



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 761**

51 Int. Cl.:

A61K 39/38 (2006.01)	A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)	A61K 38/21 (2006.01)
A61K 38/40 (2006.01)	A61K 39/42 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)	A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)	A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02714705 .7**

96 Fecha de presentación : **08.01.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1351707**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2003**

54

Título: **Procedimientos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias en un sujeto y en ensayos de diagnóstico *in vitro*.**

30

Prioridad: **09.01.2001 US 260541 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2011

73

Titular/es: **Baylor Research Institute
3434 Live Oak Street
Dallas, Texas 75204, US**

72

Inventor/es: **Banchereau, Jacques, F.;
Palucka, Anna, Karolina y
Blanco, Patrick**

74

Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 363 761 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

Procedimientos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias en un sujeto y en ensayos de diagnóstico in vitro.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y ensayos de diagnóstico relacionados con enfermedades autoinmunitarias.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades autoinmunitarias son enfermedades terribles e incapacitantes, y aparecen cuando el propio sistema inmunológico de un paciente actúa contra sí mismo atacando al propio organismo o a los propios tejidos del paciente.

- 10 Un ejemplo de una enfermedad autoinmunitaria es el lupus eritematoso sistémico (LES), que se caracteriza por una afectación multiorgánica y anomalías inmunológicas que incluyen la presencia de linfocitos T y linfocitos B autorreactivos. Los autoanticuerpos contra el nucleosoma parecen ser un rasgo característico del LES y sugieren que una manipulación no adecuada de las células que mueren (apoptóticas) puede constituir un acontecimiento patogénico clave en el desarrollo del LES. El LES es el resultado de la alteración de la regulación de las ramas tanto humoral como celular del sistema inmunológico, lo que indica que la alteración inicial puede ser al nivel de las células que reclutan y controlan los efectores inmunitarios, a saber, las células dendríticas (CD).

- 20 Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno especializadas que producen respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T (Steinman, R. M. (1991) Ann. Rev. Immunology, Vol. 9, págs. 271-296 y Banchereau y col. (2000) Ann. Rev. Immunol. 18:767). Las CD inducen y sustentan respuestas inmunitarias y se ha demostrado que capturan las células moribundas y presentan sus antígenos a los linfocitos T CD4⁺, que pueden activar a continuación otros efectores inmunitarios, incluidos los linfocitos B. Las CD progenitoras de la médula ósea dan lugar a la circulación de precursores que se dirigen al tejido al que pertenecen como células no maduras con una elevada capacidad fagocítica. Después del daño tisular, las CD capturan antígenos (Ag) y, posteriormente, migran a los órganos linfáticos donde seleccionan linfocitos T específicos de antígenos inusuales, iniciando así las respuestas inmunitarias. Las CD presentan antígenos a los linfocitos T CD4⁺, que a su vez regulan los efectores inmunitarios, incluyendo los específicos de antígeno tales como los linfocitos T CD8⁺ y los linfocitos B, así como los inespecíficos como macrófagos, eosinófilos y células NK. Las CD también pueden activar directamente los linfocitos B e inducir su diferenciación a células plasmáticas in vitro.

- 30 En la sangre circulan tres subgrupos de precursores de CD ("preCD"): (1) monocitos CD14⁺, (2) preCD mieloides CD11c⁺ y (3) preCD plasmacitoides (linfoides) CD11c⁻. Los monocitos pueden diferenciarse en células que muestran características de CD no maduras o macrófagos (MO). Las CD no maduras llegan a ser CD maduras tras el tratamiento con CD40L y/o LPS o cuando se cultivan con una combinación de citocinas, que incluyen TNF, IL-1 e IL-6. Las preCD mieloides CD11c⁺ dan lugar a CD intersticiales (CDint), células de Langerhans (CL) o MΦ en función del entorno local de las citocinas.

- 35 Los precursores de CD linfoides CD11c IL-3Rα⁺ son una fuente principal de interferón alfa (IFN-α). Los niveles elevados de IFN-α se encuentran frecuentemente en suero de lupus (Kim y col., Clin. Exp. Immunol. 70:562-269, 1987). Además, el tratamiento con IFN-α induce frecuentemente la aparición de autoanticuerpos y, finalmente, el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias, incluido el LES (Ronnlund y col., J. Intern. Med. 227:207-210, 1990). Se ha informado de anticuerpos anti-IFN-α en pacientes de LES (Suit y col., Clin. Exp. Rheumatol. 1:133-135).

- 40 Se ha informado de que las CD plasmacitoides producen IFN-α, que a su vez afecta a la diferenciación de las CD mieloides y al crecimiento y activación de los linfocitos B. Spits y col. (J Exp Med 192(12): 1775-84, 2000) y Blom y col. (J Exp Med 192 (12): 1785-96. 2000) informa de que las CD plasmacitoides CD11c⁻ tienen origen linfoide en humanos. Siegal y col., (Science 284: 1835, 1999) informa de que las CD linfoides (CD plasmacitoides) producen grandes cantidades de IFN-α cuando son expuestas al virus herpes simple inactivado. Cella y col., (Nature Medicine 5(8):868-70, 1999) informa de que las CD linfoides (CD plasmacitoides) producen grandes cantidades de IFN-α en respuesta al virus de la gripe, así como unión a CD40.

Los autoanticuerpos (autoAc) en el LES pueden clasificarse en tres categorías principales: (1) anticuerpos antinucleares y anti-ADN de doble hebra; (2) autoAc dirigidos contra la superficie de células endoteliales y plaquetas (antifosfolípidos/glicoproteína β2); y (3) autoAc dirigidos contra moléculas de la superficie de células hematopoyéticas (véase, por ejemplo, revisión de Cabral y Alarcón-Segovia (1998) Curr. Opin. Rheumatol. 10:409). Además del daño tisular directo causado por las interacciones antígeno-anticuerpo celulares y/o tisulares, muchos de los síntomas de las enfermedades son el resultado del daño indirecto a través del depósito de inmunocomplejos en los tejidos. Se ha demostrado que este mecanismo es responsable de algunas formas de LES, nefritis, artritis y vasculitis (Lahita, R.G. 1999. Systemic Lupus Erythematosus. Academic Press; Kammer, G.M., y G.C. Tsokos. 1999. Lupus, Humana Press).

- 55 Los fallos en la eliminación de los inmunocomplejos, incluida la disfunción en la inclusión del receptor de Fc ("FcR") y el receptor de C3b ("C3bR"), así como defectos genéticos en proteínas del complemento y proteína C reactiva (todos ellos actores esenciales en la eliminación de complejos anti-ADN/nucleosoma) pueden contribuir al desarrollo del LES (Lahita, R.G. 1999. Academic Press; Kammer, G.M., y G.C. Tsokos. 1999 Humana Press). Los linfocitos B

desempeñan un papel principal en la patogenia del LES, ya que son responsables de la producción de autoanticuerpos e hipergammaglobulinemia.

5 Hooks y col. (N. Engl. J. Med. 301:5, 1979) describen la presencia de interferón inmunitario circulante en pacientes con enfermedades autoinmunitarias, incluido el LES. Kim y col. divulgaron que los niveles de IFN- α se correspondían con el índice de actividad clínica. Preble y col. (J. Exp. Med. 157:214, 1983) y von Wussow y col. (Arthritis Rheum. 32:914, 1989) divulgan que se encuentran niveles elevados de 2-5A sintetasa y proteína MX, dos proteínas inducidas específicamente por IFN- α , en las células mononucleares tanto de suero positivo para IFN como de suero negativo para IFN de pacientes de LES. Vallin y col. (J. Immunol. 163:6306 1999) divulgan que el factor de inducción de IFN- α actúa sobre leucocitos con características de CD no maduras. Batteux y col. (Eur. Cytokine Netw. 10: 509, 1999) divulgan
10 que la inducción de la producción de IFN- α por suero de LES depende de Fc γ RII (CD32).

Una complicación de la terapia con IFN- α es la inducción de afecciones autoinmunitarias (en aproximadamente del 4% al 19% de los casos), siendo la más frecuente la disfunción tiroidea (Ehrenstein y col., Arthritis Rheum. 36:279, 1993; Okanoue y col., J. Hepatol. 25:283, 1996; Ronnblom y col., Ann. Intern. Med. 115:178, 1991; Kalkner y col., Qjm. 91:393, 1998). De hecho, Schilling y col. (Cancer 68:1536, 1991) divulgan que la terapia con IFN- α también puede
15 inducir LES con una frecuencia del 0,15% al 0,7%. Todos los casos se asocian con la inducción o el aumento notable en las titulaciones de anticuerpos antinucleares y anticuerpos antiADN.

La diabetes de tipo I es otra enfermedad autoinmunitaria en la que el IFN- α juega un papel etiopatogénico importante. Foulis y col. (Lancet 2:1423, 1987) y Huang y col. (Diabetes 44:658, 1995) divulga una fuerte correlación entre la expresión de IFN- α por los islotes pancreáticos y el desarrollo de diabetes autoinmune en humanos. Además,
20 Chakrabarti y col. (J. Immunol. 157:522, 1996) divulga que la expresión de IFN- α por linfocitos B de los islotes de células de Langerhans del páncreas provoca diabetes en un modelo de ratón transgénico. Adicionalmente, Fabres y col. (Lancet 340:548, 1992) y Jerzy y col. (Lancet 343: 1167, 1994) divulga que la terapia con IFN- α puede inducir diabetes de tipo I en seres humanos.

La tirosina cinasa 3 de tipo FMS ("Flt3") es un miembro de la familia de receptores tirosina cinasa de tipo III que también incluye KIT (c-kit RTK), FMS (M-CSF RTK) y el receptor de factor decrecimiento derivado de plaquetas (PDGF). De forma similar a los ligandos para los receptores KIT y FMS, factor de células madre y M-CSF, respectivamente, el receptor de Flt3 es activado por una molécula afín, llamada ligando-Flt3 ("Flt3L"). El Flt3 es una forma variante de un receptor tirosina cinasa que está relacionado con los receptores c-fms y c-kit (Rosner y col. Oncogene, 6,1641-1650, 1991). El Flt3L es una citocina hematopoyética que se ha demostrado que facilita la
30 expansión de las CD y la generación de respuestas inmunitarias contra tumores (véase patente de EE. UU. N° 5.554.512, "Ligands for Flt3 Receptors"). Se ha encontrado que Flt3L regula el crecimiento y la diferenciación de células progenitoras y células madre (Blazar y col. (2001) Biology of Blood and Marrow Transplantation 7:197-207 y ver la patente de EE. UU. N° 5.843.423). Se demostró que el tratamiento con Flt3L de cultivos de células monocíticas tenía como resultado una notable expansión en el número absoluto de CD mieloides y linfoides y una reducción en la
35 proporción de linfocitos T esplénicos del donante (Blazar y col.).

El documento EP 0 254 647 describe medicamentos para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico (LES) que comprenden una citocina citotóxica.

El documento US 5 888 511 describe el tratamiento de un paciente con enfermedad autoinmunitaria mediante la neutralización, eliminación o inhibición de distintos tipos de interferón, factor de necrosis tumoral, antígenos HLA de clase II, IgE y otros factores patológicos y/o sus receptores, así como la neutralización, eliminación o inhibición de autoanticuerpos.
40

Huang X. y col. (1994. Immunity 1:469-478) discute si la expresión de IFN- α por los islotes podría ser una causa de lesiones en la diabetes de tipo I.

El documento US 5 919 452 describe procedimientos para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF- α utilizando anticuerpos antiTNF quiméricos y péptidos antiTNF.
45

Soos, J.M. y cols. (1997, J Neuroimmunol. 75:43-50) describe la administración de IFN tau para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias como EM.

El documento EP 0627487 describe ligandos para receptores flt3.

Stewart, T.A. y cols (1993. Science 260: 1942-1946) describe que la expresión de interferón alfa por linfocitos beta
50 podría ser causal en el desarrollo de diabetes de tipo I.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de acuerdo con la reivindicación 1.

La invención también está dirigida a una composición terapéutica para inhibir la diferenciación de monocitos a células dendríticas capaces de presentar antígenos de acuerdo con la reivindicación 8.

La invención también está dirigida a un ensayo in vitro de acuerdo con la reivindicación 13.

- La invención también está dirigida a un kit para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria o para controlar el estado de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende una cantidad de una composición que se une específicamente a Flt3L y a IFN- α en una cantidad efectiva para detectar
- 5 Flt3L e IFN- α en una muestra biológica de un sujeto, en el que la composición comprende un anticuerpo monoclonal que se une a Flt3L y un anticuerpo monoclonal que se une a IFN- α . Además, la composición puede ser detectable. El kit puede incluir uno o más reactivos para detectar cantidades de la composición unidas a una o más muestras.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de acuerdo con la reivindicación 21.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de acuerdo con la reivindicación 24.

10 **Breve descripción de los dibujos**

- La **figura 1** es una representación esquemática de las interacciones entre los subgrupos de células dendríticas en LES que muestra la relación entre CD linfoides (plasmacitoides) y/o sus productos, por ejemplo, interferones de tipo I, y la diferenciación de las CD mieloides. La diferenciación de las CD mieloides inicia la cascada de presentación antigénica que conduce a la diferenciación de linfocitos T y linfocitos B autorreactivos, lo que contribuye a la
- 15 patogenicidad del LES.

- Las **figuras 2A-2E** son ilustraciones fotográficas que muestran monocitos purificados de donantes normales que se agrupan y adquieren morfología de células dendríticas cuando se cultivan con suero de pacientes con LES, pero no cuando se cultivan con suero autólogo (SA). Los monocitos se cultivan con suero SA (fig. 2C) o suero LES (fig. 2A-2B). La figura 2D representa una agrupación de células veladas inducidas con suero de LES. En la figura 2E, la tinción
- 20 Giemsa de monocitos citocentrifugados cultivados durante 24 horas con suero LES revela células con morfología típica de CD maduras. ("CD-LES" = CD inducidas con suero LES).

- La **figura 3** es una ilustración gráfica que muestra resultados de un análisis por citometría de flujo de monocitos cultivados con suero LES que adquieren el fenotipo de CD maduras. Cada gráfico muestra un incremento de la detección de un anticuerpo marcado que es específico para los marcadores de la superficie de la célula que se indican en la lista
- 25 que aparece debajo de cada gráfico. Los monocitos cultivados con suero LES (panel inferior), pero no los cultivados con suero autólogo (panel superior), regulan por disminución la expresión de CD14, regulan por aumento la expresión de HLA-DR y de moléculas coestimuladoras como CD86, CD80 y CD40, y adquieren la expresión de CD83, un marcador de CD maduras. El eje horizontal representa la intensidad de fluorescencia en una escala logarítmica de un control de isotipo (línea discontinua) y un anticuerpo específico (línea continua). El eje vertical representa la
- 30 frecuencia celular relativa.

- Las **figuras 4A-4E** son ilustraciones gráficas de resultados de citometría de flujo que muestran que los monocitos cultivados con suero LES capturan antígenos solubles. Se cultivaron monocitos enriquecidos con suero LES (fig. 4D y 4E) (LES1 y LES2 denotan suero de dos pacientes distintos con LES) o con suero SA (fig. 4C) y su actividad endocítica se determinó utilizando captación de FITC-dextrano (FITC-DX) a 4°C (línea fina) y a 37°C (línea gruesa).
- 35 Los monocitos cultivados con GM-CSF e IFN- α ("GM-IFN- α ") (fig. 4B), así como los cultivados con GM-CSF e IL-4 ("GM/IL4") (fig. 4A) (que es un estándar para cultivos de CD in vitro) muestran niveles comparables de captación de FITC-DX. Los monocitos cultivados con suero SA no captan FITC-DX.

- La **figura 5** es un histograma que muestra que los monocitos cultivados con suero LES, pero no los cultivados con suero SA, inducen la proliferación de linfocitos T CD4+ alogénicos no estimulados anteriormente. Los monocitos
- 40 cultivados con GM/IFN α , GM/IL4, LES1, LES2 y suero SA, se lavaron y se cultivaron a dosis graduadas (1000 células y 5000 células) con 1×10^5 linfocitos T CD4+CD45RA+ alogénicos no estimulados anteriormente durante 5 días. La proliferación de linfocitos T se determinó mediante incorporación de timidina (cpm $\times 10^3$, eje vertical).

- La **figura 6** es una ilustración gráfica del nivel de citocinas de linfocitos T producidas por linfocitos T inducidos bien por CD-LES o CD cultivadas en suero SA. La liberación de citocinas se determinó con un ensayo ELISA e IL-10 e IFN- γ se
- 45 muestran en pg $\times 10^3$ /ml en el eje vertical.

Las **figuras 7A, 7B y 7C** son ilustraciones fotográficas que ilustran la captura de células apoptóticas autólogas por CD-LES. Citoespinos con tinción Giemsa de cultivos de monocitos de una noche con suero LES (fig. 7A y 7B) y suero SA (fig. 7C). Las flechas indican la captura de fragmentos celulares en cultivos con suero LES.

- Las **figuras 8A y 8B** son ilustraciones gráficas que muestran la captura de células apoptóticas alogénicas y la presentación de sus antígenos a linfocitos T CD4+ autólogos. La figura 8A ilustra resultados de citometría de flujo que muestran que las CD-LES capturan cuerpos apoptóticos que contienen ADN como indica el incremento en los niveles de 7AAD. La CD cargadas se utilizan como estimuladores de la proliferación de linfocitos T CD4+ autólogos (medida mediante incorporación de timidina, eje vertical) (fig 8B).
- 50

- Las **figuras 9A-9B** son ilustraciones gráficas que muestran la relación entre la actividad patogénica del LES y la actividad inductora de IFN- α de las CD-LES. La figura 9 muestra la correlación entre la actividad inductora y el IALES.
- 55

La figura 9B muestra la correlación entre la capacidad inductora y los niveles de IFN- α en suero. Cada punto de cada gráfico representa el suero obtenido de un paciente.

La **figura 10** es una ilustración gráfica que muestra el bloqueo de IFN- α en suero obtenido de pacientes de LES. Las células presentadoras de antígeno se generan con suero LES añadiendo o no un control de isotipo o IFN- α neutralizador de anticuerpos, como se indica en el gráfico. Las células se lavan y cultivan como células estimuladoras, a dosis indicadas, con linfocitos T CD4+ alogénicos purificados (1×10^5) durante 5 días. La proliferación de linfocitos T se determinó mediante incorporación de timidina (cpm $\times 10^3$, eje vertical).

La **figura 11** muestra que los pacientes con LES tienen niveles séricos elevados de IFN- α . Las muestras de suero se obtuvieron de 45 pacientes con LES y 28 pacientes normales.

10 La **figura 12** es una ilustración gráfica que muestra que las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con LES segregan IFN- α in vitro en respuesta a un desencadenante vírico. Las CMSP totales se cultivaron en placas de 96 pocillos con o sin virus de la gripe (10 μ g/ml). Los sobrenadantes se recogieron después cultivar durante 24 horas y se realizó un ensayo ELISA para determinar la liberación de IFN- α . "Todo -" representa los niveles en los cultivos control sin virus. "+" denota cultivos con virus. "DN" denota donante normal.

15 Las **figuras 13A y 13B** son una ilustración gráfica que muestra que el IFN- α induce in vitro la expresión de BAFF/Blys (factor activador de linfocitos B de la familia TNF)/Blys (estimulador de linfocitos B) en monocitos y la expresión de BCMA (antígeno de maduración de linfocitos B) en CMSP. La figura 13A muestra la expresión relativa de BAFF (ng/ng ARN ribosómico 18S) en monocitos cultivados durante 72 horas bajo las condiciones indicadas (IFN- α U/ml). NI denota monocitos control no cultivados del mismo donante. La figura 13B muestra la expresión relativa de BCMA (ng/ng 18S) en CMSP, cultivadas (NI) o no cultivadas con IFN- α 1000 U/ml durante el número de horas indicado. La expresión de ARN se evaluó mediante PCR en tiempo real usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (ABI). La proporción entre la expresión diana (BAFF o BCMA) y una referencia (ARN ribosómico 18S) da niveles de expresión normalizados.

25 Las **figuras 14A-14C** son ilustraciones gráficas que muestran la regulación por TNF de la secreción de IFN- α por CD plasmacitoides (CDp). La fig. 14A muestra que la neutralización de TNF endógeno tiene como resultado una liberación sostenida de IFN- α por CDp CD123+. El eje vertical muestra niveles de IFN- α en ng/ml de sobrenadante de cultivo generado bajo las condiciones indicadas. Las figuras. 14B-14C muestran que añadir TNF a CDp inhibe la liberación de IFN- α inducida por virus. La figura 14B muestra en el eje vertical el porcentaje de inhibición de IFN- α que se secreta al sobrenadante del cultivo. La figura 14C muestra en el eje vertical los niveles de IFN- α en ng/ml de sobrenadante del cultivo.

30 La **figura 15** es una ilustración gráfica de un experimento de citometría de flujo que muestra que el TNF bloquea la diferenciación de las CD plasmacitoides en favor de las CD mieloides. La figura ilustra la inhibición por TNF de la generación de CDp a partir de células hematopoyéticas CD34+ progenitoras. Los progenitores hematopoyéticos CD34+CD45RA- se cultivaron en presencia de Flt3L (100 ng/ml), TPO (30 ng/ml) y, o bien IL-6 (25 ng/ml) o TNF 100 ng/ml en la primera semana de cultivo. Después, las células se lavaron y se cultivaron durante otras 3 semanas con Flt3L solo (100 ng/ml). La diferenciación de CDp se determinó por un análisis de citometría de flujo de la expresión de un marcador de la superficie celular, siendo identificadas las CDp por tinción CD11c negativa CD123 positiva.

35 La **figura 16** es una ilustración esquemática que muestra rutas en la ontogenia de CD plasmacitoides que pueden ser inhibidas por TNF exógeno que actúa como antagonista de interferón.

40 La **figura 17** es una ilustración gráfica que muestra los niveles incrementados de Flt3L (en pg/ml) en el suero de pacientes con LES.

La **figura 18** es una ilustración gráfica que muestra la correlación de los niveles séricos en Flt3L en pacientes de LES y la actividad de la enfermedad medida por el IALLES. La significatividad estadística se determinó por regresión lineal y análisis de Pearson.

45 Las **figuras 19A-19D** son ilustraciones fotográficas que muestran monocitos cultivados con medio suplementado con Flt3L que se diferencian a células con morfología de CD.

La **figura 20** es una ilustración gráfica que muestra que los monocitos cultivados con medio suplementado con Flt3L (100ng/ml) son capaces de preparar a linfocitos T CD4+ indiferenciados.

50 La **figura 21** es una ilustración esquemática que muestra varias rutas en el desarrollo y la diferenciación de subpoblaciones de CD que pueden alterarse bloqueando la actividad de Flt3L e IFN- α .

La **figura 22** es una ilustración esquemática que muestra la interacción entre citocinas y CD en LES y la identificación de citocinas y/o dianas celulares objetivo de composiciones terapéuticas de la presente invención.

Descripción detallada

La presente invención está dirigida a un uso de acuerdo con la reivindicación 1. Además, la presente invención

proporciona una composición útil para inhibir la diferenciación de monocitos a células dendríticas (CD) que son capaces de presentar antígenos de acuerdo con la reivindicación 8. Por ejemplo, un componente de la composición puede ser un antagonista que reduce o inhibe la unión o la interacción entre el interferón de tipo I (por ejemplo, IFN- α) y sus receptores. Esta composición también incluye un antagonista que reduce o inhibe la unión o la interacción entre Flt3L y su receptor.

Como se usa en el presente documento, "CD-LES" se refiere a células dendríticas que se obtienen cultivando monocitos con suero obtenido de un paciente con LES ("suero LES").

Como se usa en el presente documento, un "antagonista de interferón" comprende un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un polipéptido, un péptido mimético, un ácido nucleico que codifica un polipéptido, una molécula orgánica o cualquier combinación de ellos que sea capaz de reducir la actividad o la función de un interferón de tipo I en una célula en un sujeto o un célula in vitro.

Como se usa en el presente documento, "polipéptido" comprende péptidos y proteínas de cualquier longitud, con independencia de su función.

Como se usa en el presente documento, un "interferón de tipo I" incluye IFN- α , IFN- β , IFN- γ , e IFN- τ . Oritani y col. ((2001) Cytokine Growth Factor Rev. 12(4):337-48) proporcionan una descripción de otros ejemplos de interferón de tipo I.

Los antagonistas de interferones interfieren con la interacción entre un interferón de tipo I (como IFN- α) y su receptor, lo que tiene como resultado una reducción en la generación de células presentadoras de antígeno mediante la reducción de la diferenciación de monocitos a CD que se convierten en células presentadoras de antígeno. La reducción en la generación de células presentadoras de antígeno puede lograrse mediante uno o más mecanismos, pero el mecanismo exacto mediante el que esto sucede no es crucial. Por ejemplo, TNF y/o los anticuerpos agonistas anti-receptores de TNF pueden reducir la secreción de interferón de tipo I acelerando la diferenciación de CDp en células no productoras de IFN de tipo I.

Existen numerosos ensayos que pueden llevarse a cabo para identificar si un compuesto es un antagonista de interferón útil en la presente invención. Estos ensayos son conocidos por los expertos en la técnica. Un ensayo es un ensayo de diferenciación de células dendríticas en el que un compuesto que se va a someter a ensayo se añade a un cultivo de monocitos bajo condiciones adecuadas para la diferenciación de monocitos a CD. Las condiciones incluyen la adición de, bien suero LES, o bien interferón, de modo que se induce en los monocitos la diferenciación a CD. Así, si el compuesto provoca una inhibición de la diferenciación de monocitos a CD provocada por interferón y/o suero LES en comparación con la diferenciación de monocitos en cultivos que no tienen el compuesto añadido, entonces el compuesto es un antagonista de interferón.

Otro ensayo para identificar compuestos que son antagonistas de interferones es un ensayo de unión en el se mide la inhibición de la unión de interferón marcado a un receptor en una célula. Si un compuesto es capaz de inhibir la unión de interferón a su receptor o a células que tengan receptores de interferón, el compuesto es un antagonista de interferón.

Además, un ensayo para determinar si un compuesto es un antagonista de interferón es un ensayo para medir la inhibición de interferón producida por células en respuesta a desencadenante que normalmente inducen la producción y/o secreción de interferón, por ejemplo, virus. Por lo tanto, si en presencia del compuesto y del desencadenante (p. Ej., un virus), una célula que normalmente produciría interferón no produce interferón, o produce interferón a niveles reducidos, entonces el compuesto es un inhibidor de interferón.

Otro ensayo para determinar si un compuesto es un antagonista de interferón es un ensayo de supervivencia de célula tumoral. El interferón tiene actividad antitumoral por inhibición directa del crecimiento y/o por inducción de la muerte de células tumorales. Los ejemplos de tales células tumorales sensibles a interferón incluyen líneas celulares de melanoma. Este ensayo de supervivencia de células tumorales mide la supervivencia de células de melanoma que, de otro modo, serían sensibles, que se cultivan en presencia de interferón y antagonista de interferón. Por lo tanto, si las células tumorales sobreviven en el cultivo que contiene el compuesto que se quiere ensayar en comparación con un cultivo idéntico que no tiene el compuesto que se quiere ensayar, el compuesto es un antagonista de interferón.

Otro ensayo para identificar si un compuesto es un antagonista de interferón es un ensayo para cuantificar la expresión (nivel de proteína y/o nivel de ARN) de proteínas inducibles por interferón, incluida la proteína MXA, y de factores reguladores de interferón, como ejemplos. Por lo tanto, un compuesto que se va a someter a ensayo se añade al cultivo y se miden los niveles de proteína y ARN de las proteínas inducibles por interferón especificadas. Si la adición del compuesto reduce los niveles de expresión de la proteína y/o del ARNm, el compuesto es un antagonista de interferón.

Otro ensayo para determinar si un compuesto es un antagonista de interferón es un ensayo protector in vitro. Normalmente, añadir interferón a un cultivo celular protege las células de una actividad citolítica de un virus introducido en el cultivo celular, incrementando de este modo la supervivencia celular en el cultivo. Por lo tanto, la

adición de un antagonista de interferón elimina la protección y la supervivencia celular no aumentará. Por lo tanto, si se mide inhibición de la actividad antiviral del interferón, el compuesto es un antagonista de interferón. La medida de inhibición se basa en la determinación de la muerte de las células sensibles a virus.

5 Un ejemplo de un antagonista de interferón incluye, pero no se limita a ello, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a IFN- α . Otro ejemplo de un antagonista de interferón es un receptor de IFN- α soluble. El receptor soluble es útil para unir interferón de tipo I circulante y evitar así que se una a su receptor natural y provoque la progresión de la diferenciación de monocitos a CD. Un antagonista de interferón puede ser una molécula orgánica que se una al receptor de IFN- α , pero no tiene los efectos reguladores a la baja de dicha unión, es decir, un mímico de ligando de receptor no funcional. Dicha molécula orgánica puede unirse específicamente al bolsillo de unión a IFN- α del receptor sin provocar la activación del receptor, con el fin de desplazar todo el IFN- α que pudiera unirse así y dejando de este modo al receptor ineficaz. In antagonista de interferón puede incluir un péptido que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal que se une específicamente al interferón, a Flt3L o a ambos. Un antagonista de interferón puede ser un péptido de fusión.

15 Los antagonistas de interferón en la presente invención pueden reducir la actividad de interferón de tipo I por muchos mecanismos distintos y la invención no depende de ningún mecanismo en particular. Un antagonista de interferón de la presente invención incluye, entre otros, un IFN- α modificado que tiene actividad reducida o nula in vivo. Con respecto a la interrupción de la generación de células presentadoras de antígeno por interferón de tipo I, el antagonista de interferón puede alterar la actividad del interferón de tipo I en numerosos puntos distintos en la cascada de señalización de interferón. Como ejemplos, el antagonista puede bloquear la actividad de la proteína interferón en sí, bloquear la actividad del receptor del interferón de tipo I, inhibir la unión del interferón al receptor, bloquear la ruta de señalización y/o transducción del interferón de tipo I, bloquear la liberación de interferón de tipo I desde células que normalmente lo producen, bloquear la generación de células que normalmente generan interferón de tipo I, y bloquear la secreción de interferón de tipo I desde células que normalmente lo secretan. La inhibición de la diferenciación o la generación de células que normalmente producen interferón puede ser el resultado de la administración de TNF y/o anticuerpos agonista anti-receptor de TNF y/o moléculas que proporcionen señalización tipo TNF a las células. Estos tipos de compuestos son ejemplos de antagonistas de interferón proporcionados por la presente invención. Además, la inactivación de los cofactores de interferón de tipo I requerida para la diferenciación y crecimiento de las células presentadoras de antígeno es otro posible mecanismo de un antagonista de interferón de la invención.

30 Como se usa en el presente documento, un "antagonista de Flt3L" comprende un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un polipéptido, un péptido mimético, un ácido nucleico que codifica un polipéptido, una molécula orgánica o cualquier combinación de ellos que sea capaz de reducir la actividad de Flt3L. Por ejemplo, el antagonista de Flt3L puede interferir con la interacción entre el ligando de Flt3 ("Flt3L") y sus receptor con el fin de inhibir la diferenciación de células progenitoras en células dendríticas. La reducción en la generación de células presentadoras de antígeno puede conseguirse mediante uno o más mecanismos diferentes. Por ejemplo, FLT3L puede contribuir a la activación de CD no modificadas que pueden, a su vez, dirigir la presentación de autoantígenos en LES, de ahí que Flt3L sea una diana de intervención terapéutica. Es probable que Flt3L juegue un papel en el desarrollo o el sustento de la enfermedad autoinmunitaria LES, haciendo que la función de un antagonista de Flt3L sea útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

40 En una realización, un ensayo para identificar una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de interferón va a determinar la cantidad de antagonista de interferón necesaria para reducir la unión al receptor de interferón in vitro al suero tomado de un sujeto que va a ser tratado. En este ejemplo, la concentración necesaria para reducir en un 50% la unión in vitro será terapéuticamente efectiva in vivo. Un ensayo similar para Flt3L puede realizarse para determinar la cantidad efectiva de antagonista de Flt3L para un sujeto o paciente en particular.

45 Existen numerosos ensayos que pueden realizarse para identificar si un compuesto es un antagonista de Flt3L útil en la presente invención. Un ensayo es un ensayo de diferenciación de células dendríticas en el que un compuesto que se quiere ensayar se añade a un cultivo de monocitos bajo condiciones adecuadas para la diferenciación de monocitos a CD. Las condiciones incluyen la adición de Flt3L al cultivo de monocitos de modo que se induce la diferenciación de los monocitos a CD. Así, si el compuesto provoca al menos un 50% de inhibición de la diferenciación de monocitos a CD en comparación con cultivos de monocitos que no tienen el compuesto añadido, el compuesto es un antagonista de Flt3L.

Otro ensayo para determinar si un compuesto es un antagonista de Flt3L es un ensayo para determinar la inhibición de Flt3L marcado a su receptor. En este ensayo, un marcador detectable se une a Flt3L y se deja que el Flt3L marcado se una a su receptor en presencia y en ausencia del compuesto. Si la presencia del compuesto provoca una reducción en la unión del Flt3L al receptor, entonces el compuesto es un antagonista de Flt3L.

55 Otro ensayo útil para determinar si un compuesto es un antagonista de Flt3L es un ensayo de proliferación in vitro. Se cultivan células hematopoyéticas progenitoras humanas con Flt3L para inducir su diferenciación y/o proliferación. El compuesto que se va a ensayar se añade a algunos cultivos y otros quedan libres de compuesto. Se hace una comparación entre los cultivos con el compuesto y los que no lo tienen para determinar la cantidad de proliferación y diferenciación. Si hay inhibición de la proliferación y/o diferenciación de células hematopoyéticas progenitoras humanas dirigida por Flt3L, entonces el compuesto es un antagonista de Flt3L.

Otro ensayo útil para determinar si un compuesto es un antagonista de Flt3L es un ensayo de proliferación in vitro. Se cultivan líneas de linfocitos B dependientes de factor humanas con y sin el compuesto añadido al cultivo. Un ejemplo de dichas líneas celulares es una línea celular modificada genéticamente para que exprese Flt3. Si los cultivos con el compuesto añadido muestran al menos un 50% de inhibición de la proliferación de líneas celulares B dependientes de factor humanas dirigida por Flt3L, entonces el compuesto es un antagonista de Flt3L.

Otro ensayo útil para determinar si un compuesto que se va a ensayar en un antagonista de Flt3L es un ensayo in vivo. Se administra en ratones Flt3L y sus células hematopoyéticas, incluidas las células dendríticas, se expanden in vivo. A estos ratones se les administra o no el compuesto que se va a ensayar y se miden los niveles de células hematopoyéticas en los ratones. Por lo tanto, la inhibición de la expansión de células hematopoyéticas mediada por Flt3L, incluidas las células dendríticas, in vivo en ratones indica que el compuesto es un antagonista de Flt3L.

Un ejemplo de antagonista de Flt3L es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a Flt3L. Otro ejemplo de un antagonista de Flt3L es un receptor soluble de Flt3L. El receptor soluble es útil para unir Flt3L circulante para evitar que Flt3L se una con su receptor natural y provoque la progresión de la diferenciación de monocitos a CD.

Un antagonista de Flt3L puede ser una molécula orgánica que se una al receptor de Flt3L, pero no provoca los efectos de regulación a la baja de dicha unión, es decir, un ligando mimético del receptor. Dicha molécula orgánica puede unirse específicamente al bolsillo de unión de Flt3L del receptor para desplazar cualquier Flt3L que, de lo contrario, se uniría de este modo. Un antagonista de Flt3L puede incluir también un polipéptido que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal mencionado anteriormente, o sus péptidos de fusión.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" (AcMoHu) Como se usa en el presente documento, significa AcMoHu que pueden obtenerse a partir de linfocitos B (por ejemplo, si el anticuerpo se prepara cultivando los linfocitos B inmortalizadas y/o activadas o por recombinación a partir de ADNc de linfocitos B que codifican dichos AcMoHu y si el anticuerpo está unido a una molécula que pueda alterar su actividad biológica o no, por ejemplo, un receptor o ligando, una enzima, una toxina, un transportador, etc.) y anticuerpos que están hechos por recombinación de las porciones variables de un AcMoHu de la presente invención de un isotipo (por ejemplo, una IgG₄) con la región constante de un anticuerpo humano de otro isotipo (por ejemplo, una IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgD, IgM o IgB humanas). Los procedimientos de recombinación para hacer estos AcMoHu son conocidos en la técnica (véase patente de EE. UU. N° 5.959.085).

El uso de una combinación de un antagonista de interferón y un antagonista de Flt3L puede lograr la ventaja de utilizar mucho menos de cada molécula para reducir la generación de CD. Esta sinergia es ventajosa para permitir la reducción de las cantidades terapéuticamente efectivas de cada antagonista en los procedimientos y composiciones de la invención.

El antagonista de interferón o el antagonista de Flt3L o ambos, puede ser un polipéptido. El polipéptido puede ser un péptido mimético, un péptido sintético, un derivado de un polipéptido natural, un polipéptido modificado, un polipéptido marcado, o un polipéptido que incluya péptidos no naturales. El polipéptido puede ser total o parcialmente un polipéptido no natural que tenga una quiralidad que no se encuentra en la naturaleza, es decir, D-aminoácidos o L-aminoácidos. El uso de un enlace no natural en dicho péptido puede prolongar la vida media y proteger el péptido de la degradación por enzimas que aparecen de forma natural.

En una realización de la invención, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un humano o un primate. El sujeto puede ser un paciente humano, o un animal que muestre síntomas de enfermedad inmunitaria humana y sea, por lo tanto, un modelo animal de una enfermedad humana, tal como un modelo murino transgénico de enfermedad o un modelo de enfermedad primate, o un modelo de enfermedad humana establecida en un ratón SCID reconstituido con el sistema inmunológico humano. El mamífero puede ser, pero sin limitarse a ello, un humano, un primate, una rata, un perro, un gato, un cerdo. En otro aspecto de la invención, el sujeto es un sujeto murino, un sujeto bovino, un sujeto primate, un sujeto equino, un sujeto porcino, o un sujeto canino. El sujeto, en otro aspecto de la invención, padece LES.

En una realización de la invención, el antagonista de interferón comprende un anticuerpo anti-IFN- α o uno de sus fragmentos de unión a antígeno.

En otra realización de la invención, el antagonista de Flt3L comprende un anticuerpo anti-Flt3L o uno de sus fragmentos de unión a antígeno.

La administración de la composición puede ser intravenosa, a través de inyección subdural, oral, tópica, cutánea, subcutánea, parenteral o por aerosol. La administración de la composición de la invención a un sujeto puede comprender inyección intralesional, intraperitoneal, intramuscular o intravenosa, infusión, liberación mediada por liposomas, o administración tópica, nasal, oral, ocular y ótica. La administración puede incluir administración intrabronquial, anal o administración intratecal. La composición de la invención puede administrarse cada hora, cada día, cada semana, cada mes, cada año (por ejemplo, en una forma de liberación temporal) o como una administración en una sola vez. La administración puede ser una administración continua durante un periodo de tiempo, por ejemplo, administración intravenosa. La ruta y el momento preferidos para la administración pueden ser fácilmente determinada

por los expertos en la técnica.

- El antagonista de interferón puede ser capaz de reducir la unión de un interferón de tipo I con su receptor. El antagonista de interferón puede ser capaz de interferir con la transducción de señal posterior a la unión del interferón al receptor en las células del sujeto. El antagonista de interferón puede ser capaz de reducir la producción de interferón por parte de las células del sujeto. El antagonista de interferón puede ser capaz de reducir la secreción de interferón por parte de las células del sujeto. El antagonista del interferón puede ser capaz de reducir la biodisponibilidad de interferón en el sujeto.

En otra realización de la invención, la composición comprende además un vehículo. En otra realización de la invención, el vehículo comprende un vehículo acuoso, un liposoma, o un vehículo lipídico.

- 10 Los compuestos que comprende la composición de la presente invención puede ser compuestos péptido miméticos que pueden ser, al menos parcialmente, no naturales. El compuesto péptido mimético puede ser una molécula pequeña mímica de una parte de la secuencia de aminoácidos de Flt3L o del receptor de Flt3L o de un interferón de tipo I o de un receptor de interferón de tipo I. El compuesto puede tener una estabilidad, eficacia, potencia y biodisponibilidad aumentadas gracias al mimetismo. Además, el compuesto puede tener toxicidad reducida. El compuesto péptido mimético puede tener permeabilidad a la mucosa intestinal potenciada. El compuesto puede ser preparado sintéticamente. El compuesto de la presente invención puede incluir aminoácidos L-, D- o no naturales, aminoácidos a-disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico (un análogo isoelectrónico de la alanina). La estructura peptídica del compuesto puede tener, al menos, un enlace sustituido con PSI-[CH=CH]. El compuesto puede incluir además trifluorotirosina, p-Cl-fenilalanina, p-Br-fenilalanina, poli-L-propargilglicina, poli-D,L-alilglicina, o poli-L-alilglicina.
- 15 Una realización de la presente invención puede ser un compuesto péptido mimético en el que el compuesto tiene un enlace, un esqueleto peptídico o un componente aminoácido sustituido con un mimético adecuado. Ejemplos de aminoácidos no naturales que pueden ser miméticos de aminoácidos adecuados incluyen β -alanina, ácido L- α -aminobutírico, ácido L- γ -aminobutírico, ácido L- α -aminoisobutírico, ácido L- ϵ -aminocaproico, ácido 7-aminoheptanoico, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, cisteína (acetamindometilo), N- ϵ -Boc-N- α -CBZ-L-lisina, N- ϵ -Boc-N- α -Fmoc-L-lisina, L-metionina sulfona, L-norleucina, L-norvalina, N- α -Boc-N- δ CBZ-L-ornitina, Boc-p-nitro-L-fenilalanina, Boc-hidroxiprolina, Boc-L-tioprolina.

En una realización, el compuesto es un péptido en el que los grupos amino libres han sido inactivados por derivatización. Por ejemplo, el péptido puede ser un derivado arilo, un derivado alquilo o un derivado anhídrido. El péptido puede estar acetilado. El péptido se derivatiza con el fin de neutralizar su carga neta.

- 30 La invención establece que las células dendríticas son factores clave en la etiopatogénesis del LES y otras enfermedades autoinmunitarias, y dichas células dendríticas y/o sus productos son dianas clave para el tratamiento del LES y otras enfermedades autoinmunitarias. Como ejemplo de una enfermedad autoinmunitaria, LEs es una enfermedad en la que las CD linfoides liberan grandes cantidades de citocinas, incluido IFN- α , que posteriormente activan a las CD mieloides para desencadenar y sostener las reacciones autoinmunitarias. Esta interacción entre subgrupos de CD proporciona una explicación para (1) las profundas alteraciones en linfocitos B con un amplio espectro de autoanticuerpos, principalmente contra antígenos nucleares, (2) linfocitos T CD4+ autorreactivos y (3) altos niveles de interferón de tipo I en suero de pacientes con LES. Estas observaciones apoyan la significativa implicación de células dendríticas en la etiopatogénesis del LES y otras enfermedades autoinmunitarias.

- La figura 1 ilustra las consecuencias de la liberación incontrolada de IFN- α y su papel en la patogénesis del LES como se divulga en este documento. El daño inicial del LES es un elemento que provoca que las CD plasmacitoides (linfoides) segreguen IFN- α de una forma incontrolada. Los elementos desencadenantes incluyen virus, bacterias, hongos y sus productos, tales como ADN CpG, así como fármacos. La liberación incontrolada de IFN- α se origina con un activador permanente de CD plasmacitoides (linfoides) como una infección viral crónica, o con un inmunocomplejo que no se elimine adecuadamente de la circulación, por ejemplo, a través de polimorfismo FcR o ausencia de componentes del complemento). Las CD plasmacitoides se diferencian a CD maduras capaces de presentar el elemento desencadenante a las linfocitos T. El IFN- α liberado (posiblemente con otras citocinas) induce la activación de los precursores circulantes de CD mieloides, incluidos los monocitos, que capturan células apoptóticas presentes en cantidades aumentadas en sangre LES. Las CD mieloides procesan las células apoptóticas y presentan sus antígenos a linfocitos T autorreactivos y/o linfocitos B. Las linfocitos T autorreactivos, junto con las CD cargadas con células apoptóticas activan además a la linfocitos B autorreactivos. Éstas se diferencian a células plasmáticas con la ayuda de las CD. El IFN- α también contribuye directamente a la generación de linfocitos B autorreactivos porque puede activar un fenotipo germinal parcial (inducción de CD38) característico de los linfocitos B circulantes en LES.

- Utilizando monocitos, los precursores de CD mieloides más abundantes, de sangre de donantes sanos, se ha desarrollado un procedimiento para inducir CD inmunogénicas utilizando suero de pacientes con LES. Dichas CD son células presentadoras de antígeno activas que pueden capturar células apoptóticas y presentar sus antígenos a linfocitos T-CD4+ autólogos, provocando así su activación y proliferación. Esta secuencia de eventos explica los eventos patogénicos en LES. La formación de dicha CD puede evitarse bloqueando el interferón de tipo I en el suero de entrada y que puede reproducirse cultivando precursores de CD con interferón de tipo I. Los productos de CD plasmacitoides (linfoides) inducen la diferenciación de CD mieloides, apoyando así la presentación antigénica, y, en

consecuencia, dirigiendo el procedo patogénico.

El antagonista de Flt3L y el antagonista de interferón pueden unirse juntos en un compuesto o molécula tal como una proteína de fusión que comprenda un antagonista o un péptido competitivo contra cada Flt3L e IFN- α u otro tipo de interferón de tipo I. Es decir, el péptido de fusión incluye una parte que es un péptido que es un inhibidor competitivo de la actividad de Flt3L y un péptido que es un inhibidor competitivo de la actividad de IFN- α .

La composición puede incluir anticuerpos monoclonales contra cada Flt3L e IFN- α , fragmentos de unión a antígeno de cada anticuerpo (como un fragmento CDR), o una proteína de fusión que comprenda fragmentos (de unión a antígeno) activos de los anticuerpos.

La composición puede estar comprendida por una molécula orgánica pequeña que es capaz de interferir con la interacción entre el Flt3L y su receptor y que es capaz de interferir con la actividad de IFN- α . La composición puede incluir las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a Flt3L e IFN- α .

Los polipéptidos útiles como antagonistas de interferón de tipo I tal como IFN- α o Flt3L pueden ser polipéptidos que son derivados del sitio de unión del receptor correspondiente. Además, pueden sintetizarse IFN- α o Flt3L no funcionales (polipéptidos que compiten por la unión al receptor, pero que no desencadenan una respuesta en la célula que lleva el receptor). Un ejemplo de dicho péptido no funcional es un péptido con capacidad total para unirse al receptor, pero sin capacidad alguna para activar a la célula que lleva el receptor. Puede haber sustituciones o adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos habitual. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden incluir: valina sustituida por alanina, lisina por arginina, glutamina por asparagina, glutamato por aspartato, serina por cisteína, asparagina por glutamina, aspartato por glutamato, prolina por glicina, arginina por histidina, leucina por isoleucina, arginina por lisina, leucina por metionina, leucina por fenilalanina, glicina por prolina, treonina por serina, serina por treonina, tirosina por triptófano, fenilalanina por tirosina y leucina por valina.

Adicionalmente la invención también proporciona un ensayo in vitro de acuerdo con la reivindicación 13.

Al menos un antagonista de interferón y al menos un antagonista de Flt3L pueden ser administrados en momentos distintos al sujeto. Alternativamente, pueden administrarse simultáneamente. Por ejemplo, un antagonista puede ser

Alternativamente, pueden administrarse simultáneamente. Por ejemplo, un antagonista puede ser administrado por la mañana y el otro por la tarde. El tiempo o la frecuencia de administración de los antagonistas no tienen que ser equivalentes.

Como se muestra en este documento, el interferón de tipo I o el suero que contiene interferón de tipo I es un factor necesario para la generación de células presentadoras de antígeno, incluidas, pero sin limitarse a ellas, las CD. En el presente documento se muestra que dichas células presentadoras de antígeno dirigen la proliferación de linfocitos T CD4+ autólogas presentando antígenos de células apoptóticas capturadas. El proceso de diferenciación, captura de antígenos y presentación de antígenos puede reducirse bloqueando la actividad del interferón de tipo I. Esto puede usarse para tratar enfermedades autoinmunitarias inhibiendo la progresión de la enfermedad (aplicación terapéutica) así como el desarrollo de la enfermedad en pacientes con un perfil genético apropiado y riesgo elevado de desarrollar la enfermedad (aplicación preventiva).

El bloqueo de la proteína interferón de tipo I y/o Flt3L incluye, pero sin limitarse a ello, usar un anticuerpo (anticuerpos) que neutralicen su capacidad de generar células presentadoras de antígeno. El bloqueo del receptor de interferón de tipo I, o el receptor de Flt3L incluye, pero sin limitarse a ello, el uso de anticuerpos, péptidos o sustancias químicas que interrumpen específicamente la interacción entre el ligando y su(s) receptor(es) que conduce a la generación de células presentadoras de antígeno. Los procedimientos para la administración de antagonistas que son inhibidores (es decir, la composición de la presente invención) incluyen, pero sin limitarse a ello, proteínas y vectores que codifican las proteínas.

Los vectores basados en virus (un ejemplo de vectores de transferencia de genes) pueden usarse para administrar ácidos nucleicos al sujeto de forma que la traducción de las proteínas tenga lugar in vivo. El vector de transferencia génica puede ser un constructo que es capaz de replicar dentro de una célula huésped, pero sin limitarse a ello, plásmidos, virus de ADN, retrovirus, así como moléculas de nucleótido aisladas. Pueden usarse vectores basados en retrovirus o adenovirus, por ejemplo. Los adenovirus han atraído una atención cada vez mayor como vectores de expresión, especialmente para terapia génica en humanos (Berkner, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 158:39-66 (1992)). Dichos vectores contienen todo o parte de un genoma vírico, como repeticiones terminales largas ("LTR), promotores (por ejemplo, promotores de CMV, promotores de SV40, promotores RSV), potenciadores, etc. En cualquier caso, el vector puede comprender elementos de más de un virus. Ejemplos de adenovirus que pueden utilizarse son bien conocidos en la técnica e incluyen más de 40 adenovirus humanos diferentes, por ejemplo, Ad12 (subgénero A), Ad3 y Ad7 (Subgénero B), Ad2 y Ad5 (Subgénero C), Ad8 (Subgénero D), Ad4 (Subgénero B), Ad40 (Subgénero F) (Wigand y cols, In: Adenovirus DNA, Doerfler, Ed, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, págs. 408-441 (1986)). Los procedimientos para producir vectores de adenovirus son bien conocidos en la técnica (Berkner y col., Nucleic Acids Res, 11:6003-6020 (1983); van Doren y col., Mol. Cell. Biol., 4:1653-1656 (1984); Ghosb-Choudhury y col., Biochem. Biophys. Res. Commum, 147:964-973 (1987); McGrory y col. Viro., 163: 614-617 (1988); y Gluzman y col., In:

Eukaryotic Viral Vectors, Ed. Gluzman, Y. páginas 187-192, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Los vectores resultantes pueden introducirse (por ejemplo, por transfección o por transformación, o por infección, o por inyección, etc.) en una célula huésped, que puede estar in vivo en el sujeto o in vitro. La transferencia del vector de transferencia génica mediada por liposomas también puede realizarse en la presente invención.

- 5 Otro ejemplo de vectores víricos que pueden usarse para transferencia génica en células para llevar a cabo el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria es un sujeto incluyen, pero sin limitarse a ello, retrovirus tales como el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMnLV); papovavirus tales como JC, SV40, poliovirus, adenovirus, virus de Epstein-Barr (BBV), virus papiloma, por ejemplo virus papiloma bovino de tipo I (BPV), virus vacuna y pohovirus, vectores lentivirales, y otros virus animales y humanos.

- 10 El bloqueo de las rutas de señalización y/o transducción de interferón de tipo I y Flt3L puede incluir, pero sin limitarse a ellos, el uso de agentes químicos dirigidos especialmente hacia rutas de señalización y/o transducción relevantes.

- El bloqueo de la liberación y/o producción de interferón de tipo I, puede incluir, pero sin limitarse a ello, (1) bloquear la síntesis de interferón I por células utilizando agentes químicos específicos; (2) dirigirse hacia las células que producen interferón de tipo I con el fin de reducir su capacidad para producir interferón de tipo I; y (3) dirigirse hacia los receptores necesarios para señalar la producción o liberación de interferón de tipo I por células con el fin de reducir o inhibir esa producción o liberación. Estas células pueden ser células dendríticas plasmacitoides. Las células que producen interferón de tipo I que pueden ser diana de la composición de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ello, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas plasmacitoides en varias etapas de diferenciación (por ejemplo, progenitores de la médula ósea y precursores sanguíneos). Dirigir una composición hacia una célula para reducir su función como se estableció anteriormente, incluye, pero sin limitarse a ello, la administración de agentes químicos que bloquean específicamente la diferenciación de células dendríticas plasmacitoides a partir de progenitores hematopoyéticos en cualquier momento en que tal diferenciación pudiera tener lugar.

- 25 Dirigir una composición de la invención hacia un receptor necesario para señalar la producción y/o liberación de interferón de tipo I puede incluir, pero sin limitarse a ello, utilizar una composición para bloquear la función del receptor de manos y/o CD32 en las células.

- El ensayo puede incluir los pasos de (1) obtener una cantidad de suero del sujeto que se va a someter al ensayo; (2) determinar el nivel de Flt3L y el nivel de IFN- α en la muestra de suero del sujeto utilizando cualquier procedimiento conocido (por ejemplo, utilizando un ELISA con anticuerpos específicos para Flt3L y para IFN- α); (3) comparar el nivel de Flt3L y el nivel de IFN- α medido en el suero del sujeto con el nivel de cada factor que se determine que debe existir en una muestra de suero tomada de un sujeto normal, sano, de la misma edad y el mismo sexo; (4) identificar si los niveles medidos del sujeto que se somete al ensayo son mayores o menores que los del sujeto sano, controlando así el estado de la enfermedad autoinmunitaria en el sujeto o evaluando el riesgo de que el sujeto desarrolle una enfermedad autoinmunitaria.

- 35 Un riesgo elevado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria está indicado por las cantidades de IFN- α y Flt3L dentro del un intervalo del 30% de las cantidades medidas para el sujeto con una enfermedad autoinmunitaria. El riesgo aumenta cuando las cantidades son del 20%. En otro aspecto de la invención, los sujetos pueden ser de la misma edad.

- 40 La invención también se dirige a un kit para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria o para controlar el estado de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que comprende una composición que se une específicamente a Flt3L y a IFN- α en una muestra biológica de un sujeto, y donde la composición es detectable. El marcador detectable incluye, pero sin limitarse a ello, un marcador fluorescente, un marcador radiactivo, un marcador enzimático, un marcador colorimétrico, un marcador quimioluminiscente o una combinación de ellos.

- 45 Es una realización de la invención, la muestra biológica es una muestra de sangre o una muestra de suero. En otra realización de la invención, la composición comprende una mezcla de (a) un anticuerpo monoclonal que se une a Flt3L y (b) un anticuerpo monoclonal que se une a IFN- α . En otro aspecto de la invención, el kit además comprende uno o más reactivos para detectar un comparar cantidades de la composición unidas a una o más muestras. En otra realización de la invención, el kit comprende además componentes para correlacionar la cantidad de composición unida a la muestra biológica con un riesgo relativo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria o un estado relativo de una enfermedad autoinmunitaria. En otra realización de la invención, la composición está marcada con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser, pero sin limitarse a ello, un marcador fluorescente, un marcador radiactivo, un marcador enzimático, un marcador colorimétrico, un marcador quimioluminiscente y cualquiera de sus combinaciones. El kit también puede incluir componentes para la estandarización o la normalización entre muestras para asegurar que los ensayos de diagnóstico están comparando números de células o volúmenes de suero relativamente equivalentes.

La cantidad efectiva de la composición dependerá de la composición real que se utilice. La cantidad efectiva real se basa en el tamaño del compuesto, la biodegradabilidad del compuesto, la bioactividad del compuesto y la

biodisponibilidad del compuesto. Si el compuesto no se degrada rápidamente, está biodisponible y el altamente activo, se requiere una cantidad menor para que sea efectivo. La cantidad efectiva puede ser determinada por un experto en la técnica, también dependerá en la forma del compuesto, el tamaño del compuesto y la bioactividad del compuesto. Un experto en la técnica podría realizar pruebas empíricas de actividad rutinarias para un compuesto para determinar la bioactividad en bioensayos y así determinar la cantidad efectiva.

- 5
- La composición puede incluir cantidades terapéuticamente efectivas de composiciones y compuestos de polipéptidos, junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos adecuados. Dichas composiciones pueden ser formulaciones líquidas o liofilizadas o secadas por otros medios e incluir diluyentes de diversos contenidos tamponadores (por ejemplo, Tris-HCL, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la adsorción a las paredes, detergentes (por ejemplo, TWEEN™ 20, TWEEN™ 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietileno glicenal), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Timerosal, alcohol bencílico, parabencenos), sustancias voluminizadoras o modificadores de la tonicidad (por ejemplo, lactosa, manitol), polímeros de unión covalente tales como polietilenglicol al compuesto, complejación con iones metálicos, o incorporación del compuesto en o sobre preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos, o esferoplastos. Dichas composiciones tendrán influencia en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación in vivo, y la velocidad de eliminación del compuesto o composición. La elección de las composiciones dependerá de las propiedades físicas y químicas de la composición.
- 10
- 15
- 20 Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la formulación en depósitos lipofílicos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites).

- También están comprendidas las composiciones particuladas revestidas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y la composición terapéutica acoplada a anticuerpos dirigidos contra receptores, ligandos o antígenos específicos de tejido o acoplada a ligandos de receptores específicos de tejido o cualquier otro péptido que tenga como diana un tejido o una célula. Otras realizaciones de las composiciones terapéuticas de la invención incorporan formas particuladas, revestimientos protectores, inhibidores de proteasas o potenciadores de la permeabilidad para varias rutas de administración, incluyendo parenteral, pulmonar, nasal y oral.
- 25

- Cuando se administran, los compuestos suelen eliminarse rápidamente de la circulación y pueden, por lo tanto, producir una actividad farmacológica de vida relativamente corta. En consecuencia, las inyecciones frecuentes de dosis relativamente grandes de compuestos bioactivos pueden ser necesarias para mantener la eficacia terapéutica. Se sabe que los compuestos modificados por la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol (PEG), copolímeros de polietilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina, muestran vidas medias en sangre sustancialmente más largas después de la inyección intravenosa que los correspondientes compuestos no modificados. Dichas modificaciones pueden también aumentar la solubilidad del compuesto en disolución acuosa, eliminar la agregación, potenciar la estabilidad física y química del compuesto, y reducir enormemente la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. Como resultado, las actividad biológica in vivo deseada puede alcanzarse mediante la administración de dichos aductos de polímero-compuesto menos frecuentemente o en menores dosis que con los compuestos no modificados.
- 30
- 35

- La unión de polietilenglicol (PEG) a compuestos es particularmente útil porque PEG tiene una toxicidad muy baja en mamíferos (Carpenter y col., 1971). Por ejemplo, un aducto de PEG de adenosina desaminasa fue aprobado en Estados Unidos para su uso en humanos para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia combinada severa. Una segunda ventaja lograda por la conjugación de PEG es la de la reducción efectiva de la inmunogenicidad y antigenicidad de compuestos heterólogos. Por ejemplo, un aducto de PEG de un péptido humano podría ser útil para el tratamiento de una enfermedad en otras especies de mamíferos sin el riesgo de desencadenar una respuesta inmune grave. El polipéptido o la composición de la presente invención pueden ser administrados en un dispositivo de microencapsulación con el fin de reducir o evitar una respuesta inmune del huésped contra el polipéptido o contra células que pueden producir el polipéptido. El polipéptido o la composición de la presente invención pueden también administrarse microencapsulados en una membrana, como un liposoma.
- 40
- 45

- Como ejemplo, polímeros tales como PEG pueden unirse convenientemente a uno o más residuos aminoácidos reactivos en un péptido de la composición terapéutica tales como el grupo alfa-amino del aminoácido terminal, el grupo épsilon-amino de las cadenas laterales de la lisina, los grupos sulfhidrilo de las cadenas laterales de la cisteína, los grupos carboxilo de las cadenas laterales del aspartato y el glutamato, el grupo alfa-carboxilo del aminoácido carboxilo terminal, las cadenas laterales de la tirosina, o a derivados activados de cadenas glicosiladas unidas a determinados residuos de asparagina, serina o treonina.
- 50

- Se han descrito numerosas formas activadas de PEG adecuadas para una reacción directa con proteínas. Reactivos de PEG útiles para reaccionar con grupos amino de proteínas incluyen ésteres activos de ácidos carboxílicos o derivados de carbonatos, particularmente aquellos en los que los grupos salientes son N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenzono-4-sulfonato. Los derivados de PEG que contienen grupos maleimido o haloacetilo son reactivos útiles para la modificación de grupos sulfhidrilo libres de proteínas. Del mismo modo, los reactivos PEG que contienen grupos amino hidrazina o hidrazida son útiles para reaccionar con aldehídos generados por oxidación
- 55
- 60

periyódica de grupos hidrocarbonados en proteínas.

- En una realización preferida el vehículo farmacéutico puede ser un líquido y la composición farmacéutica estaría en forma de solución. En otra realización igualmente preferida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un sólido y la composición está en forma de polvo o comprimido. En otra realización, el vehículo farmacéutico es un gel y la composición está en forma de supositorio o crema. En otra realización el ingrediente activo puede ser formulado como parte de un parche transdérmico farmacéuticamente aceptable.

- Un vehículo sólido puede incluir una o más sustancias que pueden actuar también como agentes saborizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, cargas, deslizantes, ayudas de compresión, agentes ligantes o disgregantes de comprimidos, también puede ser un material de encapsulación. En polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está mezclado con el ingrediente activo finamente dividido. En comprimidos, el ingrediente activo se mezcla con un vehículo que tenga las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos preferiblemente contienen hasta un 99% del ingrediente activo. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, polivinilpirrolidona, ceras de punto de fusión bajo y resinas de intercambio iónico.

- Los vehículos líquidos se usan para preparar soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. El ingrediente activo puede disolverse o suspenderse en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable tal como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticamente aceptables tales como solubilizantes, emulsionantes, tamponadores, conservantes, edulcorantes, agentes saborizantes, agentes espesantes, colorantes, reguladores de viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores. Ejemplos adecuados de vehículos líquidos para administración oral y parenteral incluyen agua (que contiene, en particular, aditivos como los anteriores, por ejemplo derivados de celulosa, preferiblemente solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluidos alcoholes monohidroxilados y polihidroxilados, por ejemplo glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de cacahuete). Para administración parenteral, el vehículo puede ser también un éster oleoso tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos estériles son útiles en composiciones estériles en forma líquida para administración parenteral. El vehículo líquido para composiciones a presión puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propulsor farmacéuticamente aceptable.

- Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles pueden utilizarse, por ejemplo, por inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal o subcutánea. Las soluciones estériles pueden administrarse también por vía intravenosa. El ingrediente activo puede prepararse como una composición sólida estéril que puede ser disuelta o suspendida en el momento de la administración utilizando agua estéril, salino u otro estéril inyectable apropiado. Los vehículos deben incluir aglutinantes, agentes de suspensión, lubricantes, saborizantes, edulcorantes, conservantes, colorantes y recubrimientos necesarios e inertes.

- El ingrediente activo de la composición terapéutica de la presente invención (por ejemplo, el antagonista de Flt3L y el antagonista de interferón) pueden ser administrados oralmente en forma de una solución o suspensión estéril que contenga otros solutos o agentes de suspensión, por ejemplo, salino o glucosa suficientes para hacer que la solución sea isotónica, sales biliares, goma arábiga, gelatina, monooleato de sorbitán, polisorbato 80 (ésteres de oleato de sorbitol y sus anhídros copolimerizados con óxido de etileno) y similares.

- El ingrediente activo también puede administrarse oralmente tanto en forma de composiciones líquidas como sólidas. Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen formas sólidas, como píldoras, cápsulas, comprimidos y polvos, y formas líquidas, como soluciones, jarabes, elixires y suspensiones. Las formas útiles para administración parenteral incluyen soluciones estériles, emulsiones y suspensiones.

- En la práctica, para la presente invención se emplearán, a no ser que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía: Ver, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición (1989); *DNA Cloning*, Vols. I y II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D.Hames y S.J.Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R.K.Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL press, 1986); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); la colección, *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); y *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Como se usa en el presente documento, el término "o" se refiere a un miembro de una lista en concreto y también incluye cualquier combinación de los miembros de esa lista.

- Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen referencias plurales a no ser que el contenido dicte claramente lo contrario.

La invención se describirá con mayor detalle en referencia a los siguientes ejemplos; sin embargo, ha de entenderse que la invención no se limita a dichos ejemplos. Más bien, a la vista de la presente divulgación que describe la mejor

forma actual para poner en práctica la invención, podrían presentarse muchas modificaciones y variaciones a los expertos en la técnica sin alejarse del alcance de la invención. Todos los cambios, modificaciones y variaciones de acuerdo con el significado de las reivindicaciones deberán considerarse dentro de su alcance.

Ejemplo 1: El suero LES induce la diferenciación de monocitos a células con propiedades como las de las células dendríticas

5 Se expusieron monocitos normales a suero LES in vitro: durante 12-24 horas, se observó la agrupación de los monocitos, y en 24-48 horas, las células agrupadas mostraron proyecciones citoplasmáticas finas reminiscentes de cultivos de CD (figs. 2A y 2B). Solo el suero LES indujo la agrupación de los monocitos en 12-24 horas y la adquisición de morfología de células veladas (figs. 2A-2B comparado con SA en fig. 2C).

10 Suero LES: Tras obtener el consentimiento informado, se extrajo sangre del paciente que satisfizo los criterios de diagnóstico del American College of Rheumatology (ACR) para el LES. Se recogió sangre completa en tubos que contenían EDTA o heparina, y se separó inmediatamente por centrifugación a 100xg a 4°C. El plasma se recogió, se trató con trombina (Jones Pharma Incorporated, MO) y se almacenó a -80°C hasta su uso. La actividad de la enfermedad se evaluó utilizando la puntuación del índice de actividad de la enfermedad para LES (IALES) (Lahita, R.G. 1999. Systemic Lupus Erythematosus. Academic Press 3ª edición) determinada el mismo día que se obtuvo la muestra de sangre.

20 Cultivo celular y análisis fenotípico: Se aislaron monocitos a partir de células sanguíneas mononucleares, tras un gradiente de Ficoll-Paque™, por depleción de linfocitos T, linfocitos B y células NK utilizando anticuerpos purificados anti-CD3, anti-CD19, anti-CD56 y anti-glicoforina A, seguida de depleción inmunomagnética (Dynabeads). Se cultivaron monocitos CD14⁺ enriquecidos en placas de 6 pocillos (1x10⁶/pocillo) durante 3 días en presencia de GM-CSF a 100ng/ml e IFN- α a 1000UI/ml, o GM-CSF a 100 ng/ml e IL-4 a 20 ng/ml, o suero de lupus, o suero autólogo. Al tercer día, se recogieron las células y se tiñeron con anticuerpo anti-CD14-PE, anticuerpo anti-CD83-PE, anticuerpo anti-HLA-DR-PrCP (proteína clorofila peridina), anticuerpo anti-receptor de manosa, anticuerpo anti-CD80 PE (ficoeritrina), anticuerpo anti-CD86-PE, anticuerpo anti-CD40 PE, anticuerpo anti-CD16-PE, anticuerpo anti-CD32 PE, anticuerpo anti-CD64-PE y anticuerpo anti-CD1a-FITC.

30 Se cultivaron monocitos CD14⁺ enriquecidos de donante normal (1x10⁶/pocillo) con suero de lupus o autólogo al 20%. Los monocitos se cultivaron con CD-LES y al tercer día se recogieron las células y se evaluó por citometría de flujo la expresión de determinadas moléculas de la superficie celular. El análisis por citometría de flujo demostró una regulación a la baja de CD14, una expresión aumentada de las MHC de clase II, moléculas coestimuladoras: CD40, CD86 y CD80, CD83 así como receptor de manosa, CD32 y CD36 (fig. 3). La inducción de la diferenciación de los monocitos a células con la morfología y el fenotipo de CD, en lugar de a macrófagos (MO), se restringió a aquellas CD crecidas en suero LES. De hecho, ni el suero autólogo ni el alogénico inducen tal fenotipo (fig 2C).

Se utilizaron anticuerpos monoclonales (Acm) para los siguientes antígenos: CD14, HLA-DR (Becton Dickinson); CD86, CD40, HLA-ABC, CD1a (Dako, Carpintería, CA); CD80, CD83 (Beckman Coulter/Immunotech, Nueva York).

35 Como las células inducidas por suero LES mostraban receptores de captura de antígenos y dado que la capacidad de captura de antígenos es una propiedad importante de las CD, se determinó si las células que se diferenciaban en el cultivo podrían capturar antígenos solubles. Con este fin, los monocitos cultivados con suero LES se incubaron con FITC-dextrano. Como se muestra en las Figuras 4A-4E, las células inducidas con suero LES eran tan eficaces como las CD inducidas con GM-CSF/IL-4 en la absorción de FITC-dextrano.

40 La actividad endocítica de las células diferenciadas en el cultivo se determinó incubando las células con FITC-dextrano 100 μ g/ml durante 1 hora a 37°C. Como control, se incubaron algunas células con FITC-dextrano en hielo. Las células se lavaron con PBS/FCS frío y se analizaron por citometría de flujo.

45 Así, la morfología, el fenotipo y la captura de antígeno indicaron que el suero LES hace que los monocitos de diferencien a células capaces de capturar antígenos, por ejemplo, que expresan moléculas de captura tales como CD14, receptor de manosa y CD36 (característico de CD no maduras y macrófagos), y que expresan moléculas importantes para la presentación de antígenos incluidas HLA.DR, moléculas coestimuladoras y CD83, un marcador de CD maduras.

50 Se determinó después si los monocitos cultivados con suero LES eran capaces de inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados, una propiedad exclusiva de las CD entre todas las células presentadoras de antígeno. Como se muestra en la fig. 5, los monocitos cultivados con suero autólogo indujeron una proliferación limitada de linfocitos T CD4⁺ alogénicos, mientras que los monocitos cultivados con suero LES indujeron una fuerte proliferación de linfocitos T, similar a la de las CD GM-CSF/IL-4, que es una característica estándar de las CD in vitro. La fig.6 ilustra el nivel de citocinas de linfocitos T producidas por linfocitos T inducidas, bien por CD-LES o bien por CD cultivadas en suero SA. Las CD-LES indujeron a las linfocitos T a producir IFN- γ y no IL-10 (excepto a niveles insignificantes), demostrando así una polarización de tipo I (Th1). Los monocitos cultivados tanto con suero LES como con suero SA, GM-CSF/IF- α o GM-CSF/IL-4 se lavaron y se dispusieron en placas con linfocitos T CD4⁺ alogénicas. Se recogieron los sobrenadantes 5 días después del cultivo, y la reestimulación durante una noche con PHA. La liberación de citocinas se ensayó con un ensayo ELISA y se muestran IL-10 e IFN- γ en pg x 10³/ml en el eje vertical. Por lo tanto, los linfocitos

T CD4+ activados secretaron altos niveles de interferón- γ , bajos niveles de IL-10 y nada de IL-4, coherente con la polarización de tipo I.

- 5 Ensayo de proliferación de linfocitos T y citocinas: Se cultivaron CD con 1×10^5 linfocitos T CD4⁺ alogénicas recién aisladas a dosis graduadas durante 5 días en RPMIc más suero AB humano al 10% o con linfocitos T CD4+CD45RA+ alogénicos indiferenciados. Para ensayar la proliferación de linfocitos T autólogas, se pulsaron células GM-CSF/IFN- α o GM-CSF/IL4 o células de lupus con cuerpos de ADN durante 4 horas y se cultivaron con 1×10^5 linfocitos T autólogas a dosis graduadas. Las células se pulsaron durante las últimas 16 horas con 0,5 μ Ci [³H]timidina por pocillo (New England Nuclear, Boston, MA). Para el análisis de citocinas, se recogieron los sobrenadantes 5 días después del cultivo, y se reestimularon las células con PHA en medio fresco durante 24 horas. La liberación de citocinas se
- 10 ensayó con kits de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Ejemplo 2: Las CD-LES presentan antígenos de células apoptóticas capturadas

- 15 El procesamiento anormal e inapropiado de células apoptóticas por el sistema inmunológico se considera como uno de los hechos patogénicos en el LES. Por eso, se determinó después si las CD-LES pueden presentar antígenos de células apoptóticas capturadas. A este respecto, se demostró que las CD-LES eran capaces de capturar fragmentos de células apoptóticas en cultivo (Figs. 7A-7B).

- 20 Las CD-LES también podían capturar cuerpos apoptóticos derivados de células de melanoma que contenían ADN. Las figs. 8A y 8B muestran la captura de células apoptóticas alogénicas y la presentación de sus antígenos a linfocitos T CD4+ autólogas. Las CD-LES capturaron cuerpos apoptóticos que contenían ADN (fig. 8A) y presentaron sus antígenos a linfocitos T CD4+ autólogas, como indicó la inducción de la proliferación de linfocitos T CD4+ (fig. 8B). Los monocitos HLA-DR⁺ inducidos por suero SA, suero LES y GM-CSF/IL-4 capturaron cuerpos de ADN marcados con 7AAD (línea celular de melanoma muerta por radiación gamma (150Gy)). Para permitir la captura de cuerpos apoptóticos, las células presentadoras de antígeno se mezclan con células muertas y se incuban durante 1 hora a 37°C. Después, estas CD-LES cargadas se analizaron por citometría de flujo y se cultivaron con linfocitos T CD4+ autólogas. La proliferación de linfocitos T se determina después de 5 días.

- 25 Estas CD-LES cargadas se cultivaron después con linfocitos T CD4+ autólogas. Como se muestra en la fig. 8, las CD-LES fueron capaces de inducir la proliferación de linfocitos T CD4+ autólogas. Por lo tanto, el suero LES indujo a los monocitos a diferenciarse a CD funcionales que fueron capaces de capturar y presentar antígenos procesados a partir de células apoptóticas.

Ejemplo 3: Solo el suero LES que contiene IFN- α induce la conversión de los monocitos en CD-LES

- 30 Se realizaron experimentos para determinar si todos los sueros LES eran capaces de provocar la diferenciación de monocitos a CD. Los monocitos se cultivaron con 19 sueros LES distintos para probar su capacidad de estimular una respuesta mixta leucocitaria o una reacción mixta linfocitaria (MLR). Como se muestra en la tabla 1, los monocitos cultivados con suero autólogo solo fueron capaces de inducir niveles muy bajos de proliferación de linfocitos T (control negativo), y los monocitos cultivados con GM-CSF/IL-4 para producir CD desencadenaron una MLR del 100% (control
- 35 positivo), la proliferación media fue del 7,5% ($\pm 6,4\%$, n=5). Cuando los monocitos cultivados con suero LES se evaluaron de la misma manera, considerando un 20% de proliferación como punto de corte (media +2SD de monocitos cultivados en suero autólogo) 11 de los 19 sueros indujeron la conversión de los monocitos en CD aloestimuladoras con una proliferación media del 41% \pm 15%. Dado que los sueros de pacientes con dermatomiositis no fueron capaces de reproducir este sesgo de los resultados y, dado que los pacientes con dermatomiositis fueron tratados con el mismo
- 40 régimen de esteroides que los pacientes de LES, se llegó a la conclusión de que los efectos de los sueros LES eran independientes de los esteroides. Es más, los sueros de dos pacientes diagnosticados recientemente, no tratados, diferenciaron eficazmente los monocitos a CD-LES. Cabe destacar que, de esos 11 sueros que indujeron CD-LES, 7 sueros para los que se comprobaron los niveles de IFN- α contenían más de 190 pg/ml de IFN- α , mientras que la mayoría del resto de sueros incapaces de inducir CD-LES contenían menos IFN- α de lo que podía detectarse en el
- 45 ensayo (12pg/ml) (Tabla 1). Es más, la capacidad para inducir CD de los sueros LES estaba relacionada con la actividad de la enfermedad. En las figs. 9A-9B, un gráfico muestra la relación de la actividad de la enfermedad del LES con la actividad inductora de las CD-LES. Los monocitos de cultivaron con 11 sueros LES diferentes tomados de pacientes tanto con lupus activos (índice de actividad de la enfermedad LES (IALES) > 6) o lupus inactivo (IALES < 6) y se ensayó la capacidad de células generadas para inducir la proliferación de linfocitos T. Como controles, se cultivaron
- 50 los monocitos con GM-CSF e IL-4. El eje vertical muestra el porcentaje de capacidad aloestimuladora inducida. Por lo tanto, la capacidad de los sueros LES para dirigir la diferenciación de monocitos hacia CD es específica de la enfermedad y se corresponde con los niveles de IFN- α .

Tabla 1: Los sueros LES que contienen IFN- α inducen que los monocitos adquieran la capacidad de estimular una reacción mixta linfocitaria

SUERO	MLR	nivel de IFN- α pg/ml	IALES
LES 1	53%	ND	20
LES 2	58%	> 500	8
LES 3	27%	192	12
LES 4	28%	ND	24
LES 5	33%	>500	12
LES 6	5%	<12,5	2
LES 7	45%	733	14
LES 8	34%	410	17
LES 9	26%	>500	10
LES 10	4%	<12,5	6
LES 11	12.5%	25	6
LES 12	70%	>500	12
LES 13	4%	<12,5	4
LES 14	50%	ND	4
LES 15	10%	<12,5	6
LES 16	16%	78	6
LES 17	30%	>500	8
LES 18	60%	>500	17
LES 19	7.5%	<12,5	14
LES 20	4%	<12,5	2
SA (n=8)	7%	<12,5	
Artritis juvenil (n=2)	3%	<12,5	
Dermatomiositis (n=3)*	4%	<12,5	
GM/IL4	100%		

Los monocitos se cultivaron con distintos sueros LES (tabla 1, columna 1) y las células generadas se ensayaron para evaluar su capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T alogénicos (reacción mixta de linfocitos {columna 2, tabla 1, MLR}). Como controles, se cultivaron monocitos con GM-CSF e IL-4 y se usaron como estándar para el 100%. La actividad aloestimuladora de los monocitos cultivados con suero LES se expresa como porcentaje de proliferación de linfocitos T en comparación con GM-CSF e IL-4 y en relación con los niveles de IFN- α en el suero (columna 3, tabla 1) y con la actividad de la enfermedad (IALES, columna 4, tabla 1). El IALES está constituido por 9 grupos de criterios clínicos y de laboratorio que incluyen la evaluación de sistemas de órganos: SNC, vascular, renal, musculoesquelético, seroso, dérmico, inmunológico y hematológico. ND denota no hecho, SA denota suero autólogo de donantes sanos, LES denota suero de pacientes con LES.

Ejemplo 4: La capacidad del suero LES de inducir CD-LES se anula bloqueando IFN- α

La capacidad de las CD para dirigir la diferenciación de monocitos hacia la generación de células presentadoras de antígeno se relacionó con el nivel de IFN- α en suero. El fenotipo de CD-LES era reminiscente del inducido por GM-CSF e IFN- α y por lo tanto, los sueros LES se preincubaron con un anticuerpo neutralizador anti IFN- α . Las células cultivadas con tales sueros se ensayaron para evaluar su capacidad de inducir la diferenciación de monocitos a CD medida por su capacidad de inducir MLR. La capacidad de los sueros LES de inducir CD funcionales se inhibió por neutralización de IFN- α , pero no por el control de isotipo (como se muestra en la fig. 10) ni tampoco por otros anticuerpos para IL-4, CD40L a IL-10, que indica que IFN- α es necesario para la inducción de CD-LES. La fig 10 ilustra el bloqueo de IFN- α en suero de cultivos celulares de monocitos obtenido de pacientes con LES. La adición

de un anticuerpo bloqueante de interferón tuvo como resultado una capacidad muy reducida de inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ alogénicos. Los resultados muestran que la actividad inductora de CD del suero LES depende de IFN- α y se anula bloqueando IFN- α en el suero LES utilizado para cultivar los monocitos. Se cultivaron monocitos purificados con suero LES, o se preincubaron en suero durante 30 minutos a concentraciones saturantes de ac bloqueante de IFN- α (ac LES) (Biosource) o con la correspondiente concentración de control de isotipo (ctrl LES). Después de tres días, se evaluó la capacidad de las células de inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ alogénicos.

Ejemplo 5: Pacientes con LES tienen niveles séricos de IFN- α elevados

Se determinaron los niveles séricos de IFN- α en pacientes pediátricos con LES. Como se muestra en la fig. 11, el suero tomado de pacientes de LES tenía niveles mucho más altos de IFN- α que el suero obtenido de sujetos sanos (controles). El suero se obtuvo de pacientes con LES. El suero se ensayó para evaluar el IFN- α utilizando un kit de ELISA (BioSource, se acuerdo con las recomendaciones del fabricante) que está basado en el estándar de referencia internacional para interferón humano (aprobado por los Institutos Nacionales de Salud). La reacción colorimétrica se desarrolló utilizando HRP y TNB. Las absorbancias a 450 nm se determinaron con un lector de microplacas. Se utilizó el protocolo de intervalo ampliado del ensayo, lo que permitió la determinación de niveles séricos en el intervalo de 10 a 5000 pg/ml.

Ejemplo 6: Los CMSP de pacientes LES pueden secretan IFN- α en respuesta a exposición a virus.

Cuando se exponen a virus de la gripe, los CMSP de pacientes con LES liberaron altos niveles de IFN- α en comparación con los niveles de IFN- α liberados por CMSP de adultos sanos que fueron expuestos a virus de la gripe (véase fig. 12).

Ejemplo 7: IFN- α induce la expresión de BAFF/Bliss en monocitos y la expresión de BCMA en CMSP

Un Nuevo miembro de la familia de los TNF, denominado BAFF/Blys-L (factor activador de células B de la familia TNF) se encuentre en CD y linfocitos T y se une a dos receptores en linfocitos B, a saber, BCMA y TACI e induce su proliferación y secreción de inmunoglobulinas. Por lo tanto, se determinó si el IFN- α regularía la expresión de ambas moléculas (es decir, BCMA y TACI) en los correspondientes tipos de células. Como se muestra en las figs. 13A-13B, el IFN- α , pero no otros factores, induce niveles altos de BAFF/Blys en monocitos como se determinó por PCR en tiempo real. Además, IFN- α induce la expresión de BCMA en CMSP.

Ejemplo 8: Ensayo de diagnóstico de análisis de suero de paciente para la inducción de la diferenciación de monocitos in vitro

Se analiza el suero de un pacientes para averiguar su capacidad de inducir la diferenciación de monocitos a células dendríticas cuya diferenciación puede ser posteriormente bloqueada neutralizando el interferón de tipo I.

Se obtuvo el suero del paciente siguiendo los procedimientos descritos con detalles en el ejemplo 1. Siguiendo los procedimientos descritos en el ejemplo 1, se añade una alícuota de suero del paciente a una alícuota de monocitos purificados de pacientes normales. Después de unos tres días, el grado de diferenciación de los monocitos a células dendríticas se evalúa por cualquier medio conocido en la técnica. Los procedimientos de ensayo ejemplares incluyen análisis morfológico directo, análisis fenotípico por citometría de flujo, captura de antígeno medible por absorción de FITC-dextrano, e inducción de linfocitos T CD4⁺ alogénicos indiferenciados medible por incorporación de timidina. Este ensayo de diagnóstico in vitro incluye un conjunto de estándares conocido con el fin de clasificar los resultados obtenidos con la muestra de suero obtenida del paciente. Brevemente, se somete suero de un paciente normal, es decir, un paciente que se sabe que no padece una enfermedad autoinmunitaria, al ensayo y los resultados obtenidos se utilizan como el estándar indicativo de bajo riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria. De forma similar, se toma suero de un paciente que se sabe que padece una enfermedad autoinmunitaria, como LES, y se utiliza en el ensayo y los resultados obtenidos se utilizan como el estándar indicativo de alto riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria. Se considera que el suero de un paciente que tiene un alto grado de diferenciación de monocitos a células dendríticas que puede ser bloqueada con interferón de tipo I, sitúa al paciente en una posición de alto riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria. El "alto grado" de diferenciación de monocitos se determina comparando la cantidad de diferenciación de monocitos en el ensayo utilizando el suero del paciente con los estándares establecidos anteriormente para alto riesgo, bajo riesgo y cualesquiera otros valores intermedios. Cada nivel de riesgo para desarrollar una enfermedad autoinmunitaria se asocia con un nivel de diferenciación de monocitos observado en el ensayo. Si el suero del paciente no tiene un alto grado de diferenciación de monocitos a células dendríticas que puede bloquearse con interferón de tipo I, entonces el nivel de riesgo del paciente de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria es pequeño o inexistente. Para un paciente diagnosticado con una enfermedad autoinmunitaria, la evaluación periódica del suero del paciente en este ensayo proporciona un procedimiento para controlar los brotes o la progresión de la enfermedad.

Ejemplo 9: El TNF inhibe la secreción de interferón de tipo I por las CDp

Kadowaki y col. (J. Exp. Med 2000, 192:1785-96) divulga que el IFN- α autocrino permite la supervivencia de la CDp, mientras que el TNF-a autocrino induce su maduración a CDp maduras, que son incapaces de producir IFN- α . Por

eso, se realizaron estudios para determinar si la adición de anticuerpos neutralizadores de TNF a cultivos de CDp normales mantenía su producción de IFN- α en respuesta a desencadenante víricos o no.

- Para estos estudios, se aislaron CDp de cultivos de progenitores hematopoyéticos CD34+ separando por citometría de flujo las células CD11c negativas y las CD123 positivas. Las CDp aisladas se cultivaron a una concentración de 50.000 células por pocillo/200 μ l con virus de la gripe purificado (5 μ l) y, o bien un anticuerpo control o un anticuerpo neutralizador anti-TNF (cultivo primario). Después de 24 horas de cultivo primario, las placas se centrifugaron, se recogieron los sobrenadantes y las células se recultivaron en medio fresco con una dosis fresca (5 μ l) de virus de la gripe (cultivo secundario). Después de otras 24 horas de cultivo secundario, se recogieron los sobrenadantes y se evaluó la presencia de niveles de IFN- α . Las figs. 14A-14C muestran la regulación por TNF de la secreción de IFN- α por parte de CD plasmacitoides (CDp). Las CD purificadas generadas in vitro cultivando células hematopoyéticas progenitoras CD34+ con Flt3L (100 ng/ml) y trombopoyetina (TPO) (30 ng/ml), se cultivan a una concentración de 50.000 células por pocillo con virus de la gripe purificado (5 μ l), bien con un anticuerpo control (5 μ g/ml) o bien con anticuerpo neutralizador anti-TNF (5 μ g/ml) o con TNF exógeno (100 ng/ml) (cultivo primario). Después de 24 horas de cultivo, las placas se centrifugaron, se recogieron los sobrenadantes y las células se recultivaron en medio fresco con una dosis fresca (5 μ l) de virus de la gripe (cultivo secundario). Después de otras 24 horas de cultivo, los sobrenadantes se recogieron para evaluar sus niveles de IFN- α . Como se muestra en la fig. 14A, la adición de anticuerpo neutralizador anti-TNF tuvo como resultado la triplicación de la liberación de IFN- α en cultivos secundarios. Al contrario, la adición de TNF tuvo como resultado una inhibición de hasta el 70% de la liberación de IFN- α en cultivos primarios de CDp (véase fig.14B). Como se ilustra en la fig. 14C, la concentración de IFN- α en los sobrenadantes del cultivo primario se redujo de 100 ng/ml a 40 ng/ml.

Este estudio proporciona la teoría no limitante resumida en la fig. 16 de cómo se puede bloquear la secreción de IFN- α por parte de las CDp no maduras por incubación en TNF (o un agente de unión antagonista anti-receptor de TNF). Se promueve así que las CDp incubadas con TNF se conviertan en CDp maduras, que no secretan IFN- α .

Ejemplo 10: El TNF inhibe la ontogenia de las CDp

- Después se realizaron estudios para determinar si el efecto del TNF en las CDp se limita a su maduración/producción de IFN- α o si el TNF, una citocina proinflamatoria principal implicada en la regulación de la diferenciación de células dendríticas mieloides, también afecta a la diferenciación de CDp a partir de progenitores hematopoyéticos. Para estos estudios, se separaron progenitores hematopoyéticos CD34+CD45RA- hasta más del 90% de pureza por citometría de flujo y después se cultivaron en presencia de Flt3L (100 ng/ml, R&D), trombopoyetina (TPO, 30 ng/ml, R&D), y o bien interleucina-6 (IL-6, 25 ng/ml, R&D), o bien factor de necrosis tumoral (TNF, 100 ng/ml, R&D), en la primera semana de cultivo a una densidad entre $2/5 \times 10^5$ y 5×10^5 /pocillo. Después, las células se lavaron y se cultivaron durante aproximadamente otras 3 semanas solo con Flt3L (100 ng/ml).

- La fig. 15 muestra los resultados de un experimento de citometría de flujo que muestra que el TNF bloquea la diferenciación de CD plasmacitoides en favor de CD mieloides. La diferenciación de CDp se determinó por un análisis de citometría de flujo de la expresión de marcadores de la superficie celular, identificándose las CDp por tinción CD11c negativa y CD123 positiva. Así, la adición de TNF en la primera semana tuvo como resultado una inhibición completa de la diferenciación de células progenitoras a CDp CD123+CD11c- y un sesgo de la diferenciación hacia CD mieloides CD123-CD11c-. Así, el TNF y/o los anticuerpos agonistas anti-receptor de TNF, ambos estimuladores del receptor de TNF de las células progenitoras, bloquean la diferenciación de las CDp y redirigen a las células progenitoras hacia la diferenciación a CD mieloides.

Este estudio proporciona la teoría no limitante mostrada en la figura 16 de cómo la producción y secreción de IFN- α puede ser bloqueada exponiendo a la células progenitoras a TNF (o un agente de unión agonista anti-receptor de TNF). Dicha exposición conduce a la inhibición del desarrollo de CDp que pueden fabricar interferón y, por lo tanto, bloquea la producción y secreción de interferón.

Ejemplo 11: El nivel de Flt3L está aumentado en el suero de sujetos que padecen LES

- Como se describe en los ejemplos anteriores, se cree que la inducción de CD no modificadas provoca la terrible respuesta autoinmune en LES y, como se describe en este documento, puede controlarse dirigiéndose conjuntamente a IFN- α y Flt3L. Sin embargo, otras citocinas, que se denominan aquí "poietinas CD", pueden movilizar y/o activar a CD para que se diferencien a células presentadoras de antígeno in vivo. Esta movilización o activación de CD puede tener lugar de muchas formas distintas. Por ejemplo, dichas poietinas-CD pueden aumentar la diferenciación de células preCD a células dendríticas maduras que pueden incrementar una respuesta inmunogénica y empeorar las respuestas autoinmunitarias. Como otro ejemplo, las poietinas-CD pueden aumentar la generación real de CD de nueva maduración que contribuyen a las respuestas autoinmunitarias en el sujeto, o las poietinas-CD pueden aumentar la actividad de las CD maduras.

- Una poietina-CD no limitante es el Flt3L, que se ha demostrado que moviliza grandes cantidades de CD, tanto mieloides como plasmacitoides, in vivo en modelos humanos y de ratones (Maraskovsky y col. (1997) Adv. Exp. Med. Biol. 417:33-40; (1996) J. Exp. Med. 184(5):1953-62; (2000) Blood 96(3):878-84). Además, como se muestra en la presente invención, cultivar células madre hematopoyéticas CD34+ con Flt3L da lugar, no solo a Cd plasmacitoides,

sino también a CD mieloides CD11c+, así como a monocitos.

- Los niveles séricos de Flt3L en pacientes con LES (83 muestras de sangre), así como en controles sanos (35 muestras de sangre) se determinaron utilizando ELISA comercialmente disponible (R&D). Como se muestra en la fig. 17, los pacientes de LES tienen niveles séricos significativamente más altos de Flt3L ($p < 0,002$) que varían de $< 12,5$ a 582 pg/ml, que los medidos en suero tomado de sujetos sanos. Se ensayaron 83 muestras de sangre de pacientes con LES y 35 muestras de sangre de pacientes sanos (controles sanos) utilizando un ELISA comercialmente disponible. Las diferencias en niveles de Flt3L en las muestras de suero son estadísticamente significativas utilizando análisis tanto paramétricos como no paramétricos.

Ejemplo 12: Los niveles séricos de Flt3L se corresponden con la actividad de la enfermedad autoinmunitaria

- 10 Se determinó que los niveles séricos de Flt3L se corresponden con la actividad de la enfermedad, como se midió con el índice de actividad de la enfermedad LES (IALES). Como se muestra en la fig. 18, existía una correlación positiva significativa ($p = 0,02$), que indicaba que aquellos individuos con altos niveles séricos de Flt3L habían mostrado también una alta actividad de la enfermedad LES. Por lo tanto, la aparición de niveles elevados de Flt3L en el suero es un indicador de riesgo autoinmune o de enfermedad autoinmunitaria activa en un sujeto.

15 **Ejemplo 13: El Flt3L permite la diferenciación de monocitos a CD**

- Monocitos aislados a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donantes sanos se aislaron por selección positiva utilizando perlas CD14 o por adherencia y posteriormente se cultivaron durante 2 días en un medio de cultivo completo (RPMI1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10%) con Flt3L (100 ng/ml) e IL-3 (10 ng/ml) y/o IFN- α (1000 U/ml). Se realizaron cultivos de control con GM-CSF e IL-4. La fig. 19A muestra células cultivadas con Flt3L/IFN- α (1000 u/ml). La fig. 19B muestra células cultivadas con GM-CSF(100 ng/ml)/IL-4. (5 ng/ml). La fig. 19C muestra células cultivadas con IFN α (1000 u/ml)/IL-3 (10 ng/ml). La fig. 19D muestra células cultivadas con Flt3L/ IFN- α (1000 u/ml) /IL-3 (10 ng/ml). Tras 2 días de cultivo, se tiñeron los monocitos citospin con Giemsa. Así, los monocitos cultivados con Flt3L e IFN- α se diferenciaron a células que mostraban características de CD como se determinó por la morfología (figs. 19A-19D), el fenotipo (CD14 bajo, CD-SIGN+, CD40+, HLA-DR+, CD11c+) y la función, es decir, la capacidad para inducir la proliferación de linfocitos T CD4+ alogénicas que es una característica funcional de la célula dendrítica (fig. 20). En la fig. 20, se cultivaron 10^5 linfocitos T CD4+ alogénicas purificadas durante 5 días con cantidades graduadas de células presentadoras de antígeno (eje horizontal). La proliferación de linfocitos T se midió por incorporación de timidina (eje vertical, cpm x 10^3) después del cultivo con medio suplementado con Flt3L. La fig. 21 muestra un diagrama que resume varias rutas en el desarrollo y diferenciación de subgrupos de CD que puede ser alteradas bloqueando la actividad de Flt3L e IFN- α . Estas dianas terapéuticas incluyen 1) rutas de diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas a CDp, que pueden bloquearse por TNF o por antagonista de Flt3L o por una combinación de TNF y antagonista de Flt3L, siendo el resultado final la inhibición de la producción de interferón a través de la inhibición de la diferenciación de células que pueden producir interferón, 2) ruta e maduración de CDp, que puede acelerarse por TNF, siendo el resultado final que las CDp se convierten en células no productoras de interferón, reduciéndose así los niveles de interferón, 3) ruta de diferenciación de monocitos a células dendríticas, que puede bloquearse por un antagonista de interferón o por un antagonista de Flt3L o por una combinación de antagonista de interferón y antagonista de Flt3L, siendo el resultado final la inhibición de la diferenciación de células dendríticas que, de lo contrario, serían capaces de capturar y presentar células apoptóticas y provocar enfermedades autoinmunitarias induciendo la diferenciación de linfocitos B autorreactivas y linfocitos T autorreactivas.

Ejemplo 14: La neutralización de Flt3L en suero LES inhibe la diferenciación de monocitos a células dendríticas inducida por suero LES

- Los monocitos se cultivan con suero obtenido de pacientes con LES. Se añade una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a Flt3L (anticuerpo monoclonal anti-Flt3L), a la concentración de saturación, es decir, una concentración que varía aproximadamente entre 1-10 veces el exceso molar, al cultivo de monocitos bajo condiciones de cultivo adecuadas para la diferenciación de monocitos. Tras tres días de incubación, se ha diferenciado a CD un número de monocitos menor que en un cultivo de monocitos idéntico que no había recibido el anticuerpo monoclonal. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal para Flt3L que neutraliza la actividad de Flt3L en el cultivo, inhibe la diferenciación de monocitos a CD inducida por LES.

50 **Ejemplo 15: La adición de una composición de antagonista de Flt3L y antagonista de interferón a monocitos crecidos en suero LES inhibe la diferenciación de monocitos a CD presentadoras de antígeno**

- Se ejemplifica en el presente documento un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, mediante el cuál se administra una composición terapéutica al sujeto con el fin de reducir o inhibir la generación de células presentadoras de antígeno que causan la estimulación de linfocitos T autorreactivas y de linfocitos B autorreactivas que producen autoanticuerpos en el sujeto.

Una composición terapéutica se prepara con una cantidad de (a) un anticuerpo monoclonal anti-Flt3L y (b) una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α que es igual a aproximadamente 1-10 veces el nivel de Flt3L e IFN- α , respectivamente, en el suero del paciente que se va a tratar. Los procedimientos para preparar anticuerpos

monoclonales contra Flt3L son conocidos, por ejemplo uno de dichos procedimientos figura en el ejemplo 6 del documento de patente de EE. UU. N° 5.843.423, "Methods of Stimulating hematopoietic cells with flt3-ligand". Los procedimientos para preparar anticuerpos monoclonales contra IFN- α son conocidos y, por ejemplo, algunos de dichos procedimientos se describen en el documento de patente de EE. UU. N° 5.919.453.

- 5 El suero puede obtenerse del sujeto con la enfermedad autoinmunitaria y realizar ensayos y pruebas para asegurarse de que los niveles de Flt3L a IFN- α presentes en el suero son suficientes para garantizar la administración de la composición terapéutica.

- Las composición se administra diariamente mediante una inyección o mediante un procedimiento de administración intravenosa para asegurar que el nivel sérico de los dos elementos de la composición está dentro de un intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces el exceso molar de Flt3L y/o IFN- α . El control del estado del sujeto puede realizarse a lo largo del periodo de tratamiento con el fin de determinar el nivel de generación de CPA. La existencia de CD en el suero del sujeto se controla a lo largo del tratamiento. El tratamiento se termina cuando los síntomas de la afección autoinmune se reducen y se reinicia cuando los niveles de Flt3L y/o IFN- α muestran una tendencia creciente en dos análisis de sangre consecutivos y/o cuando los síntomas de la afección autoinmune empeoran.
- 10
- 15

REIVINDICACIONES

1. Uso de (a) al menos un antagonista de interferón que reduce la actividad de un interferón de tipo I, y (b) al menos un antagonista del ligando Flt3 (Flt3L) que reduce la actividad de un Flt3L, para la preparación de un medicamento que contiene el al menos un antagonista de interferón y el al menos un antagonista de ligando de Flt3 (Flt3L) en una cantidad efectiva para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico (LES) en un sujeto que lo necesite, en el que el al menos un antagonista de interferón se selecciona del grupo constituido por anticuerpos monoclonales anti-IFN- α y sus fragmentos de unión a antígeno, y en el que el al menos un antagonista de ligando de Flt3 se selecciona del grupo constituido por anticuerpos monoclonales anti-Flt3L y sus fragmentos de unión a antígeno.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto es un mamífero seleccionado de un ser humano, un primate, una rata, un perro, un gato o un ratón.
3. El uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista de interferón y el antagonista de Flt3L son parte de una molécula.
4. El uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista de interferón está presente en el medicamento en una cantidad que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces el exceso molar de interferón.
- 15 5. El uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista de Flt3L está presente en el medicamento en una cantidad que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces el exceso molar de Flt3L.
6. El uso según la reivindicación 1, en el que el tratamiento se efectúa mediante inyección intralesional, intraperitoneal, intramuscular o intravenosa, infusión, administración mediada por liposomas, o administración tópica, nasal, ocular u ótica del medicamento.
- 20 7. El uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista de interferón reduce uno o más de los siguientes:
 - (i) unión de un interferón de tipo I con su receptor;
 - (ii) transducción de señal dependiente de interferón;
 - (iii) niveles séricos de interferón;
 - 25 (iv) secreción de interferón por células medida por un ensayo de unión a receptor de interferón;
 - (v) biodisponibilidad de interferón en suero medida por un ensayo de unión a receptor de interferón; o
 - (vi) desarrollo de células que producen interferón de tipo I en el sujeto medido por un ensayo de diferenciación de monocitos.
- 30 8. Una composición terapéutica para inhibir la diferenciación de monocitos a células dendríticas capaces de presentar antígenos, que comprende:
 - (a) al menos un antagonista de interferón que reduce la actividad de interferón de tipo I, en el que el al menos un antagonista de interferón se selecciona del grupo constituido por anticuerpos monoclonales anti-IFN- α y sus fragmentos de unión a antígeno; y
 - 35 (b) al menos un antagonista de ligando Flt3 (Flt3L) que reduce la actividad de Flt3L, en el que el al menos un antagonista de ligando Flt3 se selecciona del grupo constituido por anticuerpos monoclonales anti-Flt3L y sus fragmentos de unión a antígeno.
9. La composición según la reivindicación 8, en la que la composición comprende además un vehículo.
10. La composición según la reivindicación 8, en la que el antagonista de interferón y el antagonista de Flt3L son parte de una molécula.
- 40 11. La composición según la reivindicación 8, en la que la composición comprende dos o más antagonistas de interferón y un antagonista de Flt3L.
12. La composición según la reivindicación 11, en la que la composición comprende un anticuerpo anti-IFN- α , un anticuerpo anti-Flt3L y TNF.
- 45 13. Un ensayo in vitro para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar lupus eritematoso sistémico (LES), que comprende:
 - (a) cuantificar el IFN- α y el ligando Flt3 (Flt3L) en la muestra de suero obtenida de dicho sujeto; y

- (b) comparar la cantidad de IFN- α y Flt3L con las cantidades de IFN- α y Flt3L en suero de sujetos con lupus eritematoso sistémico (LES), determinando así el riesgo del sujeto de desarrollar lupus eritematoso sistémico (LES).
- 5 14. El ensayo según la reivindicación 13, en el que el riesgo de desarrollar lupus eritematoso sistémico (LES) aparece cuando las cantidades de IFN- α y Flt3L están dentro de un intervalo del 30% de esas cantidades para sujetos con una enfermedad autoinmunitaria.
15. El ensayo según la reivindicación 14, en el que dicho riesgo aumenta cuando dicho intervalo es de aproximadamente el 20%.
- 10 16. El ensayo según la reivindicación 13, en el que dicha etapa de comparación (b) se hace entre sujetos de la misma edad.
17. Un kit para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria, o para controlar el estado de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende una composición que se une específicamente a Flt3L y a IFN- α en una cantidad efectiva para detectar Flt3L e IFN- α en una muestra biológica de un sujeto, en el que la composición comprende un anticuerpo monoclonal que se une a Flt3L y un anticuerpo monoclonal que se une a IFN- α .
- 15 18. El kit según la reivindicación 17, en el que el kit comprende además uno o más reactivos para detectar cantidades de la composición unida a una o más muestras.
19. El kit según la reivindicación 17, en el que la composición está marcada con un marcador detectable.
20. El kit según la reivindicación 19, en el que el marcador detectable se selecciona del grupo constituido por un marcador fluorescente, un marcador radioactivo, un marcador enzimático, un marcador colorimétrico, un marcador quimioluminiscente y cualquiera de sus combinaciones.
- 20 21. Uso de un antagonista de interferón para la preparación de un medicamento que contiene el antagonista de interferón, siendo el antagonista de interferón uno o más anticuerpos monoclonales humanizados o humanos anti-IFN α o sus fragmentos de unión a antígeno, en una cantidad efectiva para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico (LES) en un sujeto que lo necesite, en el que el medicamento está constituido por (1) el antagonista de interferón y (2) un diluyente, un conservante, un solubilizante, un emulsionante, un adyuvante, un vehículo, un tampón, un aditivo farmacéutico, un detergente, un antioxidante, un agente voluminizador, un modificador de la tonicidad, un agente aromatizante, un lubricante, un agente de suspensión, una carga, un deslizante, un adyuvante de compresión, un aglutinante, un agente disgregante de comprimidos, un material de encapsulación, un edulcorante, un agente espesante, un colorante, un regulador de la viscosidad, un estabilizante, un regulador osmótico, un propulsor farmacéuticamente aceptable, un saborizante, un pigmento, un revestimiento, o una combinación de cualquiera de ellos.
- 30 22. El uso según la reivindicación 21, en el que el antagonista de interferón está presente en el medicamento en una cantidad que comprende desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces el exceso molar de interferón.
- 35 23. El uso según la reivindicación 21, en el que el antagonista de interferón reduce uno o más de los siguientes:
- (i) unión de un interferón de tipo I con su receptor;
 - (ii) transducción de señal dependiente de interferón;
 - 40 (iii) niveles séricos de interferón;
 - (iv) secreción de interferón por células medida por un ensayo de unión a receptor de interferón;
 - (v) biodisponibilidad de interferón en suero medida por un ensayo de unión a receptor de interferón;
 - (vi) biodisponibilidad de interferón en suero medida por un ensayo de diferenciación de monocitos; o
 - 45 (vi) desarrollo de células que producen interferón de tipo I en el sujeto medido por un ensayo de diferenciación de monocitos.
24. Uso de un antagonista de Flt3L seleccionado del grupo constituido por anticuerpos monoclonales anti-Flt3L y sus fragmentos de unión a antígeno, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico (LES) en un sujeto que lo necesite, en el que dicho antagonista de Flt3L reduce la diferenciación de monocitos a células dendríticas, tratando así el lupus eritematoso sistémico (LES).
- 50 25. El uso según la reivindicación 24, en el que el antagonista de Flt3L reduce la diferenciación de células

madre hematopoyéticas a células productoras de interferón de tipo I.

26. El uso según la reivindicación 25, en el que las células productoras de interferón de tipo I comprenden células dendríticas plasmacitoides.
- 5 27. El uso según la reivindicación 24, en el que el antagonista de Flt3L está presente en el medicamento en una cantidad que comprende desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces el exceso molar de Flt3L o de receptor de Flt3L.
28. El uso según la reivindicación 21, en el que el antagonista de interferón es un anticuerpo humano anti-IFN- α o uno de sus fragmentos de unión a antígeno.
- 10 29. El uso según la reivindicación 21, en el que el antagonista de interferón es un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α .

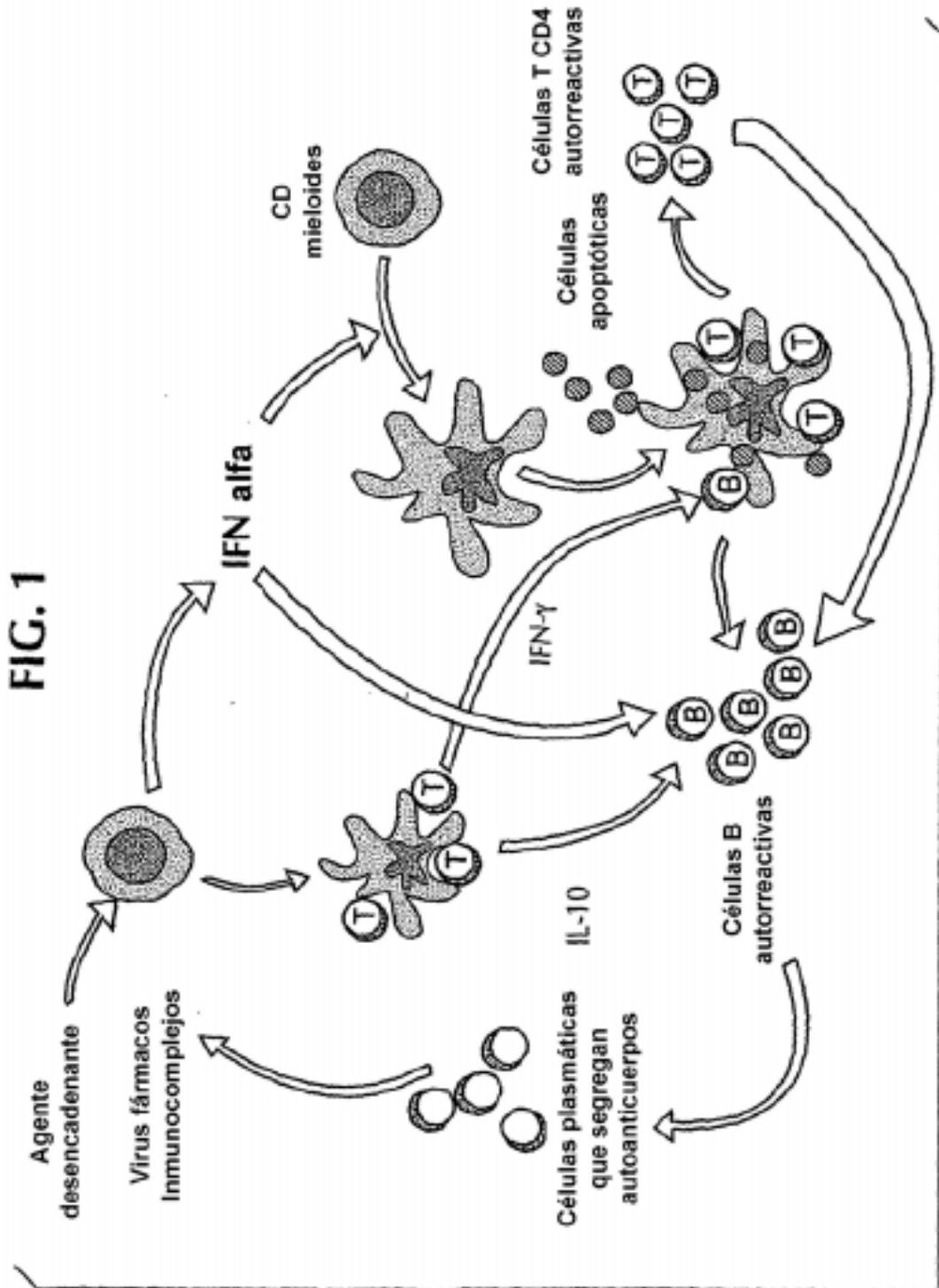


FIG. 2A

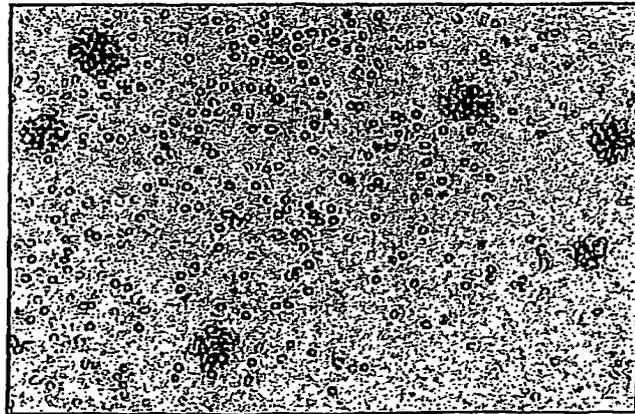


FIG. 2B

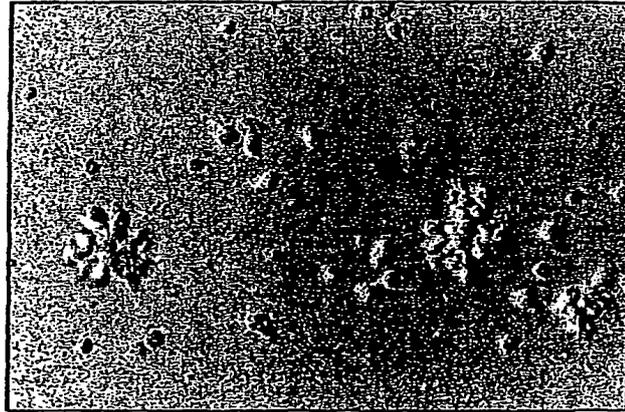


FIG. 2C

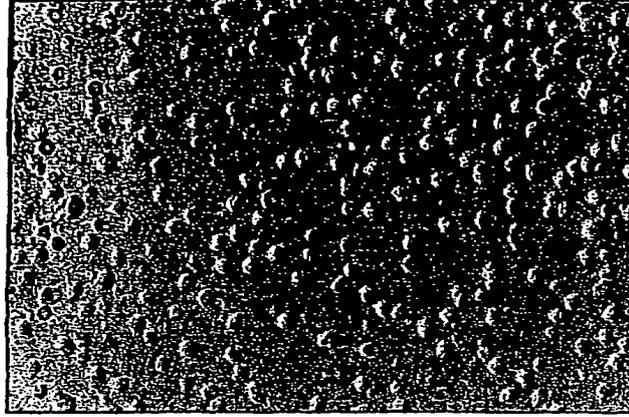


FIG. 2E

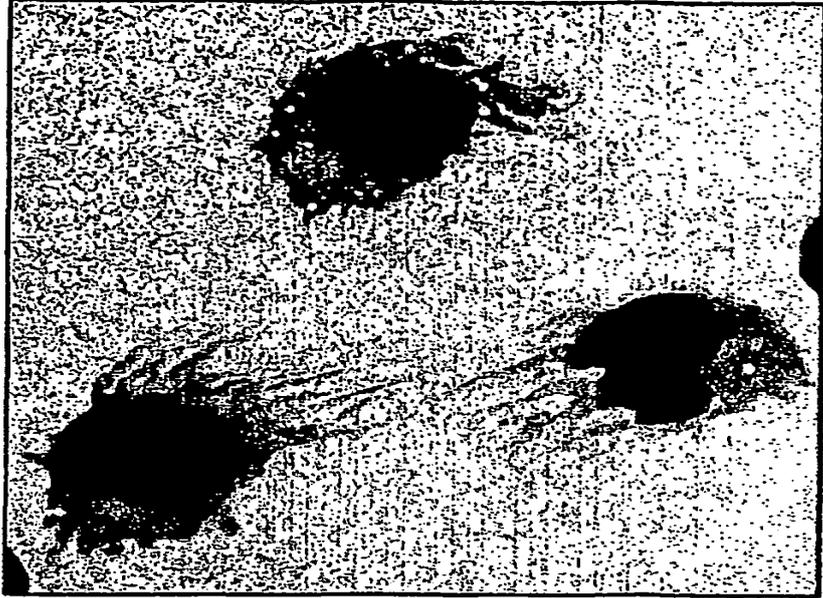


FIG. 2D

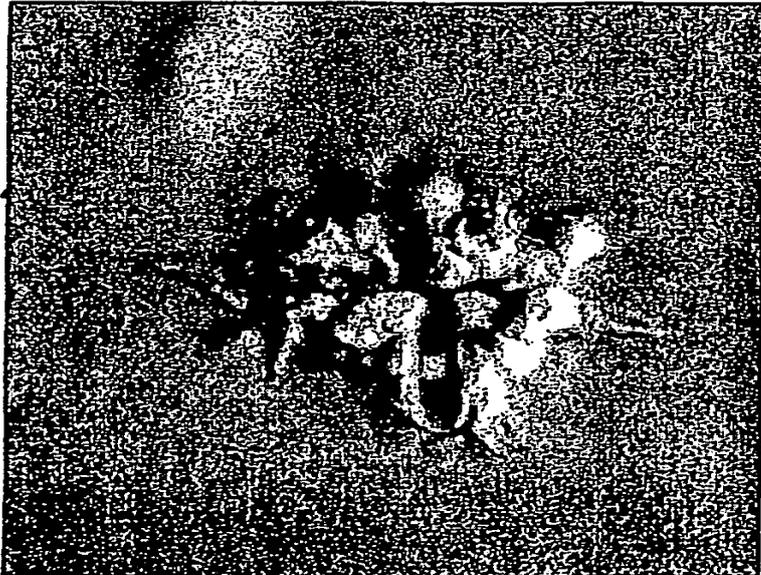


FIG. 3

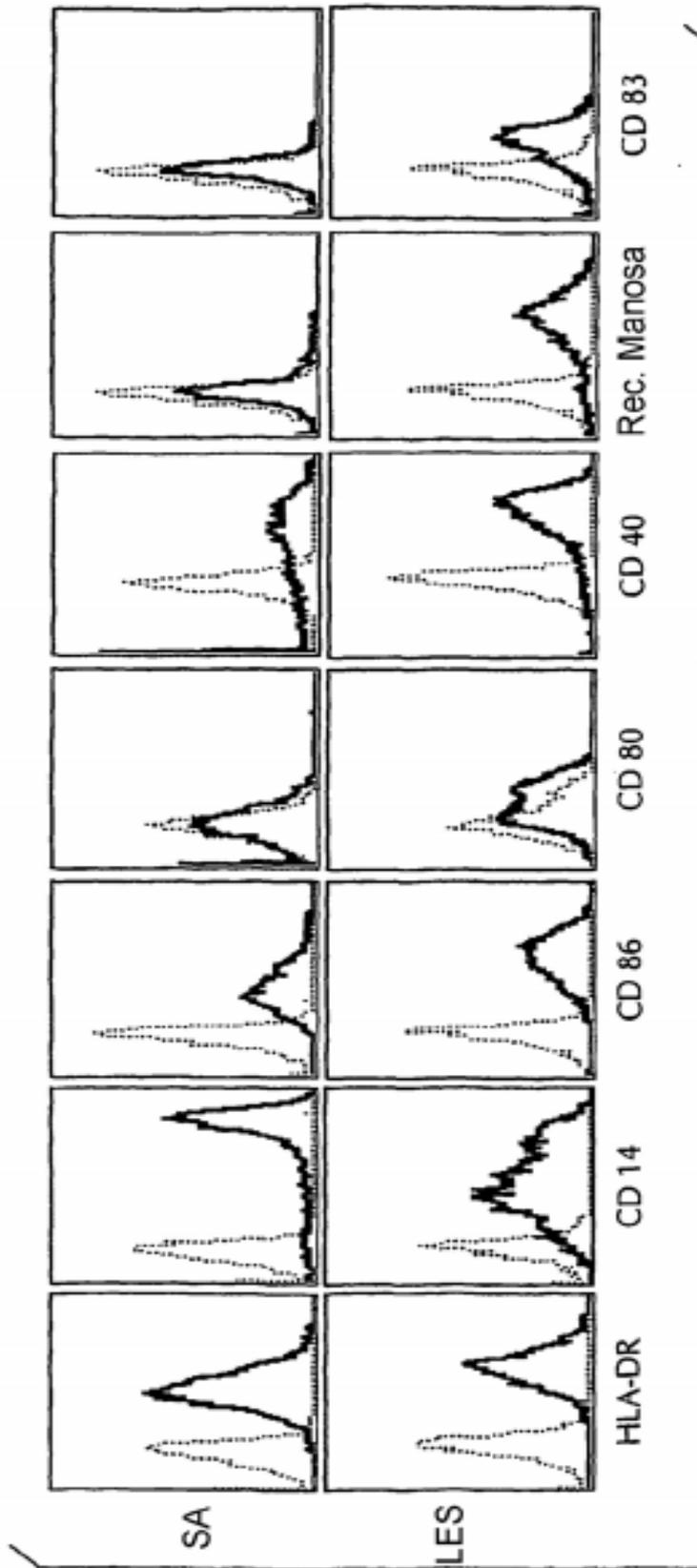


FIG. 4A FIG. 4B FIG. 4C FIG. 4D FIG. 4E

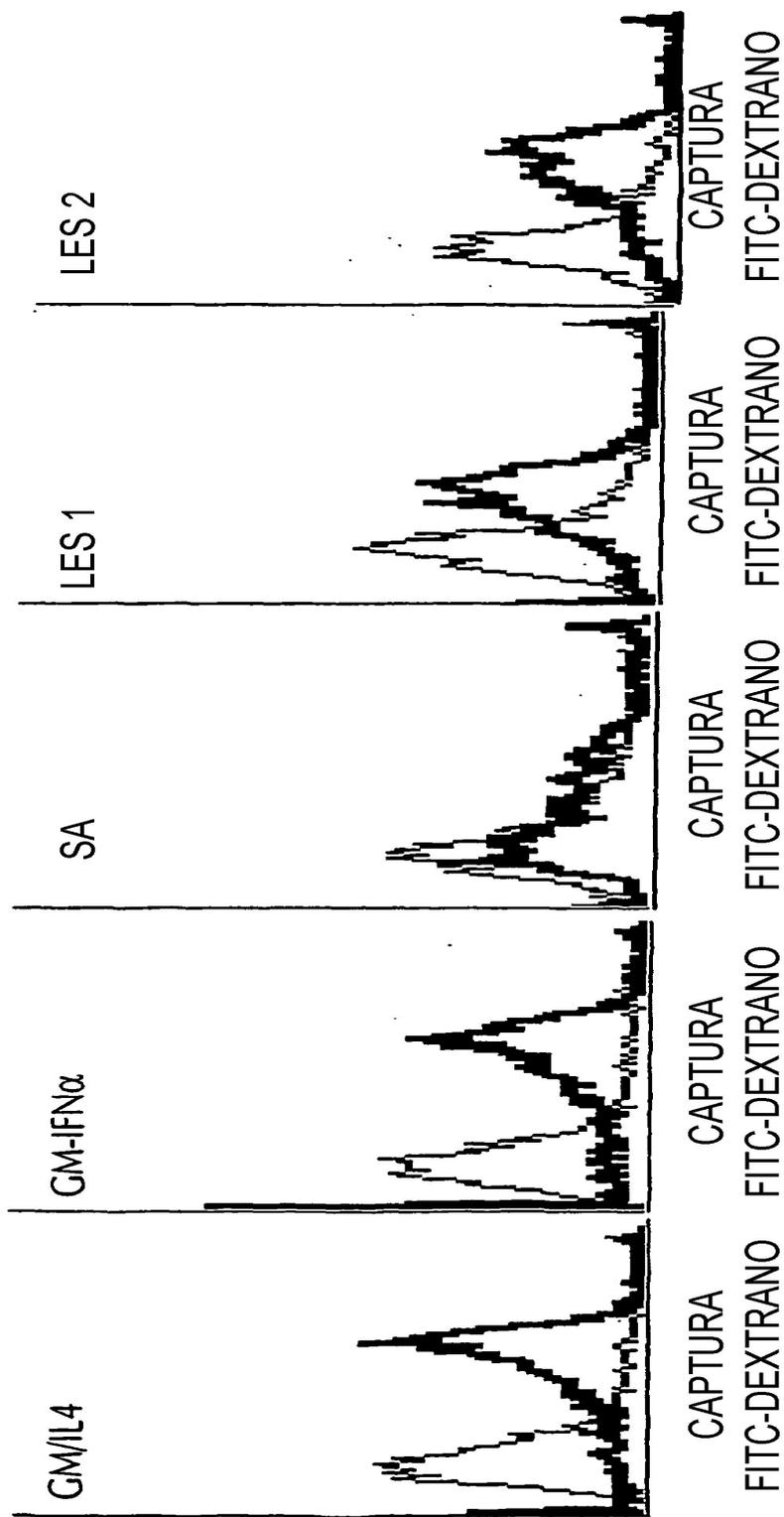


FIG. 5

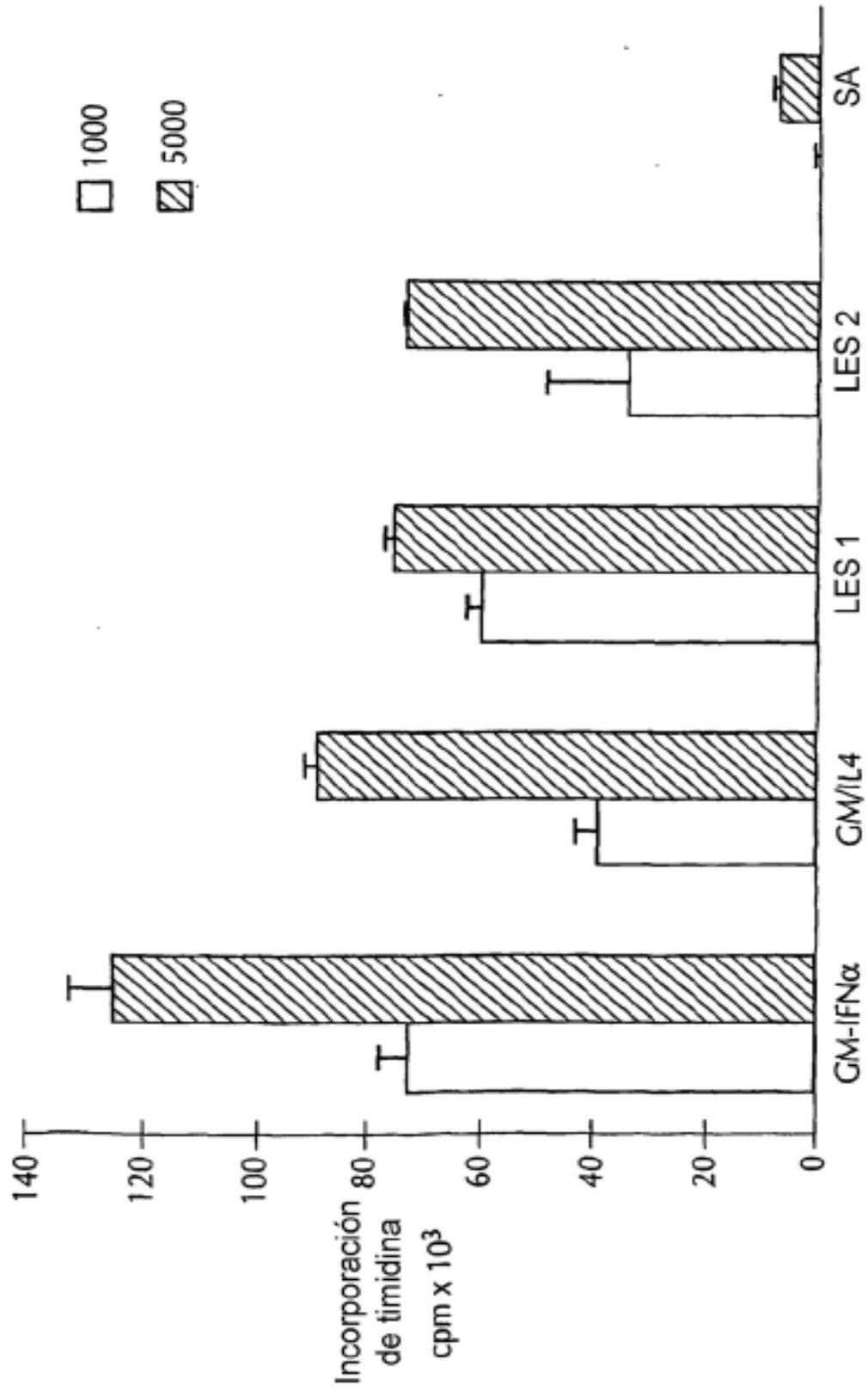


FIG. 6

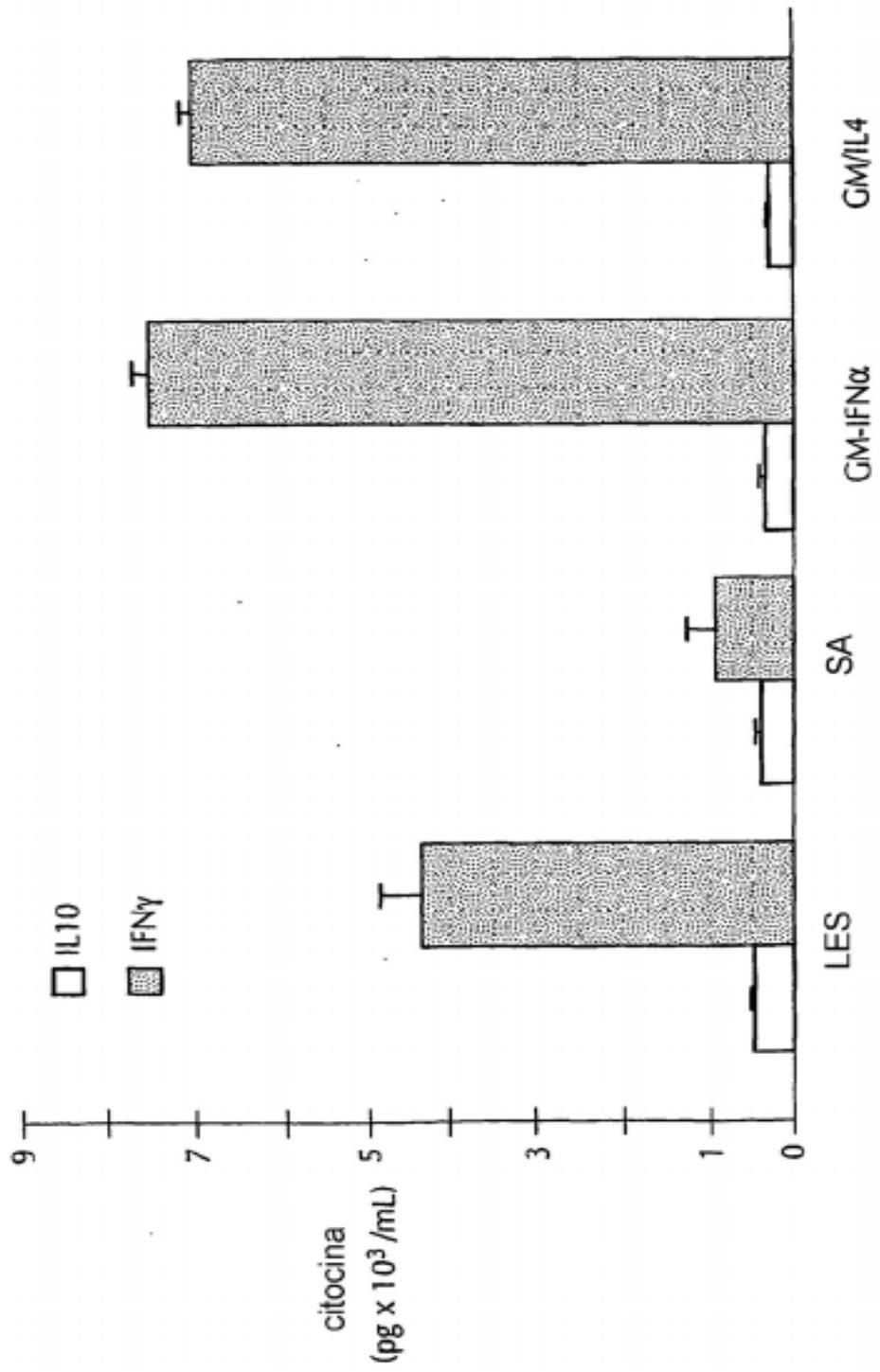


FIG. 7C

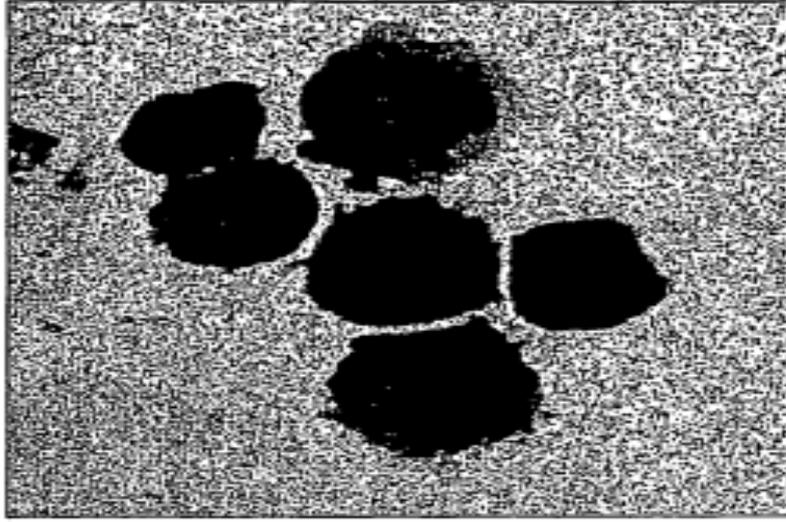


FIG. 7B

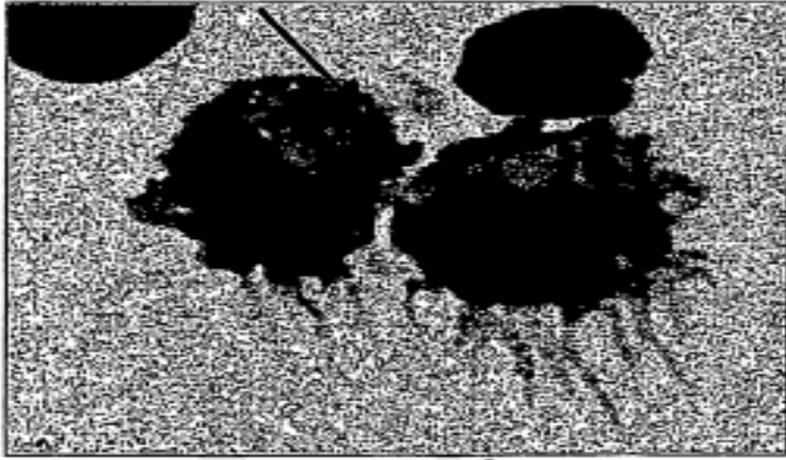


FIG. 7A

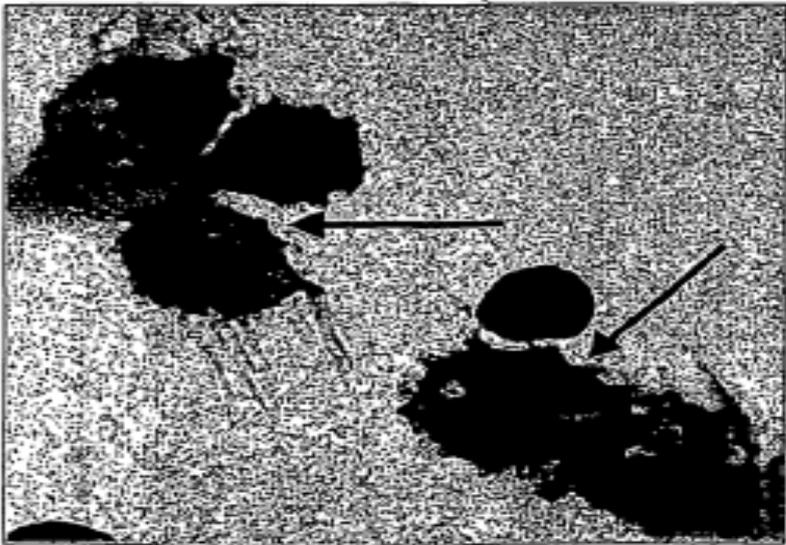


FIG. 8A

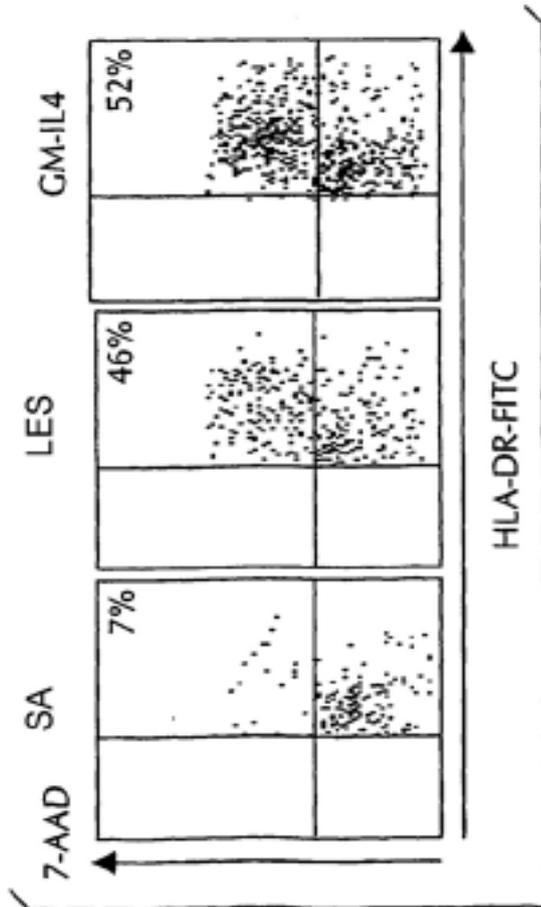


FIG. 8B

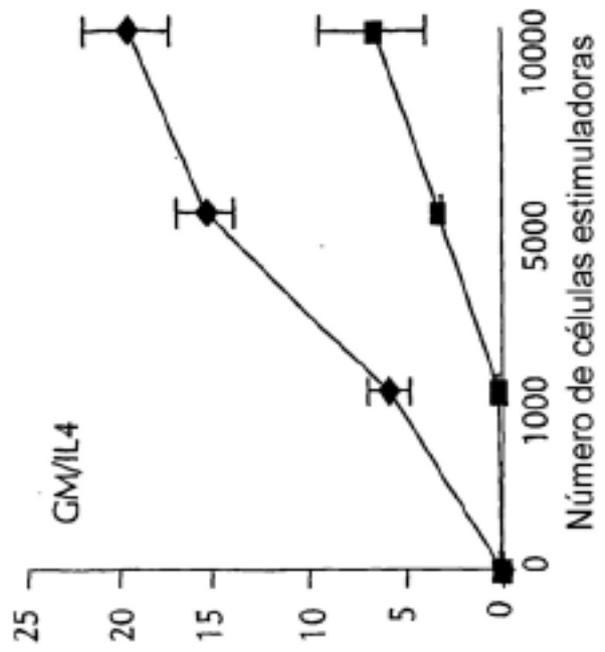


FIG. 10

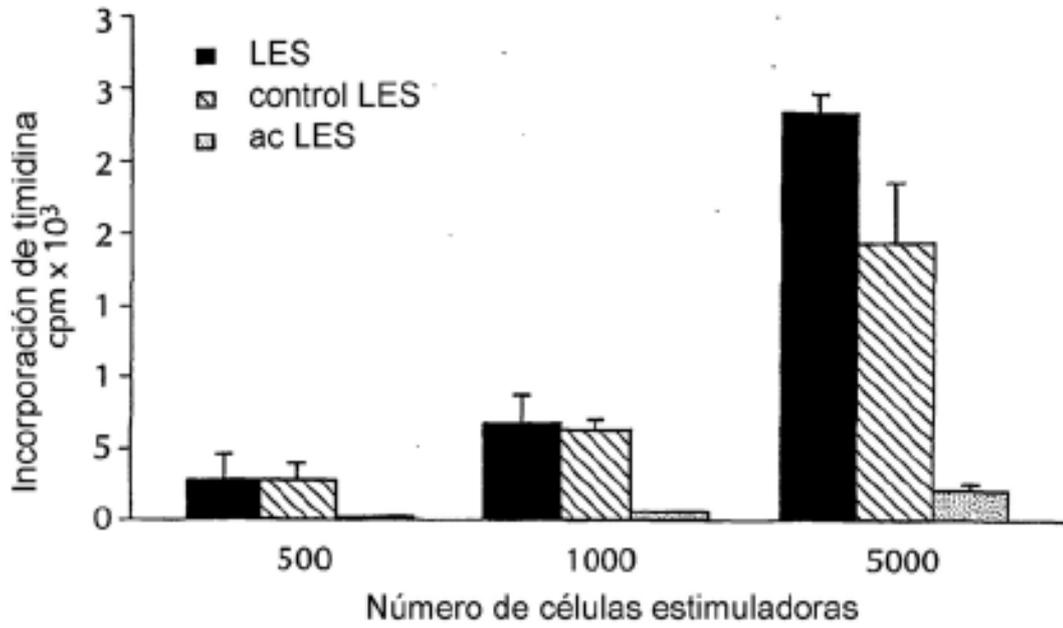


FIG. 11

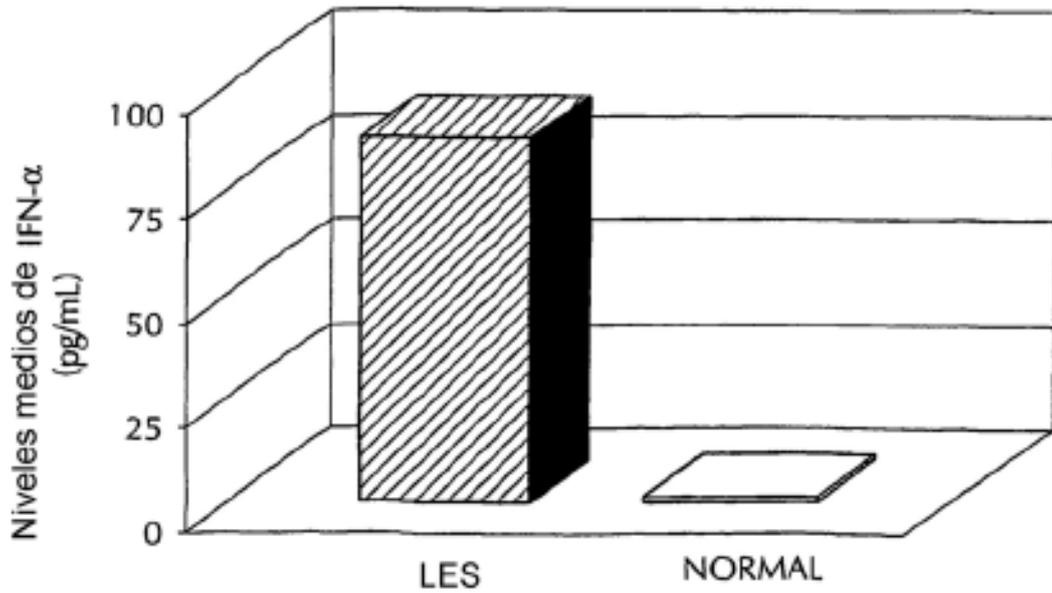


FIG. 12

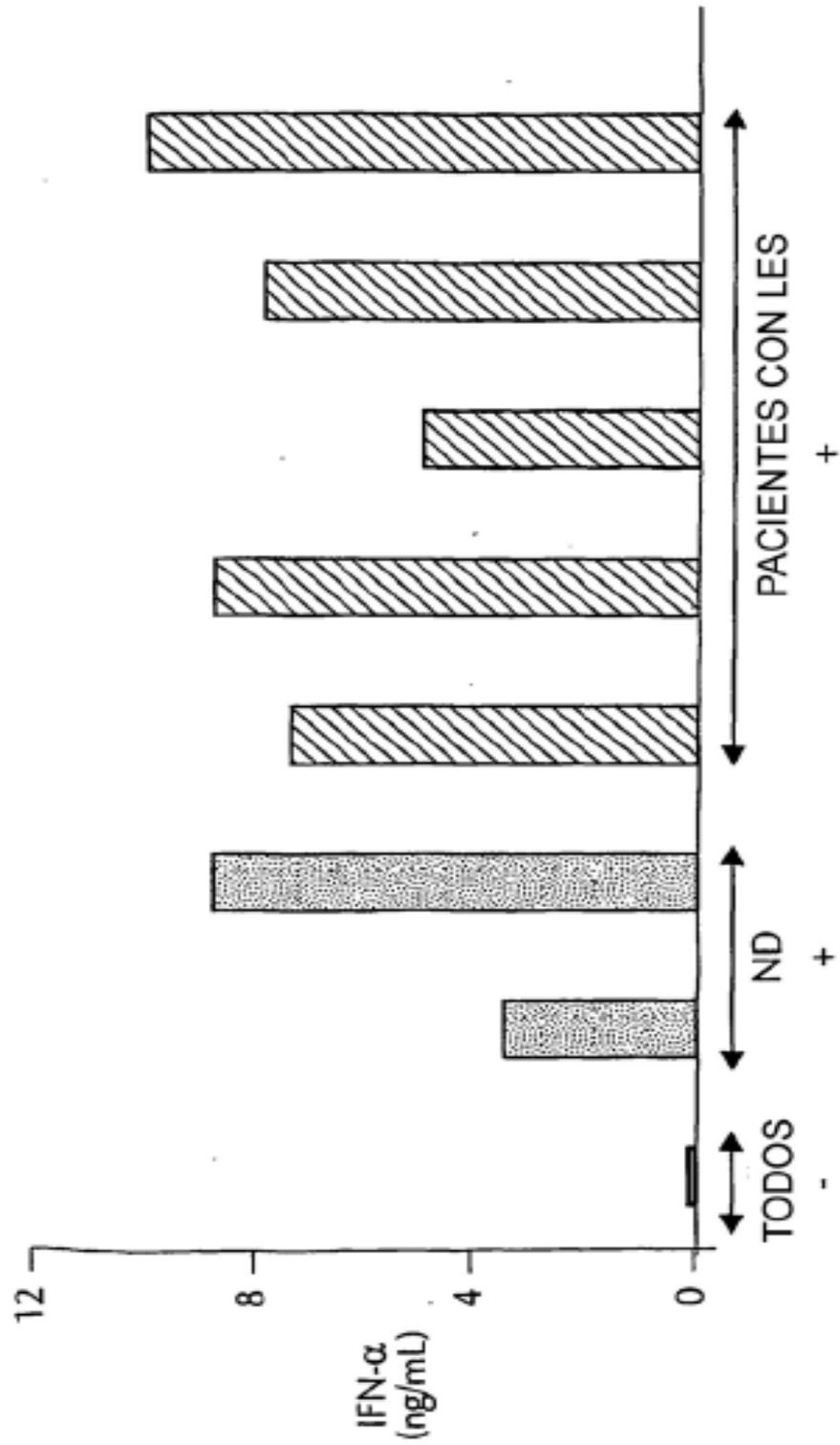


FIG. 13B

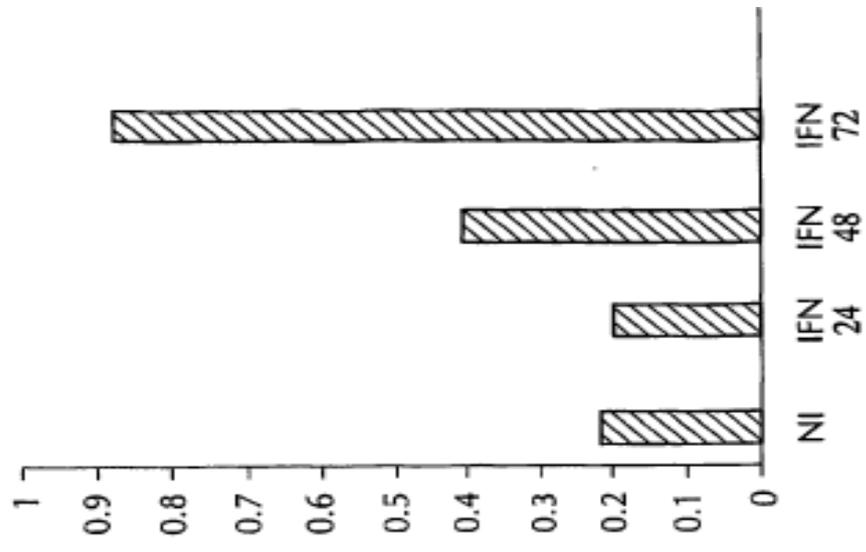


FIG. 13A

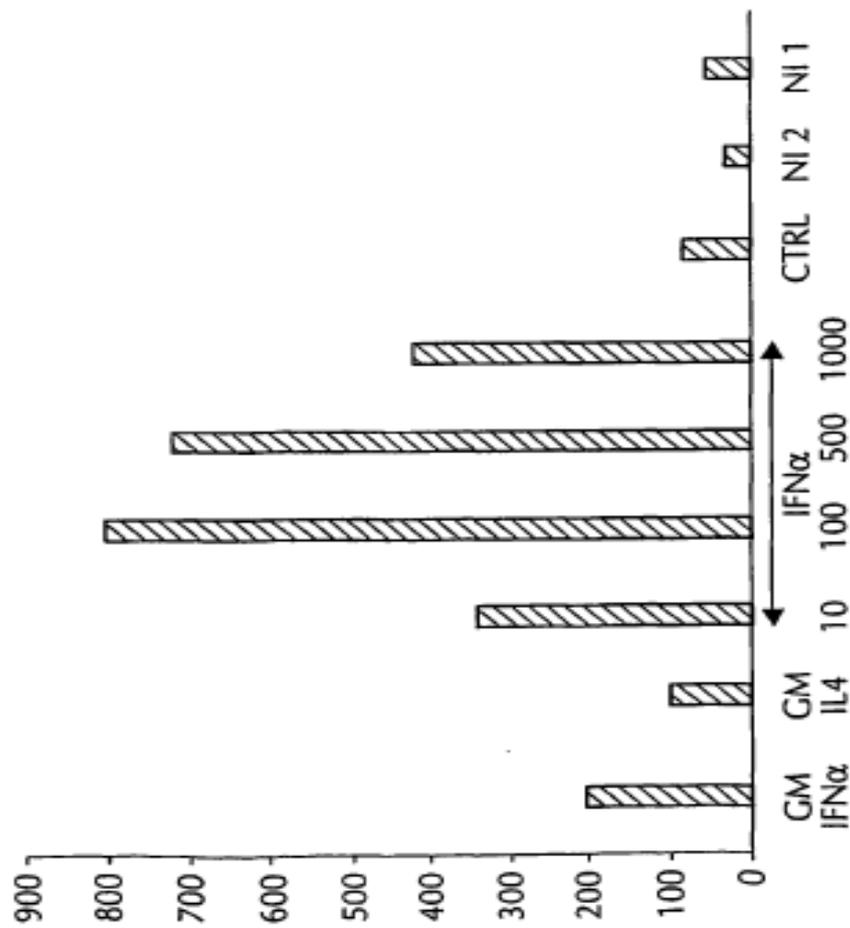


FIG. 14B

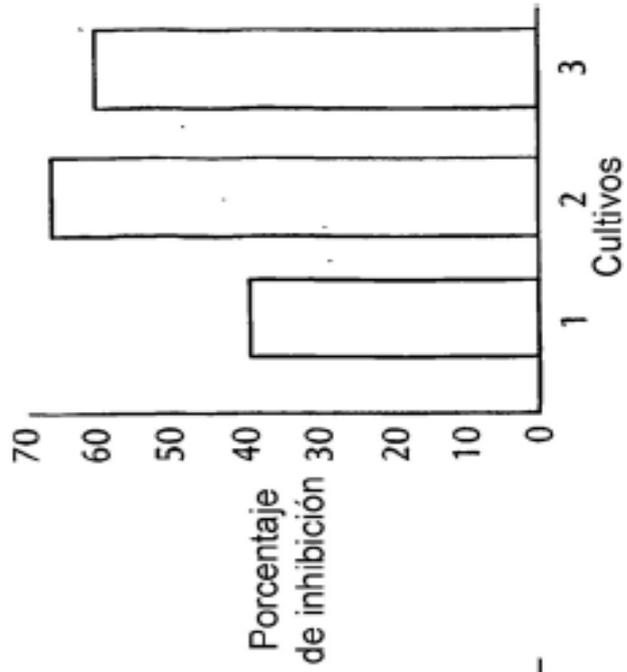


FIG. 14A

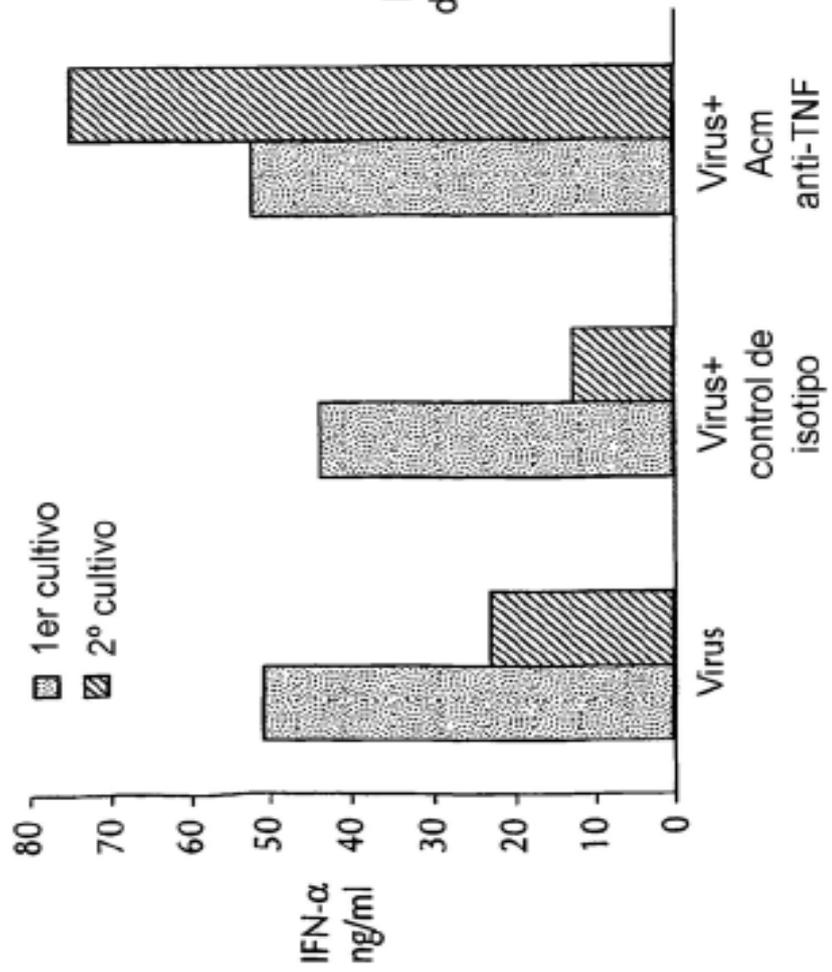


FIG. 14C

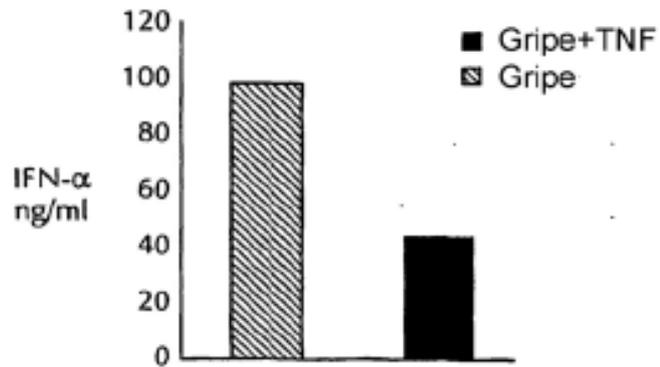


FIG. 15

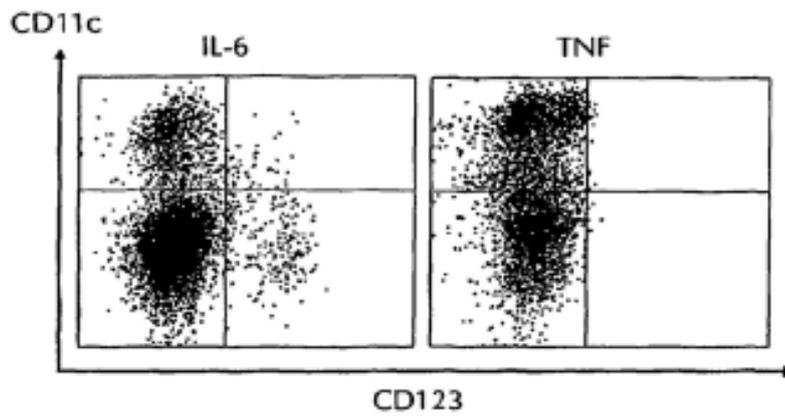


FIG. 16

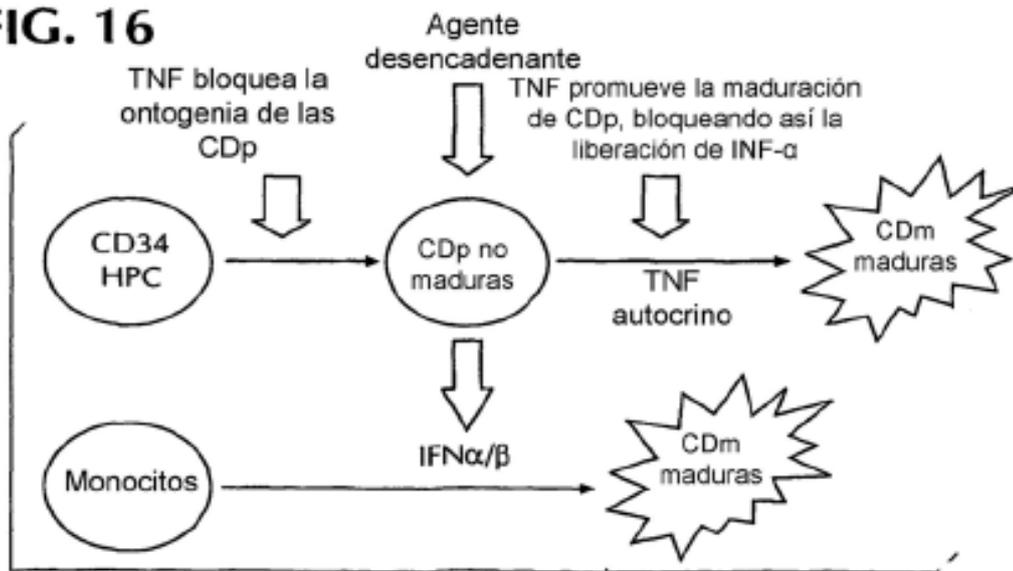


FIG. 17

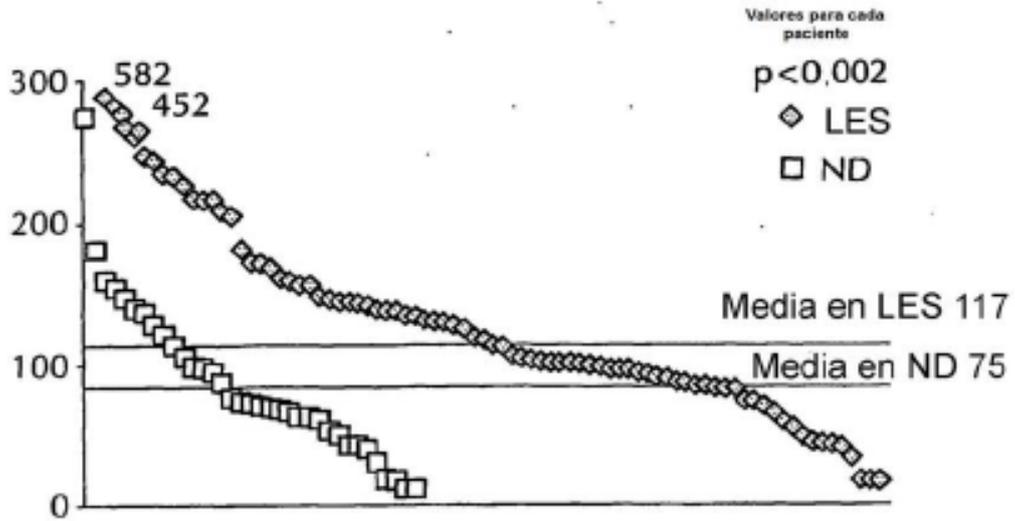


FIG. 18

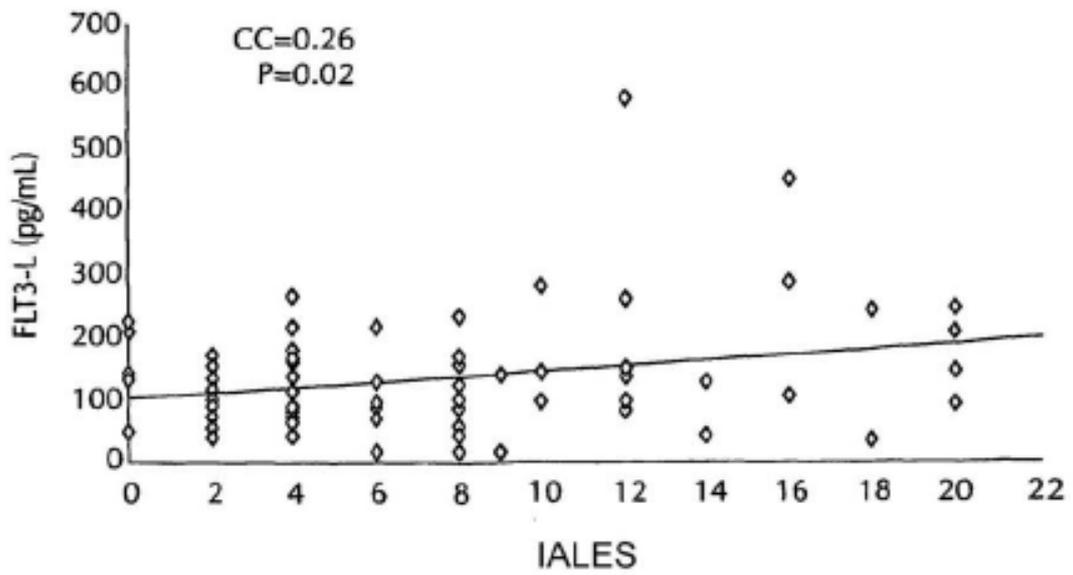


FIG. 19A

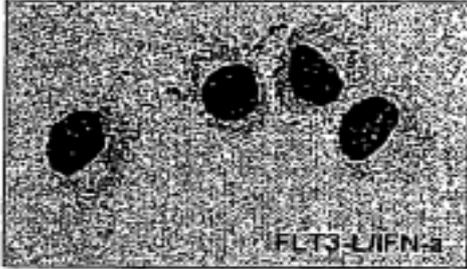


FIG. 19B

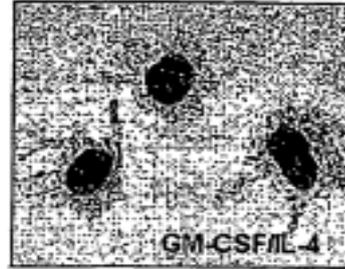


FIG. 19C

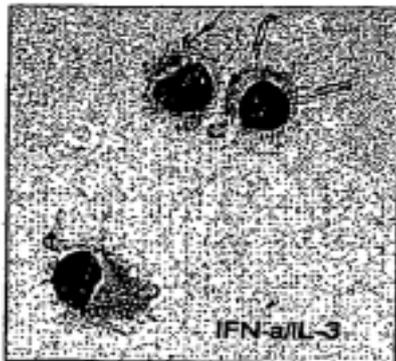


FIG. 19D

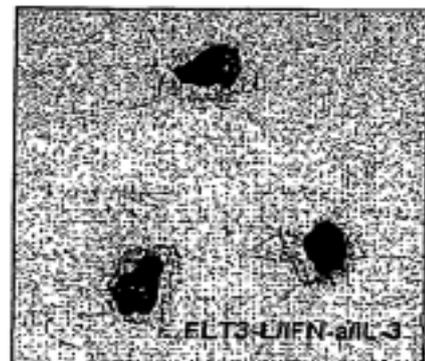


FIG. 20

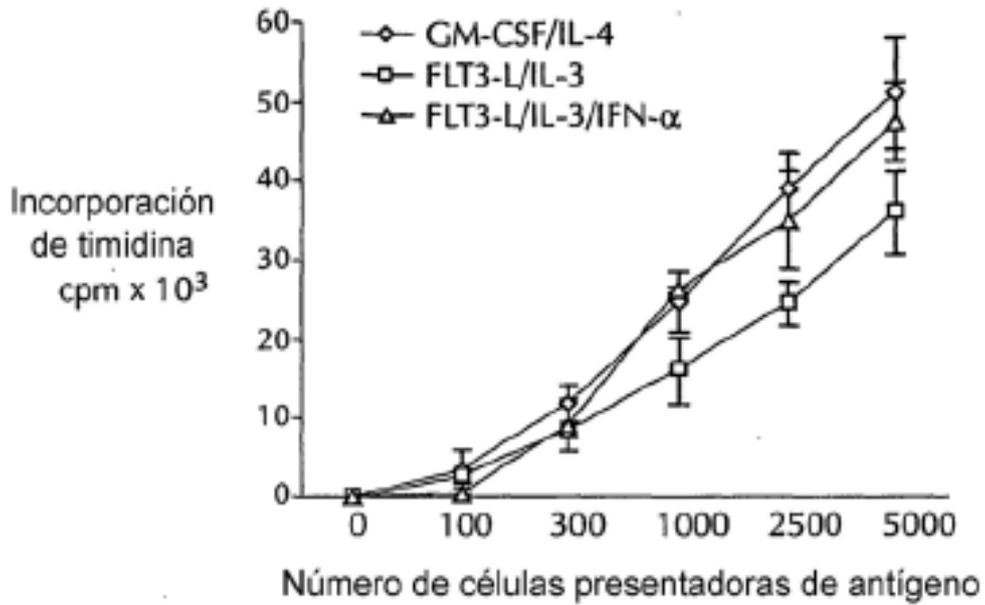


FIG. 21

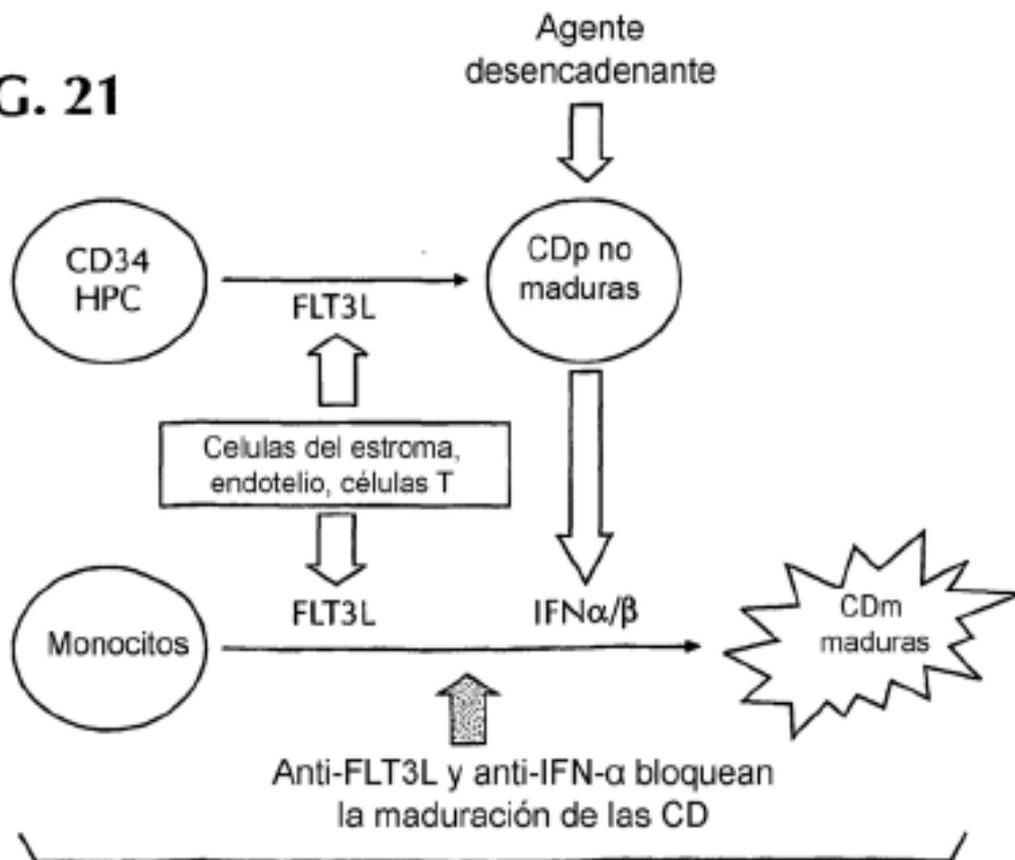


FIG. 22

