



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 560**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02727341 .6**

96 Fecha de presentación : **01.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1363937**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2003**

54

Título: **Sustancias activas inmunomoduladoras de gusanos parásitos y procedimiento para su aislamiento.**

30

Prioridad: **01.03.2001 DE 101 09 844**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73

Titular/es: **Forschungszentrum Borstel Zentrum für
Medizin und Biowissenschaften
Parkallee 1 - 40
23845 Borstel, DE**

72

Inventor/es: **Schramm, Gabriele;
Haas, Helmut;
Falcone, Franco;
Gronow, Achim y
Haisch, Karin**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 316 560 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

Sustancias activas inmunomoduladoras de gusanos parásitos y procedimiento para su aislamiento.

5 La invención se refiere a sustancias activas procedentes de gusanos parásitos, en particular, de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum* que inducen una respuesta de tipo 2 de los linfocitos T cooperadores (respuesta inmune Th2).

Antecedentes de la invención

10 En una serie de enfermedades, se ha mostrado que la causa es una reacción Th1 patológica o una reacción Th2 atenuada, o bien estas reacciones son objeto de debate. Los resultados de experimentos con animales permiten suponer que un desvío de la respuesta inmune hacia Th2, tiene un efecto protector en estas enfermedades. En este contexto, se pueden citar enfermedades autoinmunes organoespecíficas, tales como las siguientes: esclerosis múltiple [Shevach, E. M., y col., *Springer Semin. Immunopathol.* 21 (1999) 249-262; Leonard, J. P. y col., *Crit. Rev. Immunol.* 17 (1997) 545-553], uveítis autoinmune [Singh, V. K. y col., *Immunol. Res.* 20 (1999) 147-161; Sun, B. y col., *Int. Immunol.* 11 (1999) 1307-1312; Egwuagu, C. E. y col., *J. Immunol.* 162 (1999) 510-517], diabetes mellitus dependiente de insulina [Rabinovitch, A. y col., *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 1139-1149; Cooke, A. y col., *Parasite Immunol.* 21 (1999) 169-176], artritis reumatoide [Muller, B. y col., *Springer Semin. Immunopathol.* 20 (1998) 181-196], síndrome de Behcet [Frassanito, M. A. y col., *Arthritis Rheum.* 42 (1999) 1967-1974] y, además, la infección con *Helicobacter pylori* (una causa, entre otras, de la úlcera gástrica y la gastritis atrófica) [Smythies, L. E. y col., *J. Immunol.* 165 (2000) 1022-1029; Fox, J. G. y col., *Nat. Med.* 6 (2000) 536-542; Mattapallil, J. J. y col., *Gastroenterology* 118 (2000) 307-315], enfermedades intestinales inflamatorias, tales como la enfermedad de Crohn y otras [Romagnani, P. y col., *Curr. Opin. Immunol.* 9 (1997) 793-799; MacDonald, T. T., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 236 (1999) 113-135], reacción de rechazo aguda al trasplante de órganos [Morelli, A. E. y col., *Transplantation* 69 (2000) 2647-2657] y abortos espontáneos recurrentes [Jenkins, C. y col., *Fertil. Steril.* 73 (2000) 1206-1208].

En relación con la orientación hacia una respuesta Th1 o Th2, las citocinas son consideradas los factores clave [Paul, W. E. y col., *Cell* 76 (1994) 241-251]. Por ello, la IL-4 representa probablemente la señal decisiva de las citocinas para la diferenciación de los linfocitos T cooperadores vírgenes en las células Th2. La iniciación de una respuesta Th1 está controlada por otro lado esencialmente por la IL-12 y el IFN- γ , que se producen en las células dendríticas y en otras células accesorias. Aparte de las citocinas, también pueden influir otros factores en la diferenciación de los linfocitos T [Constant, S. L. y col., *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 297-322]. Para la orientación, IL-4 o IL-12 ya deben estar presentes en el momento del cebado, es decir, al principio durante una respuesta inmune (véase la Fig. 1).

35 La producción temprana de IL-4 o IL-12 y, de este modo, la diferenciación de los linfocitos T, está controlada por factores exógenos y endógenos. Entre los factores exógenos, la naturaleza del agente patógeno es particularmente importante. Algunos agentes patógenos estimulan preferentemente una respuesta Th1, otros una respuesta Th2 [Scott, P. y col., *Immunol. Today* 12 (1991) 346-348]. Esto hace suponer que las propiedades moleculares del agente patógeno correspondiente son responsables del efecto en cuestión. Como la naturaleza del agente patógeno influye decisivamente sobre la producción temprana de citocinas, se llega a la cuestión fundamental, de cuáles son los factores moleculares desencadenantes que inducen la IL-4 temprana o la IL-12 temprana y cuál es la fuente celular que proporciona estas citocinas.

45 La fuente celular para la IL-4 temprana es objeto de controversia [Coffman, R. L. y col., *J. Exp. Med.* 185 (1997) 373-375]. En principio, varios tipos celulares son capaces de producir IL-4 si se estimulan adecuadamente: linfocitos T de tipo 2, linfocitos T NK1.1⁺ de múrido, eosinófilos, mastocitos y basófilos. Durante una respuesta inmune primaria, la IL-4 temprana se origina con bastante probabilidad a partir de células de la inmunidad innata, puesto que los linfocitos T maduros, específicos de antígeno en el momento del primer contacto con un agente inmunógeno no están todavía disponibles. Incluso en casos de células Th2 preexistentes con reactividad cruzada, queda abierta la cuestión de qué estructura ha desencadenado su desarrollo. Por ello, los linfocitos T del tipo 2 se excluyen como fuente de IL-4 temprana. El papel exclusivo postulado de los linfocitos T NK1.1⁺, como proveedores de IL-4 temprana en el ratón, se cuestionó con experimentos con animales genéticamente deficientes [Coffman, R. L. y col., *J. Exp. Med.* 185 (1997) 373-375].

55 Diversos autores han supuesto que los basófilos están implicados en la aparición de una respuesta Th2 [Paul, W. E. y col., *Cell* 76 (1994) 241-251; Romagnani, S., *Immunol. Today* 13 (1992) 379-381; Dahinden, C. A., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113 (1997) 134-137]. A favor de esta suposición está el hecho de que los basófilos humanos liberan cantidades considerables de IL-4, unas pocas horas después de una estimulación específica con antígeno y no específica [Brunner, T. y col., *J. Exp. Med.* 177 (1993) 605-611; Kasaian, M. T. y col., *Int. Immunol.* 8 (1996) 1287-1297]. Además, los basófilos como células móviles de la sangre periférica, se pueden acumular rápidamente en lugares de conflicto con agentes patógenos. La migración y la acumulación se dirigen con una variedad de quemocinas. Se destacan en particular la eotaxina que atrae basófilos, eosinófilos y células Th2 mediante la unión a su receptor de quemocina CCR3. De forma interesante, la IL-4 conduce a la liberación de eotaxina a partir de fibroblastos de la piel humana y de células endoteliales, que podría representar probablemente un mecanismo de amplificación para el reclutamiento de basófilos. Además de su acción quimiotáctica, la eotaxina intensifica claramente la liberación de IL-4 inducida con antígenos Comparada con los basófilos, la producción de IL-4 en los mastocitos y los eosinófilos es baja, lo que relativiza su papel en la inducción de Th2. Resumiendo, los basófilos se consideran principalmente por tanto, los productores de IL-4 temprana.

La cuestión de los factores desencadenantes para la IL-4 temprana, no se ha solucionado todavía hasta la fecha. Por otro lado, los factores desencadenantes de la IL-12 temprana ya se conocen. De este modo, por ejemplo, productos bacterianos tales como lipopolisacáridos y oligodesoxinucleótidos de CpG pueden inducir a macrófagos o a células dendríticas para que liberen rápidamente IL-12 y causar una inducción de Th1 *in vivo* [Paul, W. E. y col., *Cell* 76 (1994) 241-251; Bohle, B. y col., *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2344-2353]. La identificación de los factores de la inducción de Th2 es algo que todavía se tiene que realizar. Sin embargo, se han descrito factores desencadenantes potenciales que inducen, *in vitro*, una rápida liberación de IL-4 a partir de los basófilos: la proteína Fv del superantígeno de los linfocitos B [Patella, V. y col., *J. Immunol.* 161 (1998) 5647-5655] y la glicoproteína 120 del VIH [Patella, V y col., *J. Immunol.* 164 (2000) 589-595], que se activa al unirse con el segmento VH3 de IgE, y lectinas [Haas, H. y col., *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 918-927], que se unen a las cadenas laterales de carbohidratos de la IgE o del receptor de IgE.

Para la terapia de ciertas enfermedades, sería deseable dirigir la respuesta inmune hacia una respuesta con linfocitos T cooperadores de tipo 2 (respuesta Th2). Para ello, no hay hasta la fecha ninguna posibilidad que sea satisfactoria y la administración de IL-4 como tal, no es practicable en un uso rutinario porque es muy laboriosa y demasiado costosa.

Por tanto, es un objeto de la presente invención poner a disposición inductores potentes de Th2 así como medicamentos para la inmunomodulación.

Este objetivo se consigue de acuerdo con la invención, mediante nuevas proteínas que se aíslan a partir de gusanos parásitos.

Los gusanos parásitos se pueden clasificar esencialmente en tres grupos taxonómicos principales de helmintos (cestodos, trematodos y nematodos) y se caracterizan por un modo de vida parásito dentro de animales vertebrados y/o invertebrados. Ahí, atacan órganos/tejidos específicos: el lumen del intestino (nematodos intestinales), el epitelio (nematodos pulmonares), los vasos sanguíneos (esquistosomas), los vasos linfáticos y la piel (filarias) y diversos tejidos corporales (estados larvarios de la solitaria) y por ello tienen que enfrentarse a diferentes estados inmunológicos.

A nivel mundial, existen aproximadamente 3,5 mil millones de personas infectadas con gusanos parásitos. Aunque la mortalidad directa es baja, las personas afectadas pueden padecer insuficiencias en el crecimiento, en el desarrollo y lesiones en órganos y frecuentemente dolencias crónicas.

Los representantes más importantes de los gusanos parásitos en humanos son: ascárides (*Ascaris lumbricoides*; aproximadamente mil millones de personas infectadas), anquilostomas (*Ankylostoma duodenale* y *Necator americanus*; cerca de mil millones), tricocéfalo (*Trichuris trichiura*; aproximadamente 800 millones), esquistosomas (aproximadamente 200 millones), filarias (*Brugia*, *Onchocerca* y *Wuchereria*, aproximadamente 100 millones) y especies de solitarias (*Taenia*; aproximadamente 50 millones).

En los animales, la infección con gusanos parásitos, de los cuales existen muchos más tipos diferentes, es mucho más elevada que en los seres humanos. El perjuicio económico infligido a los animales de explotación puede ser considerable.

La invención se basa en el conocimiento de que sobre todo los gusanos parásitos inducen de forma fiable una respuesta Th2. En ese contexto, la propiedad inductora de Th2 puede estar limitada a un estado específico del desarrollo. Por tanto, en el caso de una infección de ratones con el trematodo *Schistosoma mansoni*, el estado de huevo induce una respuesta inmune de tipo Th2, mientras que el estado de esquistosomula (larvario) induce una respuesta inmune de tipo Th1 [Pearce, E. J. y col., *J. Exp. Med.* 173 (1991) 159-166]. La potencia inductora de IL-4 de los huevos de esquistosoma es tan elevada, que incluso ratones sin tratamiento previo, responden a la administración de huevos de esquistosoma después de una respuesta Th0 transitoria, al cabo de 7-10 días, con una respuesta Th2 y síntesis de IgE [Vella, A. T. y col., *J. Immunol.* 148 (1992) 2283-2290]. Incluso después de una administración intranasal de extracto de huevos de *S. mansoni*, se produce una producción sistémica de IgE en un modelo de ratón [Okano, M. y col., *J. Immunol.* 163 (1999) 6712-6717]. Sin embargo, hasta la fecha, no se han conseguido identificar o aislar las sustancias activas que son responsables de la elevada capacidad inductora de IL-4 de los huevos de *S. mansoni*.

Descripción detallada de la invención

En el contexto de la presente invención, se pone ahora a disposición por primera vez un procedimiento con el que es posible aislar sustancias que inducen IL-4 procedentes de huevos de *S. mansoni* y de huevos de otros gusanos parásitos.

Por ello, es un objeto de la invención un procedimiento para aislar una proteína que induce IL-4, a partir de gusanos parásitos en los que un antígeno del huevo (EA) o un extracto de los estados inductores de Th2 o inductores de IgE procedentes de gusanos parásitos (EX), se dializa frente a agua y se liofiliza, el EA o el EX liofilizado se fracciona mediante cromatografía de intercambio catiónico, las fracciones que proporcionan una inducción de IL-4 durante la incubación de granulocitos basófilos humanos, se reúnen y se concentran, se realiza una cromatografía de afinidad con Sefarosa activada con NHS, a la que se une aglutinina de *Aleuria aurantia*, las fracciones que proporcionan una inducción de IL-4 durante la incubación de los granulocitos basófilos humanos se reúnen y se concentran. La proteína obtenida preferentemente se liofiliza a continuación.

ES 2 316 560 T3

De acuerdo con una realización preferida de la invención, se emplea EA procedente de *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium*, *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium lanceolatum*, *Echinococcus multilocularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Ankylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*, *Taenia solium*, *Taenia bovis* y otras especies relacionadas.

5 Como alternativa a la aglutinina de *Aleuria aurantia*, se producen anticuerpos monoclonales para las proteínas y los polipéptidos de acuerdo con la invención (componentes proteicos y carbohidratos), que se emplean para la purificación de moléculas relacionadas de otras especies de gusanos.

10 Estos anticuerpos monoclonales también se emplean en investigaciones inmunohistológicas, por ejemplo, para la localización de las proteínas y de los polipéptidos de acuerdo con la invención y de moléculas obtenidas a partir de los mismos en el parásito o para caracterizar la interacción de estas proteínas, polipéptidos o derivados de moléculas, con células hospedadoras. Además, estos anticuerpos, según el caso, en forma humana, se pueden utilizar para la neutralización biológica del efecto de dichas proteínas, polipéptidos y moléculas obtenidas a partir de los mismos o
15 de las moléculas relacionadas con los mismos (tales como alérgenos) *in vivo* e *in vitro* (el primero en condiciones de una respuesta inmune no deseada Th2/IgE).

De acuerdo con una realización particular de la invención, el EA o el EX liofilizado se recoge en tampón de fosfato potásico 20 mM a pH 5,0 para la cromatografía de intercambio catiónico. De acuerdo con otra realización particular de la invención, después de reunir y concentrar las fracciones activas obtenidas a partir de la cromatografía de intercambio catiónico, se tamponan con tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, antes de realizar la cromatografía de afinidad.

20 Cuando se emplea el antígeno de los huevos de *Schistosoma mansoni* (SmEA), se obtiene de este modo una proteína denominada IPSE que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. La proteína está preferentemente glicosilada, pero incluso en la forma no glicosilada, muestra unas propiedades acusadas como inductora de IL-4.

25 “SEQ ID NO” significa en la presente invención la numeración de acuerdo con la referencia numérica <400>, empleada en la norma ST. 25 de la OMPI.

30 Es otro objeto de la invención proteínas o polipéptidos que son homólogos, derivados o fragmentos de las proteínas y los polipéptidos de acuerdo con la invención y, en particular, de IPSE, los cuales también muestran la actividad estimuladora de la producción de IL-4 y/o de IL-3 en granulocitos basófilos humanos. El término “homólogos” se entiende en la presente invención, las proteínas o los polipéptidos que tienen uno o varios intercambios de aminoácidos en comparación con la secuencia representada por SEQ ID NO: 2; el término “derivados” significa moléculas en las
35 que aminoácidos aislados se sustituyen, por ejemplo, por aminoácidos no naturales (artificiales) o aminoácidos en la forma D.

Okano y col. han propuesto que los componentes carbohidratos del antígeno de los huevos de *S. mansoni* (SmEA) ejercen una regulación reductora de las respuestas Th1 y que también son necesarios para la inducción de Th2 estimulada con SmEA (véanse Velupillai, P. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 18-22, Okano y col., *J. Immunol.* 163 (1999) 6712-6717). Los autores proporcionaron una evidencia en un modelo de ratón con sensibilización intranasal con SmEA desglicosilada (tratada con peryodato), que no era capaz de inducir la producción de IL-4, IL-5, IL-10 e IgE específica de SmEA, en contraposición con el antígeno natural de los huevos. Además, se estableció que la lacto-N-fucopentaosa III, un componente glicano predominante de SmEA que contiene Lewis^x (Le^x), actúa como un
45 cooperador que induce Th2 en los ratones, cuando se une covalentemente a la seroalbúmina humana (M. Okano y col., *J. Immunol.* 167 (2001) 442-450).

En el contexto de la presente invención, se estableció que las proteínas o los polipéptidos de acuerdo con la invención, en particular IPSE, también son funcionalmente eficaces en ausencia de carbohidratos, es decir, en forma
50 no glicosilada. En particular, IPSE no glicosilada y recombinante muestra un fuerte efecto inductor de IL-4. Los resultados obtenidos en el contexto de la presente invención no excluyen, sin embargo, la posibilidad de que los carbohidratos contribuyan a una orientación hacia Th2, pudiéndose incluir tipos celulares distintos de los basófilos, que no se activan con la seroalbúmina humana acoplada a fucopentaosa III.

55 Por ello se incluyen adicionalmente en la invención, las proteínas o los polipéptidos mencionados anteriormente, en forma no glicosilada, ya que se pudo establecer que muestran un efecto inductor de IL-4 que tiene una eficacia similar al de los análogos glicosilados.

La invención se refiere adicionalmente a una molécula de ácido nucleico que muestra una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o un polipéptido mencionado anteriormente, que no se trata de de una molécula con la siguiente secuencia:

La base de datos EM_EST entrada AI820476 (Oliveira y col.) publica -sin hacer referencia a una posible actividad del polipéptido codificado- esta secuencia de un marcador de secuencia expresada (EST, del inglés “Expressed Sequence Tag”) procedente de *Schistosoma mansoni*, que en la región solapante muestra una alta identidad con SEQ ID NO: 1. De acuerdo con una realización especial de la invención, la molécula de ácido nucleico presenta la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 1.

catcagttca tatgcgtata tttagtttaag agcacacaaag aattataaagg cgcattacat
 ttccttggat tagaacggac agtatgtcct tctcagtttc gggttgattg atacattcaa
 cttttccatc ctttgtttga atacaccggt taatagagga atgcctttga atcgggattt
 5 cgtgaagtca tcaatgcagg taccatgtcc gagaccagta atccgacctg tgraattgcc
 gaagtcaata ataccagtat ggacgctctc tcttcctgtt catttacgaa gggtaacaaa
 cagttccagg ttgtccatgg tgggtgagagt gagcaaccgc ttttgtagac ttcattatat
 gaccctctct atacgtttca tctgacaatt gtagacattt tttgctggat cgggtgtggg
 10 tatcccattg gcttatcatg tgttgacata cggcataaga acctcgattt cgtggctttg
 tttatctggg qgggaacttc tctqtaacce ttcctctctg attttccat

Ventajas de la invención

15 Las proteínas y los polipéptidos de acuerdo con la invención, incluso en concentraciones muy bajas, condujeron a la liberación de las sustancias mensajeras celulares, interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13), a partir de granulocitos basófilos (linfocitos) de donantes de sangre sanos, no sensibilizados. La IL-4 y la IL-13 son factores clave en el desarrollo de la alergia mediada por inmunoglobulina E (mediada con IgE). Las proteínas de acuerdo con la invención,

20 tienen un papel central en el inicio de la respuesta de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (respuesta Th2) y en la síntesis de IgE que es típica de gusanos parásitos. Ya que los factores que inducen Th2 inhiben el desarrollo de una respuesta Th1 (respuesta inmune celular), las moléculas de esta invención que son muy potentes, se pueden emplear inmunofarmacológicamente, por ejemplo, en enfermedades acompañadas por una respuesta Th1 patológica, tal como la esclerosis múltiple.

25 Por ello es un objeto de la invención el uso de la proteína o del polipéptido de acuerdo con la invención, para la producción de una composición farmacéutica para la inmunomodulación, preferentemente para la producción de una composición farmacéutica para estimular la producción de IL-4 y/o IL-13, o para la producción de una composición farmacéutica para la estimulación de la producción de IgE.

30 La inducción o la amplificación de una respuesta inmune acentuada del tipo Th2, también es deseable, de cara al desarrollo de ciertas vacunas. Por tanto, una respuesta Th2 es protectora en ciertas infecciones con gusanos parásitos (p. ej., infecciones con nematodos o la esquistosomiasis), mientras que una respuesta inmune acentuada del tipo Th1 tiene aquí el efecto opuesto. Esto se tiene que tener en cuenta en la producción de vacunas antihelmínticas o de otro tipo.

35 Investigaciones relacionadas con el mecanismo de acción, han mostrado que la activación basófila (desgranulación, histamina, liberación de IL-4 y de IL-13) a través de IPSE, requiere la presencia de IgE en la superficie de los basófilos. Esto se mostró con los experimentos denominados de liberación de IgE y de resensibilización de IgE, en los cuales, la IgE unida al receptor se disocia mediante una bajada a corto plazo del pH de los basófilos, y las células se cargan de nuevo con IgE. La dependencia de IgE de la inducción con IL-4, permite suponer que IPSE se vuelve eficaz a través

40 de la unión y la reticulación de IgE unida al receptor.

Para estudiar si IPSE es un factor que se une a inmunoglobulinas, se emplearon técnicas de transferencia de tipo Western y de transferencia puntual. Para ello, se fijó IPSE o IgE a una membrana de nitrocelulosa mediante

45 transferencia y añadiendo IPSE o IgE, respectivamente, a la fase soluble. Bajo ambas condiciones, tuvo lugar una unión entre IgE e IPSE. Las investigaciones iniciales con el método de Biacore (Resonancia de plasmón superficial; Amersham Pharmacia Biotech, Friburgo, Alemania) confirmaron este resultado, mostrando una alta afinidad en la unión entre IPSE e IgE. Para determinar si la actividad de unión a la inmunoglobulina de IPSE está restringida al isotipo IgE o afecta también a otras clases de inmunoglobulinas, se realizaron investigaciones con transferencia de tipo Western, con IgG procedente del suero de donantes de sangre sanos del norte de Europa. De este modo se observó

50 que IPSE también se une a las subclases 1-4 de la IgG humana. De forma interesante, los experimentos de inhibición competitiva revelaron que IPSE se une a IgE con una afinidad 100 veces más elevada que a IgG.

Además, IPSE se une a todos los fragmentos peptídicos de IgG después de una digestión con papaína, es decir, a

55 Fab y sobre todo a los fragmentos Fc.

Gracias a sus propiedades como factor de unión a inmunoglobulinas, los polipéptidos de acuerdo con la invención, particularmente IPSE, se pueden emplear por tanto para detectar y purificar inmunoglobulinas, particularmente IgE e IgG, y fragmentos de las mismas (tales como los fragmentos Fc y/o Fab), por ejemplo, en la realización de un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) o como parte de una cromatografía de afinidad.

60

Debido a las propiedades inmunológicas de las proteínas y los polipéptidos de la invención, éstas son particularmente adecuadas para la producción de una composición farmacéutica para inducir o amplificar una respuesta inmune Th2, particularmente para la producción de una composición farmacéutica para tratar enfermedades que se acompañan de una respuesta inmune Th1. Estas enfermedades son preferentemente enfermedades procedentes del grupo consistente en esclerosis múltiple, uveítis autoinmune, diabetes mellitus, artritis reumatoide, síndrome de Behcet, infecciones

65 con *Helicobacter pylori*, enfermedades intestinales inflamatorias (particularmente la enfermedad de Crohn), reacción de rechazo aguda al trasplante de órganos y abortos espontáneos recurrentes.

ES 2 316 560 T3

Un objeto de la invención es en particular el uso de los polipéptidos de acuerdo con la invención, pero sobre todo IPSE, para producir una composición farmacéutica para la inmunomodulación, por ejemplo, en caso de reacciones alérgicas. En virtud de estas propiedades de unión a la inmunoglobulina, los péptidos de acuerdo con la invención son más adecuados para la terapia de enfermedades que se caracterizan por un nivel elevado en suero de IgE y/o una producción incrementada de interferón gamma, como por ejemplo, la rinoconjuntivitis alérgica y el asma bronquial alérgico.

También se incluyen composiciones farmacéuticas que contienen una proteína o un polipéptido de acuerdo con la invención, junto con sustancias auxiliares y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las proteínas y los polipéptidos de la presente invención sirven también para inducir o intensificar la producción de IL-4, IL-13 y/o IgE *in vitro*, en donde granulocitos basófilos, linfocitos B, linfocitos T o linfocitos citolíticos naturales (NK) en particular, pero también otras células (del sistema inmune o de otros tejidos, tales como por ejemplo, células endoteliales o fibroblastos) y líneas celulares obtenidas a partir de las mismas, se incuban con una proteína o un polipéptido mencionado anteriormente. De esta forma, las proteínas y los polipéptidos son adecuados para la producción de IL-4 y/o IL-3 *in vitro*. En este procedimiento, las células mencionadas anteriormente se incuban con la proteína o con el polipéptido y a continuación se aísla IL-4 y/o IL-13 a partir del material sobrenadante.

Otro uso de las proteínas y de los polipéptidos de acuerdo con la invención, consiste en la inhibición de la producción de citocina Th1/respuesta Th1 mediante células mononucleares procedentes de la sangre periférica (de seres humanos y de animales) *in vitro*.

Ya que las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente codifican las proteínas y los péptidos de acuerdo con la invención, son adecuadas como matrices para la producción *in vitro* de las proteínas o los polipéptidos, es decir, para la expresión *in vitro*. Para ello, el ADN se incorpora por ejemplo en un vector de expresión y las proteínas correspondientes se sobrepresan de forma recombinante en células hospedadoras adecuadas, tales como por ejemplo, *Escherichia coli*. En caso de que la glicosilación sea decisiva para la actividad funcional de las proteínas o de los polipéptidos, la expresión tiene lugar en baculovirus o en otro sistema eucarionte.

Por tanto, un objeto de la invención es además un vector de expresión que incorpora una molécula de ácido nucleico acoplada dentro del mismo.

Las moléculas de ácido nucleico son también adecuadas para la producción de una composición farmacéutica para la expresión *in vivo* (p. ej., vacunación con ADN). La preparación de dichas proteínas y polipéptidos se puede realizar, por tanto, *in vivo*, más específicamente de cara a un cambio en una respuesta inmune. Para este fin, el ADN correspondiente se incorpora en un vector para transferir genes (como por ejemplo un vector adenovírico). De este modo, por ejemplo, los sistemas de expresión adenovíricos conducen a una producción transitoria muy alta de proteínas; la expresión organoespecífica también es posible. Debido a una inyección intramuscular del vector, la proteína o el polipéptido local se pueden inducir inicialmente en animales experimentales. Sistemas de expresión adecuados, particularmente para uso en humanos, son bien conocidos por los expertos en la técnica y se mejoran continuamente de cara a la seguridad de su uso.

Por tanto, también es un objeto de la invención, un vector para la transferencia de genes en el que una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, se incorpora y también un compuesto farmacéutico que contiene dicho vector de transferencia de genes junto con sustancias auxiliares y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

A continuación se aclara con más detalle la invención mediante los ejemplos de realización.

Ejemplo 1

Métodos para la obtención del antígeno de los huevos de Schistosoma mansoni (SmEA)

El material de partida para la purificación de IPSE son huevos de *Schistosoma mansoni* que están a disposición sólo en una cantidad limitada, ya que su obtención es laboriosa y costosa. A partir de los huevos de esquistosoma, se obtuvo un extracto total denominado antígeno de los huevos de *Schistosoma mansoni* (SmEA), mediante extracción en solución salina tamponada con fosfato (Boros D L y col., *J. Exp. Med.* 132 (1970) 488-507; Carter CE y col., *J Parasitol.* 64 (1978) 285-290). Después de dializar frente a agua destilada, se almacenó en forma liofilizada hasta un procesamiento posterior. Debido a que IPSE está presente en SmEA con una concentración muy baja, no se reconoce entre los numerosos constituyentes después de la presentación del extracto total mediante SDS-PAGE y tinción con plata.

Ejemplo 2

Métodos para purificar IPSE a partir de SmEA

A. Cromatografía de intercambio catiónico

Al contrario que en otros métodos para la purificación de proteínas, tales como la cromatografía por exclusión (Superdex 200 PC, sistema SMART, Pharmacia), la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), la HPLC de fase inversa y el enfoque isoelectrico preparativo (Rotofor, Bio-Rad Laboratories, Múnich, Alemania), que en nuestras

ES 2 316 560 T3

manos condujeron a una pérdida total y/o a un enriquecimiento insatisfactorio del principio activo que induce la IL-4, conseguimos un claro enriquecimiento de IPSE con la técnica de cromatografía de intercambio catiónico.

5 Para ello se recogió el SmEA liofilizado (2 mg) en 0,5 ml de tampón de fosfato potásico 20 mM, pH 5,0, y se separó mediante cromatografía de intercambio catiónico (SP-Sefarosa; columnas de 1 ml de HiTrap® pre-empaquetadas, Amersham Pharmacia, Friburgo, Alemania). Después de aplicar la muestra y de lavarla con el tampón de partida (tampón de fosfato-K 20 mM, pH 5,0), el material unido se eluyó con un gradiente salino lineal hasta tener KCl 1 M en el tampón de partida. La separación tuvo lugar en un sistema *Äktaprime* (Amersham Pharmacia, Friburgo, Alemania) con un caudal medio de 1 ml/min. Las fracciones de 0,5 ml se recogieron. El pH 5,0 es decisivo puesto que con valores de pH superiores (pH 6,0) una gran parte de IPSE sale de la columna junto con el eluyente rico en proteínas y de este modo no tiene lugar el enriquecimiento del principio activo. Las fracciones funcionalmente activas (detección mediante la determinación de la inducción de IL-4 en el ensayo basófilo, véase más abajo) se reunieron, se concentraron mediante un Centricon Plus 20 (Millipore, Eschborn, Alemania) y el tampón se intercambiaba con tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. El uso de Centricon Plus20 para la concentración fue decisivo para el rendimiento de IPSE, ya que la pérdida del principio activo en más de 90% tenía lugar con el uso de otras unidades de concentración, tales como Centricon y Centriprep. Para reducir aún más las pérdidas debidas a la concentración con Centricon Plus20, las unidades se preincubaron adicionalmente con Tween 20 al 5% durante una noche. Antes del uso se lavaron con agua doblemente destilada para evitar la transferencia de Tween a los ensayos funcionales y de este modo evitar un daño de los basófilos con la consecuencia de resultados negativos falsos. Este proceder hace posible mantener la pérdida de actividad inductora de IL-4 en relación con el procedimiento de concentración por debajo del 50%.

Después de concentrar las muestras (por lo menos hasta un factor 5), se consiguió detectar dos bandas adyacentes en un intervalo de peso molecular de aproximadamente 40 kD en las fracciones activas, además de componentes irrelevantes en el gel SDS-PAGE, después de una tinción con plata. Sin embargo, fue necesario un largo periodo de revelado de la tinción con plata (al menos 30 minutos) para detectar estas dos bandas. En las fracciones no activas no se detectaron las bandas dobles.

La sospecha de que una (o ambas) de las dos bandas fuera el principio activo buscado, aumentó con el resultado del siguiente experimento: la separación de SmEA a través de SDS-PAGE y la electroelución fraccionada del gel, permitieron asignar la actividad inductora de IL-4 a un intervalo de peso molecular de alrededor de 40 kD, es decir, al sector en el que se encontraron las dos bandas.

B. Cromatografía de afinidad mediante Sefarosa con aglutinina de *Aleuria aurantia*

35 El hecho de que los huevos de esquistosoma contengan numerosas, en algunos casos poco comunes, glicoproteínas y glicolípidos glicosilados, se empleó para una purificación adicional. Por tanto, un análisis de tipo transferencia de afinidad mostraba que los componentes del extracto total de huevos de esquistosoma, después de la separación mediante SDS-PAGE y la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, eran reconocidos diferencialmente por una serie de lectinas marcadas, que incluían la aglutinina de *Aleuria aurantia*, concavalina A, aglutinina de *Datura stramonium*, aglutinina de *Galanthus nivalis*, aglutinina de *Maackia amurensis*, aglutinina de cacahuete, aglutinina de *Ricinus communis*, aglutinina de *Sambucus nigra*, aglutinina de germen de trigo. Sin embargo, sólo reaccionaban tres lectinas con las fracciones activas después de la cromatografía de intercambio catiónico. De ellas, sólo la aglutinina de *Aleuria aurantia* que se une a la fucosa ligada de forma α 1-6-glicosídica, interaccionaba selectivamente con las dos bandas cercanas alrededor de 40 kD. Por otro lado, las otras dos lectinas (la aglutinina de cacahuete y la aglutinina de *Ricinus communis*) reaccionaban exclusiva o adicionalmente con otras bandas, incluyendo las detectables en las fracciones no activas.

Por tanto la hipótesis de trabajo se estableció de modo que las bandas dobles se corresponden con IPSE y a continuación se realizó una cromatografía de afinidad con la aglutinina de *Aleuria aurantia* (Vector Laboratories, Alexis-Deutschland GmbH, Grünberg, Alemania). Para ello, se acopló esta lectina a sefarosa activada con NHS (columna de HiTrap; Amersham Pharmacia). El acoplamiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para los fines de la cromatografía de afinidad, las fracciones funcionalmente activas procedentes de la cromatografía de intercambio catiónico, se transfirieron a la columna, se lavaron con el tampón de partida (tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,0) y se eluyeron con el tampón de elución (tampón de partida + fucosa 0,1 M (Sigma, Taufkirchen, Alemania)). Las fracciones se concentraron a continuación de nuevo mediante un Centricon Plus 20 (Millipore GmbH, Eschborn, Alemania), tal y como se ha descrito anteriormente, y el material obtenido se caracterizó de nuevo con la ayuda de un SDS-PAGE y a continuación una tinción con plata o una afinotransferencia con aglutinina de *A. aurantia* marcada. La actividad inductora de IL-4 se localizó exclusivamente en las fracciones con las bandas dobles que se unen a la aglutinina de *A. aurantia*. Las fracciones positivas se reunieron y se dividieron en partes alícuotas o se dializaron frente a agua doblemente destilada y liofilizada. Posteriormente se almacenaron a -80°C.

60 Ejemplo 3

Determinación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos completa de IPSE

65 A. Secuenciación parcial N-terminal de IPSE

Para obtener cantidades adecuadas de IPSE para la secuenciación N-terminal, las fracciones activas procedentes de 10 tandas de cromatografía de intercambio catiónico, se reunieron y se purificaron adicionalmente mediante cro-

ES 2 316 560 T3

matografía de afinidad con la aglutinina de *Aleuria aurantia*. El material así obtenido (IPSE) se observó con SDS-PAGE (tinción con plata o transferencia de lectina) a 40 kD como una banda doble sin una contaminación adicional. La secuenciación parcial N-terminal de las dos bandas (sin una separación adicional), permitió identificar 18 de los 20 aminoácidos N-terminales. La búsqueda en bases de datos de proteínas, no reveló la existencia de, ninguna proteína homóloga conocida hasta la fecha. La búsqueda en una base de datos de EST proporcionó en primer lugar un marcador de secuencia expresada (EST) procedente de una genoteca de ADNc de huevos de *Schistosoma mansoni*. Una secuencia de aminoácidos que era idéntica en 11 aminoácidos consecutivos a la secuencia N-terminal de IPSE, se obtuvo a partir de uno de los tres marcos de lectura de esta EST.

10 B. Aislamiento del ADNc de IPSE procedente de genotecas de ADNc de huevos de *S. mansoni*

La información de la secuencia descrita en la sección anterior, permitió la producción de una sonda de ADN (sin degenerar) específica para la búsqueda de la secuencia de nucleótidos de IPSE en las genotecas de ADNc de huevos de *Schistosoma mansoni*. Una genoteca de ADNc de huevos de *S. mansoni* producida por nosotros y también una producida por G. Oliveira (ambas en el vector λ -zap) contenían clones que reaccionaban con esta sonda. La secuenciación de estos clones reveló que su secuencia N-terminal completa es idéntica a la secuencia N-terminal de IPSE, siendo cisteínas los aminoácidos que inicialmente no se conocían (el aminoácido cisteína es difícil de detectar con una secuenciación N-terminal). Una comparación de la secuencia encontrada en el contexto de la presente invención con la EST indicada anteriormente, reveló unas diferencias considerables que se podrían atribuir posiblemente a errores en la secuenciación y a saltos en el marco de lectura de la EST. La Fig. 2 ilustra la secuencia completa de IPSE a nivel de ADN y también a nivel proteico (con una secuencia líder de 20 aminoácidos).

Ejemplo 4

25 Sistema de detección para IPSE

A. Purificación y estimulación de granulocitos basófilos humanos

El aislamiento y la estimulación de granulocitos basófilos humanos tuvieron lugar por el método de K. Haisch y col. (*J. Immunol. Methods* 226 (1999) 129-137). Para ello, se obtuvieron células mononucleares a partir de sangre venosa de donantes de sangre sanos, con ayuda de un gradiente de Ficoll-Percoll, a partir de las cuales se aislaron fracciones ricas en basófilos mediante elutriación en contracorriente. Los basófilos se aislaron de las mismas con una alta pureza (de forma rutinaria más de 98% de pureza) mediante lechos inmunomagnéticos (sistema MACS). Los basófilos purificados se incubaron con SmEA o sus fracciones durante 4 horas (IL-4) o 18 horas (IL-13) y el material sobrenadante se retiró para la determinación de citocinas y se almacenó a -70°C hasta el análisis.

B. ELISA de IL-4 y de IL-13

Las concentraciones de las citocinas IL-4 e IL-13 en el material sobrenadante del cultivo se determinaron mediante un ELISA de tipo sándwich (entre otros, disponible comercialmente).

Ejemplo 5

45 Obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales contra IPSE

Para obtener anticuerpos policlonales, se inyectó IPSE intramuscularmente en los dos muslos de conejos, en presencia de coadyuvante TiterMax. La formación de anticuerpos específicos de IPSE se determina a través de una transferencia de tipo Western. Las inyecciones de refuerzo tuvieron lugar a intervalos de 4 semanas.

La preparación de anticuerpos monoclonales se realiza de acuerdo con el método desarrollado por Köhler y Milstein (*Nature* 256 (1975) 495-497) en la modificación de acuerdo con *Current Protocols of Immunology* (compiladores: J. E. Coligan y col., editorial: John Wiley & Sons, Inc. (1997); ISBN: 0-471-522767). Para ello, se inyectó IPSE intraperitonealmente en dos ratones, en presencia de coadyuvante. Una inyección de refuerzo (sin coadyuvante) se realizó al cabo de 10-14 días. Tres días después, se fusionaron las células del bazo de los ratones con la línea celular de mieloma SP2/0-Ag14. Al día siguiente, se añade un medio que contiene hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) para seleccionar las células del hibridoma. Después de 10-14 días, se escruta el material sobrenadante de los hibridomas primarios en busca de reactividad de los anticuerpos contra IPSE, mediante el método de transferencia de tipo Western. Las líneas de hibridoma que son candidatas, se propagan y se clonan de nuevo mediante "Limiting Dilution".

60 Ejemplo 6

Eficacia de IPSE no glicosilada

La lacto-N-fucopentaosa III (LNFPIII) es un componente glicano principal de las glicoproteínas en los extractos de antígeno procedentes de huevo de *S. mansoni*. De cara a la capacidad de los polipéptidos de acuerdo con la invención, particularmente de IPSE, para activar los basófilos humanos, se investigó si la lacto-N-fucopentaosa III unida a seroalbúmina humana (LNFPIII-HSA) (Biocarb Chemicals, Lund, Suecia), es también capaz de activar los basófilos. El método experimental se correspondía con el método al que se hace referencia en el Ejemplo 4A.

ES 2 316 560 T3

Se observó que, al contrario del antígeno de los huevos de *S. mansoni* empleado como testigo positivo, LNFPIII-HSA no inducía la desgranulación de los basófilos, la liberación de mediadores o la expresión de IL-4 o de IL-13, en un amplio intervalo de concentración (0,03-30 $\mu\text{g/ml}$).

5 Ejemplo 7

Estudio de las características de IPSE para la unión a inmunoglobulinas

10 Para investigar las características de la unión a inmunoglobulinas de los polipéptidos de acuerdo con la invención, en particular de IPSE, se emplearon técnicas de transferencia de tipo Western y de transferencia puntual.

15 *Transferencia puntual:* La IgE policlonal (BA1004; DPC Biermann, Bad Nauheim, Alemania) se aplicó a una membrana de nitrocelulosa en diversas cantidades (1000-30 ng/mancha). Los sitios de unión libres de la membrana se bloquearon a continuación, incubando en una solución salina tamponada con Tris 0,1 M, pH 7,4, añadiendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (Tris-Tween) y la membrana se incubó durante una noche a temperatura ambiente con IPSE re-
combinante biotinilada (proteína de fusión His-Tag (cola de 6 histidinas) 1 $\mu\text{g/ml}$). Después del lavado, las manchas se incubaron durante 2 horas con estreptavidina-fosfatasa alcalina (1:5000). El revelado de las manchas se realizó después de lavar de nuevo, mediante la adición de la mezcla de sustrato y cromógeno (nitro azul de tetrazolio-bromo-
cloro-indolil-fosfato).

20 De forma paralela se aplicaron diversas cantidades de la proteína de fusión IPSE His-Tag (1000-30 ng/mancha) a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear los sitios de unión libres (véase el párrafo anterior), la membrana se incubó durante una noche a temperatura ambiente con IgE policlonal biotinilada (1 $\mu\text{g/ml}$). El revelado posterior se realizó mediante estreptavidina-fosfatasa alcalina, como en el párrafo anterior.

25 *Transferencia de tipo Western:* Para ello se fraccionó la IPSE o la proteína de fusión recombinante IPSE His-Tab, mediante un SDS-PAGE (12% de T, 4% de C) según un método convencional (Lämmli, U. K., *Nature* 227 (1970) 680-685) bajo condiciones no reductoras y se transfirió mediante una transferencia semi seca (30 minutos, 0,8 mA/cm) a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schüll, Dassel, Alemania). Los sitios de unión a proteína libres, se bloquearon incubando la membrana con Tris-Tween. A continuación se incubaron tiras de la membrana durante una noche a temperatura ambiente con sueros de donantes de sangre sanos y sin sensibilizar (1:20 o 1:100 en Tris-Tween). Después del lavado, las tiras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con fosfatasa alcalina-IgE anti-humana marcada (1:2000 en Tris-Tween; Allergopharma, Reinbek, Alemania) o con IgG anti-humana (1:40000; Dianova, Hamburgo, Alemania). El revelado de las manchas se realizó después de lavar de nuevo, mediante la adición de la mezcla de sustrato-cromógeno (nitro azul de tetrazolio-bromo-cloro-indolil-fosfato).

30 Para comparar entre sí la afinidad de la unión de IPGE a IgE, o a IgG, se incubaron transferencias de tipo Western con IPSE His-Tag (0,5 $\mu\text{g/cm}$) con IgE humana (100-100.000 ng/ml). La prueba de la unión de IgE a IPSE His-Tag tuvo lugar mediante la incubación con IgE anti-humana marcada con fosfatasa alcalina (1:2000; Allergopharma, Reinbeck, Alemania), tal y como se ha aclarado anteriormente.

35 Se observó que IPSE se une a las subclases de IgG humana 1 a 4 y que después de digerir con papaína, se une a los fragmentos Fc y Fab, así como a IgE con una afinidad aproximadamente 100 veces superior a la de IgG.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Proteína con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

2. Proteína según la reivindicación 1, **caracterizada** porque está glicosilada.

3. Proteína o polipéptido, **caracterizado(a)** porque es un homólogo, un derivado o un fragmento de la proteína según la reivindicación 1 ó 2, que presenta la actividad de estimular la producción de IL-4 y/o de IL-13 en granulocitos basófilos humanos.

4. Molécula de ácido nucleico, **caracterizada** porque presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o un polipéptido según las reivindicaciones 1 a 3, y no se trata de una molécula que tiene la secuencia siguiente:

```

catcagttca tatgcgata tttagttaag agcacacaag aattataagg cgcattacat
ttocttggat tagaacggac agtatgtcct tctcagtttc gggttgattg atacattcaa
ctttccatc ctttgtttga atacaccgtt taatagagga atgcctttga atcgggattt
cgtgaagtca tcaatgcagg taccatgtcc gagaccagta atccgacctg tgraattgcc
gaagtcaata ataccagtat ggaecgtctc tcttccgtgt cattedacgaa gggtaacaaa
cagttccagg ttgtccatgg tgggtgagagt gagcaaccgc ttttgtagac ttcattatat
gaccctctc atacgtttca tcgtacaatt gtagacattt ttgtctggat ccgggtgtgg
tateccattg gcttatcatg tgttgacata cggcataaga acctcgattt cgtggctttg
tttatctggg ggggaacttc tctgtaacce ttcctctctg attttccat
    
```

5. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4, que tiene la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 1.

6. Vector de expresión, **caracterizado** porque contiene una molécula de ácido nucleico incorporada según la reivindicación 4 ó 5.

7. Anticuerpo, **caracterizado** porque se dirige específicamente contra una proteína y/o un polipéptido según las reivindicaciones 1 a 3.

8. Anticuerpo según la reivindicación 7, **caracterizado** porque es un anticuerpo monoclonal.

9. Composición farmacéutica, **caracterizada** porque contiene una proteína o un polipéptido según las reivindicaciones 1 a 3, junto con coadyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

10. Proteína o polipéptido según las reivindicaciones 1 a 3, para emplear como medicamento.

11. Uso de una proteína o de un polipéptido según las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de enfermedades que se escogen entre el grupo constituido por esclerosis múltiple, uveítis autoinmune, diabetes mellitus, artritis reumatoide, síndrome de Behcet, infecciones con *Helicobacter pylori*, enfermedades intestinales inflamatorias, reacción de rechazo aguda al trasplante de órganos, abortos espontáneos recurrentes, infecciones con nematodos, esquistosomiasis, reacciones alérgicas, rinoconjuntivitis alérgica y asma bronquial alérgico.

12. Uso según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la enfermedad intestinal inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

13. Uso de una proteína o de un polipéptido según las reivindicaciones 1 a 3, para inducir o acentuar La producción de IL-4, IL-13 y/o IgE *in vitro*, **caracterizado** porque las células escogidas a partir del grupo constituido por granulocitos basófilos humanos, linfocitos B, linfocitos T, células NK, células endoteliales y fibroblastos y otras células del sistema inmune o de otros tejidos, así como líneas celulares obtenidas a partir de las mismas, se incuban con una proteína o un polipéptido según las reivindicaciones 1 a 3.

14. Uso de una proteína o de un polipéptido según las reivindicaciones 1 a 3, para detectar y para purificar inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas.

15. Uso según la reivindicación 14, **caracterizado** porque las inmunoglobulinas son IgE e IgG y los fragmentos son fragmentos Fc y/o Fab.

16. Uso según la reivindicación 14 ó 15, en el contexto de un ELISA.

ES 2 316 560 T3

17. Uso según la reivindicación 14 ó 15, en el contexto de una cromatografía de afinidad.

18. Uso de una molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 4 ó 5, para expresar *in vitro* las proteínas o los polipéptidos según una de las reivindicaciones 1 a 3.

19. Uso según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la molécula de ácido nucleico se incorpora en un vector de expresión adecuado y porque las proteínas o los polipéptidos se sobreexpresan de forma recombinante en las células hospedadoras adecuadas.

20. Uso según la reivindicación 19, **caracterizado** porque las células hospedadoras son células de *Escherichia coli*, baculovirus o células eucariontes.

21. Composición farmacéutica que comprende un vector de expresión según la reivindicación 6, para expresar las proteínas o los polipéptidos codificados *in vivo*.

22. Composición farmacéutica **caracterizada** porque contiene un vector de transferencia de genes, en el que se incorpora una molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 4 ó 5, junto con coadyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

23. Procedimiento para la preparación de IL-4 y/o IL-13 *in vitro*, **caracterizado** porque las células escogidas a partir del grupo constituido por granulocitos basófilos humanos, linfocitos B, linfocitos T, células NK, células endoteliales y fibroblastos y otras células del sistema inmune o de otros tejidos, así como líneas celulares obtenidas a partir de las mismas, se incuban con una proteína o un polipéptido según las reivindicaciones 1 a 3, y se aísla IL-4 y/o IL-13 a partir del material sobrenadante del cultivo.

24. Procedimiento para aislar proteínas que inducen IL-4 a partir de gusanos parásitos, **caracterizado** porque el antígeno Ei (EA) o un extracto que proviene de estados que inducen Th2 o IgE de gusanos parásitos (EX), se dializa frente a agua y se liofiliza, el EA o el EX liofilizado se fracciona mediante cromatografía de intercambio catiónico, las fracciones que producen una inducción de IL-4 durante la incubación de los granulocitos basófilos humanos se reúnen, se concentran, se efectúa una cromatografía de afinidad con sefarsa activada con NHS, a la que se acoplan la aglutinina de *Aleuria aurantia* o los anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína según las reivindicaciones 1 a 3, las fracciones que producen una inducción de IL-4 durante la incubación de los granulocitos basófilos humanos, se reúnen y se concentran.

25. Procedimiento según la reivindicación 24, **caracterizado** porque los gusanos parásitos se escogen entre el grupo consistente en *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium*, *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium lanceolatum*, *Echinococcus multilocularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Ankylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*, *Taenia solium*, *Taenia bovis* y otras especies relacionadas.

26. Procedimiento para aislar la proteína según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el antígeno Ei de *Schistosoma mansoni* (SmEA) se dializa frente a agua y se liofiliza, el SmEA liofilizado se fracciona mediante cromatografía de intercambio catiónico, las fracciones que producen una inducción de IL-4 durante la incubación de los granulocitos basófilos humanos se reúnen, se concentran, se efectúa una cromatografía de afinidad con sefarsa activada con NHS, a la que se acopla la aglutinina de *Aleuria aurantia* o los anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína según las reivindicaciones 1 a 3, las fracciones que producen una inducción de IL-4 durante la incubación de los granulocitos basófilos humanos se reúnen y se concentran.

27. Procedimiento según las reivindicaciones 24 y 25, **caracterizado** porque se aísla la proteína obtenida.

28. Procedimiento según la reivindicación 27, **caracterizado** porque la proteína aislada se liofiliza a continuación.

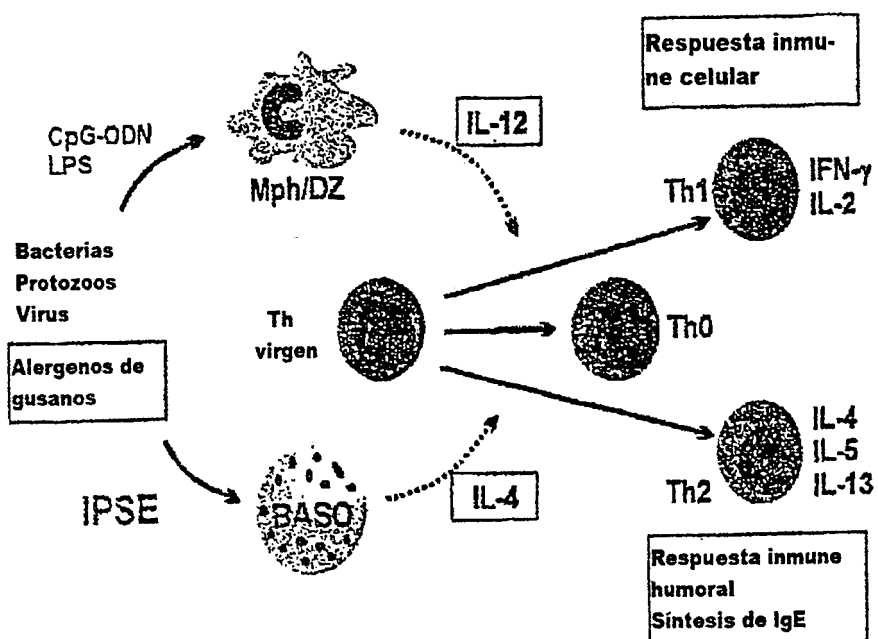


Fig. 1:

ES 2 316 560 T3

```

5'   9       18       27       36       45       54
    ATG TTT CPT ATT GCC GTA TTG TCA TAC ACA TTG ATA AGT CAA TTG GGG ATA ACT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    M  F  L  I  A  V  L  S  Y  T  L  I  S  Q  L  G  I  T

      63       72       81       90       99       108
    ACA TCG GAT TCA TGC AAA TAT TGT CTA CAA TTG TAC GAT GAA ACG TAT GAG AGG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    T  S  D  S  C  K  Y  C  L  Q  L  Y  D  E  T  Y  E  R

      117      126      135      144      153      162
    GGT TCA TAT ATT GAA GTC TAC AAA AGC GTT GGC TCA CTC TCA CCA CCA TGG ACA
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    G  S  Y  I  E  V  Y  K  S  V  G  S  L  S  P  P  W  T

      171      180      189      198      207      216
    CCT GGA TCT GTT TGT GTA CCC TTC GTA AAT GAC ACG AAG AGA GAG CGT CCA TAC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    P  G  S  V  C  V  P  F  V  N  D  T  K  R  E  R  P  Y

      225      234      243      252      261      270
    TGG TAT TTA TTT GAC AAC GTC AAT TAC ACA GGT CGG ATT ACT GGT CTC GGA CAT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    W  Y  L  F  D  N  V  N  Y  T  G  R  I  T  G  L  G  H

      279      288      297      306      315      324
    GGT ACC TGC ATT GAT GAC TTC ACG AAA TCC GGA TTC AAA GGC ATT TCC TCT ATT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    G  T  C  I  D  D  F  T  K  S  G  F  K  G  I  S  S  I

      333      342      351      360      369      378
    AAA CGG TGT ATT CAA ACA AAG GAT GGA AAA GTT GAA TGT ATC AAT CAA CCG AAA
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    K  R  C  I  Q  T  K  D  G  K  V  E  C  I  N  Q  P  K

      387      396      405
    CGG AGA AGG ACA TAC TGT CGA TTC TAA 3'
    --- --- --- --- --- --- ---
    R  R  R  T  Y  C  R  F  *
  
```

Fig. 2:

ES 2 316 560 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Forschungszentrum Borstel	
5	<120> Sustancias activas inmunomoduladoras procedentes de gusanos parásitos y procedimiento para su aislamiento	
	<130> P059569	
10	<140>	
	<141>	
	<160> 2	
15	<170> PatentIn versión 2.1	
	<210> 1	
20	<211> 405	
	<212> ADN	
	<213> <i>Schistosoma mansoni</i>	
25	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(405)	
30	<400> 1	
	atg ttt ctt att gcc gta ttg tca tac aca ttg ata agt caa ttg ggg 48	
	Met Phe Leu Ile Ala Val Leu Ser Tyr Thr Leu Ile Ser Gln Leu Gly	
	1 5 10 15	
35	ata act aca tcg gat tca tgc aaa tat tgt cta caa ttg tac gat gaa 96	
	Ile Thr Thr Ser Asp Ser Cys Lys Tyr Cys Leu Gln Leu Tyr Asp Glu	
	20 25 30	
40	acg tat gag agg ggt tca tat att gaa gtc tac aaa agc gtt ggc tca 144	
	Thr Tyr Glu Arg Gly Ser Tyr Ile Glu Val Tyr Lys Ser Val Gly Ser	
	35 40 45	
45	ctc tca cca cca tgg aca cct gga tct gtt tgt gta ccc ttc gta aat 192	
	Leu Ser Pro Pro Trp Thr Pro Gly Ser Val Cys Val Pro Phe Val Asn	
	50 55 60	
50	gac acg aag aga gag cgt cca tac tgg tat tta ttt gac aac gtc aat 240	
	Asp Thr Lys Arg Glu Arg Pro Tyr Trp Tyr Leu Phe Asp Asn Val Asn	
	65 70 75 80	
55	tac aca ggt cgg att act ggt ctc gga cat ggt acc tgc att gat gac 288	
	Tyr Thr Gly Arg Ile Thr Gly Leu Gly His Gly Thr Cys Ile Asp Asp	
	85 90 95	
60	ttc acg aaa tcc gga ttc aaa ggc att tcc tct att aaa cgg tgt att 336	
	Phe Thr Lys Ser Gly Phe Lys Gly Ile Ser Ser Ile Lys Arg Cys Ile	
	100 105 110	
65	caa aca aag gat gga aaa gtt gaa tgt atc aat caa ccg aaa cgg aga 384	
	Gln Thr Lys Asp Gly Lys Val Glu Cys Ile Asn Gln Pro Lys Arg Arg	
	115 120 125	
65	agg aca tac tgt cga ttc taa 405	
	Arg Thr Tyr Cys Arg Phe	
	130 135	

ES 2 316 560 T3

<210> 2

<211> 134

<212> PRT

5 <213> *Schistosoma mansoni*

<400> 2

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

25

30

35

40

45

50

55

60

65