receptor de quimiocina CCR2, cuyo ligando es MCP-1, son resistentes a la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Cuando a ratones defectivos para CCR2 se transfunden diferentes cantidades de  
35 monocitos de ratones CCR2+ a los que se ha inducido EAE, las puntuaciones clínicas de los ratones receptores son proporcionales a las cantidades de monocitos transfundidos de los ratones con EAE donantes. Este resultado sugiere que los monocitos son muy importantes para la progresión de la enfermedad EAE.

45 Hasta ahora, no se ha encontrado una terapia satisfactoria para la esclerosis múltiple. Hay 8 medicamentos aprobados por la FDA para tratar pacientes con EM. Rebif, Avonex, betaferon y Extavia son diferentes tipos de  $\beta$ -interferones, que son inmunomoduladores. Copaxon es un análogo de la mielina que funciona como receptor señuelo para el antígeno Th1 CD4+. Gilenya es un modulador del receptor de espingosina 1-fosfato (S1P-1) con una estructura estrechamente relacionada con la espingosina. Gilenya actúa como antagonista funcional en el SIP linfocítico y los efectos inmunomoduladores de Gilenya se deben, probablemente, a la inhibición de la salida de los linfocitos T  
50 específicos de antígeno de los ganglios linfáticos drenantes. Tysabri es un anticuerpo monoclonal contra la integrina del receptor de la matriz extracelular ( $\alpha 4\beta 1$ ), que es importante para la migración de los leucocitos. Laquinimod es un inhibidor de la vía inflamatoria mediado por NF $\kappa$ B; las células efectivas incluyen linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas. Tecfidera (fumarato de dimetilo BG12) es un inhibidor de la vía de transcripción de Nrf2 y evita que las células inmunitarias secreten citocinas y células epiteliales de CD 62E en expresión. La mitoxantrona es un análogo  
55 del antracenión, que es tóxico para las células inmunes activadas. Aunque algunos de ellos son eficaces, estos medicamentos solo conducen a una disminución de la frecuencia y la intensidad de las fases agudas de la enfermedad. Siempre tienen algunos efectos secundarios, por ejemplo, infecciones por fármacos relacionados con  $\beta$ -interferones y leucoencefalopatía multifocal progresiva para Tysabri.

60 La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a las articulaciones de los pacientes. Los síntomas de la AR incluyen dolores, inflamaciones, rigidez y deformaciones en las articulaciones. Los pacientes siempre sienten fiebre y fatiga. La etiología de la AR no se entiende completamente. La enfermedad comienza a partir de autoanticuerpos contra los tejidos conectivos de los pacientes, seguido de la infiltración de leucocitos, incluidos monocitos, macrófagos y neutrófilos. Luego, los linfocitos erosionan e invaden los huesos y tejidos blandos de las  
65 articulaciones. Los fármacos terapéuticos tradicionales de la AR se conocen como antirreumáticos, incluidos, por ejemplo, metotrexato y lefunomida. A veces se utilizan esteroides. Recientemente, pueden administrarse productos

biológicos más efectivos, tales como Remicade™ y Humira™, que son anticuerpos contra TNF-alfa, o Enbrel, que es un receptor señuelo de TNF-alfa, o Anakinra™, que es un antagonista del receptor de IL-1. A pesar de que estos medicamentos son efectivos, se pueden observar efectos secundarios, por ejemplo, infecciones y fiebres. Aún así, en muchos casos, no es posible tratar satisfactoriamente la enfermedad y evitar daños en las articulaciones, lo que incluso puede dar como resultado inmovilización.

En ambas enfermedades (EM y AR), los datos en las publicaciones sostienen que los monocitos y macrófagos inflamatorios de la sangre están involucrados en la progresión de ambas enfermedades inmunitarias.

La alfa-enolasa (enolasa-1 o ENO1) es una proteína funcional múltiple, que se descubrió por primera vez como enzima clave en la ruta de la glucólisis. En condiciones normales, la ENO1 se expresa en el citosol. Sin embargo, datos recientes en las publicaciones respaldan la idea de que la ENO1 puede expresarse en las superficies celulares como un receptor de plasminógeno en muchas células cancerosas y en células hematopoyéticas activadas, tales como neutrófilos, linfocitos y monocitos. Se sabe que la regulación por aumento de las proteínas receptoras del plasminógeno induce las respuestas en cascada de la UPAS (señal de activación de la uroquinasa plasminógeno) y da como resultado la degradación de la matriz extracelular. Como consecuencia, da como resultado un aumento de la metástasis de las células cancerosas y la infiltración de las células inmunitarias. Los estímulos inflamatorios, por ejemplo, LPS, regulan por aumento la expresión en la superficie celular de ENO1 en monocitos de sangre humana y células monocíticas U937 mediante modificación postraduccional y translocación a la superficie celular.

Se cree que la translocación de ENO1 está regulada por la vía de transducción de señales de la MAP quinasa. Esto implica que los aumentos en la expresión de ENO1 en la superficie celular pueden desempeñar un papel importante en las enfermedades inflamatorias. Se han descubierto autoanticuerpos contra ENO1 en enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias variables, incluyendo lupus eritematoso, esclerosis sistémica, enfermedad de Behcet, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Los estudios de Saulot et al. (Arthritis Rheum., 46: 1196-1201 (2002)) y Wkui et al. (Clin. Exp. Immunol., 118: 445-450 (1999)) sugieren que entre el 25-66 % de los pacientes con AR tienen niveles séricos de anticuerpos contra ENO1 regulados por aumento. El estudio de Bae (J. Immunology, 189: 365-372 (2013)) indica que cuando las PBMC de los pacientes con AR se tratan con un anticuerpo contra ENO1 para estimular la actividad del receptor de plasminógeno ENO1, los monocitos y macrófagos de las PBMC producen una mayor cantidad de mediadores proinflamatorios, tales como TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  /  $\beta$ , IFN- $\gamma$  y PGE2 a través de la ruta de p38 MAPK y NF- $\kappa$ B. Este estudio sugiere que la ENO1, a través de su actividad del receptor de plasminógeno, desempeña un papel clave en la progresión de la enfermedad de los pacientes con AR al aumentar las actividades de invasión de monocitos y macrófagos.

En resumen, los monocitos con su expresión de ENO1 regulada por aumento en las superficies celulares como receptores de plasminógeno para aumentar las actividades de invasión son muy importantes para la progresión de la enfermedad de la EM, la AR y los trastornos inmunitarios relacionados. Por lo tanto, apuntar a ENO1 en la superficie celular de los monocitos tiene un buen potencial para tratar enfermedades inflamatorias, tales como EM, AR, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y lupus eritematoso sistémico, o trastornos inmunitarios relacionados, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, alergia, psoriasis, diabetes mellitus de tipo 1, arteroesclerosis y osteoporosis.

### Sumario de la invención

Las realizaciones de la presente invención se refieren a nuevos tratamientos para una enfermedad inflamatoria o un trastorno inmunitario, tal como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico o trastornos inmunitarios relativos, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, alergia, psoriasis, diabetes mellitus de tipo 1, arteroesclerosis y osteoporosis.

De acuerdo con cualquier realización de la divulgación, un método para tratar una enfermedad inflamatoria o un trastorno inmunitario puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite un antagonista contra ENO1, en el que el antagonista se une a ENO1 e inhibe la actividad del receptor de plasminógeno de ENO1. De acuerdo con cualquier realización de la invención, el antagonista es un anticuerpo anti-ENO1, o un fragmento scFv, Fab o F(ab)<sub>2</sub> del mismo como se define en las reivindicaciones. Además, de acuerdo con cualquier realización de la divulgación, el método puede comprender además administrar un inmunomodulador al sujeto. Un ejemplo de un inmunomodulador es fumarato de dimetilo.

De acuerdo con cualquier realización de la invención, una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o un trastorno inmunitario puede realizarse con un medicamento que contiene un anticuerpo como se define en la reivindicación 1, que puede unirse específicamente al receptor de plasminógeno ENO1 para el tratamiento de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico o trastornos inmunitarios relativos en un sujeto, y el uso de dicho anticuerpo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico o trastornos inmunitarios relativos en un sujeto, respectivamente.

De acuerdo con cualquier realización de la invención, un anticuerpo, o un fragmento scFv, Fab o F(ab)<sub>2</sub> del mismo, se

une a un epítipo en la ENO1 humana e inhibe la actividad del receptor de plasminógeno ENO1, en el que el epítipo está localizado en una región que consiste en la secuencia de <sup>296</sup>FDQDDWGAWQKFTASAGIQVVG DDLTVTNPVKRIAKAVNEKS<sup>336</sup> (SEC ID NO:39) de la ENO1 humana. De acuerdo con cualquier realización de la invención, el anticuerpo, o el fragmento scFv, Fab o F(ab)<sub>2</sub> del mismo, se une a un epítipo en la ENO1 humana e inhibe la actividad del receptor de plasminógeno ENO1, en el que el epítipo se ubica en una región que consiste de la secuencia de <sup>296</sup>FDQDDWGA WQKFTA<sup>309</sup> (SEQ ID NO:40) o <sup>326</sup>KRIAKAVNEKS<sup>336</sup> (SEQ ID NO:41) de la ENO1 humana.

Como se ha indicado anteriormente, el estudio de Bae (J. Immunology, 189: 365-372 (2013)) indica que cuando las PBMC de los pacientes con AR se tratan con un anticuerpo contra ENO1 se estimula la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 y los monocitos y macrófagos de las PBMC producirían una mayor cantidad de mediadores proinflamatorios, tales como TNF $\alpha$ , IL1- $\alpha$  /  $\beta$ , IFN- $\gamma$  y PGE2 a través de la ruta de p38 MAPK y NF- $\kappa$ B. En contraste con esta observación, los inventores de la presente invención descubrieron, sorprendentemente, que la administración de anticuerpos dirigidos contra ENO1 puede efectuar una mejora clínica de la artritis reumatoide. Es decir, se descubrió que administrando anticuerpos dirigidos contra la actividad de ENO1 en lugar de la activación con el epítipo del anticuerpo que es diferente del elegido por Bae et al., se puede lograr una mejoría clínica en una enfermedad inflamatoria o trastorno inmunitario (tal como artritis reumatoide). Asimismo, se descubrió que se puede efectuar una mejoría clínica de la esclerosis múltiple. Estas observaciones sugieren que no todos los anticuerpos contra la ENO1 tienen un efecto terapéutico en las enfermedades inmunitarias y este efecto es dependiente del epítipo.

Además, se descubrió, sorprendentemente, que un tratamiento no solo es posible durante el inicio de la enfermedad en un modelo animal, sino también cuando ya están presentes los síntomas clínicos explícitos de la enfermedad. Esto permite una intervención terapéutica relativamente tardía, entre otras, como se requiere en la práctica clínica humana.

El receptor de plasminógeno ENO1 humano es conocido por un experto en la materia (véase, GenBank: AAH50642.1 en el sitio web del Instituto Nacional de Salud). Este receptor es un receptor de plasminógeno y existe en dos variantes diferentes de corte y empalme en seres humanos, ENO1 y proteína de unión a Myc. ENO1 también se conoce como ENO1 humana, alfa-enolasa o gen de ENO-1.

Los ortólogos correspondientes de ENO1 de varias otras especies también son conocidos y un experto en la técnica puede determinarlos fácilmente, por ejemplo, por medio de búsquedas de secuencia a partir de la ENO1 humana. De acuerdo con las realizaciones de la invención, el término "ENO1" se refiere a proteínas ENO1 tanto humanas como animales (por ejemplo, de mascotas y ganado).

De acuerdo con la presente invención, el término "anticuerpo" debe entenderse en un sentido amplio y, entre otros, comprende anticuerpos policlonales, monoclonales y producidos de forma recombinante, incluyendo anticuerpos biespecíficos así como fragmentos de los mismos, tales como Fv, Fab y Fragmentos F(ab)<sub>2</sub>, en los que el Fv puede ser monocatenario (cadena sencilla). preferentemente, el anticuerpo es uno de los isotipos de IgG. Preferentemente, el anticuerpo es tal que no es, o solo en un grado bajo, rechazado por el sistema inmunitario del sujeto. Esto se puede lograr, por ejemplo, convirtiendo regiones de anticuerpos (por ejemplo, las regiones Fc) que no son necesarias para reconocer el antígeno (por ejemplo, la proteína ENO1, que es un receptor de plasminógeno) en secuencias derivadas de secuencias de anticuerpos de la especie del sujeto. Por ejemplo, los denominados anticuerpos humanizados son conocidos por los expertos en la técnica y son particularmente adecuados para aplicaciones en seres humanos. Los anticuerpos que, de otro modo, se modifican, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kontermann, R.E. (editor) (2011), los anticuerpos biespecíficos, Springer Heidelberg Dordrecht London New York), los diacuerpos, así como los denominados aglutinantes o aptámeros, que pueden fabricarse, por ejemplo, por medio de un esqueleto peptídico o un esqueleto de ácido nucleico, por ejemplo, ARNa, también se pretende abarcarlos en el término "anticuerpo" en el contexto de la presente invención. Preferentemente, los anticuerpos en el contexto de la presente invención tienen un peso molecular de menos de 600 kDa, más preferentemente de menos de 300 kDa, aún más preferentemente de menos de 200 kDa y lo más preferentemente de aproximadamente 150 kDa. El anticuerpo, como se usa en el presente documento, también puede incluir un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo madurado por afinidad, que es un anticuerpo que ha sido sometido a mutación para optimizar la unión (afinidad). El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco para formar un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). Los métodos para formar conjugados de anticuerpo y fármaco son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, que involucran la oxidación de carbohidratos en el anticuerpo con peryodato de sodio para generar aldehídos, que luego reaccionan con un grupo funcional amino en un fármaco o un enlazador unido a un fármaco.

Los métodos para la producción de anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes adecuados, incluida la producción de aglutinantes y aptámeros, son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Jorg Knablein (editor), Modern Biopharmaceuticals, vol. 2, p. 635); véanse también los Ejemplos descritos más adelante. Por ejemplo, la inmunización se puede llevar a cabo mediante inyección de la proteína ENO1. La identificación de anticuerpos adecuados también es posible mediante la detección selectiva del sobrenadante de hibridoma con las moléculas correspondientes (antígenos). Después de la identificación, los anticuerpos pueden producirse mediante métodos que son conocidos por un experto en la materia.

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, un anticuerpo anti-ENO1 puede ser mAb EN10 o mAb 7E5, o

un fragmento scFv, Fab o F(ab)<sub>2</sub> de los mismos. Los anticuerpos anti ENO1 mAb EN10 y mAb 7E5 pueden unirse al receptor de plasminógeno ENO1. Preferentemente, el anticuerpo se une con una constante de disociación  $K_d$  de  $10^{-7}$  M o inferior, más preferentemente de  $10^{-8}$  M o inferior, incluso más preferentemente de  $10^{-9}$  M o inferior, lo más preferentemente de  $10^{-10}$  M o inferior. Preferentemente, la unión es específica. La unión específica en el contexto de la presente invención significa que, en condiciones fisiológicas, (es decir, en una solución salina fisiológica, en cultivo celular o *in vivo*, preferentemente en la sangre o el tejido del sujeto correspondiente), el anticuerpo se une a ENO1 con al menos 10 veces mejor afinidad, preferentemente 20 veces mejor afinidad, más preferentemente 50 veces mejor afinidad, lo más preferentemente 100 veces mejor afinidad por ENO1, en comparación con las de otras proteínas, en particular, en comparación con proteínas similares (por ejemplo, en comparación con Anexina 2, Histona 2B, CK8 u otros receptores de plasminógeno). Sin embargo, la unión a otras proteínas puede ser tolerada siempre que no interfiera en los efectos terapéuticos del anticuerpo. Sin embargo, es posible la reactividad cruzada con receptores de plasminógeno ENO1 ortólogos de otras especies e incluso puede ser ventajosa para permitir aplicaciones del anticuerpo en varias especies. Dicha reactividad cruzada no es infrecuente y un experto en la técnica sabe cómo determinar la reactividad cruzada. Más detalles sobre este asunto también se pueden encontrar en los ejemplos.

Preferentemente, un anticuerpo para usar de acuerdo con realizaciones de la invención puede inhibir la actividad del receptor de plasminógeno ENO1. Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo inhibe la actividad del receptor de plasminógeno ENO1. Por ejemplo, tal anticuerpo puede disminuir la actividad de la plasmína proteinasa que resulta de la expresión del receptor de plasminógeno ENO1 inducida por LPS en células que reaccionan por medio de ENO1, tales como células U937. Un ejemplo de ensayo se describe en los ejemplos a continuación.

Además, la inhibición de la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 se puede determinar por el hecho de que la inhibición de la actividad de invasión inducida por LPS y MCP-1 se produce en las células, por ejemplo, U937. Un ensayo de ejemplo se describe en los ejemplos siguientes.

Los ejemplos de anticuerpos que son adecuados o pueden parecerse a los puntos de partida de los anticuerpos modificados incluyen el anticuerpo monoclonal mAb EN10 y mAb 7E5. La producción del anticuerpo mAb EN10 y mAb 7E5, así como sus características, se describe en los siguientes ejemplos.

Un medicamento de acuerdo con las realizaciones de la invención puede contener anticuerpos mAb EN10 y mAb 7E5. Además, el medicamento puede contener cualquier tipo de adyuvante, que un experto en la técnica considere aceptable. Tales adyuvantes pueden ser, por ejemplo, sustancias portadoras, como almidón, lactosa, grasas, ácido esteárico, alcohol, soluciones salinas fisiológicas u otros aditivos. En particular, son deseables los adyuvantes que estabilizan los anticuerpos y preservan sus actividades. El medicamento de acuerdo con realizaciones de la invención también puede contener anticuerpos que tienen otras moléculas terapéuticas conjugadas en los anticuerpos (es decir, conjugados de anticuerpo-fármaco, CAF), los métodos para hacer CAF son bien conocidos en la técnica.

La administración del medicamento puede llevarse a cabo con cualquier método conocido que pueda administrar el anticuerpo mAb EN10 y 7E5 contenidos en el medicamento a las células diana, por ejemplo, en particular, monocitos, *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, el medicamento se puede administrar mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa (i.v.), por vía subcutánea (s.c.), o por vía intraperitoneal (i.p.) en forma de soluciones, suspensiones o infusiones. Sin embargo, también son posibles otros modos de administración, tales como en forma microencapsulada o en forma de implantes. Preferentemente, la administración del medicamento se lleva a cabo de manera tal que el anticuerpo pueda entrar en la circulación o en el área objetivo respectiva. También es posible administrar directamente en el área objetivo, por ejemplo, para la esclerosis múltiple directamente en el sistema nervioso central (por ejemplo, el líquido cefalorraquídeo), para la artritis reumatoide directamente en las articulaciones afectadas, para la enfermedad intestinal inflamatoria directamente en los intestinos, para el LES directamente en los riñones, o para otras enfermedades inflamatorias directamente en los órganos relativos.

Un experto en la técnica conoce la esclerosis múltiple (EM) y la artritis reumatoide (AR) y ya se han descrito en la introducción. El término tratamiento también es conocido para un experto en la técnica. En el contexto de la presente invención, un tratamiento se refiere a cualquier tipo de intervención que de como resultado una mejoría clínica de una enfermedad o trastorno, tal como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o lupus eritematoso sistémico o un trastorno inmunitario en un sujeto. Una mejoría clínica, por ejemplo, en la esclerosis múltiple, puede determinarse midiendo la disminución del déficit neurológico, por ejemplo, la parálisis. En la artritis reumatoide, una mejoría clínica se puede determinar, por ejemplo, mediante una reducción de los síntomas, como la hinchazón, la inflamación o el dolor. Preferentemente, una mejora se manifiesta en el alivio de los síntomas clínicos que, por ejemplo, corresponden a una mejora de la puntuación de EAE, de acuerdo con el ejemplo, de al menos 0,25 unidades, preferentemente 0,5 unidades, más preferentemente al menos 0,75 unidades, más preferentemente al menos 1,0 unidades, o más preferentemente al menos 1,3 unidades. Preferentemente, la mejora se manifiesta en el alivio de los síntomas clínicos que, por ejemplo, corresponde a una mejora de la puntuación de artritis, según el ejemplo, de al menos 0,25 unidades, preferentemente al menos 0,5 unidades, más preferentemente al menos 1,0 unidades, más preferentemente al menos 2.0 unidades, o más preferentemente al menos 3.0 unidades.

Para una estimación de la mejoría clínica en el hombre, también se conocen muchos parámetros, por ejemplo, la puntuación clínica para la esclerosis múltiple (Avnir, Y. et al., (2011) PLoS ONE.6:1-13). Además, el tratamiento puede

referirse, en particular, a esclerosis múltiple y / o artritis reumatoide refractaria a la terapia, es decir, a una forma de la enfermedad respectiva, en la que no se podría lograr una mejoría clínica con los agentes conocidos hasta ahora. En un número considerable de sujetos, el curso de una enfermedad es tal que la mejoría clínica ya no es posible con agentes conocidos. Además, el tratamiento puede referirse a un sujeto con la enfermedad respectiva, en la que se producen efectos secundarios no deseados en un grado no aceptable con los métodos de tratamiento existentes hasta ahora. El tratamiento también puede referirse a la enfermedad respectiva en un estadio avanzado.

Un sujeto de acuerdo con realizaciones de la presente invención puede ser un vertebrado, preferentemente un mamífero. Un mamífero puede ser, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón, una rata o un conejo), un cerdo, un perro, un gato o un primate. Preferentemente, el mamífero es un primate (por ejemplo, un macaco o un títi común o un ser humano). Particularmente preferente, el sujeto es un ser humano.

Generalmente, se determina una dosis efectiva para la administración del medicamento. La expresión "una dosis efectiva" y la determinación de la dosis efectiva son conocidos por los expertos en la técnica. Además, un experto en la técnica puede consultar la información proporcionada en el presente documento para determinar una dosis efectiva. Se entiende que una dosis es efectiva cuando conduce a una mejoría clínica en la enfermedad que se está tratando. En particular, en el contexto de la presente invención, se entiende que una dosis del medicamento que alivia los síntomas de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico o un trastorno inmunitario en un sujeto, es una dosis efectiva. Una dosis efectiva es, por ejemplo, una dosis que se elige de modo que se inhiba al menos el 20 %, preferentemente al menos el 30 %, más preferentemente al menos el 40 %, lo más preferentemente al menos el 50 % de las actividades de invasión de los monocitos que expresan ENO1 en sangre periférica.

Preferentemente, se elige una dosis efectiva del medicamento de manera que se asemeje a la dosis más baja que proporcione un tratamiento satisfactorio de la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el lupus eritematoso sistémico o un trastorno inmunitario. Una dosis efectiva particularmente adecuada se puede determinar al continuar aumentando las dosis en una serie de pruebas hasta que se alcance la relación deseada entre el efecto y los efectos secundarios no deseados. En el contexto de la presente invención, este será, por ejemplo, el caso cuando la enfermedad que se está tratando ya no se mejore clínicamente aún más con un aumento adicional de la dosis (según sea el caso, incluso se agrave) y / o cuando los efectos secundarios no deseados en relación con el efecto terapéutico ya no son aceptables.

Además, la presente invención se refiere a un medicamento que contiene un anticuerpo capaz de inhibir la actividad de invasión de monocitos en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico o un trastorno inmunitario en un sujeto y el uso de dicho anticuerpo para el fabricación de un medicamento para el tratamiento de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico o un trastorno inmunitario en un sujeto.

Todas las realizaciones y variantes preferidas de la invención y las definiciones ilustradas en esta descripción también se relacionan evidentemente con todos los medicamentos y usos mencionados anteriormente de una manera correspondiente.

En el contexto de la presente invención, se descubrió que la administración de un anticuerpo que es capaz de inhibir el receptor de plasminógeno ENO1 puede afectar a la actividad de invasión de los monocitos que expresan ENO1.

Los presentes inventores suponen que el tratamiento de la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el lupus eritematoso sistémico o un trastorno inmunitario se produce preferentemente a través de un compromiso de la actividad del receptor de plasminógeno de los monocitos inflamatorios que expresan ENO1.

En el contexto de la presente invención, se entiende que la inhibición de la actividad del receptor de plasminógeno de los monocitos inflamatorios que expresan ENO1 da como resultado el compromiso de la actividad de invasión de los monocitos correspondientes.

El mecanismo de inhibición de la actividad del receptor de plasminógeno puede verse afectado por el diseño del anticuerpo. Preferentemente, la inhibición se efectúa por un mecanismo que compromete la actividad de UPAS (señal de activación del plasminógeno de uroquinasa). La inhibición basada en UPAS puede, por ejemplo, estar mediada a través de la proteína ENO1. El anticuerpo frente a ENO1 hace posible retener la migración de monocitos a los tejidos inflamatorios.

La inhibición de la actividad de invasión con la ayuda de un anticuerpo de la invención se puede lograr en varias especies. Por ejemplo, las poblaciones de monocitos de ratón y hombre son similares. En ratones, se ha demostrado una dicotomía de los monocitos sanguíneos en monocitos inflamatorios (CD11b+ CCR2+ GR1+ CD62L+ CX3CR bajos) y no inflamatorios (CD11b+ CCR2- GR1-CD62L-CX3CR alto) (Geissmann F. et al. (2003), Immunity, 19: 71-82). En seres humanos, estas dos poblaciones de monocitos se conocen desde hace más tiempo y se determinan, predominantemente, a través de los niveles de expresión de los marcadores de superficie CD14 y CD16 (Ziegler-

Heitbrock H.W. et al. (2000), J. Leukoc. Biol., 67: 603-6).

Las realizaciones de la presente divulgación se refieren a métodos para la inhibición de la invasión de monocitos que comprenden: poner en contacto los monocitos con un anticuerpo que puede unirse específicamente al receptor de plasminógeno ENO1. Preferentemente, el contacto se lleva a cabo *in vivo* o *in vitro*. El término "*in vitro*" se entiende en su forma más amplia posible en este contexto. Se refiere a cualquier evento que tenga lugar fuera de un cuerpo vivo, tales como métodos en cultivo celular, cultivo de tejidos o cultivo de órganos. El término "*in vitro*" se entiende particularmente que comprende también un método que se refiere al tratamiento de la sangre fuera del cuerpo del sujeto.

La presente divulgación se refiere además a métodos para los tratamientos de la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa o el lupus eritematoso sistémico o un trastorno inmunitario en un sujeto. El método comprende la etapa de administrar un anticuerpo que puede unirse específicamente al receptor de plasminógeno ENO1.

La presente divulgación se refiere además a métodos para la inhibición de la actividad de invasión de monocitos específicos en un sujeto. El método comprende la etapa de administrar un anticuerpo que puede unirse específicamente al receptor de plasminógeno ENO1.

Todas las implementaciones y variantes preferidas de la invención y las definiciones que ya se han presentado anteriormente evidentemente también se refieren a los métodos mencionados anteriormente de la manera correspondiente.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de ELISA de la unión de ENO1 por un mAb anti ENO1 de ratón aislado de ascitis del hibridoma. La purificación con sulfato de amonio, la purificación en columna de proteína A y la purificación con SDS-PAGE se realizaron como se describe en el Ejemplo 1. Estos datos muestran la  $K_d$  del anticuerpo anti-ENO1 humana mAb EN10.

Las FIG. 2A, 2B y 2C muestran los resultados de la expresión de ENO1 en la superficie de las células CD11b+ cuando las PBMC humanas normales se tratan con LPS. La inducción de la expresión de ENO1 por LPS en PBMC humanas normales se realizó como se describe en el Ejemplo 2. La Figura 1A muestra que el LPS indujo la expresión de ENO1 en la superficie celular, como lo demuestra el aumento y el desplazamiento a la derecha de la población de células fluorescentes en la exploración FACS. Los datos en la figura 2B y la figura 2C muestran que ENO1 está regulado por incremento en células CD11b<sup>alto</sup> (FIG. 2B) y Mac3<sup>alta</sup> (FIG. 2C) de PBMC inflamatorias.

La Figura 3 muestra los resultados de los efectos sobre la actividad fibrinolítica de U937 inducida por LPS por el mAb EN10 (anticuerpo anti-ENO1) aislado de ascitis de hibridoma. La inducción de la expresión de ENO1 por LPS en la línea celular monocítica U937 humana y el ensayo de la actividad de la plasmína se realizaron como se describe en el Ejemplo 3. Estos datos muestran que el mAb EN10 puede inhibir la función del receptor de plasminógeno ENO1 en monocitos.

La Figura 4 muestra los resultados de las actividades de invasión de la línea celular monocítica U937 humana tratada con diferentes concentraciones de mAb EN10 cuando la expresión de células ENO1 en la superficie es inducida por LPS. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 4. Estos datos muestran que el mAb EN10 inhibe la actividad de invasión de las células U937 de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 5 muestra que el mAb EN10 reconoce la ENO1 en la superficie celular en los monocitos U937 humanos tratados con LPS. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 5.

La Figura 6A muestra las actividades de unión del mAb EN10 de los mutantes de delección de ENO1. El epítipo de unión del mAb EN10 se localiza entre los residuos amino número 297 y 434 de la proteína ENO1 humana debido a que la eliminación de este fragmento esencialmente elimina la unión del anticuerpo. La eliminación de gran parte de ENO1 para determinar la región de unión del mAb EN10 se realizó como se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 6B muestra la SDS PAGE al 12 % de 6 proteínas mutantes por delección en C-terminal de ENO1 purificadas a partir de *E. coli*. Los procedimientos detallados para la purificación de mutantes de eliminación ENO1 se describen en el Ejemplo 6.

La Figura 6C muestra las actividades de unión de mAb EN10 de 6 mutantes de eliminación C-terminal de ENO1. El epítipo de unión de mAb EN10 se localiza entre los residuos amino número 296 y 336 de la proteína ENO1 humana. La eliminación de gran parte de ENO1 para determinar la región de unión del mAb EN10 se realizó como se describe en el Ejemplo 6.

- La Figura 7A representa la estructura cristalina y los restos de aminoácidos de exposición superficial entre los números de aminoácidos 296 y 336 de ENO1 humana. La predicción de la estructura se describió en el Ejemplo 7.
- 5 La Figura 7B muestra la SDS PAGE al 12 % de 11 proteínas mutantes de barrido de alanina de ENO1 purificadas en *E. coli*. Los procedimientos detallados para la purificación de proteínas de mutación de ENO1 se describen en el Ejemplo 7.
- 10 La Figura 7C muestra el ELISA de unión a ENO1 y los valores de Kd de 11 mutantes de barrido de alanina contra el mAb EN10. El resultado sugiere que las secuencias del péptido 1 de ENO1, FD Q D D W G A W Q K F TA (SEQ ID NO: 40) y el péptido 2, K R I A K A V N E K S (SEQ ID NO: 41), ubicados entre los restos amino 296 y 336 de ENO1 humana, están implicados en la unión del mAb EN10. El barrido de alanina se realizó como se describe en el Ejemplo 7.
- 15 La Figura 7D muestra las secuencias del péptido 1 de ENO1 (FD Q D D W G A W Q K F TA) (SEQ ID NO: 40)) y el péptido 2 (K R I A K A V N E K S (SEQ ID NO:41)) entre los restos amino números 296 y 336 de ENO1 humana (SEQ ID NO: 39), que participan en la unión de ENO1 humana y mAb EN10.
- 20 Las Figuras 8A y 8B muestran los resultados de la inhibición de la infiltración de leucocitos en un modelo de inflamación no infecciosa de ratón mediante la administración del mAb EN10 en ratones. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 8A muestra el efecto del mAb EN10 en los recuentos totales de células del peritoneo y la Figura 8B no muestra ningún efecto sobre los recuentos de neutrófilos después de la administración del mAb EN10.
- 25 La Figura 9 muestra que la administración del mAb EN10 mejora el curso de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en un modelo profiláctico animal de esclerosis múltiple. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el ejemplo 9.
- 30 La Figura 10A muestra que la administración del mAb EN10 mejora los síntomas de la esclerosis múltiple de EAE en un modelo terapéutico animal. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 10.
- 35 La Figura 10B muestra que la administración del mAb EN10 disminuye las puntuaciones histopatológicas del SNC de EAE en un modelo terapéutico animal. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 10.
- La Figura 10C muestra que la administración del mAb EN10 mejora las puntuaciones de desmielinización del SNC de EAE en un modelo terapéutico animal.  
Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 10.
- 40 La Figura 10D muestra que la administración del mAb EN10 alivia la inflamación del SNC de EAE en un modelo terapéutico animal. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el ejemplo 10.
- 45 La Figura 11A muestra que la administración del mAb EN10 alivia los síntomas de la artritis en el modelo de roedores de artritis inducida por anticuerpos de colágeno. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 11.
- 50 La Figura 11B muestra que el tratamiento del mAb EN10 regula por disminución la IL1-b sinovial en el modelo de roedores de artritis inducida por anticuerpos de colágeno. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 11.
- 55 La Figura 11C muestra que el tratamiento del mAb EN10 regula por disminución la MMP9 sinovial en el modelo de roedores con artritis inducida por anticuerpos de colágeno. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 11.
- 60 Las Figuras 12A y 12B muestra la generación de hibridomas de anticuerpo frente a ENO1 de rata anti-ratón y la verificación de cada uno de los clones de anticuerpos monoclonales mediante el ELISA de unión y el ELISA de competición. La lectura de la DO de los ensayos ELISA se muestra al lado de cada clon. Los procedimientos para la generación de hibridomas y la producción de cada anticuerpo y la verificación del anticuerpo mediante el ELISA de unión y el ELISA de competición se describieron en el Ejemplo 12. Los datos muestran que 5 de los 75 anticuerpos de hibridomas pueden reconocer el epítipo ortólogo del mAb EN10 en la proteína ENO1 de ratón.
- 65 La Figura 13 muestra los resultados del ELISA de unión de ENO1 por 5 anticuerpos frente a ENO1 de rata anti-ratón aislados de los sobrenadantes de hibridomas individuales. La purificación con sulfato de amonio y la purificación en columna de proteína A se realizaron como se describe en el Ejemplo 1. Estos datos muestran la Kd del 7E5 ENO1 de rata anti-ratón



La figura 14A. muestra que la administración del anticuerpo 7E5 ENO1 de rata anti-ratón mejora los síntomas de la esclerosis múltiple de EAE en un modelo terapéutico animal. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 14.

5 La Figura 14B muestra que la administración del anticuerpo 7E5 ENO1 de rata anti-ratón disminuye las puntuaciones histopatológicas del SNC de la EAE en un modelo terapéutico animal. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 14.

10 La Figura 14C muestra que la administración del anticuerpo 7E5 ENO1 de rata anti-ratón mejora las puntuaciones de desmielinización del SNC de EAE en un modelo terapéutico animal. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 14.

15 La Figura 14D muestra que la administración del anticuerpo 7E5 ENO1 de rata anti-ratón alivia la inflamación del SNC de EAE en un modelo terapéutico animal. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el ejemplo 14.

### Descripción detallada de la invención

20 Las realizaciones de la divulgación se refieren a métodos para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos relacionados con la ENO1. Las enfermedades o trastornos relacionados con la ENO1 son enfermedades inflamatorias o trastornos inmunitarios. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y lupus eritematoso sistémico. Los ejemplos de trastornos inmunitarios incluyen enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, alergia, psoriasis, diabetes mellitus de tipo 1, arteriosclerosis y osteoporosis. Los métodos utilizan un antagonista que puede unirse a ENO1 para inhibir su función como receptor  
25 del plasminógeno. Mediante dicha inhibición, se inhibe la activación del plasminógeno, por lo que se previenen o reducen las reacciones posteriores que involucran la actividad de la plasmina. Los antagonistas contra ENO1 pueden ser anticuerpos, que pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales u otros anticuerpos modificados que pueden unirse a ENO1 e inhibir la función de ENO1 en la activación de plasminógeno.

30 Las realizaciones de la invención se ilustrarán adicionalmente con ejemplos específicos que se exponen a continuación. Un experto en la técnica apreciaría que estos ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

### Ejemplos

35

#### Ejemplo 1

40 Para evaluar la afinidad de unión a ENO1 del anticuerpo mAb EN10 contra ENO1 anti-humano, se cultivaron hibridomas en RPMI que contenía 10 % de suero bovino fetal (FCS). Después de una semana de cultivo, se recogieron  $1 \times 10^6$  células, se lavaron con PBS, se resuspendieron en 200 ul de medio RPMI y se inyectaron en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) mediante inyección i.p. Tres semanas después, se recogieron ascitis de los ratones y se diluyeron a 15 ml. El anticuerpo se purificó adicionalmente mediante una columna con 40 % de sulfato de amonio y proteína A (kit de purificación de anticuerpos Montage Millipore) de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. El anticuerpo purificado se concentró con un dispositivo de filtro centrífugo Amicon Ultra-15,  
45 siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante (Millipore). La pureza del anticuerpo se analizó mediante SDS PAGE al 12 %.

50 Una placa de ELISA de 96 pocillos se revistió con cuatrocientos (400) ng de proteína ENO1 humana y la placa se lavó adicionalmente con PBS. Se añadieron a la placa diluciones en serie de  $1 \times 10^{-12}$  to  $1 \times 10^{-8}$  M del anticuerpo mAb EN10 y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se añadió una IgG de cabra anti-ratón conjugada con hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT). Después de 1 hora, se añadieron 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y se leyó la DO405. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Las lecturas de la DO y las concentraciones de anticuerpos se utilizaron para hacer un gráfico de dispersión múltiple utilizando Sigmoidplot. Los valores de  $K_d$  se predijeron mediante un ajuste logístico de cuatro parámetros.

55 Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 1. El anticuerpo mAb EN10 tenía productividades de 20,4 mg a 4,6 mg por ratón. El valor de la  $K_d$  del anticuerpo mAb EN10 fue de  $2,03 \pm 0,12 \times 10^{-10}$  M (N = 3). Este resultado sugiere que el anticuerpo mAb EN10 puede reconocer la proteína ENO1 humana y tiene una afinidad favorable con un valor de  $K_d$  de aproximadamente  $2,03 \pm 0,12 \times 10^{-10}$  M (N = 3).

60

#### Ejemplo 2

65 Se sabe que la proteína ENO1 está regulada por aumento en monocitos inflamatorios de ratón *in vivo* e *in vitro* (Wygrecka, M. et al. (2009) Blood. 113: 5588-5598). Para evaluar el nivel de expresión de ENO1 en PBMC humanas en el estado inflamatorio, se extrajeron muestras de sangre fresca de voluntarios normales siguiendo los códigos de los comités del IRB del Centro de Desarrollo de Biotecnología, Taiwán. La sangre se procesó para purificar las PBMC

utilizando centrifugación en gradiente Ficoll-Hypaque. La densidad de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Francia) se ajustó a aproximadamente 1,077 g / ml. Las células cosechadas se cultivaron en RPMI que contenía suero bovino fetal al 10 % hasta una densidad celular de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células / ml. La viabilidad de las células se comprobó con tinciones de azul tripán para confirmar que el porcentaje total de linfocitos era superior al 90 %. Las PBMC se trataron  
 5 adicionalmente con 10 microgramos / ml de lipopolisacárido (LPS) durante 6 horas. Las células se lavaron con PBS dos veces y se sometieron a análisis de citometría de flujo. Las células intactas se tiñeron con o sin mAb EN10 (dilución 1:300) y con anticuerpo CD11b o Mac3 antihumano de rata. Las células teñidas se visualizaron con IgG anti-ratón de cabra conjugada con FITC para el mAb EN10 e IgG anti-rata conjugada con PE para el anticuerpo CD11b o Mac3 (Becton Dickinson). Las muestras se analizaron después con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). La  
 10 expresión de ENO1 y CD11b+ se midió por la intensidad de fluorescencia resultante.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 2A. El tratamiento de PBMC normales con LPS y mAb EN10 desplaza el histograma hacia la derecha, en comparación con la incubación de células sin LPS y con mAb EN10. Esta observación indica que las PBMC normales expresan ENO1 en su superficie celular cuando las células están en  
 15 condición de inflamación (por ejemplo, estimuladas con LPS). Además, se pueden identificar poblaciones celulares con alta expresión de ENO1. Como se muestra en la figura 2B y la figura 2C, las poblaciones celulares Mac3+ y CD11b+ también aumentan en las PBMC humanas tratadas con LPS en comparación con las células sin tratamiento. La población de células de expresión alta de ENO1 se correlaciona con las células CD11b<sup>alto</sup> y Mac3<sup>alto</sup> (FIG. 2B y la figura 2C). Estos resultados indican que la proteína ENO1 está regulada por aumento en las superficies de los  
 20 monocitos y macrófagos activados.

### Ejemplos 3

El estudio de Wygrecka indica que la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 es muy importante para que los  
 25 monocitos transmigran a sitios inflamatorios (Wygrecka, M. et al., (2009), Blood., 113:5588-5598). Para evaluar la capacidad del mAb EN10 para inhibir la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 de los monocitos humanos, se desarrolló una línea celular de monocitos U937 humanos en RPMI que contenía FCS al 10 %. Las células se trataron con 10 microgramos / ml de LPS durante 6 horas para inducir la expresión de la proteína ENO1 en la superficie celular. A continuación se preincubaron  $1,5 \times 10^6$  células / ml en PBS con 1 microgramo / ml de Lys-plasminógeno humano y  
 30 10 microgramos / ml de mAb EN10 durante una hora, respectivamente. Las muestras se lavaron con PBS dos veces y luego se añadieron activador de plasminógeno específico de tejido 3 nM y de sustrato cromogénico S-2251 0,5 mM. Tras una hora de incubación a 37 °C, se leyó la DO 405. Cada estudio se repitió tres veces y se analizó la actividad antagonista. Los datos se presentaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Se usó la prueba T para comparar cada grupo. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3. El mAb EN10 tenía una elevada actividad antagonista del receptor de plasminógeno ENO1 y puede alcanzar una inhibición del 100 % de la actividad de ENO1 específica  
 40 inducida por LPS. Por lo tanto, el mAb EN10 tendría un buen potencial para inhibir la trans migración de los monocitos a los órganos diana.

### Ejemplos 4

El resultado del ejemplo 3 sugiere que el mAb EN10 puede inhibir la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 y  
 45 da como resultado la inhibición de la activación del plasminógeno y la actividad de trans migración en los monocitos humanos estimulados con LPS. Este resultado está apoyado además por otros informes de la literatura que indican que los monocitos de ratones sin plasminógeno pierden la capacidad de migración y la actividad de infiltración en un modelo de inflamación no infecciosa de ratón (Ploplis, V.A. et al., (1998) Blood, 91:2005-2009).

Para evaluar si comprometer la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 da como resultado el alivio de la  
 50 actividad de invasión de los monocitos activados, se desarrolló una línea celular U937 de monocitos humanos en RPMI que contenía FCS al 10 %. Las células se trataron con 10 microgramos / ml de LPS durante 6 horas para inducir la expresión de la proteína ENO1 en la superficie celular. Después de mezclarse con 5 a 50 microgramos / ml del mAb EN10, se sembraron  $2 \times 10^4$  células en la cámara superior de un sistema de ensayo de dos cámaras que contiene 15 micromolar de Lys-plasminógeno y se incubaron durante 24 horas con medios que contenían 10 % de FBS y MCP-1  
 55 10 nM en la cámara inferior. Se usó una IgG anti-ratón como grupo de control negativo. Se separaron dos cámaras mediante un filtro de microporos (tamaño de poro de 8 micrómetros) recubierto con matrigel. Después del período de incubación, las células en la cámara inferior se contaron con un hemocitómetro bajo un microscopio. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE. Se usó la prueba T para comparar cada grupo. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados se muestran en la figura 4. Cuando las células U937 tratadas con LPS se trataron con 5 a 50  
 60 microgramos / ml de mAb EN10, la actividad de invasión de U937 fue de  $90,2 \pm 2$  % a  $49,1 \pm 1$  % ( $N = 3$ ) de la IgG control. Estos resultados indican que el mAb EN10 puede aliviar la capacidad de invasión de los monocitos U937 activados al comprometer la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 de una manera dependiente de la dosis. Al apuntar a la proteína ENO1 en la superficie de los monocitos inflamatorios, es posible inhibir que las células entren  
 65 en los sitios afectados utilizando el mAb EN10.

## Ejemplos 5

Para conocer el nivel de expresión de ENO1 en la superficie celular después de la estimulación inflamatoria, se cultivaron monocitos U937 humanos en RPMI que contenía FCS al 10 %. Las células se trataron con 10 microgramos / ml de LPS durante 6 horas para inducir la expresión de la proteína ENO1 en la superficie celular. Para el análisis de citometría de flujo, las células completas intactas se tiñeron con o sin mAb EN10 (dilución 1:300), se visualizaron con antisuero de cabra conjugado con FITC (Jackson Lab) y se analizaron con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). La expresión de ENO1 se midió por la intensidad de fluorescencia resultante.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 5. La incubación de U937 con LPS y mAb EN10 desplaza el histograma hacia la derecha, en comparación con la incubación de células sin LPS pero con mAb EN10. Este resultado indica que las células U937 expresan ENO1 en sus superficies celulares cuando son estimuladas con LPS. Estos datos respaldan la idea de que el mAb EN10 reconoce la ENO1 de superficie inducida por LPS en los monocitos.

## Ejemplo 6 Mapeo de epítomos

### Mapeo de epítomos de anticuerpos

Para determinar el epítipo del mAb EN10 en la proteína ENO1 humana, se diseñaron dos cebadores directos, con las secuencias de nucleótidos de 5'-GGATCCGAGCAAACCTTCAGGGAAGCCATG-3' (SEQ ID NO:1) y 5'-GGATCCTCGAAGATC- CTTTGACCAGGATG-3' (SEQ ID NO:2) y un cebador inverso 5'-TCAGGCTGAAAATCTCTCATCCGC-3' (SEQ ID NO:3). Se usó un plásmido de expresión en *E. coli* pTRC-HIS ENO1 que contiene el gen de ADNc de ENO1 humana como molde para amplificar mutantes de delección de ENO1. Se usaron los cebadores con las SEQ NO:1 y SEQ NO:2 como cebadores directos, con la SEQ ID NO:3 como cebador inverso, para amplificar las mutantes de delección  $\Delta$ 1-189 (Fig. 6A) y  $\Delta$ 1-297 (Fig. 6A), respectivamente. El otro conjunto de cebadores con las secuencias de 5'-GGATCCTATCTATTCTCAAGATCCATGCC-3' (SEQ ID NO:4) y 5'-CTCGAGGTCATGGTGTCTCATCGTTCGCTCGAG-3' (SEQ ID NO:5) se usó para amplificar un mutante de delección  $\Delta$ 297-434 (Fig. 6A). Para la amplificación de cada mutante se preparó una solución de reacción que tenía una composición de 1 microlitro de una dilución 1:1000 de ADN molde aproximadamente 0,1 ng, 5 microlitro de 10xtampón de reacción, 1 microlitro de mezcla de dNTP 10 mM, 1 microlitro de 2,5 unidades de *Taq* polimerasa, 1 microlitro del cebador directo y 1 microlitro del cebador inverso, en un volumen final de 50 microlitros con agua destilada doble y se sometió a PCR. Se utilizó un ciclo de 94 grados C durante 10 minutos, luego se repitió un ciclo de 94 grados C durante un minuto, 52 grados C durante un minuto y 72 grados C durante 1 minuto se repitió 35 veces, y la reacción se incubó a 72 grados C durante 10 minutos más. Esta solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2 % para analizar los productos de reacción. Los productos de reacción con los pesos moleculares correctos se ligaron en un vector pCR 2.1-TOPO (fabricado por Invitrogen) para la subclonación de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. A continuación se usaron los cebadores M13 directo 5'-GTAAACAACGACGGCGAG--3'(SEQ ID NO: 6) y M13 inverso 5'- CAG GAAACA GCT ATG AC--3' (SEQ ID NO: 7) para determinar la secuencia de nucleótidos. Cada clon de mutación con la secuencia correcta se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I y los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2 %. El fragmento de inserción de cada mutante se cortó del gel de agarosa y se purificó con un kit de limpieza de genes de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (BIO101). El fragmento de ADN de *Bam*HI y *Xho*I de cada mutante se ligó a los sitios *Bam*HI y *Xho*I de un vector de expresión en *E. coli* pTRC His A (Invitrogen). El plásmido resultante se transformó en *E. coli* BL21 Rosseta. La proteína de mutación ENO1 se expresó en *E. coli* por inducción con IPTG y se purificó con agarosa de Ni de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (Qiagen) después de que se aplicaron ultrasonidos al sedimento de bacterias. La pureza de cada mutante se analizó mediante SDS PAGE al 12 %. Para determinar la actividad de unión de cada proteína mutante, una placa ELISA de 96 pocillos se revistió con 400 ng de cada proteína mutante ENO1 humana y la placa se lavó con PBS. Se añadieron 10 microgramos de mAb EN10 a la placa y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar el complejo de unión con PBS dos veces, se añadió una IgG anti-ratón de cabra conjugada con HPRT. Después de 1 hora de incubación, se añadió TMB. La afinidad de unión se determinó por las lecturas de la DO 405. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE. Se usó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados se muestran en la figura 6A. Los mutantes de ENO1  $\Delta$ 1-189 y  $\Delta$ 1-297 tienen lecturas de DO405 de aproximadamente  $1,43 \pm 0,18$  y  $1,56 \pm 0,08$  ( $N = 3$ ) (en la Figura 6A), que son aproximadamente el 42 % y el 39 % de las de la ENO1 de tipo salvaje ( $2,87 \pm 0,08$ ) ( $N = 3$ ), respectivamente. Sin embargo, cuando se eliminaron los restos de aminoácidos de 297 a 434, se perdió la actividad de unión de este mAb ENO1 a la EN10 mutada, en comparación con el fondo de BSA. Estos resultados sugieren que se requieren restos de aminoácidos de 297 a 434 para la unión de la proteína ENO1 al mAb EN10 y la disminución en la actividad de unión de los mutantes  $\Delta$ 1-182 y  $\Delta$ 1-297 puede deberse a la inestabilidad o al cambio de conformación de las proteínas mutantes.

Para explorar adicionalmente el epítipo del mAb EN10 en la proteína ENO1, se diseñaron 5 cebadores inversos con las secuencias de 5'- CTCGAGAGGGATCTTCGATAGACACCACTGGG -3' (SEQ ID NO:8), 5'-

CTCGAGCTACCTGGATTCTGCACT- GGCTG-3' (SEQ ID NO:9), 5'-  
 CTCGAGACTTCTCGTTCACGGCCTTGGCGATC-3' (SEQ ID NO:10), 5'-CTCGAGACT-  
 TCTCGTTCACGGCCTTGGCGATCC-3' (SEQ ID NO:11), 5'-CTCGAGCAGTCTCCCCGAACGATGAGACACC-3'  
 (SEQ ID NO:12), and 5'-CTCGAG CACCAGTCTTGATCTGCCAGTGCAC-3' (SEQ ID NO:13). Se usó un plásmido  
 5 de expresión en *E. coli* pTRC-HIS ENO1 que contiene el gen de ADNc de ENO1 humana como molde para amplificar  
 los mutantes de delección de ENO1. La SEQ ID NO: 4 se usó como cebador directo para amplificar los mutantes de  
 delección 296-434, 316-434, 336-434, 376-434 y 396-434 con los cebadores de SEQ ID NO:8, SEQ ID:9, SEQ ID: 10,  
 SEQ ID:11, SEQ ID:12 y SEQ ID:13, respectivamente. Para la amplificación de cada mutante se preparó una solución  
 10 de reacción que tenía una composición de 1 microlitro de una dilución 1:1000 del ADN molde aproximadamente 0,1  
 ng, 5 microlitros de 10xtampón de reacción, 1 microlitro de mezcla de dNTP 10 mM, 1 microlitro de 2,5 unidades de  
*Taq* polimerasa, 1 microlitro del cebador directo y 1 microlitro del cebador inverso, en un volumen final de 50 microlitros  
 con agua destilada doble y se sometió a PCR. Se utilizó un ciclo de 94 grados C durante 10 minutos. A continuación,  
 se repitió un ciclo de 94 grados C durante un minuto, 52 grados C durante un minuto y 72 grados C durante 1 minuto  
 15 se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2 % para analizar los productos de reacción. Los productos de reacción  
 con los pesos moleculares correctos se ligaron en un vector pCR 2.1-TOPO (fabricado por Invitrogen) para la  
 subclonación de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. A continuación se usaron los cebadores directo M13  
 (5'-GTAAACAACGACGGCGAG--3'(SEQ ID NO: 6) e inverso M13 (5'- CAG GAAACA GCT ATG AC- -3' (SEQ ID NO:  
 20 7) para determinar la secuencia de nucleótidos. Cada clon de mutación con la secuencia correcta se digirió con las  
 enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I y el producto de la digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2  
 %. El fragmento de ADN de cada mutante se aisló del gel de agarosa y se purificó con un kit Gene Clean de acuerdo  
 con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (BIO101). El fragmento de ADN de *Bam*HI y  
*Xho*I de cada mutante se ligó en los sitios *Bam*HI y *Xho*I de un vector de expresión de *E. coli* pTRC His A (Invitrogen).  
 El plásmido resultante se transformó en *E. coli* BL21 Rosseta. La proteína de mutación ENO1 se expresó en *E. coli*  
 25 por inducción con IPTG y se purificó con agarosa de Ni de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto  
 proporcionado por el fabricante (Qiagen) después de que se aplicaron ultrasonidos al sedimento de bacterias. La  
 pureza de cada mutante se analizó mediante SDS PAGE al 12 %. Para determinar la actividad de unión de cada  
 proteína mutante, una placa ELISA de 96 pocillos se revistió con 400 ng de la proteína ENO1 o la proteína mutante y  
 la placa se lavó con PBS. Se añadieron 10 microgramos de mAb EN10 y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después  
 30 de lavar el complejo de unión con PBS dos veces, se añadió una IgG anti-ratón de cabra conjugada con HPRT.  
 Después de 1 hora de incubación, se añadió TMB. La afinidad de unión se determinó por las lecturas de la DO 405.  
 Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media ± DE. Se usó la prueba T para comparar la  
 actividad entre cada grupo. Los valores de p <0,05 se consideran estadísticamente significativos.

35 El 12 % de SDS PAGE de cada mutante y la proteína de tipo salvaje se muestran en la figura 6B. El peso molecular  
 de cada mutante aumenta desde el mutante 296-343 hasta el tipo salvaje. Este resultado sugiere que se puede  
 producir la proteína completa a partir de cada mutante, aunque se puede ver cierta degradación de los mutantes 336-  
 434 y 376-434. Como se muestra en la figura 6C, no hay una diferencia significativa entre la afinidad de unión a mAb  
 EN10 de la ENO1 de tipo salvaje y la de los mutantes por delección 336-434, 376-434 y 369-343. Sin embargo, cuando  
 40 se eliminan los restos de aminoácidos de 296 a 316 y 317 a 336, se pierden las actividades de unión del mAb EN10  
 de estos dos mutantes de ENO1, en comparación con las del fondo del lisado celular de *E. coli*. Estos resultados  
 sugieren que los restos de aminoácidos de aproximadamente 296 a aproximadamente 336  
 (296FDQDDWGAWQKFTASAGIQWGDDLTVTNPKRIAKAVNEKS<sup>336</sup>, SEQ ID NO:39) son importantes para la unión de  
 la proteína ENO1 con el mAb EN10.

### Ejemplo 7 Barrido de alanina

Para explorar más a fondo qué restos de 296 a 336 de ENO1 humano son importantes para la unión del mAb EN10,  
 la estructura cristalina de ENO1 se descargó del banco de datos de proteínas (entrada pdb: 2PSN). Después del  
 50 análisis de la estructura, se predice que los restos de aminoácidos D300, W301, G302, Q305, K306, A309, K326,  
 K330, N333, E334 y K335 estarán expuestos en la superficie de la proteína y son candidatos a las mutaciones para  
 analizar si son realmente importantes para la unión de mAb EN10. 10 de estos 11 restos se eligieron para ser mutados  
 a alanina, a excepción de A309, que se mutó a glicina utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II  
 de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (Agilent Technology). Los  
 55 siguientes oligonucleótidos mutagénicos para el barrido de alanina (Tabla 1) fueron generados por Genomics  
 BioScience and Technology Co., Ltd.

TABLA 1: Secuencias oligonucleotídicas

60 5'-GATCCCTTTGACCAGGATGCCTGGGGAGCTTGGCAG-3' (SEQ ID NO:14)  
 5'-CTGCCAAGCTCCCCAGGCATCCTGGTCAAAGGGATC-3' (SEQ ID NO: 15)  
 5'-CCCTTTGACCAGGATGACGCGGGAGCTTGGCAGAAG-3' (SEQ ID NO: 16)  
 5'-CTTCTGCCAAGCTCCCGCGTCATCCTGGTCAAAGGG-3' (SEQ ID NO:17 )  
 5'-CTTTGACCAGGATGACTGGGCAGCTTGGCAGAAGTTC-3' (SEQ ID NO: 18)  
 5'-GAACCTCTGCCAAGCTGCCAGTCATCCTGGTCAAAG-3' (SEQ ID NO:19)  
 65 5'-GACTGGGGAGCTTGGCGAAGTTCACAGCCAGTGCA-3' (SEQ ID NO:20)  
 5'-TGCACTGGCTGTGAACCTCGCCCAAGCTCCCCAGTC-3' (SEQ ID NO:21)

5'-GGGGAGCTTGGCAGGCGTTCACAGCCAGTGCAGG-3' (SEQ ID NO:22)  
 5'-CCTGCACTGGCTGTGAACGCCTGCCAAGCTCCCC-3' (SEQ ID NO:23)  
 5'-GGCAGAAGTTCACAGGCAGTGCAGGAATCCAGGTAG-3' (SEQ ID NO:24)  
 5'-CTACCTGGATTCTGCACTGCCTGTGAACCTTCTGCC-3' (SEQ ID NO:25)  
 5 5'-TCACAGTGACCAACCCAGCGAGGATCGCCAAGGCC-3' (SEQ ID NO:26)  
 5'-GCCTTGGCGATCCTCGCTGGGTTGGTCACTGTGAG-3' (SEQ ID NO:27)  
 5'-CAACCCAAAGAGGATCGCCGCGGCCGTGAACGAGAAG-3' (SEQ ID NO:28)  
 5'-CTTCTCGTTACGGCCGCGGCGATCCTCTTGGGTTG-3' (SEQ ID NO:29)  
 5'-GAGGATCGCCAAGGCCGTGGCCGAGAAGTCTGCAAC-3' (SEQ ID NO:30)  
 10 5'-GTTGCAGGACTTCTCGGCCACGGCCTTGGCGATCCTC-3' (SEQ ID NO:31)  
 5'-GATCGCCAAGGCCGTGAACGCGAAGTCTGCAACTG-3' C (SEQ ID NO:32)  
 5'-GCAGTTGCAGGACTTCCGCTTACGGCCTTGGCGATC-3' (SEQ ID NO:33)  
 5'-GCCAAGGCCGTGAACGAGGCGTCTGCAACTGCCTC-3' (SEQ ID NO:34)  
 5'-GAGGCAGTTGCAGGACGCCTCGTTCACGGCCTTGGC-3' (SEQ ID NO:35)  
 15 5'-CAAGGCCGTGAACGCGGCGTCTGCAACTGCCTCCTG-3' (SEQ ID NO:36)  
 5'-CAGGAGGCAGTTGCAGGACGCCGCTTACGGCCTTG-3' (SEQ ID NO:37)

Para la amplificación de cada mutante se preparó una solución de reacción que tenía una composición de 3 microlitros de ADN molde aproximadamente 30 ng, 5 microlitros de 10x tampón de reacción, 1 microlitro de mezcla de dNTP 10 mM, 1 microlitro de 2,5 unidades ufp de *Taq* polimerasa, 12,5 microlitros del 125 ng de cebador directo y 12,5 microlitros de 125 ng del cebador inverso, en un volumen final de 50 microlitros con agua destilada doble y se sometió a PCR. Se utilizó un ciclo de 95 grados C durante 10 minutos. A continuación se repitió 16 veces un ciclo de 95 grados C durante 30 segundos, 55 grados C durante 30 segundos y 68 grados C durante 6 minutos. Después de la reacción de PCR, se añadió 1 microlitro de *DpnI* a cada tubo de PCR, se incubó a 37 °C durante 1 hora y luego se calentó *DpnI* para inactivar a 80 °C durante 20 minutos. Los productos de reacción se transformaron en 50 microlitros de células competentes XL1-Blue-micro de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto (fabricado por Invitrogen). Se usó un cebador ENO1 R400-420 (5'-GCAAGGGGCAC-CAGTCTTGATCTG-3' (SEQ ID NO:38)) para determinar la secuencia de nucleótidos. Todos los plásmidos de clon de mutación con secuencias correctas se transformaron en *E. coli* BL21 Rosseta. La proteína de mutación ENO1 se expresó en *E. coli* por inducción con IPTG y se purificó con agarosa de Ni de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (Qiagen) después de que se aplicaron ultrasonidos al sedimento de bacterias. La pureza de cada proteína mutante se analizó mediante SDS PAGE al 12 %.

Para determinar la actividad de unión de cada proteína mutante, una placa ELISA de 96 pocillos se revistió con 400 ng/100 microlitros de la proteína ENO1 humana o la proteína ENO1 mutante durante una noche a 4 °C y la placa se lavó con PBS. La placa se bloqueó con BSA al 1 % (p / v) en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora, después se lavó nuevamente con 1x PBS. Un anticuerpo primario (mAb EN10) se diluyó en serie 2 veces a 15 concentraciones diferentes y se añadió a la placa a 37 °C durante 1 hora. Una vez completada la reacción, la placa se lavó 3 veces con 1 x PBS. Se añadió una dilución 1/8000 de anticuerpo anti-ratón-HRP de cabra y se incubó a 37 °C durante 1 hora, luego la placa se lavó 3 veces con 1xPBS. A continuación, se añadió el sustrato TMB y la reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se detuvo añadiendo HCl 1 N y se leyó la DO 450 para determinar la actividad. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE. Las lecturas de DO y las concentraciones de anticuerpos se utilizaron para hacer un gráfico de dispersión múltiple utilizando Sigmaplot™. Los valores de  $K_d$  se predijeron mediante un ajuste logístico de cuatro parámetros.

De acuerdo con los resultados del estudio de eliminación de una gran porción de ENO1 mostrados en el Ejemplo 6, se requiere una secuencia peptídica <sup>296</sup>FDQDDWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKS<sup>336</sup> (SEQ ID NO:39) del resto número 296 a 336 para la unión estrecha de la proteína ENO1 con mAb EN10. "Unión estrecha" como se usa en el presente documento se refiere a la unión entre un agente de unión específico (por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento scFv o Fab) y un ligando / objetivo (por ejemplo, un péptido, proteína o célula) con una constante de disociación ( $K_d$ ) de 10 nM o inferior, preferentemente de 1,0 nM o inferior.

Los experimentos de delección anteriores identifican los restos 296 a 336 en ENO1 como la región para la unión del anticuerpo. Para caracterizar adicionalmente los sitios de unión reales (por ejemplo, epítomos), la estructura cristalina de ENO1 se descargó del banco de datos de proteínas (entrada pdb: 2PSN) para analizar las posiciones de los restos de esta región. Hay once restos de aminoácidos que incluyen D300, W301, G302, Q305, K306, A309, K326, K330, N333, E334 y K335 expuestos en la superficie de la proteína (FIG. 6A, epítomo putativo). Por mutagénesis dirigida al sitio, estos 11 aminoácidos se mutaron y las proteínas mutantes resultantes se expresaron en *E. coli* y se purificaron, respectivamente (FIG. 7B). Cada proteína ENO1 mutante purificada se analizó para detectar cualquier cambio en la  $K_d$  (en comparación con la unión de ENO1) utilizando ELISA.

Los resultados indican que hay tres clases funcionales de restos de aminoácidos en estos mutantes. Los restos de aminoácidos W301 y K330 son importantes para la unión entre la proteína ENO1 y el mAb EN10. Si estos dos restos de aminoácidos se mutan a alanina, respectivamente, las actividades de unión de estos dos mutantes de ENO1 a mAb EN10 se anulan significativamente. La segunda clase de restos de aminoácidos incluye A309, E334, K335 y D300. Si E334, K335 y D300 se mutan a alanina o la A309 se muta a glicina, respectivamente, se comprometen las actividades

de unión de estos mutantes ENO1 a mAb EN10. El resto de los restos de aminoácidos, incluidos G302, Q305, K306, N333 y K326, pertenecen al grupo de restos de aminoácidos que no tienen efectos de unión significativos sobre la unión de la proteína ENO1 a mAb EN10 (FIG. 7C y Tabla II). Estos resultados sugieren que W301, K330 A309, E334, K335 y D300 son importantes para la unión a proteína-proteína entre el mAb ENO1 y EN10. Estos restos de aminoácidos pertenecen a secuencias del péptido 1 de ENO1,<sup>296</sup>FD Q D W G A W Q K F TA<sup>309</sup> (FIG. 7D, SEQ ID NO:40) y el péptido 2, <sup>326</sup>K R I A K A V N EK S<sup>336</sup> (FIG. 7D, SEQ ID NO: 41), que pueden ser los epítomos de unión de mAb EN10 en los números de resto de aminoácidos 296 a 335 (FIG. 7D; SEQ ID NO:39) de ENO1 humana.

Tabla II: Valores de la K<sub>d</sub> mutante

Mutante	KD	Mutante	KD	Mutante	KD
<b>Tipo silvestre</b>	$4,43 \pm 0,65 \times 10^{-10}$	A300	$6,33 \pm 2,57 \times 10^{-8}$	A301	No detectado
A302	$3,45 \pm 0,28 \times 10^{-10}$	A305	$3,31 \pm 0,50 \times 10^{-10}$	A306	$4,65 \pm 2,42 \times 10^{-10}$
A309	$5,63 \pm 2,67 \times 10^{-9}$	A326	$7,87 \pm 1,35 \times 10^{-10}$	A330	No detectado
A333	$4,13 \pm 1,09 \times 10^{-10}$	A334	$1,07 \pm 4,39 \times 10^{-7}$	A335	$9,57 \pm 3,72 \times 10^{-9}$

## 10 Ejemplo 8

Los resultados de los ejemplos 3 y 4 sugieren que el mAb EN10 puede comprometer la actividad del receptor de plasminógeno ENO1. Esta reducción de la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 a su vez inhibe la activación del plasminógeno, lo que da como resultado el alivio de la capacidad de invasión de los monocitos U937 activados. Este resultado está apoyado además por otros informes de la literatura que indican que los monocitos de ratones sin plasminógeno pierden la capacidad de migración y la actividad de infiltración en un modelo de inflamación no infecciosa de ratón (Ploplis, V.A. et al., (1998) Blood, 91:2005-2009).

Para demostrar la eficacia del mAb EN10 en la inhibición de la infiltración de leucocitos *in vivo*, se utilizó un modelo de inflamación no infecciosa de ratón (NII) para el estudio. Doce ratones se dividieron en 4 grupos con tres ratones en cada grupo. El primer día, cada grupo recibió PBS, 6 mg / kg de peso corporal (mpk) de Enbrel, 10 mpk de IgG de ratón y 10 mpk de mAb EN10 (i.p.), respectivamente. Dos horas más tarde, a cada ratón se le inyectaron 200 microgramos de caseína (i.p.). Los ratones se mantuvieron a 25 °C durante 12 horas. A continuación, se trató a los ratones con la misma dosis del mismo fármaco, seguido de 200 microgramos de caseína después de dos horas, respectivamente. Tres horas después, se abrió el peritoneo del ratón y se recogió el fluido. Se contaron las células peritoneales totales de cada grupo. Para identificar la distribución de la población celular de monocitos y neutrófilos, las células de fluido peritoneal de cada grupo se tiñeron con el anticuerpo 1A8 de rata para neutrófilos y anti BR1 de rata para monocitos, se visualizaron con IgG anti-rata de cabra conjugada con FITC (Jackson Lab) y se analizaron con citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM. Se usó la prueba T para comparar cada grupo. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 8A y la Figura 8B. Los recuentos celulares totales promedio de ratones tratados con 6 mpk de Enbrel, vehículo y 10 mpk de IgG control son  $1,5 \pm 0,1 \times 10^7$  (N = 3),  $1,8 \times 10^7$  y  $4 \pm 0,5 \times 10^7$  (N = 3) en el peritoneo, respectivamente. Sin embargo, cuando a los mismos ratones tratados con caseína se les administran 10 mpk de mAb EN10, el recuento celular promedio en el peritoneo es de  $5 \pm 1,2 \times 10^6$  (N = 3), que es significativamente más bajo que el de los grupos de Enbrel, vehículo e IgG control. No se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con 10 mpk de mAb EN10 y el grupo no tratado ( $3,9 \pm 1,2 \times 10^6$  (N = 3)) (FIG. 8A).

Cuando se analizaron las poblaciones de células en el peritoneo, los neutrófilos representan aproximadamente del 73 % al 85 % de las células totales en el peritoneo y no se encontraron diferencias significativas entre cada grupo (excepto el grupo de tratamiento sin tratamiento previo) en este estudio (FIG. 8B). Este resultado implica que el mAb EN10 puede comprometer la actividad del receptor de plasminógeno ENO1, que a su vez, a medida que los ratones sin plasminógeno disminuyen la activación del plasminógeno en el tejido y evita que las células inflamatorias (por ejemplo, los neutrófilos) se infiltren en los sitios afectados. Por lo tanto, apuntar al receptor de plasminógeno ENO1 con el anticuerpo ENO1 tiene aplicaciones potenciales en la terapia de enfermedades inmunitarias.

## Ejemplo 9

Informes recientes de la literatura indican que la infiltración de monocitos es muy importante en la progresión de la enfermedad de esclerosis múltiple en un modelo animal con EAE. Según los datos del Ejemplo 8, se planteó la hipótesis de que la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 por el anticuerpo anti-ENO1 mejoraría los síntomas de esclerosis múltiple de EAE en un modelo animal. A doce ratones CB57 / BL / 6 hembra de siete a 10 semanas de edad se administró por vía subcutánea 100 microgramos de MOG p35-55 en adyuvante completo de Freud y luego se inyectaron por vía intraperitoneal 100 ng de toxina pertussis. Los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos con 6 ratones en cada grupo. Al segundo día, a cada grupo de ratones se inyectó por vía subcutánea 200 microlitros de 10 mpk de mAb EN10 e IgG de ratón, respectivamente. Al tercer día, se administró la otra dosis de 100 ng de toxina pertussis por vía intraperitoneal. Se observó a los animales diariamente y los síntomas clínicos se evaluaron de la siguiente manera: 0, sin signos; 1, disminución del tono de la cola; 2, monoparesia leve o paresia; 3, paraparesia severa; 4, paraplejía y / o tetraparesia; 5 moribundos o muerte. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las

pautas prescritas por el comité de Cuidado y Uso de Animales en el Centro de Desarrollo de Biotecnología, Taiwán.

Los resultados se muestran en la Figura 9. Cada grupo de ratones comenzó a mostrar los síndromes de EAE el día 7 y no hubo diferencias significativas en las puntuaciones clínicas entre los dos grupos desde los días 7 hasta el día 12.

5 En el grupo de tratamiento con mAb EN10, los ratones alcanzan la meseta de la enfermedad el día 13 con una puntuación clínica máxima promedio de aproximadamente  $2,7 \pm 0,32$  (N = 6). A continuación, los ratones entraron en la fase de remisión de EAE hasta el día 28, momento en el que se terminó el estudio. En contraste, los ratones tratados con la IgG de ratón alcanzaron la meseta de la enfermedad el día 16 con una puntuación clínica máxima promedio de aproximadamente  $3,3 \pm 0,21$  (N = 6). Después, estos ratones comenzaron a entrar en la etapa de remisión. Al final del estudio, ambos grupos tienen las mismas puntuaciones clínicas promedio.

Este estudio indica que el ratón tratado con el anticuerpo ENO1 tiene una puntuación clínica máxima más baja de aproximadamente 0,6 puntos en promedio, en comparación con los ratones con tratamiento con IgG. Estos datos sugieren que la inhibición de la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 para el anticuerpo confiere beneficios clínicos en el modelo profiláctico de ratón con EAE.

### Ejemplo 10

20 En el Ejemplo 9, el resultado indica que la administración de anticuerpo ENO1 confiere beneficios clínicos en el modelo profiláctico de ratón con EAE. Para explorar los efectos terapéuticos del mAb EN10 en la EM, se usó un modelo terapéutico de EAE de ratón en el siguiente estudio. A 28 ratones CB57 / BL / 6 hembra de siete a 10 semanas de edad se administró por vía subcutánea 100 microgramos de MOG p35-55 en adyuvante completo de Freud y luego se inyectaron por vía intraperitoneal 100 ng de toxina pertussis. Al tercer día, se administró otra dosis de 100 ng de toxina pertussis. Los animales se observaron diariamente y los síntomas clínicos se evaluaron de la siguiente manera: 0, sin signos; 1, disminución del tono de la cola; 2, monoparesia leve o paresia; 3, paraparesia severa; 4, paraplejia y / o tetraparesia; 5 moribundos o muerte. Hasta aproximadamente el día 10, momento en el que la puntuación clínica promedio de los ratones fue de aproximadamente 0,5, los ratones se dividieron aleatoriamente en 4 grupos con 7 ratones en cada grupo. Los días 11, 13 y 15, a los ratones del grupo 1 se les inyectaron 5 mpk de mAb EN10 por vía intraperitoneal. Se alimentó diariamente a los ratones del grupo 2 con 15 mpk de fumarato de dimetilo (DMF) dos veces al día después del día 11. Los ratones del grupo 3 se trataron como los del grupo 2, excepto que a estos ratones se les inyectaron 5 mpk de mAb EN10 por vía intraperitoneal los días 11, 13 y 15. El grupo 4 fue el grupo control al que se inyectó vehículo; a estos ratones se les inyectó PBS por vía intraperitoneal diariamente.

35 Al final del estudio, se recolectaron los tres ratones con las puntuaciones clínicas máximas cercanas a la media de cada grupo y se perfundió en la totalidad de solución de Bouin. Los cerebros y la médula espinal de estos ratones se fijaron con formalina al 10 %, se seccionaron y se tiñeron con azul Luxol rápido, así como con hematoxilina y eosina (H&E). Las puntuaciones histopatológicas de las lesiones inflamatorias meníngeas y parenquimatosas de la desmielinización fueron evaluadas por un anatomopatólogo según el método de puntuación de Shackelford (Toxicologic Pathology, Vol 30, No 1, pp93-96, 2002) de la siguiente manera: 1, mínimas; 2, leves; 3, moderadas; 4, moderadas / severas; 5, severas / altas. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM. Se usó la prueba T para comparar cada grupo. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las pautas prescritas por el comité de Cuidado y Uso de Animales en el Centro de Desarrollo para Biotecnología de Taiwán.

45 Los resultados se muestran en las Figuras 10A, 10B, 10C y 10D. Cada grupo de ratones comenzó a mostrar los síndromes de EAE el día 10 y en ese momento la puntuación clínica promedio fue de aproximadamente 0,5. Después de que los ratones comenzaron a recibir medicamentos de prueba el día 11, los ratones a los que se administró 5 mpk de mAb EN10, 15 mpk de DMF dos veces al día y la combinación de mAb EN10 y DMF, respectivamente, comenzaron a mostrar una desaceleración en la aparición de los síndromes de EAE. Los ratones de cada grupo alcanzan la meseta de la enfermedad alrededor del día 27. En ese momento, las puntuaciones clínicas máximas promedio de vehículo, 5 mpk de mAb EN10, 15 mpk e DMF dos veces al día, y los grupos de combinación de mAb EN10 y DMF son  $4,1 \pm 0,34$  (N = 7),  $2,9 \pm 0,16$  (N = 7),  $2,7 \pm 0,47$  (N = 7), y  $2,4 \pm 0,39$  (N = 7), respectivamente (FIG. 10A). El estudio finalizó el día 32 y 3 ratones en el grupo del vehículo murieron debido a la progresión de la enfermedad en el período de estudio. No hubo diferencia estadística en las puntuaciones clínicas máximas promedio en cada grupo, a pesar de que los ratones tratados con 5mpk de mAb EN10, 15 mpk de DMF dos veces al día, y la combinación de mAb EN10 y DMF mostraron beneficios de los tratamientos, como se evidencia en la disminución de las puntuaciones clínicas máximas promedio, aproximadamente 1,2, 1,4 y 1,7, respectivamente, en comparación con las del grupo de vehículo.

60 Estos resultados indican que la inhibición de la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 por el anticuerpo mostró beneficios clínicos en el modelo terapéutico de EAE de ratón, y tres dosis de 5 mpk de mAb EN10 tienen una eficacia similar a la de 15 mpk de DMF dos veces al día. Se observaron algunos efectos sinérgicos en el grupo de tratamiento de la combinación de mAb EN10 y DMF (FIG. 10A-10D).

65 Para estudiar los beneficios de la enfermedad EAE de los ratones tratados con mAb EN10 y DMF, se analizaron las incidencias histopatológicas de estas secciones del SNC en ratones. Los elementos analizados incluyen histopatología clínica total, desmielinización y puntuaciones inflamatorias del SNC y los tejidos examinados incluyen cerebro,

cerebelo, médula, vértebras cervicales, vértebras torácicas, vértebras lumbares y sacro. Los resultados se muestran en las Figuras 10B, 10C y 10D.

- 5 Las puntuaciones promedio de la incidencia de histopatología total de los ratones de los grupos de vehículo, 5 mpk de mAb EN10, 15 mpk de DMF dos veces al día, y la combinación de mAb EN10 y DMF son  $40,7 \pm 7,1$  (N = 3),  $15 \pm 4,4$  (N = 3),  $28 \pm 5,2$  (N = 3), y  $13 \pm 11,7$  (N = 3), respectivamente. Los ratones en el grupo de tratamiento con mAb EN10 y en el grupo de tratamiento con combinación de mAb EN10 y DMF mostraron una diferencia estadística en las puntuaciones de incidencia histopatológica promedio totales por ratón, en comparación con la del grupo de vehículo, con valores de P de 0,025 y 0,004, respectivamente (FIG. 10B). Este resultado indica que los ratones tratados con mAb EN10 o la combinación de mAb EN10 y DMF tienen patología total y beneficios de lesiones en el SNC de la enfermedad por EAE. Cuando se compararon las puntuaciones de desmielinización del SNC, los resultados se muestran en la Figura 10C. Las puntuaciones promedio totales de desmielinización por ratón en el SNC de los grupos de vehículo, 5 mpk de mAb EN10, 15 mpk de DMF dos veces al día, y la combinación de mAb EN10 y DMF son  $13 \pm 1,8$  (N = 3),  $4,3 \pm 0,7$  (N = 3),  $7 \pm 1,0$  (N = 3), y  $3 \pm 2,3$  (N = 3), respectivamente. Todos los grupos de tratamiento farmacológico muestran una diferencia estadística en las puntuaciones promedio de incidencia de desmielinización totales por ratón en el SNC, en comparación con la del grupo de vehículo, con valores de P de 0,01 para el grupo de mAb EN10, 0,04 para el grupo de DMF y 0,04 para el grupo de tratamiento con la combinación, respectivamente. Este resultado indica que los ratones tratados con mAb EN10, o DMF, o la combinación de mAb EN10 y DMF están protegidos por los fármacos probados en este estudio, contra los daños por desmielinización del SNC en el curso de la enfermedad EAE. Este estudio está respaldado por los informes de la literatura que indican que DMF tiene efectos de protección de las neuronas en pacientes con EM (Moharreg-Khiabani, D. et al., (2009), *Current Neuropharmacology*, 7:60-64; Oh, C.J. (2012) et al., *PLoS ONE*, 7:1-10). Tres dosis de 5 mpk de mAb EN10 en el curso de la enfermedad tienen mejor eficacia que la de 30 mpk de DMF al día.
- 25 El otro parámetro examinado es la puntuación de incidencia de infiltración de leucocitos en el SNC. Los resultados se muestran en la figura 10D. La puntuación promedio total de inflamación total por ratón en el SNC de los grupos de vehículo, 5 mpk de mAb EN10, 15 mpk de DMF dos veces al día, y la combinación de mAb EN10 y DMF son  $10,3 \pm 1,18$  (N = 3),  $6,3 \pm 0,9$  (N = 3),  $9 \pm 1,0$  (N = 3) y  $2,7 \pm 1,3$  (N = 3), respectivamente. Los ratones en el grupo de tratamiento con mAb EN10 y el grupo de combinación de mAb y DMF EN10 muestran una diferencia estadística en la puntuación de inflamación total promedio por ratón en el SNC, en comparación con la del grupo de vehículo, con valores de P de 0,05 y 0,01, respectivamente (FIG. 10D.) Sin embargo, el DMF no parece tener efectos estadísticos en la prevención de la entrada de células inflamatorias en los sitios del SNC afectados. Este resultado sugiere que el mAb EN10 o el mAb EN10 combinado con DMF puede evitar que los leucocitos se infiltren en el SNC, lo que disminuye las incidencias de la enfermedad en el SNC, lo que es más importante para mejorar la desmielinización de la neurona del SNC en los síntomas de la EM.

### Ejemplo 11

- 40 el resultado de Bae (Bae, S. et al. (2013) *J. Immunology*. 189:365-372) muestra que la activación de la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 en la superficie de los monocitos incrementa las citocinas proinflamatorias, por ejemplo TNF $\alpha$  e IL $\beta$ , en las PBMC del paciente con artritis reumatoide (AR) y provoca la exacerbación de enfermedades. Cuando el epítipo del anticuerpo usado por el estudio de Bae se compara con el mAb EN10, se descubrió que el mAb EN10 se une a un epítipo diferente del estudio de Bae. El epítipo de la ENO1 antihumana utilizado en el estudio de Bae se ubica en el extremo N-terminal y la parte central de la proteína ENO1. Sin embargo, 45 el epítipo de mAb EN10 está en los restos de aminoácidos de 296 a 336. Dos anticuerpos muestran las diferentes discrepancias agonistas del receptor de plasminógeno. El anticuerpo utilizado en el estudio de Bae muestra la actividad agonista, que activa la actividad del receptor de plasminógeno de ENO1. Sin embargo, el mAb EN10 muestra actividad antagonista cuando el anticuerpo se administró en los monocitos humanos estimulados. Este estudio respalda los resultados de EM en los ejemplos 8, 9 y 10 y el estudio de Presslor en el modelo inflamatorio de pulmón que la regulación por disminución de la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 en monocitos evita que los monocitos 50 activados se infiltren en los sitios de inflamación. Ambos resultados sugieren que el efecto terapéutico de los anticuerpos contra la ENO1 en las enfermedades inmunitarias es dependiente del epítipo y algunos de los anticuerpos contra la ENO1, como el que se usa en el estudio de Bae, pueden dar como resultado en la exacerbación de las enfermedades. Para confirmar la eficacia del mAb EN10 en la AR, se realizó un estudio utilizando un modelo de roedores con artritis inducida por anticuerpos de colágeno. Se inyectó a ratones Balb / c macho de seis semanas de edad 1,5 mg / ratones de colágeno anti-tipo II monoclonal de ratón por vía intravenosa. Cuatro días después, se trató a los ratones con 50 microgramos / ratón de LPS (*E. coli* 0111B4) por vía intraperitoneal. Los ratones se dividieron en 3 grupos con tres ratones en cada grupo. Cada grupo se trató con 5 mpk de IgG de ratón, 5 mpk de mAb EN10 y 6 mpk de Enbrel, respectivamente, los días 1, 3, 5 y 7. Se observó a los animales diariamente y los síntomas clínicos se 60 evaluaron de la siguiente manera: peso corporal (todos los días), grosor de la almohadilla para la pata (día 1, 3, 7 y 10), puntuación de la artritis (día 3, 7 y 10), patología (día 10) y citocinas (ELISA). Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM. Se usó un ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls para comparar tres o más grupos. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las pautas prescritas por el comité de Cuidado y Uso de Animales en el Centro de Desarrollo de Biotecnología, Taiwán. Para el análisis de citocinas, se abrieron las rodillas y el líquido sinovial se lavó con PBS y se recogió. Las concentraciones de citocinas se analizaron con un kit ELISA de citocinas.



El resultado se muestra en la figura. 11A. El día 7, las puntuaciones promedio de artritis de 10 mpk de mAb EN10, 6 mpk de Enbrel y los grupos de vehículo son  $10 \pm 0,54$  (N = 3),  $12 \pm 0,8$  (N = 3) y  $12 \pm 0,3$  (N = 3). respectivamente. La puntuación promedio de artritis de los ratones tratados con mAb EN10 es estadísticamente diferente de la del grupo del vehículo con un valor de P de 0,0001. El día 10, las puntuaciones promedio de artritis de los grupos de 10 mpk de mAb EN10, 6 mpk de Enbrel y de vehículo son  $8,9 \pm 0,53$  (N = 3),  $7,2 \pm 0,8$  (N = 3) y  $11,7 \pm 0,3$  (N = 3). respectivamente. La puntuación promedio de artritis de los ratones tratados con mAb EN10 y 6 mpk de Enbrel son estadísticamente diferentes de la del grupo de vehículo con un valor de P inferior a 0,0001 (FIG. 11A). Los resultados de este estudio indican que comprometer la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 con el mAb EN10 redujo los síntomas de la AR en el modelo de roedores CAIA. Cuando se analizaron las citocinas IL1b y MMP9 en el líquido sinovial de ratones CAIA, las concentraciones promedio de MMP9 de los grupos tratados con mAb EN10, tratados con Enbrel y de vehículo son  $62,5 \pm 5$ ,  $34 \pm 9,4$  y  $92,5 \pm 11,25$  ng / ml (N = 3). Para las citocinas IL1b, las concentraciones promedio de los grupos tratados con mAb EN10, tratados con Enbrel y con vehículos son  $91 \pm 15,8$ ,  $68,9 \pm 31$  y  $115,6 \pm 20$  pg / ml (N = 3), respectivamente. Ambas citoquinas están reguladas por disminución en los grupos tratados con mAb EN10 y con Enbrel. Según los resultados mostrados en las Figuras 11A, 11B y 11C, se puede concluir que en ambos casos, tres dosis de 10 mpk de mAb EN10 y Enbrel tienen efectos terapéuticos en la reducción de los síntomas de la AR.

### Ejemplo 12

El resultado de los ejemplos 9, 10 y 11 sugiere que comprometer la actividad de ENO1 por un anticuerpo antagonista de ENO1 alivia los síndromes de EM y artritis reumatoide en modelos de ratones con EAE y CAIA.

Los inventores plantearon la hipótesis de que el epítipo similar de ENO1 de ratón es eficaz en enfermedades autoinmunes de ratón similares. Se contrajeron 10 mg de proteína ENO1 de ratón para generar el anticuerpo ENO1 anti-ratón de rata mediante Genescript Inc. (Piscataway, NJ, USA). Para seleccionar los hibridomas que secretaron el anticuerpo ENO1 anti-ratón de rata, se revistió una placa de ELISA de 96 pocillos con cuatrocientos nanogramos de proteína ENO1 de ratón y la placa se lavó adicionalmente con PBS. A la placa se añadieron diluciones en serie de cada sobrenadante de hibridoma y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se añadió un ensayo de IgG anti-rata de cabra conjugada con hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT). Después de 1 hora, se añadieron 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y se leyó la DO405. Se sometieron adicionalmente 75 clones positivos de 30.000 hibridomas con afinidades de unión a ENO1 de ratón para realizar el ensayo de competición de mAb EN10 (Figura 12A). Se usó una placa ELISA recubierta con proteína ENO1 de ratón para unir los sobrenadantes individuales (aproximadamente 100 microlitros) de clones de hibridomas positivos. Después de lavar la placa tres veces con PBS, se añadieron 100 nanogramos de mAb EN10 a la placa y la placa se incubó a 37 °C durante una hora. Se añadió un ensayo de IgG anti-rata de cabra conjugada con hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT). Después de 1 hora, se añadieron 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y se leyó la DO405. El resultado se muestra en la Figura 12B. Solo 5 de los 75 sobrenadantes de hibridoma tienen actividades de unión a ENO1 de ratón que compiten por el mAb EN10. Este resultado sugiere que estos 5 anticuerpos frente a ENO1 anti-ratón de rata pueden tener un epítipo en la ENO1 de ratón similar al de mAb EN10 en la ENO1 humana.

### Ejemplo 13

Para evaluar la afinidad de unión a ENO1 de 5 anticuerpos anti-ENO1 de ratón, se cultivaron hibridomas en 25 ml de medio SFM (Gibco Inc). Después de una semana de cultivo, se recogió el sobrenadante individual. El anticuerpo se purificó adicionalmente con un 40 % de sulfato de amonio y una columna de proteína A (kit de purificación de anticuerpos Montage Millipore). El anticuerpo purificado se concentró con un dispositivo de filtro centrífugo Amicon Ultra-15, siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante (Millipore Inc).

Una placa ELISA de 96 pocillos se revistió con 400 nanogramos de proteína ENO1 de ratón y la placa se lavó adicionalmente con PBS. A la placa se añadieron diluciones en serie de  $1 \times 10^{-12}$  a  $1 \times 10^{-8}$  M de anticuerpo individual y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se añadió una IgG anti-rata de cabra conjugada con hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT). Después de 1 hora, se añadieron 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y se leyó la DO405. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Las lecturas de la DO y las concentraciones de anticuerpos se utilizaron para hacer un gráfico de dispersión múltiple utilizando Sigmaplot. Los valores de Kd se predijeron mediante un ajuste logístico de cuatro parámetros.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 13. El valor de la Kd de los anticuerpos individuales varía de  $3,90 \pm 0,66 \times 10^{-10}$  M (N = 3) a  $3,39 \pm 1,89 \times 10^{-8}$  M (N=3). Debido a la baja productividad del clon 12D9, se eligió 7E5 para realizar el estudio adicional.

### Ejemplo 14

En los Ejemplos 9 y 10, el resultado indica que la administración del anticuerpo ENO1 confiere beneficios clínicos en los modelos profilácticos y terapéuticos de ratones con EAE. Para explorar si 7E5 tiene los efectos terapéuticos similares del mAb EN10 sobre la EM, se usó un modelo terapéutico de EAE de ratón en el siguiente estudio. A 18 ratones CB57 / BL / 6 hembra de siete a 10 semanas de edad se administró por vía subcutánea 100 microgramos de

- MOG p35-55 en adyuvante completo de Freud y luego se les inyectó por vía intraperitoneal 100 ng de toxina pertussis. Al tercer día, se administró otra dosis de 100 ng de toxina pertussis. Los animales se observaron diariamente y los síntomas clínicos se evaluaron de la siguiente manera: 0, sin signos; 1, disminución del tono de la cola; 2, monoparesia leve o paresia; 3, paraparesia severa; 4, paraplejia y / o tetraparesia; 5 moribundos o muerte. Hasta aproximadamente el día 10, momento en el que la puntuación clínica promedio de los ratones fue de aproximadamente 0,5, los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos con 6 ratones en cada grupo. Los días 11, 13 y 15, a los ratones del grupo 1 se les inyectaron 5 mpk de mAb 7E5 por vía subcutánea. A los ratones del grupo 2 se les inyectaron 20.000 unidades de Betaferon por vía subcutánea. El grupo 3 fue el grupo de control al que se inyectó vehículo PBS por vía subcutánea.
- Al final del estudio, se recolectaron los tres ratones con las puntuaciones clínicas máximas cercanas a la media de cada grupo y se perfundió en la totalidad de solución de Bouin. Los cerebros y la médula espinal de estos ratones se fijaron con formalina al 10 %, se seccionaron y se tiñeron con azul Luxol rápido, así como con hematoxilina y eosina (H&E). Las puntuaciones histopatológicas de las lesiones inflamatorias meníngeas y parenquimatosas de la desmielinización fueron evaluadas por un anatomopatólogo según el método de puntuación de Shackelford (Toxicologic Pathology, Vol 30, No 1, pp93-96, 2002) de la siguiente manera: 1, mínimas; 2, leves; 3, moderadas; 4, moderadas / severas; 5, severas / altas. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM. Se usó la prueba T para comparar cada grupo. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las pautas prescritas por el comité de Cuidado y Uso de Animales en el Centro de Desarrollo de Biotecnología, Taiwán.
- Los resultados se muestran en las Figuras 14A, 14B, 14C y 14D. Cada grupo de ratones comenzó a mostrar los síndromes de EAE el día 10 y en ese momento la puntuación clínica promedio fue de aproximadamente 0,5. Después de que los ratones comenzaron a recibir medicamentos de prueba el día 11, los ratones a los que se administró 5 mpk de mAb 7E5 y 20.000 unidades de Betaferon, respectivamente, comenzaron a mostrar una disminución en la aparición de síndromes de EAE. Los ratones de cada grupo alcanzan la meseta de la enfermedad alrededor del día 27. En ese momento, las puntuaciones clínicas máximas promedio de los grupos tratados con vehículo, 5 mpk de mAb 7E5 y 20.000 unidades de Betaferon son  $2,6 \pm 0,9$  (N = 6),  $1,6 \pm 0,5$  (N = 6) y  $2,1 \pm 0,4$  (N = 6), respectivamente (Figura 14A). No hubo diferencias estadísticas en las puntuaciones clínicas máximas promedio en cada grupo, a pesar de que los ratones tratados con mAb 7E5 y 20.000 unidades de Betaferon mostraron beneficios de los tratamientos, como se evidencia en la disminución de las puntuaciones clínicas máximas promedio, aproximadamente 1,0 y 0,5, respectivamente, en comparación con la del grupo de vehículo. Estos resultados indican que el anticuerpo 7E5 tiene una inhibición similar de la actividad del receptor de plasminógeno ENO1, mientras que el mAb EN10 mostró beneficios clínicos en el modelo terapéutico de EAE de ratón, aunque se unen a diferentes especies de ENO1 con epitopo similar.
- Para estudiar los beneficios de la enfermedad EAE de los ratones tratados con mAb 7E5 y Betaferon, se analizaron las incidencias histopatológicas de estas secciones del SNC en ratones. Los elementos analizados incluyen histopatología clínica total, desmielinización y puntuaciones inflamatorias del SNC y los tejidos examinados incluyen cerebro, cerebelo, médula, vértebras cervicales, vértebras torácicas, vértebras lumbares y sacro. Los resultados se muestran en las Figuras 14B, 14C y 14D.
- Las puntuaciones promedio de la incidencia de la histopatología total de los ratones de los grupos tratados con vehículo, 5 mpk de mAb 7E5 y 20.000 unidades de Betaferon son  $40,7 \pm 6,8$  (N = 3),  $14,7 \pm 9$ . (N = 3) y  $41,8 \pm 3,4$  (N = 3), respectivamente. Los ratones en el grupo de tratamiento con mAb 7E5 mostraron una diferencia estadística en las puntuaciones promedio de incidencia histopatológica total por ratón, en comparación con la del grupo de vehículo, con valores de P de 0,025 (FIG. 14B). Este resultado indica que los ratones tratados con mAb 7E5 tienen beneficios de patología total y lesiones en el SNC de la enfermedad EAE. Cuando se compararon las puntuaciones de desmielinización del SNC, los resultados se muestran en la Figura 14C. Las puntuaciones promedio de desmielinización total por ratón en el SNC de los grupos tratados con vehículo, 5 mpk de mAb 7E5 y 20.000 unidades de Betaferon son  $12,2 \pm 0,8$  (N = 3),  $5,1 \pm 1,4$  (N = 3) y  $9,1 \pm 1,1$  (N = 3), respectivamente. El grupo de mAb 7E5 muestra una diferencia estadística en las puntuaciones promedio de incidencia de desmielinización total por ratón en el SNC, en comparación con la del grupo de vehículo, con valores de P de 0,01. Este resultado indica que los ratones tratados con mAb 7E5 están protegidos, por los medicamentos probados en este estudio, de los daños por desmielinización del SNC en el curso de la enfermedad EAE.
- El otro parámetro examinado es la puntuación de incidencia de infiltración de leucocitos en el SNC. Los resultados se muestran en la figura 14D. La puntuación promedio de inflamación total por ratón en el SNC de los grupos tratado con vehículo, 5 mpk de mAb 7E5 y 20.000 unidades de Betaferon es  $10 \pm 1,9$  (N = 3),  $4,6 \pm 2,7$  (N = 3) y  $9,2 \pm 2,6$  (N = 3), respectivamente. Los ratones en el grupo de tratamiento con mAb 7E5 muestran una diferencia estadística en la puntuación promedio de inflamación total por ratón en el SNC, en comparación con la del grupo de vehículo, con valores de P de 0,05 (FIG. 14D). Sin embargo, Betaferon no parece tener efectos estadísticos en la prevención de la entrada de células inflamatorias en los sitios afectados del SNC. Este resultado sugiere que lo mismo que mAb EN10 mAb 7E5 puede evitar que los leucocitos se infiltren en el SNC, lo que disminuye las incidencias de patología en el SNC, lo que es más importante para mejorar la desmielinización de la neurona del SNC en los síntomas de EM. Los resultados de los inventores sugieren que la región peptídica de la ENO1 humana de los aminoácidos número 296 a 336 (SEC ID NO: 39), incluidas las secuencias peptídicas FDQDDWGA WQKFTA (SEC ID NO: 40) y KRIAKAVNEKS (SEQ ID NO:41) son muy importantes para que un anticuerpo inhiba la actividad del receptor de plasminógeno y como

agente terapéutico para tratar las enfermedades inmunitarias respecto a los monocitos, incluso en los ratones, la MOA es eficaz.

5 Los resultados de los Ejemplos 9, 10, 11 y 14 indican que la inhibición de la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 por los anticuerpos ENO1, independientemente de la especie, puede disminuir la activación del plasminógeno, inhibir la cascada de UPAS y reducir la degradación de la actividad de la matriz extracelular. Como resultado, se inhibe la infiltración de monocitos inflamatorios para dañar las células afectadas y esta inhibición mejora los síntomas de las inflamaciones en NII, EM en EAE y AR en modelos de CAIA. Por lo tanto, apuntar al receptor de plasminógeno ENO1 en la superficie de las células activadas (como los monocitos) se puede usar para tratar enfermedades inflamatorias y el anticuerpo frente a ENO1 contra la región peptídica de la ENO1 humana desde el número de aminoácidos 296 a 336 (SEQ ID NO: 39), incluidas las secuencias peptídicas FDQDDWGA WQKFTA (SEQ ID NO:40) y KRIAKAVNEKS (SEQ ID NO:41) es útil como un fármaco terapéutico para los pacientes con enfermedades inmunitarias.

15 Aunque la invención se ha descrito con respecto a un número limitado de realizaciones, los expertos en la técnica, que se benefician de esta divulgación, apreciarán que pueden idearse otras realizaciones que no se aparten del alcance de la invención como se describe en el presente documento. En consecuencia, el alcance de la invención debe estar limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

**Listado de secuencias**

- 20 <110> Development Center for Biotechnology
- <120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE LA ALFA-ENOLASA Y MÉTODO DE USO EN ENFERMEDADES INMUNITARIAS
- 25 <130> 17787/017WO1
- <150> 61/919,391
- 30 <151> 20/12/2013
- <160> 41
- <170> PatentIn versión 3.5
- 35 <210> 1
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Sintético
- <400> 1
- 45 ggatccgcag caaactcag ggaagccatg 30
- <210> 2
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
- <223> Sintético
- <400> 2
- 55 ggatcctcga agatccctt gaccaggatg 30
- <210> 3
- <211> 24
- <212> ADN
- 60 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintético
- 65 <400> 3
- tcaggctgaa aatctctcat ccgc 24

# ES 2 730 253 T3

5	<210> 4 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
10	<400> 4 ggatcctatc tattctcaag atccatgcc	29
15	<210> 5 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
20	<400> 5 ctcgaggta tggtgtctca tcgttcgctc gag	33
25	<210> 6 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
30	<400> 6 gtaaacaacg acggcgag	18
35	<210> 7 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
40	<400> 7 caggaaacag ctatgac	17
45	<210> 8 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
50	<400> 8 ctcgagaggg atcttcgata gacaccactg gg	32
55	<210> 9 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
60	<400> 9 ctcgagctac ctggattcct gcactggctg	30

ES 2 730 253 T3

5	<210> 10 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
10	<400> 10 ctcgagactt ctcgttcacg gccttggcga tc	32
15	<210> 11 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
20	<400> 11 ctcgagactt ctcgttcacg gccttggcga tcc	33
25	<210> 12 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
30	<400> 12 ctcgagcagt ctccccgaa cgatgagaca cc	32
35	<210> 13 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
40	<400> 13 ctcgagcacc agtcttgatc tgcccagtgc ac	32
45	<210> 14 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
50	<400> 14 gatcccttgg accaggatgc ctggggagct tggcag	36
55	<210> 15 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
60	<400> 15 ctgccaaagct cccaggcat cctggtcaaa gggatc	36

# ES 2 730 253 T3

5	<210> 16 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
10	<400> 16 cccttgacc aggatgacgc gggagcttgg cagaag	36
15	<210> 17 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
20	<400> 17 ctctgcaaa gctcccgcgt catcctggtc aaaggg	36
25	<210> 18 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
30	<400> 18 cttgaccag gatgactggg cagcttgga gaagtc	37
35	<210> 19 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
40	<400> 19 gaacttctgc caagctgcc agtcatcctg gtcaaag	37
45	<210> 20 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
50	<400> 20 gactggggag ctgggcaaa gttcacagcc agtgca	36
55	<210> 21 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
60	<400> 21 tgactggct gtgaactcg cccaagctcc ccagtc	36

# ES 2 730 253 T3

5	<210> 22 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
10	<400> 22 ggggagcttg gcaggcggtc acagccagtg cagg	34
15	<210> 23 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
20	<400> 23 cctgcactgg ctgtgaacgc ctgccaagct cccc	34
25	<210> 24 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
30	<400> 24 ggcagaagtt cacaggcagt gcaggaatcc aggtag	36
35	<210> 25 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
40	<400> 25 ctacctgat tcctgcactg cctgtgaact tctgcc	36
45	<210> 26 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
50	<400> 26 tcacagtgac caaccagcg aggatcgcca aggcc	35
55	<210> 27 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
60	<400> 27 gccttggcga tcctcgctgg gttgtcact gtgag	35

## ES 2 730 253 T3

5	<210> 28 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
10	<400> 28 caaccxaaag aggatcgccg cggccgtgaa cgagaag	37
15	<210> 29 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
20	<400> 29 ctctcgtc acggccgcg cgatcctt tgggtg	37
25	<210> 30 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
30	<400> 30 gaggatgcc aaggccgtg cggagaagtc ctgcaac	37
35	<210> 31 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
40	<400> 31 gttgcaggac ttctcgcca cggccttggc gatcctc	37
45	<210> 32 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
50	<400> 32 gatcgccaag gccgtgaac ggaagtcctg caactg	36
55	<210> 33 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
60	<400> 33 gcagttgcag gacttcgct tcacggcctt ggcgatc	37



# ES 2 730 253 T3

5	<210> 34 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
10	<400> 34 gccaaaggccg tgaacgaggc gtcctgcaac tgcctc	36
15	<210> 35 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
20	<400> 35 gaggcagtgc caggacgcct cgttcacggc cttggc	36
25	<210> 36 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
30	<400> 36 caaggccgtg aacgcggcgt cctgcaactg cctcctg	37
35	<210> 37 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
40	<400> 37 caggaggcag ttgcaggacg ccgcgtcac ggccttg	37
45	<210> 38 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Sintético	
50	<400> 38 gcaaggggca ccagtcttga tctg	24
55	<210> 39 <211> 82 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 39	
60		

ES 2 730 253 T3

Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly Ala Trp Gln Lys Phe Thr Ala Ser Ala  
1 5 10 15

Gly Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg  
20 25 30

Ile Ala Lys Ala Val Asn Glu Lys Ser Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly  
35 40 45

Ala Trp Gln Lys Phe Thr Ala Ser Ala Gly Ile Gln Val Val Gly Asp  
50 55 60

Asp Leu Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg Ile Ala Lys Ala Val Asn Glu  
65 70 75 80

Lys Ser

<210> 40  
<211> 14  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 40

10 Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly Ala Trp Gln Lys Phe Thr Ala  
1 5 10

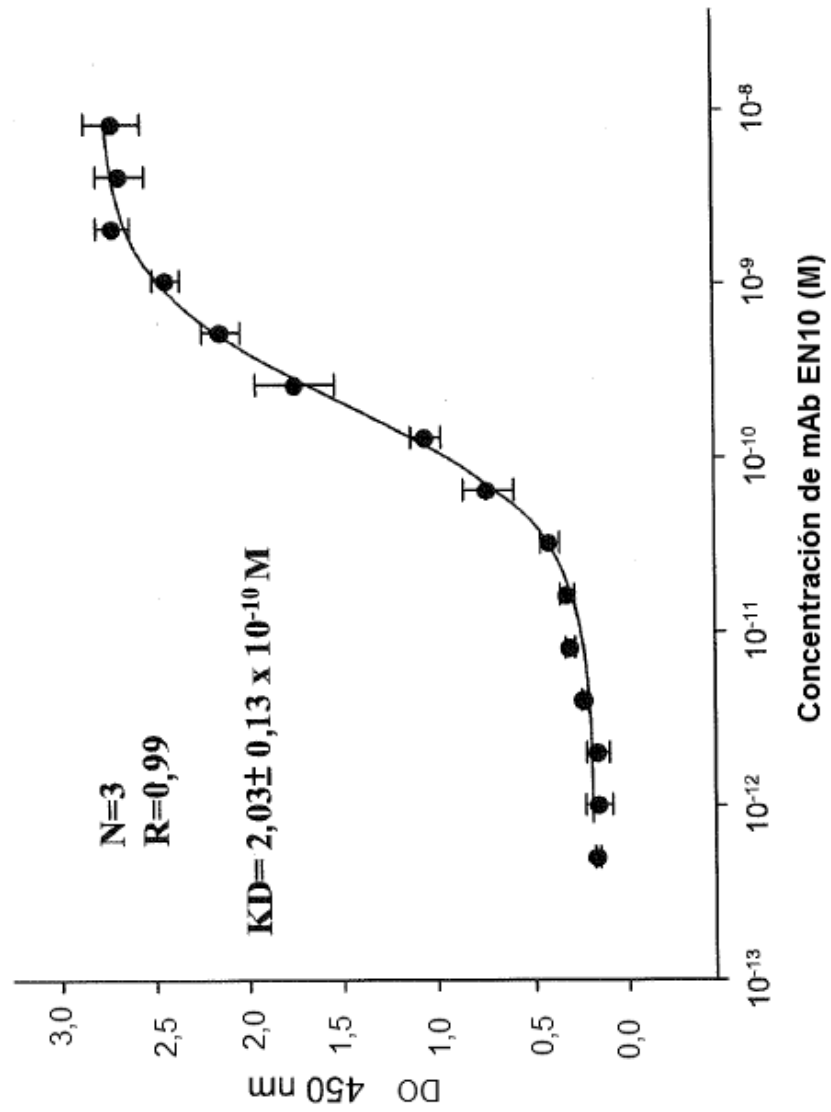
<210> 41  
<211> 11  
15 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 41

20 Lys Arg Ile Ala Lys Ala Val Asn Glu Lys Ser  
1 5 10

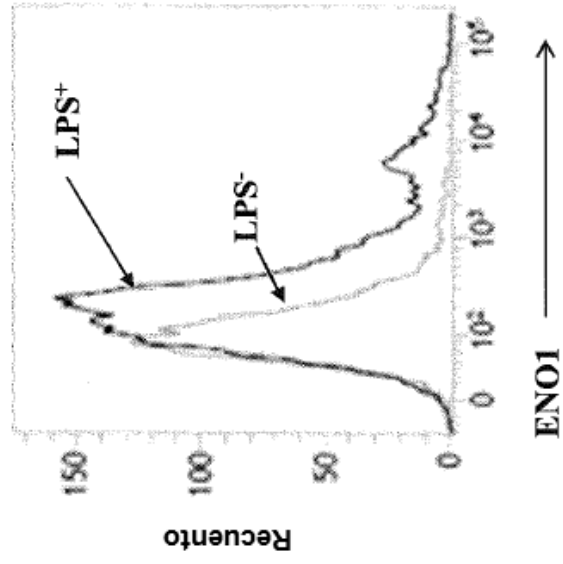
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o un trastorno inmunitario, que comprende un anticuerpo, o un fragmento scFv, Fab o F(ab)<sub>2</sub> del mismo, contra ENO1, en donde el anticuerpo, o el fragmento scFv, Fab o F(ab)<sub>2</sub> del mismo, se une específicamente a un epítipo en ENO1 e inhibe la actividad del receptor de plasminógeno ENO1, en donde el epítipo está situado en una región que consiste en la secuencia de <sup>296</sup>FDQDDWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKS<sup>336</sup> (SEQ ID NO:39) de la ENO1 humana.
- 10 2. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en la que el epítipo está situado en una región que consiste en la secuencia de <sup>296</sup>FDQDDWGAWQKFTA<sup>309</sup> (SEQ ID NO:40) o <sup>326</sup>KRIAKAVNEKS<sup>336</sup> (SEQ ID NO:41) de la ENO1 humana.
- 15 3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 20 4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humano, un anticuerpo biespecífico y un conjugado de anticuerpo y fármaco( CAF).
- 25 5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el anticuerpo puede unirse específicamente al receptor de plasminógeno ENO1 de monocitos o leucocitos.
- 30 6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la enfermedad inflamatoria o el trastorno inmunitario se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, alergia, psoriasis, diabetes mellitus de tipo 1, osteoporosis, arteroesclerosis y una combinación de los mismos en un sujeto.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un inmunomodulador.

**FIG.1**



**FIG.2A**



**FIG.2B**

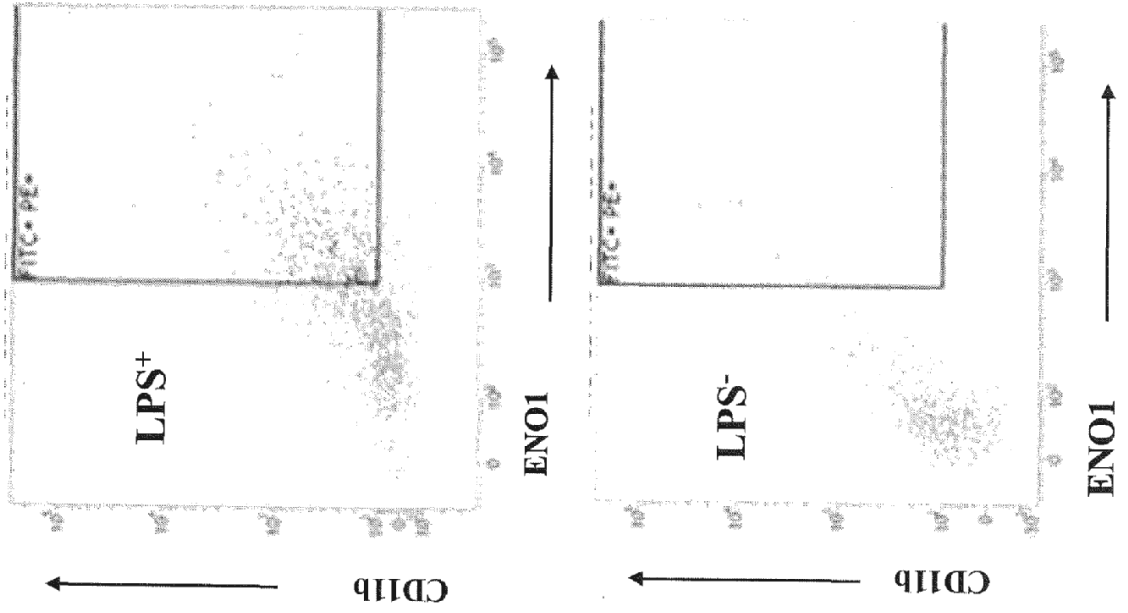
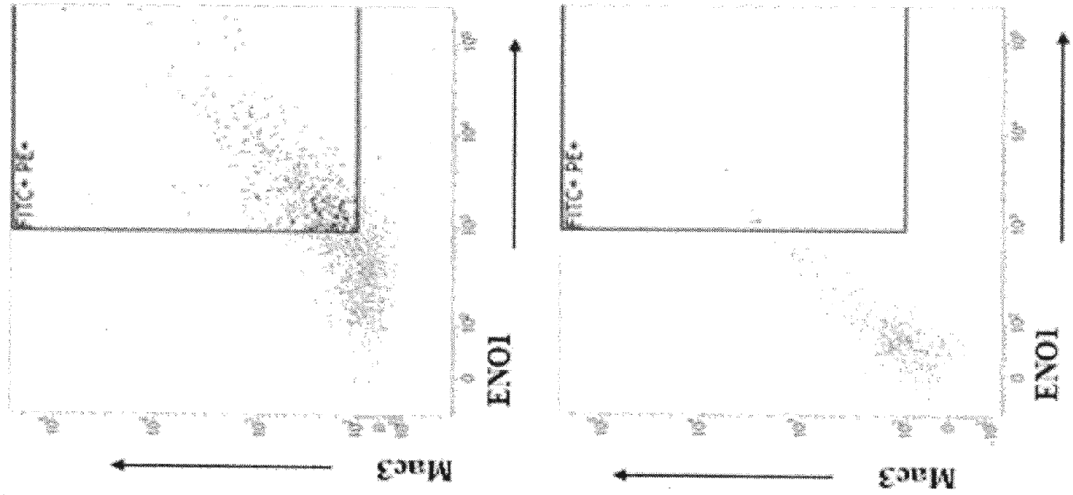
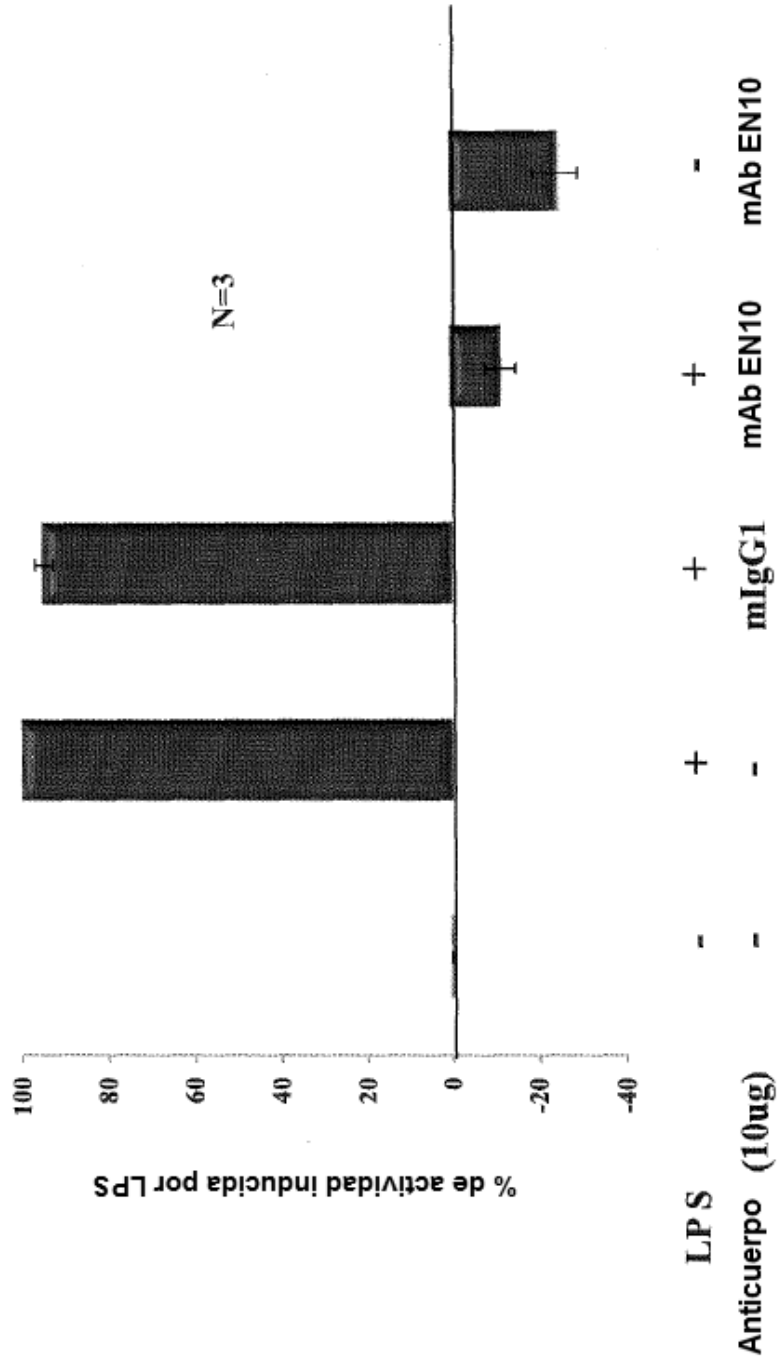


FIG.2C

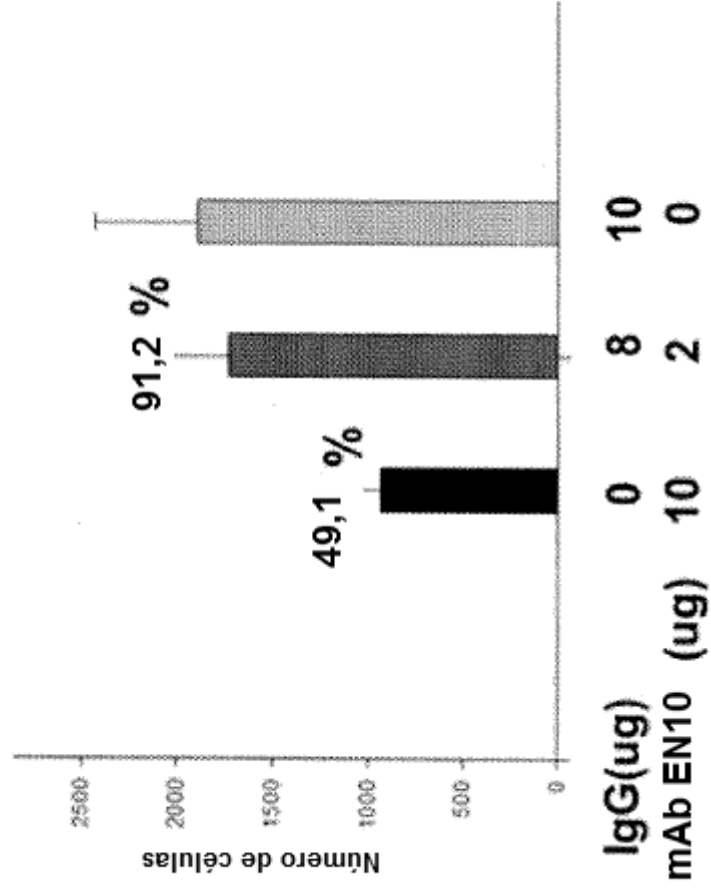


**FIG.3**





**FIG.4.**



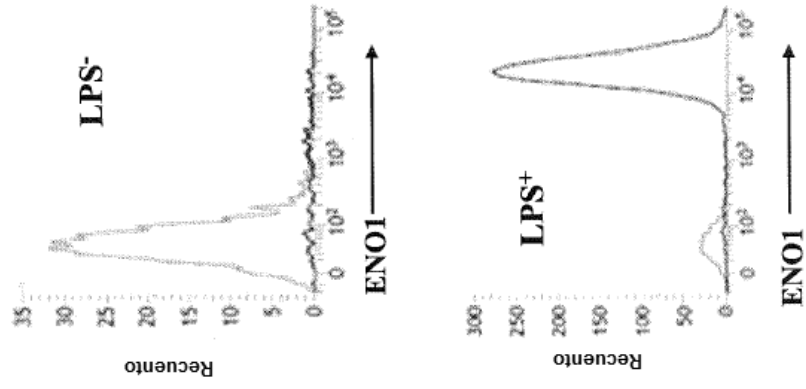
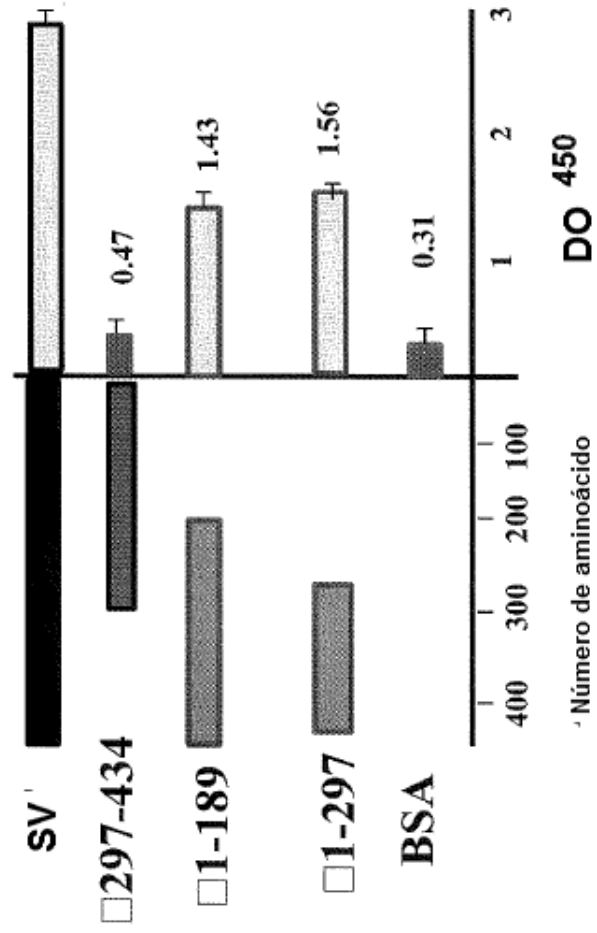


FIG.5

FIG.6A





**FIG.6B**

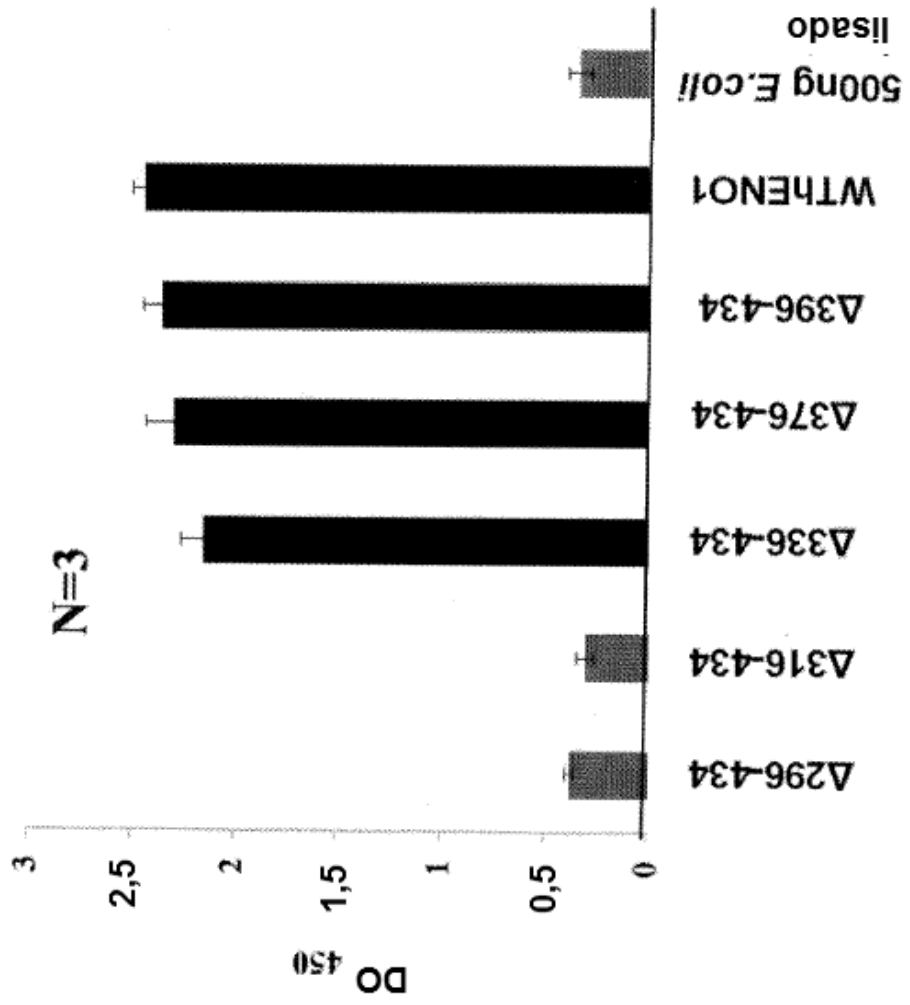
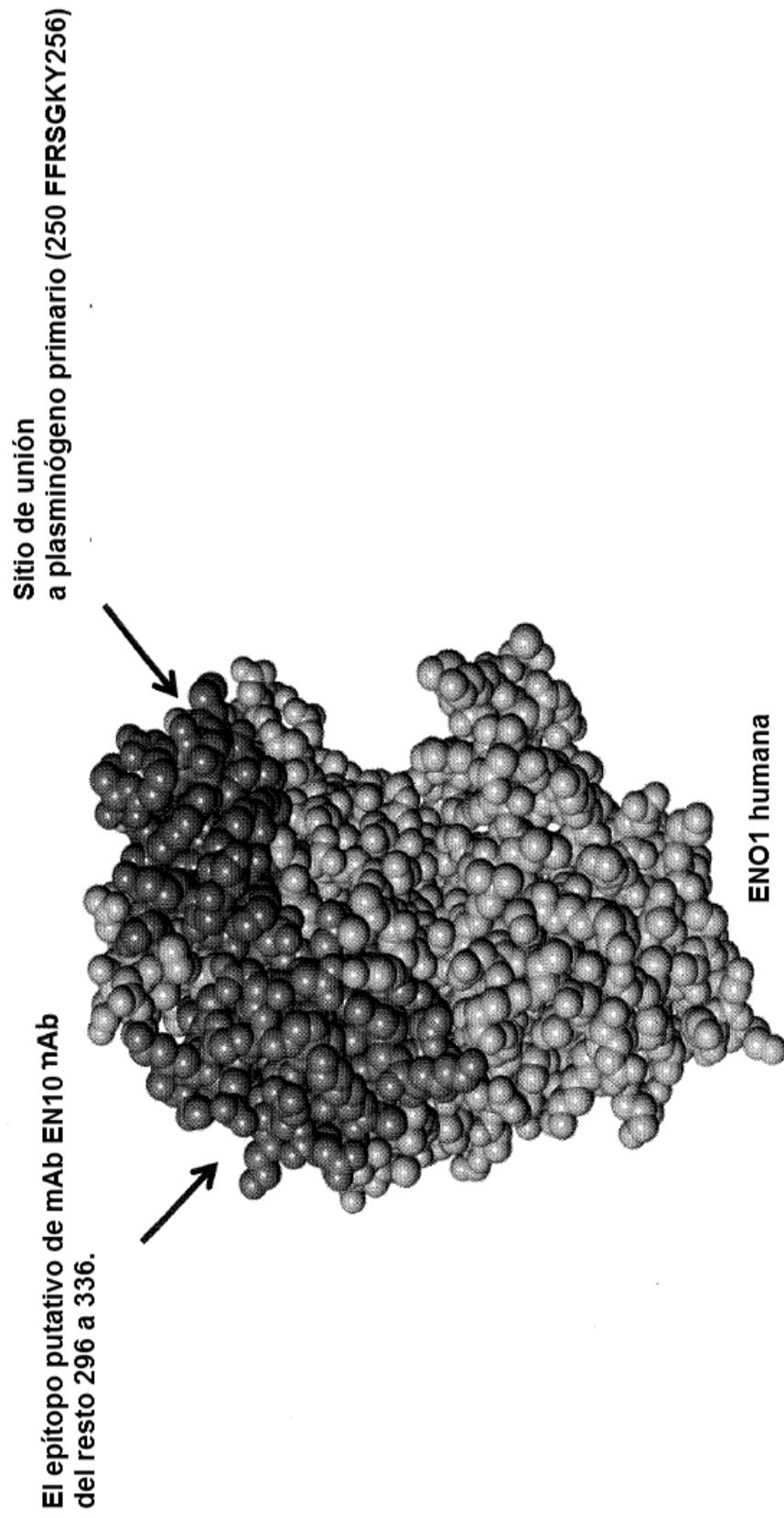


FIG.6C

**FIG.7A**



**FIG.7B**

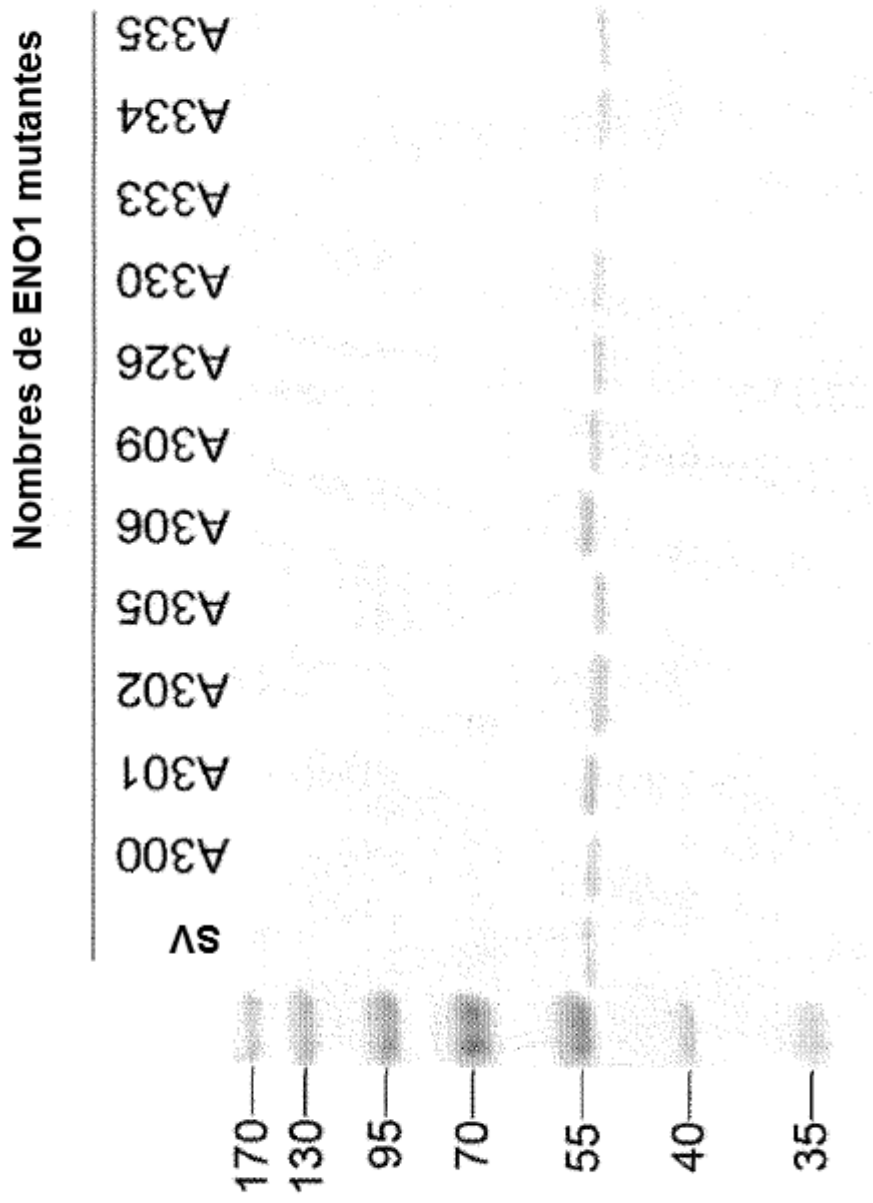


FIG.7C

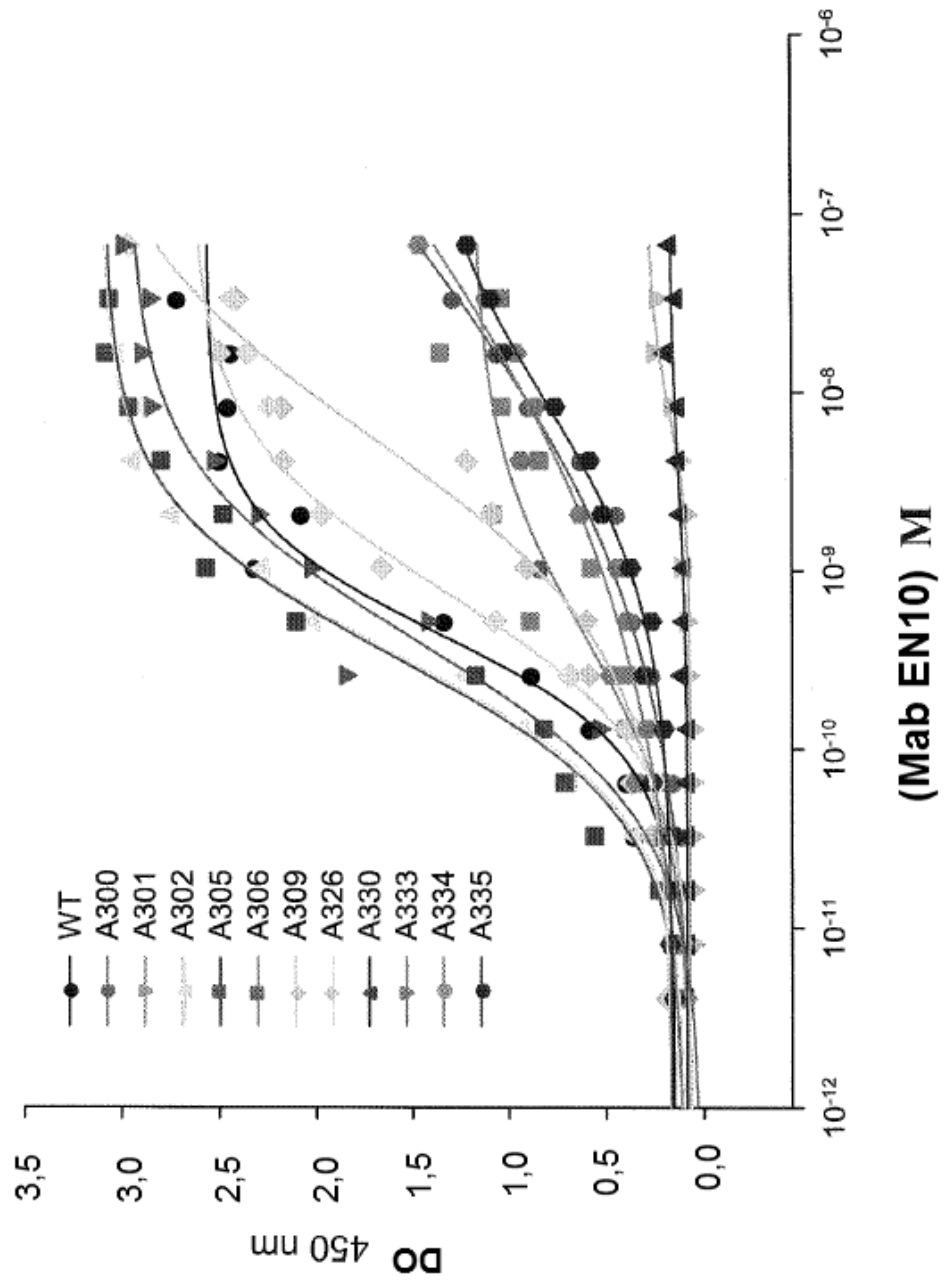




FIG. 7C (Continuación)

TABLA I-US-00002 Mutante KD

Mutante	KD	Mutante	KD	Mutante	KD
Tipo salvaje	$4,43 \pm 0,65 \times 10^{-10}$	A300	$6,33 \pm 2,57 \times 10^{-8}$	A301	No detectado
A302	$3,45 \pm 0,28 \times 10^{-10}$	A305	$3,31 \pm 0,50 \times 10^{-10}$	A306	$4,65 \pm 2,42 \times 10^{-10}$
A309	$5,63 \pm 2,67 \times 10^{-9}$	A326	$7,87 \pm 1,35 \times 10^{-10}$	A330	No detectado
A333	$4,13 \pm 1,09 \times 10^{-10}$	A334	$1,07 \pm 4,39 \times 10^{-7}$	A335	$9,57 \pm 3,72 \times 10^{-9}$

**FIG.7D**

<sup>296</sup>FDQDDWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKS<sup>336</sup> **SEQ ID NO:39**  
**SEQ ID: 40** **SEQ ID: 41**

FIG. 8A

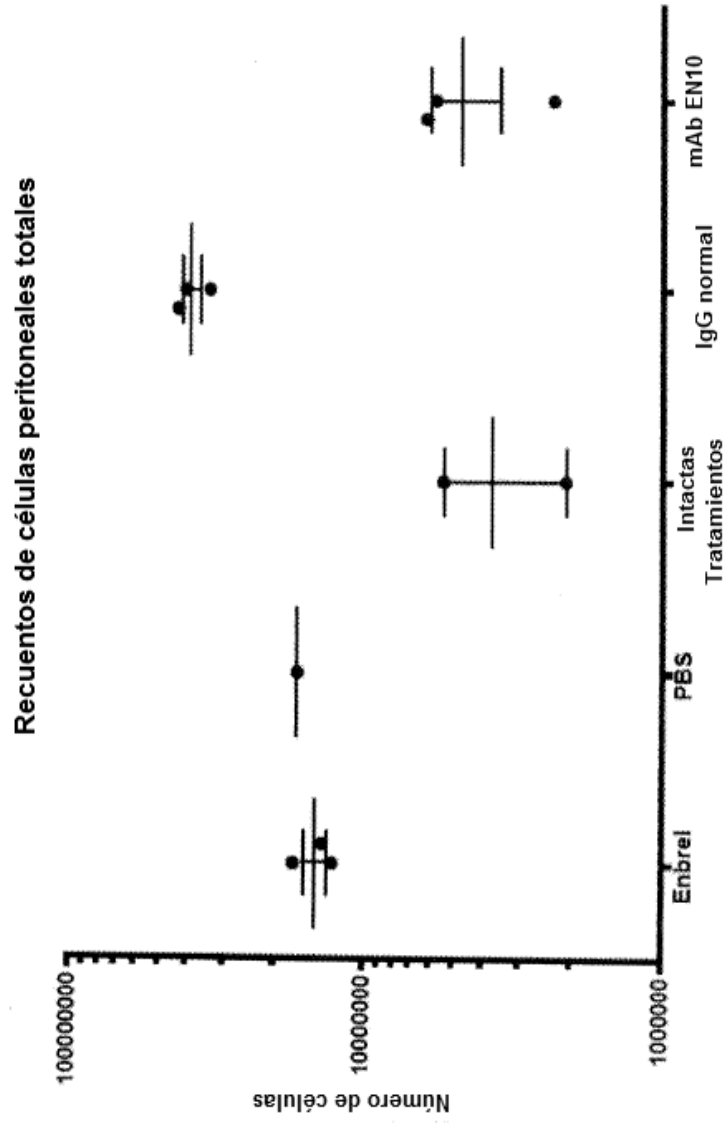


FIG.8B

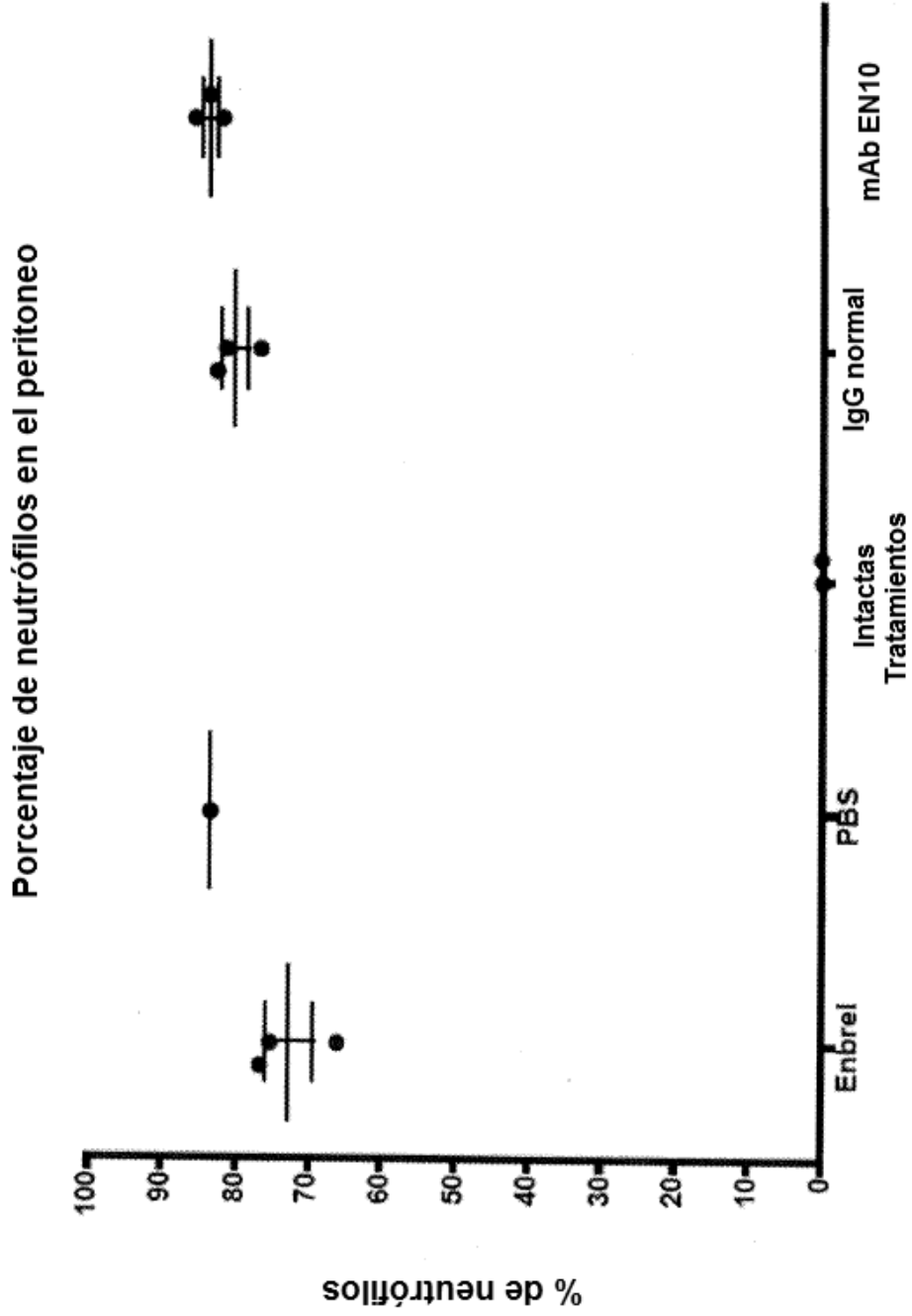


FIG.9

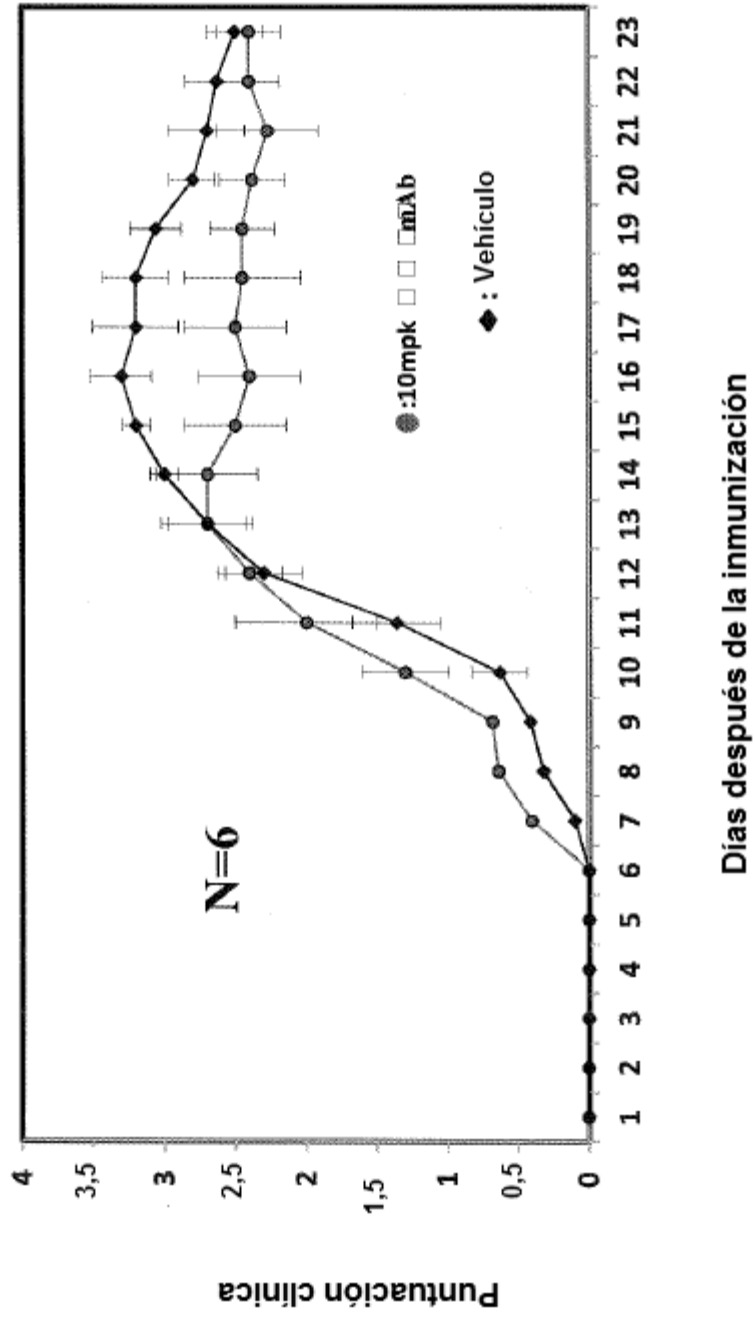
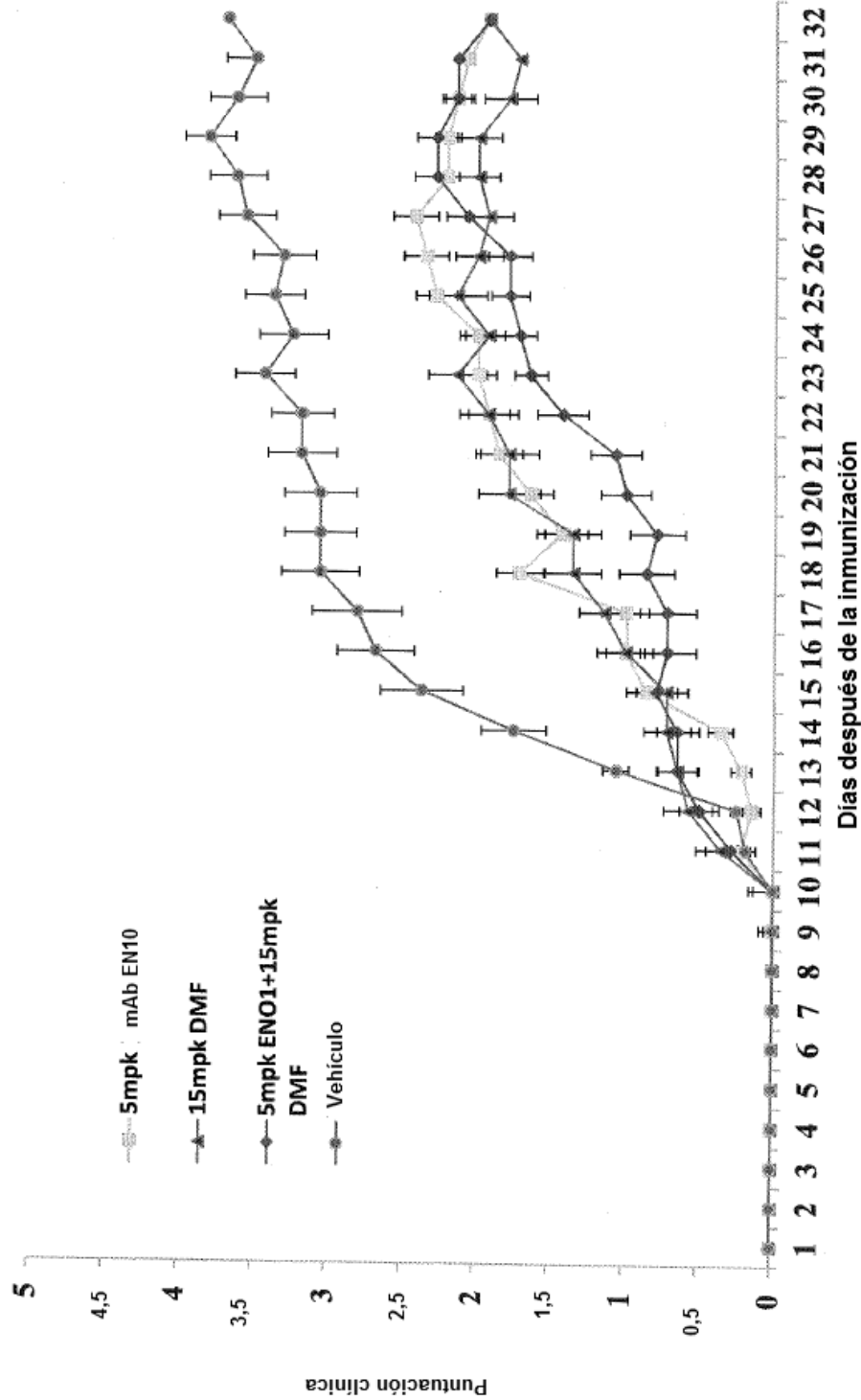
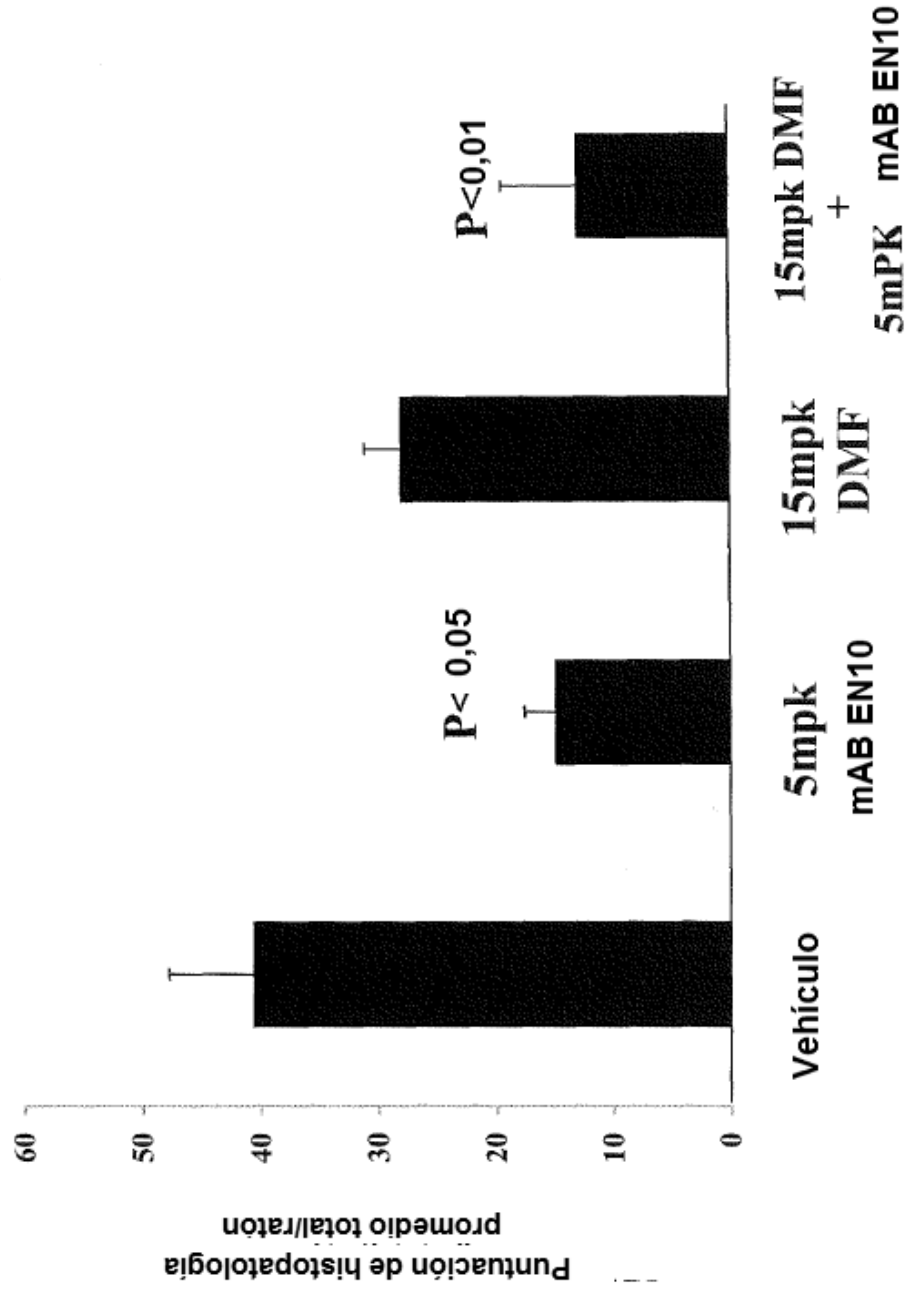


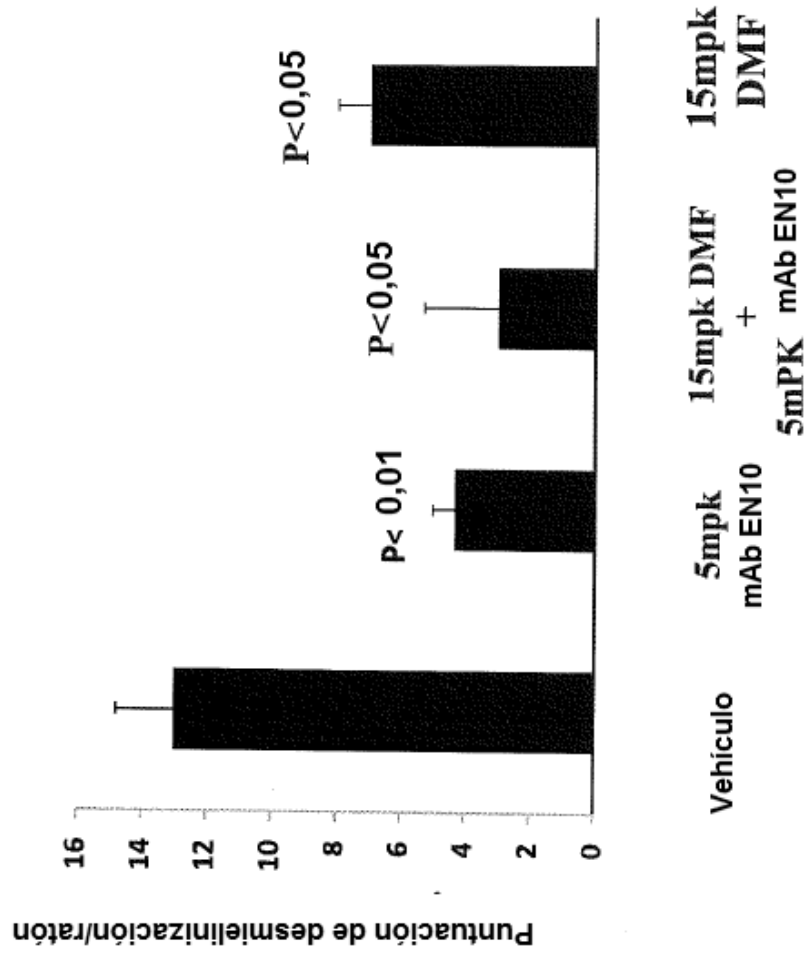
FIG.10A



**FIG.10B**



**FIG.10C**





**FIG.10D**

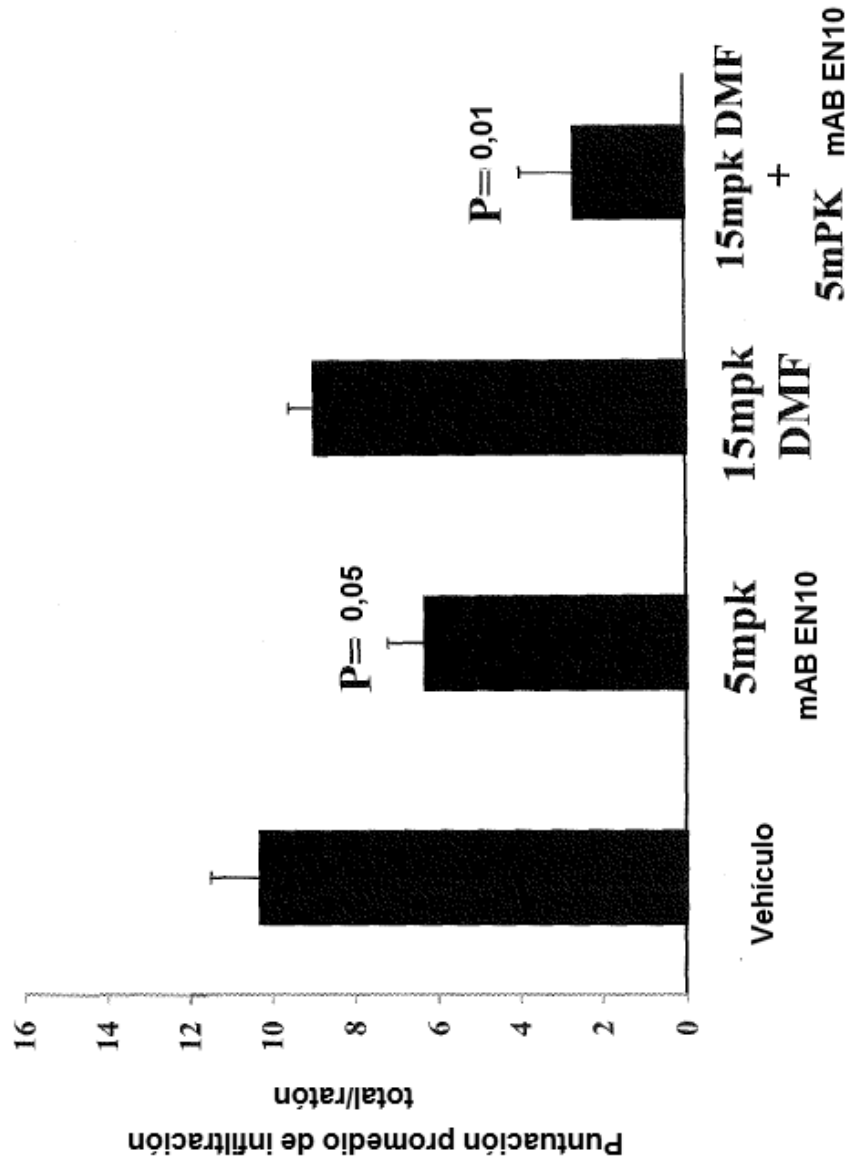


FIG.11A

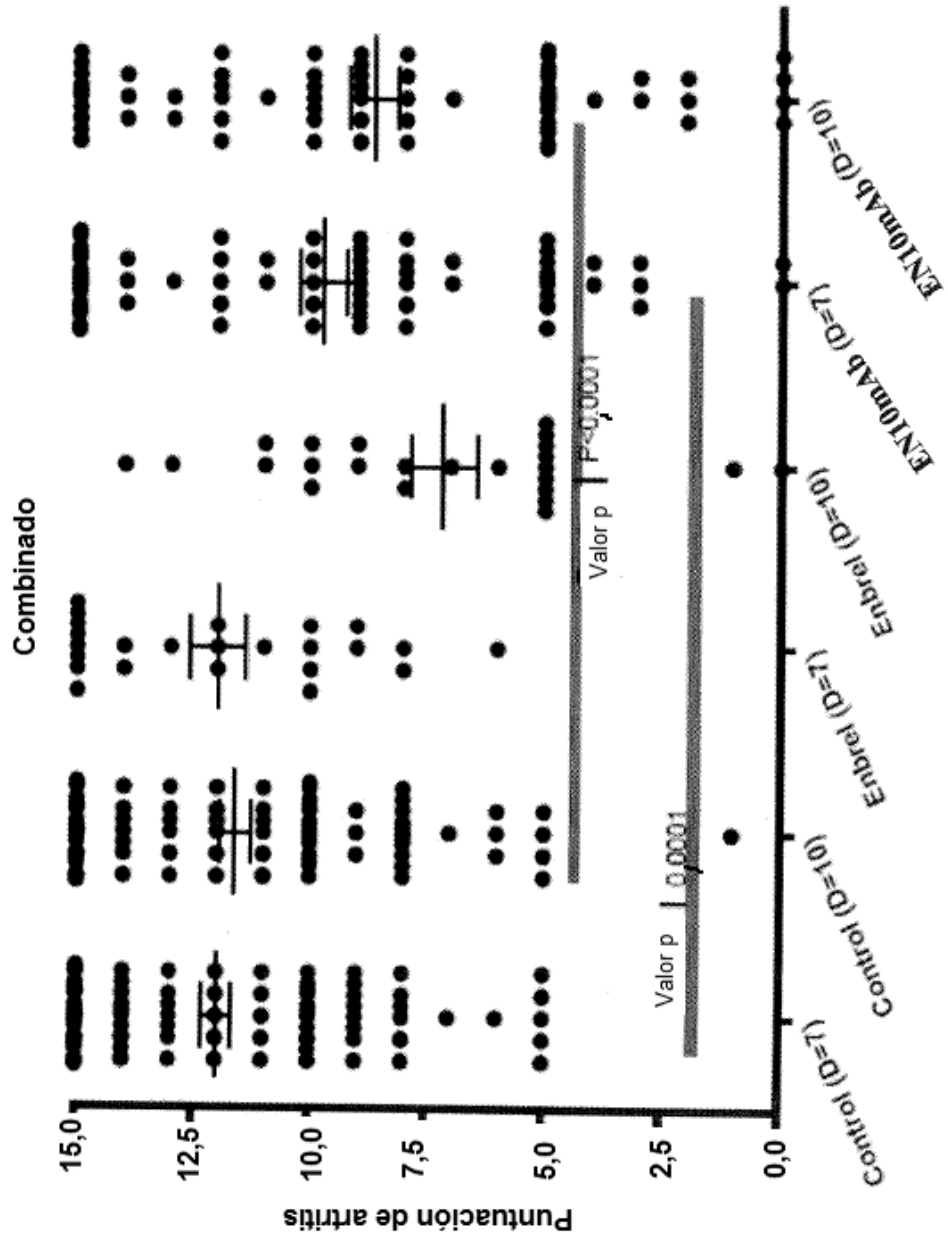


FIG.11B

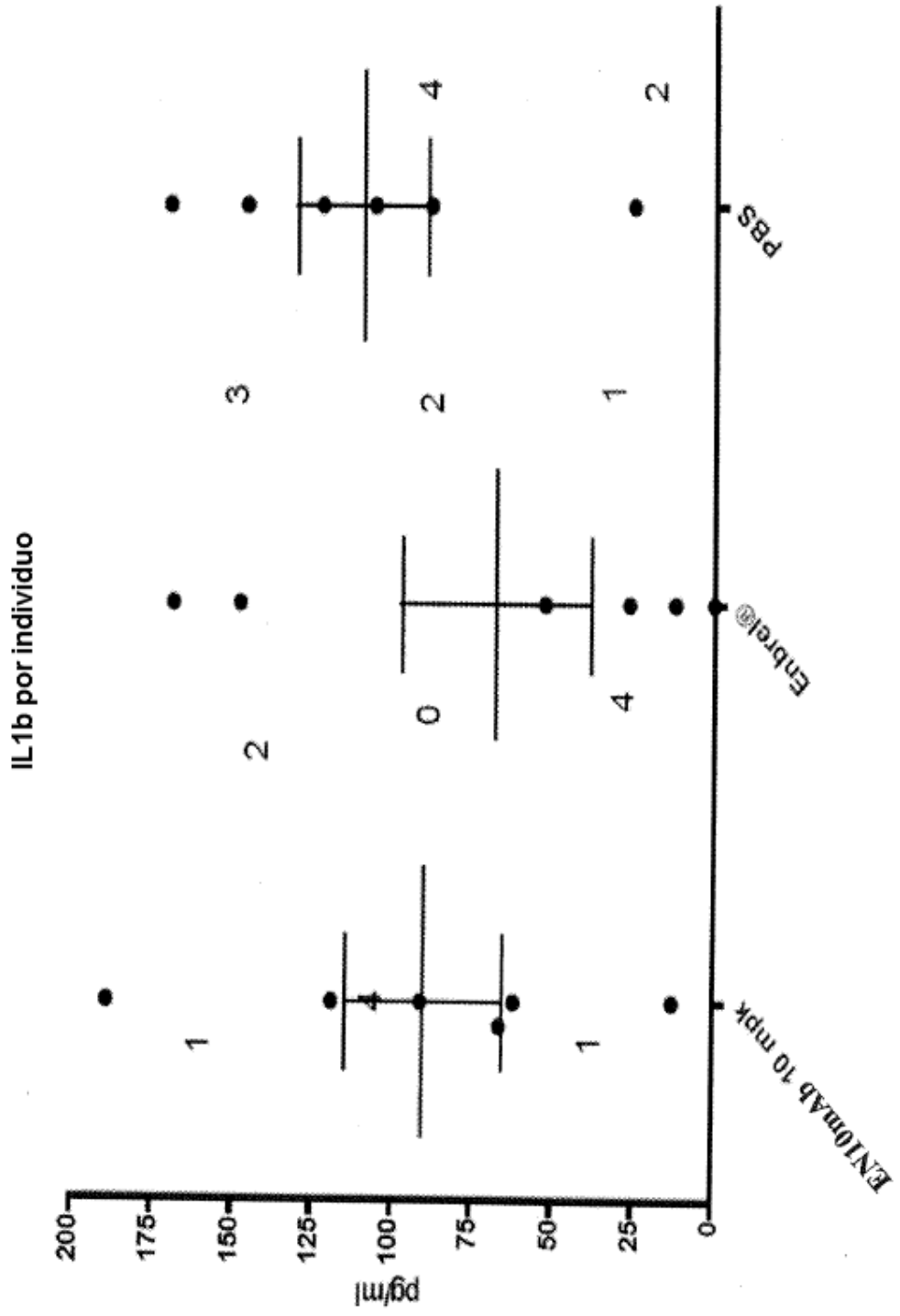


FIG.11C

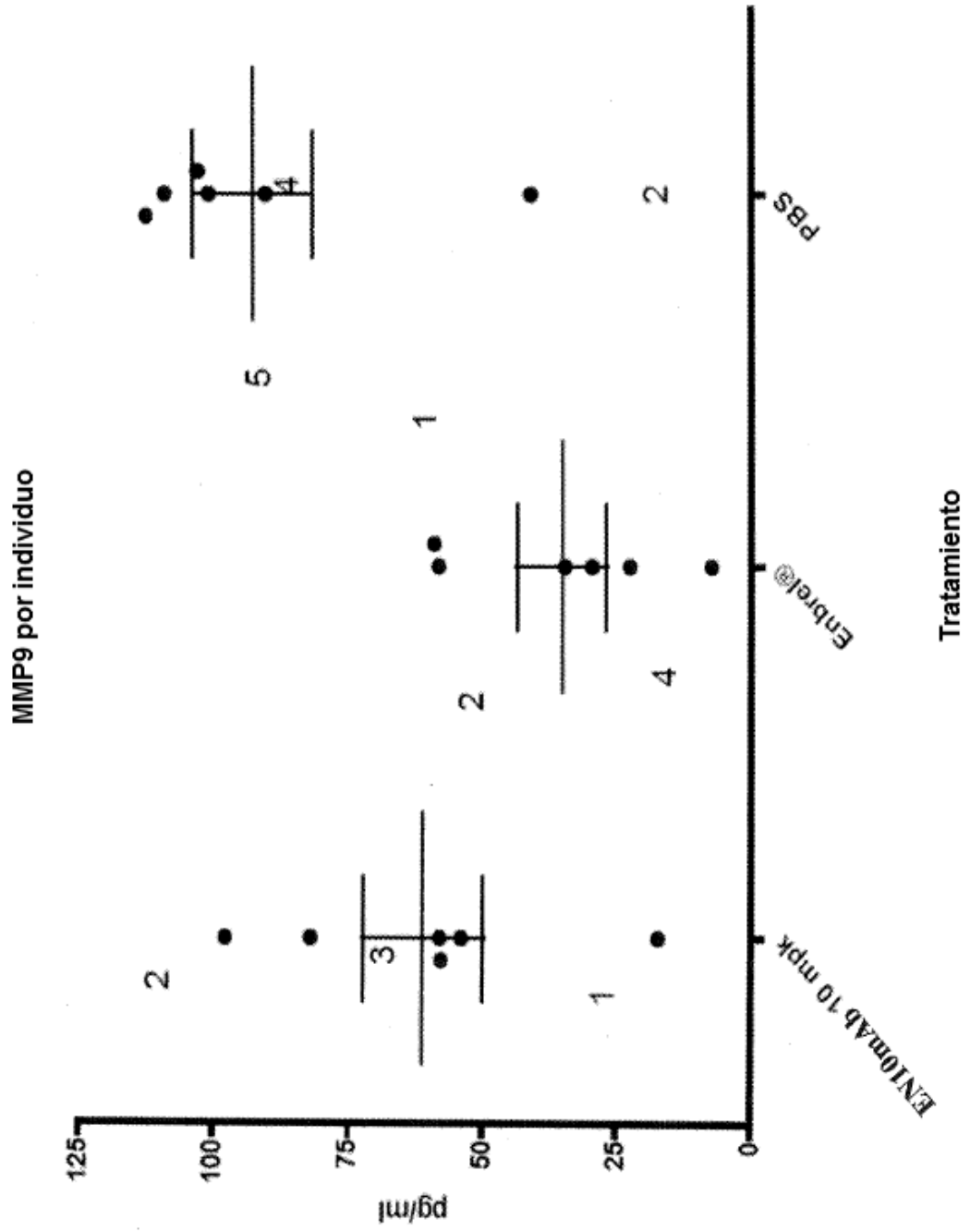


FIG.12A

15F8	1,552	12D9	1,563	4A7	1,968	17G10	1,780	7G6	1,580	6C4	2,119
17A11	1,683	13D8	1,522	4B2	1,768	18D11	1,747	9A4	1,660	6D6	2,068
17C9	1,458	11B4	1,642	4C5	1,655	18H3	1,706	9C2	1,484	6E2	1,738
15H4	1,547	12B10	1,363	4D5	2,008	10F4	1,271	9E1	1,686	6F5	1,851
16D4	1,514	12E8	1,784	4E3	2,215	11B10	1,528	22B4	1,446	6H5	1,879
17B7	1,749	13G2	1,654	4F3	2,079	12D4	1,471	22C8	1,912	1C6	1,884
17E10	1,499	11A10	1,468	4F5	1,749	14D2	1,528	22C11	1,57	1E2	1,657
16A2	1,768	12C10	1,496	4F6	1,945	11A3	1,507	22F3	1,587	1F5	1,609
16H3	1,685	12F4	1,342	5A12	2,193	12C1	1,447	22F5	1,58	2D2	1,872
18G4	1,602	7C9	1,423	5D6	2,052	2D8	1,994	2G9	1,725	3B1	1,685
16B5	1,772	7D5	1,490	5E1	1,766	2F3	2,038	3A2	1,758	3B11	1,655
17A10	1,573	7E5	1,465	6B11	2,114	2G4	1,586	3A5	1,812	3C8	1,723
3D1	1,698	3H8	2,014	17H3	2,007						

FIG.12B

15F8	1,642	12D9	0,486	4A7	1,765	17G10	0,846	7G6	0,585	6C4	1,794
17A11	1,705	13D8	1,308	4B2	1,421	18D11	1,239	9A4	1,254	6D6	1,562
17C9	0,825	11B4	1,213	4C5	1,357	18H3	1,444	9C2	0,927	6E2	1,943
15H4	1,433	12B10	1,449	4D5	1,465	10F4	0,918	9E1	1,985	6F5	2,008
16D4	1,694	12E8	1,103	4E3	1,928	11B10	1,125	22B4	1,218	6H5	1,656
17B7	1,862	13G2	1,458	4F3	1,540	12D4	1,336	22C8	1,785	1C6	1,575
17E10	1,582	11A10	1,051	4F5	1,233	14D2	1,780	22C11	1,690	1E2	1,668
16A2	1,246	12C10	1,333	4F6	1,569	11A3	1,619	22F3	1,345	1F5	1,911
16H3	1,456	12F4	0,899	5A12	2,216	12C1	1,408	22F5	1,511	2D2	1,563
18G4	1,805	7C9	1,644	5D6	2,258	2D8	1,550	2G9	1,923	3B1	1,768
16B5	1,667	7D5	1,675	5E1	1,340	2F3	1,643	3A2	1,680	3B11	1,509
17A10	1,302	7E5	0,582	6B11	0,445	2G4	0,912	3A5	1,482	3C8	1,237
3D1	1,155	3H8	2,043	17H3	1,698						

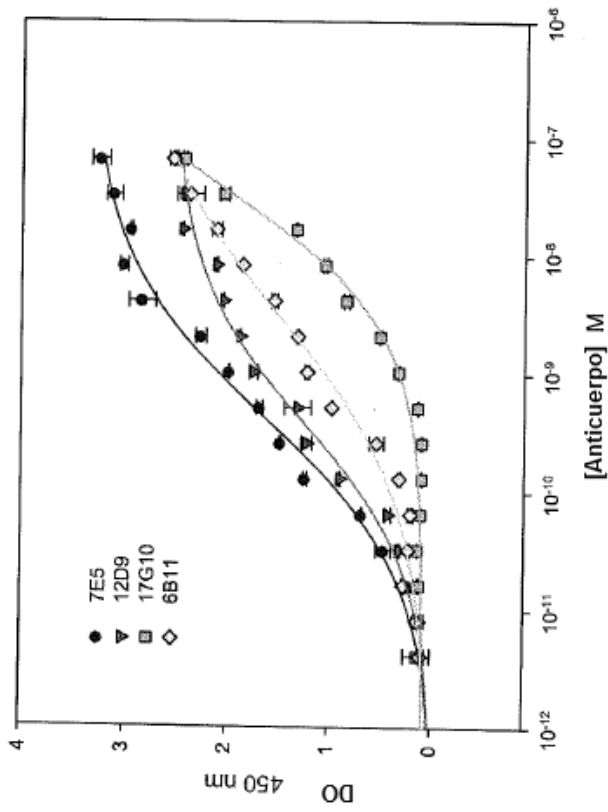
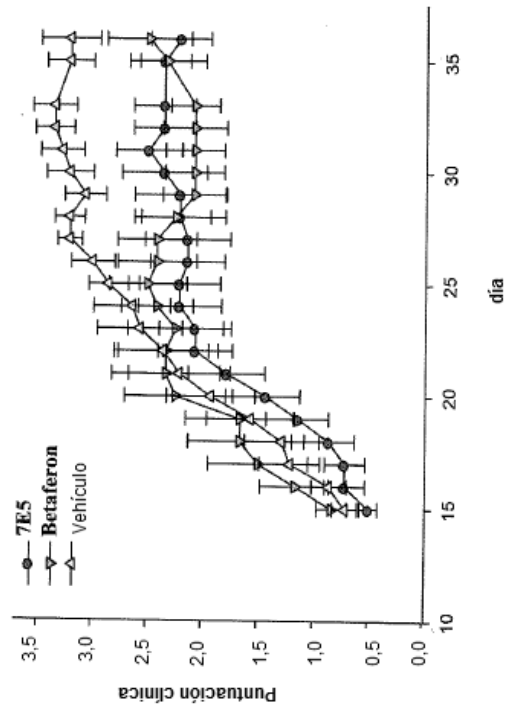


FIG.13

Clon #	KD (M)	Max.	Min.	R seq.
7E5	$4,42 \pm 0,82 \times 10^{-10}$	3,35	0,04	0,992
12D9	$3,90 \pm 0,66 \times 10^{-10}$	2,53	0,02	0,992
17G10	$3,39 \pm 1,89 \times 10^{-8}$	3,85	0,08	0,992
6B11	$3,04 \pm 1,11 \times 10^{-9}$	2,94	0,03	0,990

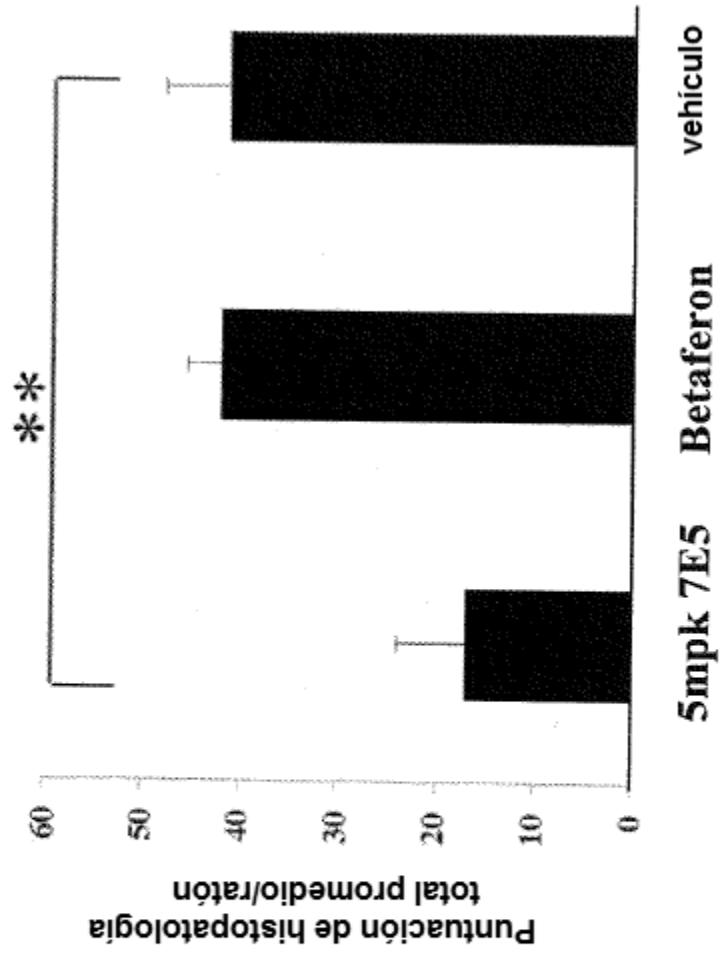
**FIG.14A**



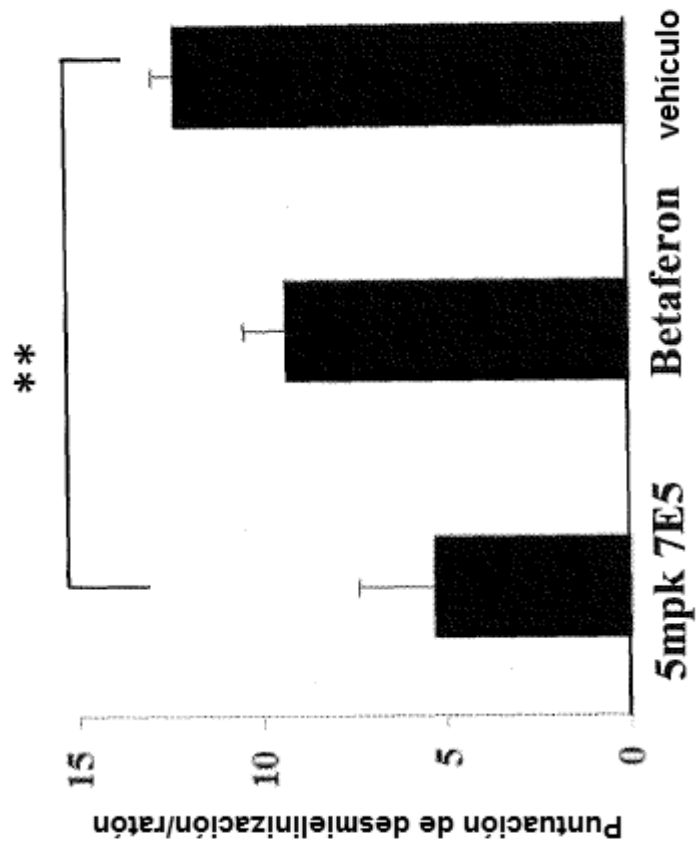
Grupo	Días para alcanzar la puntuación 2	Puntuación clínica prom.	Puntuación clínica máx.
5mpk 7E5	24	1,6 ± 0,5	2,8 ± 0,8
Betaferon	20	2,1 ± 0,4	3,1 ± 1,1
Vehículo	20	2,6 ± 0,9	3,8 ± 0,6

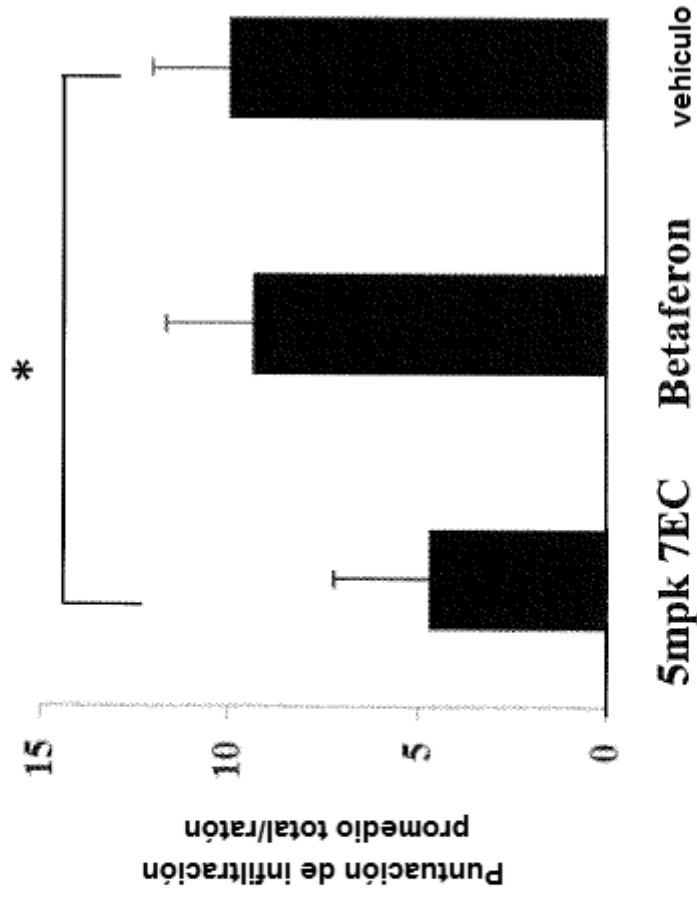


**FIG.14B**



**FIG.14C**





**FIG.14D**