

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 103**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)
G01N 33/487	(2006.01)	A61P 25/16	(2006.01)
G01N 33/49	(2006.01)	A61P 37/00	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)	A61P 37/06	(2006.01)
A61K 31/00	(2006.01)		
A61K 31/337	(2006.01)		
A61K 31/437	(2006.01)		
A61K 31/4745	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
A61K 39/395	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05777835 .9**

96 Fecha de presentación: **08.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1805510**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2007**

54 Título: **Estrategia terapéutica para tratar enfermedades autoinmunitarias y degenerativas**

30 Prioridad:
08.09.2004 AU 2004905118

73 Titular/es:
**IMMUNAID PTY LTD
60-66 HANOVER STREET
FITZROY, VICTORIA 3065, AU**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2012

72 Inventor/es:
**ASHDOWN, Maria, Luisa y
ASHDOWN, Martin, Leonard**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2012

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 383 103 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

Estrategia terapéutica para tratar enfermedades autoinmunitarias y degenerativas

Campo de la invención

5 Se han vinculado numerosas enfermedades con la producción de células efectoras. Se divulga aquí el entendimiento de que las cifras de células efectoras son cíclicas en estas enfermedades. Adicionalmente, se divulga aquí la determinación de que las células reguladoras son cíclicas en las enfermedades degenerativas. Con base en estas realizaciones, se divulgan aquí los usos de un agente en la fabricación de un medicamento para tratar afecciones tales como enfermedades autoinmunitarias, enfermedades degenerativas, y enfermedad injerto versus anfitrión. También se describen aquí métodos para determinar cuándo se debe administrar la terapia a un paciente.

10 Antecedentes de la invención

Enfermedades autoinmunitarias

15 Muchos trastornos autoinmunitarios surgen cuando las células de tejidos específicos se convierten en los objetivos de los linfocitos T (para revisión ver Santamaria, 2001). En algunos casos, los linfocitos T provocan daño de tejido directamente a través de los procesos de citotoxicidad mediada por células que implican Fas, perforina, o ambas. La lisis mediada por perforina requiere una interacción de cognato entre el receptor de célula T específico de antígeno en un linfocito T y el antígeno específico (usualmente un péptido) presentado en una molécula MHC en la membrana de plasma de la célula objetivo. La citotoxicidad mediada por Fas implica la ligación de Fas en la célula objetivo mediante el ligando Fas (FasL) en células T pero no requiere una interacción cognato entre el linfocito efector y su objetivo; y sin embargo tiene el potencial de dañar personas inocentes. En otros casos, los linfocitos T matan a sus objetivos al secretar citoquinas que pueden ligar los receptores pro-apoptóticos en la célula objetivo. En otros casos, los linfocitos autorreactivos matan a sus objetivos indirectamente, al mejorar su susceptibilidad a los mecanismos efectores de muerte mediados por no linfocitos, al promover el reclutamiento de células inflamatorias adicionales en el tejido objetivo (es decir macrófagos citotóxicos), o al dirigir la diferenciación de células B autorreactivas en células de plasma que secretan autoanticuerpo.

25 Mucho de lo que se conoce actualmente acerca de las rutas de autoinmunidad efectoras se ha aprendido de los modelos espontáneos y experimentales de enfermedad autoinmunitaria. La diabetes mellitus tipo 1 (T1D) en ratones diabéticos no obesos (NOD) es un modelo prototípico de autoinmunidad específica de órgano, espontánea. Los ratones NOD desarrollan espontáneamente una forma de diabetes autoinmunitaria, muy parecida al T1D humano, que resulta de la destrucción de las células β pancreáticas por los linfocitos T.

30 Los estudios de ratones NOD deficientes de células T CD8+ indican que el ataque de la célula β inicial en T1D se efectúa por las células T CD8+ citotóxicas. Diversos modelos transgénicos de T1D han mostrado que las células T CD8+ pueden matar fácilmente a las células β que expresan neo-antígenos transgénicos; sin embargo, se conoce poco acerca de la especificidad o especificidades antigénicas de las células T CD8+ que matan las células β en ratones NOD. Wong et al. (1999) ha reportado que existe una subpoblación de células T CD8+ que reconoce un péptido derivado de insulina en los islotes de ratones NOD jóvenes. Adicionalmente, estudios inmunopatológicos del páncreas de individuos diabéticos humanos y los receptores de isoinjerto de páncreas han sugerido que la destrucción de células β en T1D humano también se puede afectar, por lo menos en parte, mediante células T efectoras CD8+ (Bottazzo et al., 1985).

40 Las células T efectoras CD8+ también están implicadas en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias espontáneas de la tiroides. La tiroiditis de Hashimoto, por ejemplo, resulta de la destrucción de células foliculares tiroideas por células T CD8+ (Bretz et al., 1999). También se ha reportado que la iniciación de la tiroiditis inducida por yodo en ratones NOD y NOD-H2h4 requiere la contribución de células T CD8+ (Verma et al., 2000). Como en T1D, el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias de tiroides también implica células T CD4+.

45 La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es una enfermedad autoinmunitaria experimental prototípica que modela la esclerosis múltiple humana y que se desarrolla en cepas de roedores susceptibles después de inmunización con proteína básica de mielina, antígeno de proteolípido o proteína oligodendrocito mielina (MOG). La evidencia sugiere que las células T CD8+ cumplen una función en la progresión y severidad de la enfermedad (revisado por Goverman, 1999). La proteína básica de mielina se procesa in vivo mediante la ruta MHC clase I, y un péptido derivado de MOG activa células T CD8+ encefalitogénicas in vivo. También existe evidencia de expansiones clónicas de células T CD8+ en lesiones de esclerosis múltiple activa (Babbe et al., 2000).

50 En muchos trastornos autoinmunitarios, los linfocitos T funcionan como efectores indirectos de autoinmunidad al dirigir la diferenciación de linfocitos B en células de plasma que secretan autoanticuerpos o al propagar

autoantígenos de células objetivo. Estas enfermedades incluyen, entre otros, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, enfermedad de Graves, síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, pénfigo vulgar y lupus eritematoso sistémico.

Enfermedad anfitrión versus injerto

5 La enfermedad anfitrión versus injerto es un proceso de múltiples etapas. Se ha mostrado que las células T efectoras cumplen una función clave en la inducción de la enfermedad. Durante la 'fase de inducción' las células T efectoras ven desigualdades aloantígeno y luego se llegan a activar y expandir por vía de clonación (la 'etapa de expansión'). Estas células T luego liberan citoquinas y posiblemente quimioquinas (por ejemplo proteína inflamatoria de macrófago 1 α), que resulta en la incorporación de otros tipos celulares (macrófagos, granulocitos, linfocitos citotóxicos naturales, etc.) en la 'fase de incorporación'. Finalmente, las células T y los otros tipos celulares median la patología asociada con la enfermedad de anfitrión versus injerto (la 'fase efectora') (para revisión ver Murphy and Blazar, 1999).

15 Ha habido énfasis en la delimitación de los mecanismos efectores de la enfermedad del anfitrión versus injerto. Las células T y otras células median principalmente sus funciones efectoras a través de FasL, perforina-granzima-B o TNF. El uso reciente de ratones transgénicos ha demostrado una función clave para cada una de estas rutas en la etapa efectora de la enfermedad de anfitrión versus injerto. FasL y perforina-granzima-B parecen críticos para patología de órgano sólido mientras que el TNF parece mediar en la debilidad/pérdida de peso asociado con la enfermedad de anfitrión versus injerto. El TNF también parece ser inducido, junto con otras citoquinas, después de acondicionamiento (Hill et al., 1997) – lo que demuestra que las citoquinas provocadas por el donante o el receptor afectan la enfermedad de anfitrión versus injerto. Se ha mostrado que los ratones transgénicos de receptor TNF y el uso de anticuerpos anti-TNF son protectores en modelos de enfermedad de anfitrión versus injerto (Speiser et al., 1997).

Enfermedades degenerativas

25 Aunque las enfermedades degenerativas tal como enfermedad de Alzheimer no se consideran clásicamente que están mediadas por inflamación o el sistema inmunitario, en algunos casos el sistema inmunitario puede cumplir una función importante en el proceso degenerativo. Adicionalmente, se hace claro que el sistema inmunitario en sí mismo puede tener efectos beneficiosos en enfermedades del sistema nervioso consideradas degenerativas. Recientemente se han desarrollado métodos inmunoterapéuticos diseñados para inducir una respuesta inmunitaria humoral para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En modelos de animal, también se ha mostrado que la inmunoterapia diseñada para inducir una respuesta inmunitaria celular puede ser de beneficio en la lesión del sistema nervioso central, aunque las células T pueden tener un efecto beneficioso o perjudicial en el tipo de respuesta inducida por célula T (Monsonog and Weiner, 2003).

Células T reguladoras

35 Los estudios han proporcionado evidencia firme de la existencia de una población que ocurre en forma natural de células T reguladoras/supresoras, que, luego de estimulación mediada in vitro por Tor, suprime la proliferación de las células T efectoras (von Herrath and Harrison, 2003). Estas células son fundamentales para el control de la homeostasis de célula T y en la modulación de las respuestas inmunitarias a los autoantígenos, células de cáncer, patógenos, y aloantígenos.

40 En la periferia de ratones jóvenes no propensos a enfermedades autoinmunitarias, las células T reguladoras constituyen un 10 % estable de células T CD4+. Esta proporción parece ser reducida en ratones genéticamente propensos a enfermedad autoinmunitaria tal como diabetes (Salomon et al., 2000). Se ha mostrado que la transferencia de células T reguladoras evita un rango amplio de enfermedades autoinmunitarias experimentales, que incluyen diabetes, encefalomiелitis autoinmune experimental, y colitis (Salomon et al., 2000; Wu et al., 2002; Kohm et al., 2002; Read et al., 2000). Adicionalmente, se ha mostrado que el agotamiento de células T reguladoras exacerba diversas enfermedades autoinmunitarias experimentales, que incluyen artritis inducida por colágeno (Morgan et al., 2003)). En los humanos, se ha identificado en la sangre periférica y el timo (Jonuliet et al., 2001; Annunziato et al., 2002) una población análoga de células T reguladoras CD4+CD25+ .

50 El potencial de regulación para que las células T regulen activamente enfermedades autoinmunitarias y la enfermedad de anfitrión versus injerto, e induzcan tolerancia a largo plazo que tenga aplicación potencial como una estrategia para inducir tolerancia de larga duración. Ha sido complicado tomar ventajas de células T reguladoras por la incapacidad de expandir y caracterizar este subconjunto de células T menores, una población de células reducida aún adicionalmente en animales y pacientes propensos a enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, estudios recientes han sugerido que puede ser imposible reversar el inicio de diabetes autoinmunitaria debido a que las células T autorreactivas se vuelven resistentes a la supresión durante la fase activa de la enfermedad. Los esfuerzos anteriores para expandir células T reguladoras ex vivo no han logrado clínicamente suficiente expansión, ni eficacia

demostrable in vivo (Fu et al., 2004). El número bajo de células T reguladoras CD4+ CD25+, su fenotipo anérgico y diversa especificidad de antígeno presentan exposiciones principales para endurecimiento de esta población tolerogénica potente para tratar enfermedades autoinmunitarias y rechazo de trasplante.

5 La WO 2005/070090 proporciona métodos para producir una composición enriquecida de célula T reguladora específica de autoantígeno predeterminada, y las composiciones resultantes y métodos de uso. En un ejemplo, la WO 2005/070090 proporciona un método para modular una reacción autoinmune en un sujeto al (a) obtener una población de células compatibles del sujeto; (b) producir una composición enriquecida por célula T reguladora específica de autoantígeno, preferiblemente específica de autoantígeno predeterminado de dicha población de células; y (c) introducir dicha composición en dicho sujeto para modular dicha reacción autoinmune en dichos
10 sujetos.

Marcadores inflamatorios de fase aguda

15 Las mediciones de ciertas concentraciones de plasma de proteína de fase aguda pueden ser de valor diagnóstico o pronóstico bajo condiciones clínicas específicas. La proteína de fase aguda mejor conocida es la proteína reactiva C (CRP). La CRP es una proteína de plasma que aumenta en la sangre con inflamación de ciertas afecciones. El nivel de CRP en plasma en sangre puede aumentar tanto como 1000 veces con la inflamación. Las afecciones que conducen comúnmente a cambios marcados en el CRP incluyen infección vírica y bacteriana, trauma, cirugía, quemaduras, afecciones inflamatorias, enfermedad coronaria y vascular y cáncer avanzado.

20 La mayor parte de las proteínas de fase aguda son sintetizadas por los hepatocitos, algunos se producen por otros tipos celulares, incluyen monocitos, células endoteliales, fibroblastos y adipocitos. Las proteínas de fase aguda incluyen amiloide A en suero (SAA), CRP y el componente P amiloide en suero (SAP).

La sensibilidad inmediata de CRP y SAA a estímulos, junto con su amplio rango de concentración y facilidad de medición automática, han conducido a niveles CRP y SAA en plasma que se utilizan para supervisar precisamente la severidad de la inflamación y la eficacia del manejo de la enfermedad durante ciertas condiciones de la enfermedad.

25 J. Immunol., 2002, 169:4982-4989 describe las funciones 15-desoxiespergualina inmunosupresoras al inhibir la expansión de célula T CD4+. Arch. Neurol., 1997, 54:485-8 describe una mejora en la demencia después de terapia citotóxica.

30 Estudios previos no aprecian que el sistema inmunitario, que incluye poblaciones de células efectoras, tienen ciclos (oscilan en cifras) en forma repetitiva y diferencial en enfermedades autoinmunitarias y durante rechazo de trasplante. Adicionalmente, estudios anteriores no aprecian que la respuesta inmunitaria, que incluye poblaciones de células reguladoras, tiene ciclos en estados de enfermedad degenerativa. Se describe aquí la realización de estos ciclos, y así los usos de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de estas enfermedades.

Resumen de la invención

35 Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la célula efectora y el ciclo de cifras de células reguladoras durante los estados de la enfermedad se caracterizan por la presencia de células efectoras. Este ciclo ocurre sobre una base regular, con expansión de células efectoras contra un antígeno objetivo seguido por la expansión de las células reguladoras dirigidas contra los efectores. Luego del control de las células efectoras mediante las células reguladoras se reducen las cifras de ambos tipos de células, lo que a su vez sigue por el mismo ciclo debido a la presencia continua de antígeno.

40 El conocimiento de este ciclo se puede utilizar para tratar enfermedades en donde se sabe que la emergencia de las células efectoras es perjudicial para el paciente. Ejemplos de tales afecciones son enfermedades autoinmunitarias y rechazo de trasplante. Más específicamente, el tratamiento de un paciente puede ser tal que no ocurre expansión de la célula efectora, y/o las cifras de células efectoras se reducen o eliminan.

Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método o uso como se define en las reivindicaciones adjuntas.

45 Con respecto a las enfermedades autoinmunitarias, mientras no esté limitado por la teoría, parece que la expansión de la célula efectora contra un autoantígeno objetivo sigue mediante la expansión de las células reguladoras dirigidas contra los efectores. Luego del control de las células efectoras por las células reguladoras las cifras y/o actividad de ambos tipos de células se reduce, lo que a su vez sigue por el mismo ciclo debido al esfuerzo continuo del sistema inmunitario de los pacientes para dirigir los autoantígenos.

Preferiblemente, el marcador del sistema inmunitario es un marcador inflamatorio de fase aguda. Más preferiblemente, el marcador inflamatorio de fase aguda se selecciona del grupo que consiste de amiloide A en suero, amiloide P en suero y proteína c reactiva.

5 Preferiblemente, el agente se administra entre cuando los niveles de un marcador inflamatorio de fase aguda han alcanzado su punto más bajo y antes que el marcador suba en el siguiente ciclo.

Preferiblemente, el marcador del sistema inmunitario refleja el número y/o actividad de las células reguladoras, y/o el número y/o actividad de células efectoras.

10 En otra realización, el marcador del sistema inmunitario es temperatura corporal. Con respecto a esta realización, se prefiere que el agente se administre cuando la temperatura corporal ha alcanzado su punto más bajo y antes que la temperatura corporal suba en el siguiente ciclo.

Preferiblemente, las células T efectoras son células T CD8+CD4. Preferiblemente, el agente se administra cuando los números de células T CD8+CD4 están en su punto más bajo y antes que los números de las células T CD8+CD4 suban en el siguiente ciclo. Más preferiblemente, el agente se administra aproximadamente cuando las cifras de las células T CD8+CD4 estén en su ciclo de punto más bajo o se aumenten en los siguientes ciclos.

15 Preferiblemente, las células T reguladoras son células T CD4+CD8. Preferiblemente, el agente se administra aproximadamente cuando, o justo antes, las cifras de las células T CD4+CD8 hayan subido.

20 Con respecto al anterior aspecto, el agente inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye; las células efectoras y el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, fármacos anti-metabólicos, radiación, dsARN y anticuerpos que inhiben la producción, limitan la función de y/o actividad de las células efectoras. Preferiblemente, el fármaco anti-proliferativo se selecciona del grupo que consiste de: taxol, vincristina, vinblastina y vinblastina anhidra.

Un ejemplo de un anticuerpo preferido es el anticuerpo anti-CD8+.

25 La observación que el sistema inmunitario tiene ciclos durante estados de la enfermedad caracterizado por la presencia de células efectoras también se puede utilizar como un indicador de la presencia de tal enfermedad. Estos procedimientos diagnósticos serían particularmente útiles para analizar un paciente por recurrencia del estado de la enfermedad (tal como enfermedad autoinmunitaria) luego de tratamiento, o para analizar un paciente que se determina es susceptible a la enfermedad (tal como en casos donde el sujeto se ha identificado previamente como que posee un alelo del gen que predispone al sujeto a una enfermedad autoinmunitaria) para la emergencia de la enfermedad.

30 También se describe aquí un método para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de la células reguladoras para diagnosticar una enfermedad caracterizada por la producción de células efectoras, el método comprende supervisar el paciente, o las muestras obtenidas del mismo, por fluctuaciones en por lo menos uno de: a) las cifras y/o actividad de las células efectoras, b) cifras y/o actividad de la célula reguladora, c) una molécula asociada con la enfermedad, y/o d) un marcador del sistema inmunitario, en donde el ciclo de uno cualquiera de a) a d) indica que la enfermedad puede estar presente.

También se describe aquí el uso de un ensayo que detecta un marcador del sistema inmunitario para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de la célula reguladora para determinar cuándo se debe administrar un agente a un paciente que sufre de una enfermedad caracterizada por la producción de células efectoras.

40 Preferiblemente, el marcador es un marcador inflamatorio de fase aguda. Más preferiblemente, el marcador inflamatorio de fase aguda se selecciona del grupo que consiste de: amiloide A en suero, amiloide P en suero y proteína c reactiva.

También se describe aquí el uso de un ensayo que detecta las cifras y/o actividad de las células efectoras para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de la célula reguladora para determinar cuándo se debe administrar un agente a un paciente que sufre de una enfermedad caracterizado por la producción de células efectoras.

45 Preferiblemente, el ensayo detecta el número de células T CD8+CD4.

También se describe aquí el uso de un ensayo que detecta números y/o actividad de la célula reguladora para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de la célula reguladora para determinar cuándo se debe administrar un agente a un paciente que sufre de una enfermedad caracterizada por la producción de células efectoras.

Preferiblemente, el ensayo detecta el número de células T CD4+CD8.

También se describe aquí el uso de un ensayo que detecta una molécula asociada con una enfermedad caracterizada por la producción de células efectoras para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de la célula reguladora para determinar cuándo un agente se debe administrar para tratar la enfermedad.

5 También se describe aquí un equipo que se utiliza para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de la célula reguladora para determinar cuándo se debe administrar un agente a un paciente que sufre de una enfermedad caracterizada por la producción de células efectoras, el equipo comprende por lo menos un reactivo para supervisar al paciente, o las muestras obtenidas del mismo, para fluctuaciones en por lo menos uno de: a) las cifras y/o actividad de las células efectoras, b) números y/o actividad de la célula reguladora, c) una molécula asociada con la enfermedad, y/o d) un marcador del sistema inmunitario.
10

Preferiblemente, el equipo comprende instrucciones escritas para desarrollar un método de la invención que incluye la referencia al número preferido de muestras que se van a analizar, y el tiempo entre el análisis de la muestra.

15 Los presentes inventores también han encontrado sorprendentemente que las cifras de células efectoras y de células reguladoras tienen ciclos durante una enfermedad degenerativa. Estos ciclos ocurren sobre una base regular, con la expansión de las células efectoras contra un antígeno objetivo seguido por la expansión de las células reguladoras dirigidas contra las efectoras. Luego del control de las células efectoras por las células reguladoras las cifras de ambos tipos de células se reduce, lo que a su vez está seguido por el mismo ciclo debido a la presencia continua o remoción incompleta del antígeno.

20 El conocimiento de este ciclo se puede utilizar para tratar enfermedades en donde se sabe que la emergencia de las células reguladoras es perjudicial para el paciente. Más específicamente, el tratamiento de un paciente puede ser programado de tal manera que no ocurra expansión de células reguladoras, y/o se reduzca o eliminen la cantidad de células reguladoras.

Ejemplos de enfermedades degenerativas incluyen, enfermedad de Alzheimer, y una enfermedad relacionada con priones.

25 Aunque no se desea estar limitado por la teoría, parece que la expansión de las células efectoras contra un antígeno objetivo está seguido por la expansión de las células reguladoras dirigidas contra las efectoras. Aunque no se considera tradicionalmente como enfermedades caracterizadas por la producción de un antígeno, se provocan enfermedades degenerativas tales como enfermedad de Alzheimer y una enfermedad relacionada con priones, por lo menos en parte, mediante niveles elevados de una proteína o antígeno particular. Existe evidencia que una respuesta inmunitaria se puede elevar contra tales proteínas, y se ha hecho alguna sugerencia para producir vacunas para tratar enfermedades degenerativas tales como enfermedad de Alzheimer y una enfermedad relacionada con priones. Luego del control de células efectoras mediante células reguladoras las cifras y/o actividad de ambos tipos de células se reduce, lo que a su vez está seguido por el mismo ciclo debido a la presencia continua o remoción incompleta del antígeno lo que resulta en una respuesta inmunitaria oscilante persistente, pero inefectiva.
30
35

Un momento apropiado para administrar el agente es cuando los niveles de marcador inflamatorio de fase aguda han aumentado y antes que el marcador empiece a subir en el siguiente ciclo. De acuerdo con lo anterior, un marcador del sistema inmunitario particularmente preferido es un marcador inflamatorio de fase aguda. Más preferiblemente, el marcador inflamatorio de fase aguda se selecciona de, pero no se limita a, el grupo que consiste de amiloide A en suero, amiloide P en suero y proteína c reactiva.
40

Preferiblemente, el marcador del sistema inmunitario refleja el número y/o actividad de las células reguladoras, y/o el número y/o actividad de células efectoras.

45 En otra realización, el marcador del sistema inmunitario es temperatura corporal. Con respecto a esta realización, se prefiere que el agente se administre cuando la temperatura corporal ha subido y antes que temperatura corporal se empiece a elevar en el siguiente ciclo.

En una realización, el paciente se supervisa para un aumento en el número y/o actividad de las células reguladoras mediante el análisis de los niveles de célula T CD4+CD8. Con respecto a esta realización, se prefiere que el agente se administre cuando las cifras de células T CD4+CD8 están en su punto más bajo y antes que las cifras de células T CD4+CD8 suben en el siguiente ciclo. Más preferiblemente, el agente se administra aproximadamente cuando las cifras de células T CD4+CD8 están en su punto más bajo o aumentan en el siguiente ciclo.
50

En otra realización, el paciente se supervisa para un aumento en el número y/o actividad de células efectoras mediante el análisis de los niveles de célula T CD8+CD4. Con respecto a esta realización, se prefiere que el agente se administre aproximadamente cuando, o justo antes, que hayan subido los números de células T CD8+CD4.

5 Con respecto a aspectos de la invención que se relacionan con enfermedades degenerativas, el agente inhibe la producción de, limita la función de; y/o destruye, las células reguladoras y el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos antineoplásicos tales como fármacos anti-proliferativos, fármacos anti-metabólicos, radiación, dsARN y anticuerpos que inhiben la producción y/o actividad de las células reguladoras. Preferiblemente, el fármaco anti-proliferativo se selecciona del grupo que consiste de, pero no se limita a, taxol, vincristina, vinblastina y vinblastina anhidra. Ejemplos de anticuerpos preferidos incluyen, pero no se limitan a, anti-CD4+, anti-CTLA-4
10 (antígeno 4 asociado con linfocito citotóxico), anti-GITR (receptor del factor necrosis de tumor inducido por glucocorticoide), anti-CD28 y anti-CD25.

La observación que el sistema inmunitario tiene ciclos durante una enfermedad degenerativa también se puede utilizar como un indicador de la presencia de tal enfermedad. Estos procedimientos diagnósticos serían particularmente útiles para analizar un paciente para la recurrencia del estado de la enfermedad luego de
15 tratamiento, o para analizar un paciente que se determina es susceptible a la enfermedad para la emergencia de la enfermedad.

También se describe aquí un método para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de las células reguladoras para diagnosticar una enfermedad degenerativa, el método comprende supervisar el paciente, o las muestras obtenidas del mismo, por fluctuaciones en por lo menos uno de: a) las cifras y/o actividad de las células efectoras, b)
20 cifras y/o actividad de la célula reguladora, c) una molécula asociada con la enfermedad, y/o d) un marcador del sistema inmunitario, en donde el ciclo de uno cualquiera de a) a d) indica que la enfermedad puede estar presente.

Los presentes inventores también han determinado que el tratamiento de una enfermedad degenerativa se puede mejorar (o se pueden aumentar las oportunidades de tratamiento exitoso) cuando una vacuna se administra en el tiempo apropiado. En estos casos, la vacuna refuerza la respuesta inmunitaria innata contra la enfermedad. Este
25 sería probablemente el resultado de cifras aumentadas y/o actividad de células efectoras. Aunque teóricamente las células reguladoras aún se producirán finalmente, el refuerzo del sistema inmunitario le permite al paciente controlar en forma adecuada la enfermedad antes de la emergencia de las células reguladoras.

En una realización, la vacuna se administra aproximadamente cuando se aumentan los niveles de células efectoras. En otra realización, la vacuna se administra aproximadamente cuando se reducen los niveles de una molécula asociada con la enfermedad. En una realización adicional, la vacuna se administra aproximadamente cuando se
30 aumentan los niveles de un marcador inflamatorio de fase aguda.

También se describe aquí el uso de un ensayo que detecta un marcador del sistema inmunitario para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de las células reguladoras para determinar cuándo se debe administrar un agente o vacuna a un paciente que sufre de una enfermedad degenerativa.

35 Preferiblemente, el marcador es un marcador inflamatorio de fase aguda. Más preferiblemente, el marcador inflamatorio de fase aguda se selecciona del grupo que consiste de: amiloide A en suero, amiloide P en suero y proteína c reactiva.

También se describe aquí el uso de un ensayo que detecta las cifras y/o actividad de las células efectoras para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de las células reguladoras para determinar cuándo se debe
40 administrar un agente o vacuna a un paciente que sufre de una enfermedad degenerativa.

Preferiblemente, el ensayo detecta el número de células T CD8+CD4.

También se describe aquí el uso de un ensayo que detecta cifras y/o actividad de las células reguladoras para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de las células reguladoras para determinar cuándo se debe
45 administrar un agente o vacuna a un paciente que sufre de una enfermedad degenerativa.

Preferiblemente, el ensayo detecta el número de células T CD4+CD8.

También se describe aquí el uso de un ensayo que detecta una molécula asociada con una enfermedad degenerativa para analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de las células reguladoras para determinar cuando un agente o vacuna se debe administrar para tratar la enfermedad.

50 También se describe aquí el uso de un agente para la fabricación de un medicamento para administrar a un paciente que sufre de una enfermedad degenerativa, en donde el agente se administrará en el tiempo seleccionado de tal manera que la actividad de las células efectoras no se reduce significativamente.

Preferiblemente, el agente inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, las células reguladoras.

5 También se describe aquí un equipo cuando se utiliza para analizar el ciclo de las célula efectoras y/o el ciclo de la células reguladoras para determinar cuándo se debe administrar un agente o vacuna a un paciente que sufre de una enfermedad degenerativa, el equipo comprende por lo menos un reactivo para supervisar el paciente, o las muestras obtenidas del mismo, por fluctuaciones en por lo menos uno de: a) las cifras y/o actividad de las células efectoras, b) cifras y/o actividad de las células reguladoras, c) una molécula asociada con la enfermedad, y/o d) un marcador del sistema inmunitario.

Preferiblemente, el equipo comprende instrucciones escritas para desarrollar un método de la invención que incluye la referencia al número preferido de muestras que se van a analizar, y el tiempo entre el análisis de la muestra.

10 Como se bosqueja aquí, los presentes inventores han notado que las fluctuaciones en numerosos factores indican que el sistema inmunitario tiene ciclos en pacientes que sufren de una enfermedad caracterizada por la producción de células efectoras, así como también enfermedades degenerativas. Estos factores incluyen marcadores inflamatorios de fase aguda. Estos factores se ligan, directamente o indirectamente, al estado general del sistema inmunitario que incluye, pero no se limita necesariamente a, la producción y/o actividad de la célula efectora,
15 producción y/o actividad de la célula reguladora, y/o la producción y/o actividad de célula B.

Se apreciará por parte del experto que las enfermedades tales como enfermedades autoinmunitarias y enfermedades degenerativas tienen un efecto complejo en el paciente. Adicionalmente, las variaciones naturales entre los individuos ligadas a factores tales como su genotipo, nutrición, estado físico, estado de enfermedad previo y actual, toda la influencia de cómo un individuo dado responde a un estado de enfermedad. Así, los individuos
20 variarán en periodicidad o longitud de onda o frecuencia de su ciclo de sistema inmunitario dependiendo de su estado de enfermedad. Adicionalmente, al igual que el ciclo menstrual, la longitud del ciclo variará ligeramente dentro de un individuo debido una variación natural y/o factores ambientales. Así, se puede encontrar variación individual mínima por lo menos con respecto a, por ejemplo, i) la longitud del ciclo, ii) las cifras absolutas de células efectoras o células reguladoras durante el ciclo, o iii) los niveles de marcador inflamatorio de fases agudas durante el
25 ciclo. Tal variación se puede exagerar en pacientes con enfermedad avanzada, cuando el sistema inmunitario del paciente se ha expuesto durante una cantidad considerable de tiempo.

Como resultado, probablemente será más deseable supervisar el paciente por una cantidad suficiente de tiempo para seguir tendencias en las fluctuaciones entre y dentro de los ciclos, y por lo tanto suficiente para determinar el máximo y/o el mínimo, cualquiera que se requiera para el tipo celular relevante, o marcador del mismo. Esto asegura
30 que se entienden las dinámicas de ciclo del sistema inmunitario dentro de un paciente particular. Preferiblemente, el paciente se supervisa durante un periodo de por lo menos 7 días, más preferiblemente por lo menos 14 días, más preferiblemente por lo menos 21 días, más preferiblemente por lo menos 28 días. También puede ser deseable supervisar el paciente durante periodos largos tales como por lo menos 35 días, por lo menos 42 días, por lo menos 49 días, o aún más.

35 Una excepción para supervisar el paciente por una cantidad de tiempo razonable es cuando el método se utiliza para tratar un rechazo de trasplante. En este caso, la exposición a las células efectoras puede resultar rápidamente en rechazo del injerto. Así, cuando se trata, por ejemplo, de la enfermedad de anfitrión versus injerto se prefiere que la supervisión de los pacientes empiece inmediatamente, o justo después, que reciba el injerto, y las células efectoras se dirigen durante el primer ciclo inmunitario. Por ejemplo, en una realización preferida la supervisión
40 empieza aproximadamente 1 día después de recibir el injerto y continúa durante por lo menos 15 días, más preferiblemente por lo menos 21 días.

En general, se prefiere que se supervisen numerosos factores al mismo tiempo. Esto se debe a los factores descritos anteriormente, es improbable que cada factor tenga un perfil de ciclo perfecto, particularmente sobre un número de ciclos, para proporcionar rutinariamente una indicación clara del tiempo apropiado para administrar el agente. Aunque el análisis de numerosos factores durante un periodo largo puede tener costes elevados, y puede tener por lo menos alguna inconveniencia para el paciente, las enfermedades tales como enfermedades autoinmunitarias y enfermedades degenerativas pueden ser letales. Por lo tanto, es valioso entender tanto como sea posible con respecto al ciclo del sistema inmunitario en un paciente dado antes que se trate el paciente.
45

Adicionalmente, aunque el análisis de diferentes factores de ciclo en algunos pacientes puede resultar en perfiles complejos, dada la guía proporcionada aquí está bien dentro de la experticia del médico analizar los datos de la supervisión para determinar el tiempo óptimo para administrar el agente.
50

Un factor de complicación adicional sería si el paciente ha adquirido recientemente una enfermedad o trauma no relacionado con lo que se va a tratar. Por ejemplo, un paciente que se trata por una enfermedad autoinmunitaria también puede contraer el virus de gripe común. La presencia del virus de gripe resultará en, por ejemplo, un
55 aumento en los marcadores inflamatorios de fase aguda independiente del ciclo de estos marcadores que ocurre

5 debido a la enfermedad autoinmunitaria. Otras enfermedades que pueden provocar complicaciones en supervisar el efector/ciclo de las células reguladoras para uso en los métodos de la presente invención incluyen, otras infecciones, y cáncer. De acuerdo con lo anterior, es deseable supervisar el paciente por cualesquier factores que puedan resultar en niveles elevados de, por ejemplo, marcadores inflamatorios de fase aguda para asegurar que el factor que se supervisa verdaderamente refleja el ciclo celular regulador/ efector que resulta de la enfermedad que se va a tratar.

10 Adicionalmente, se prefiere que el paciente se supervise tan frecuentemente como sea posible para asegurar el ciclo del sistema inmunitario dentro de un paciente dado que se caracteriza en forma adecuada. Naturalmente, esto asegurará que el agente se administra en el tiempo apropiado y que cualesquier variaciones pequeñas en, por ejemplo, efecto/ números de células reguladoras o actividad, o marcadores de los mismos, no se interpreta mal. Preferiblemente, el paciente se supervisa por lo menos cada 3 días, más preferiblemente por lo menos cada 2 días, y más preferiblemente por lo menos cada día. Puede ocurrir la supervisión más frecuentemente, por ejemplo cada 12 horas, cuando el ciclo alcanza una etapa en donde es probable que el tiempo sea apropiado para administrar el agente.

15 Preferiblemente, el paciente es un mamífero. Más preferiblemente, el mamífero es un humano.

Como será evidente, los rasgos y características preferidas de un aspecto de la invención se pueden aplicar a muchos otros aspectos de la invención.

20 A través de esta especificación la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento indicado, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

La invención se describe aquí adelante por vía de los siguientes Ejemplos no limitantes y con referencia a las figuras que acompañan.

Breve descripción de los dibujos que acompañan

Figura 1. Proteína c reactiva y Amiloide A en suero versus tiempo en Mrs FO.

25 Figura 2. Amiloide A en suero y IL-2 versus tiempo en Mrs FO.

Figura 3. Amiloide A en suero y marcador de cáncer CA125 versus tiempo en Mrs FO.

Figura 4. Proteína c reactiva y C3 versus tiempo en Mrs FO.

Descripción detallada de la invención

Técnicas Generales y Definiciones

30 A menos que se defina específicamente otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí se deben considerar que tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente una persona medianamente versada en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genéticas moleculares, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteína, y bioquímica).

35 A menos que se indique otra cosa, la proteína recombinante, cultivo celular, y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos estándar, bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y se explican a través de la literatura en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), t.a. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, que incluye todas las actualizaciones hasta ahora), Ed Harlow and David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (que incluye todas las actualizaciones hasta ahora).

45 Como se utiliza aquí los términos "que trata", "tratar" o "tratamiento" incluyen administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente suficiente para reducir o eliminar por lo menos un síntoma de la enfermedad.

"Células efectoras" incluyen, pero no se limitan necesariamente a, la población de células T conocida como células CD8+.

5 "Las células reguladoras" incluyen, pero no se limitan necesariamente a, una subpoblación de células T CD4+. Tales células también se pueden denominar en la técnica como "células supresoras". Las células reguladoras pueden actuar directamente sobre las células efectoras o puede hacer valer sus efectos sobre de las células efectoras a través de otros mecanismos.

Las células CD4+ expresan el marcador conocido en la técnica como CD4. Típicamente, el término "células T CD4+" como se utiliza aquí no se refiere a células que también expresan CD8. Sin embargo, Este término puede incluir células T que también expresan otros marcadores antigénicos tales como CD25.

10 Como se utiliza aquí, el término "inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye" cuando se refiere a la exposición de las "células efectoras" al agente significa que el número, y/o actividad, de las células efectoras se regula por disminución por el agente. Más preferiblemente, el número, y/o actividad, de las células efectoras se erradica completamente por el agente.

15 Como se utiliza aquí, el término "inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye" cuando hace referencia a la exposición de "las células reguladoras" al agente significa que el número, y/o actividad, de las células reguladoras se regula por disminución por el agente. Más preferiblemente, el número, y/o actividad, de las células reguladoras se erradica completamente por el agente.

20 Como se utiliza aquí el término "enfermedad caracterizada por la producción de células efectoras" se refiere a cualquier afección en donde el número o actividad de las células efectoras cumple la función de prolongar el estado de la enfermedad. Estas enfermedades i) se caracterizan típicamente por una respuesta inmunitaria contra los autoantígenos conocidos de manera general en la técnica como enfermedades autoinmunitarias, o ii) involucran una respuesta inmunitaria de los pacientes durante el trasplante de órgano/tejido/célula de un donante adecuado.

25 Como se utiliza aquí, el término "enfermedad autoinmunitaria" se refiere a cualquier enfermedad en la que el cuerpo produce una respuesta inmunogénica (es decir, sistema inmunitario) a algún constituyente de su propio tejido. En otras palabras el sistema inmunitario pierde su capacidad de reconocer algún tejido o sistema dentro del cuerpo como "propio" y lo trata y ataca como si fuera extraño. Las enfermedades autoinmunitarias se pueden clasificar en aquellas en las que se afecta predominantemente un órgano (por ejemplo, anemia hemolítica y tiroiditis anti-inmune), y aquellas en las que el proceso de enfermedad autoinmunitaria se difunde a través de muchos tejidos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico). Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a,

30 artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, miastenia gravis, escleroderma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Graves, síndrome de Sjogren, falla poliendocrina, vitiligo, neuropatía periférica, síndrome poliglandular autoinmune tipo I, glomerulonefritis aguda, enfermedad de Addison, hipoparatiroidismo idiopático de inicio en adulto (AOIH), alopecia totalis, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, anemia aplásica autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Behcet,

35 enfermedad celiaca, hepatitis activa crónica, síndrome de CREST, dermatomiositis, cardiomiopatía dilatada, síndrome de eosinofilia mialgia, epidermólisis bullosa adquirida (EBA), arteritis de célula gigante, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain-Barré, hemocromatosis, púrpura de Henoch-Schonlein, nefropatía idiopática IgA, diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), artritis reumatoide juvenil, síndrome de Lambert-Eaton, dermatosis lineal IgA, miocarditis, narcolepsia, vasculitis necrotizante, síndrome de lupus neonatal (NLE), síndrome nefrótico,

40 pemfigoide, pemfigo, polimiositis, colangitis esclerosante primaria, soriasis, glomerulonefritis rápidamente progresiva (RPGN), síndrome de Reiter, síndrome de hombre-rígido, enfermedad inflamatoria del intestino, osteoartritis y tiroiditis.

45 El término "trasplante" y variaciones del mismo se refiere a la inserción de un injerto en un anfitrión, si el trasplante es alogénico (cuando el donante y receptor son de diferentes orígenes genéticos pero de la misma especie), o xenogénico (cuando el donante y el receptor son de diferentes especies). Así, en un escenario típico, el anfitrión es humano y el injerto es un isoinjerto, derivado de un humano del mismo origen genético o diferente. En otro escenario, el injerto se deriva de una especie diferente de aquella que se trasplanta, tal como un corazón de babuino trasplantado en un anfitrión receptor humano, y que incluye animales de especies separadas ampliamente filogénicas, por ejemplo, una válvula de corazón de cerdo, o células islote beta de animal o células neuronales trasplantadas en un anfitrión humano. Las células, tejidos y/o órganos se pueden trasplantar, ejemplos incluyen,

50 pero no se limitan a, células aisladas tales como células islote; tejido tal como la membrana amniótica de un neonato, médula ósea, células precursoras hematopoyéticas, y tejido ocular, tal como tejido de cornea; y órganos tales como piel, corazón, hígado, bazo, páncreas, lóbulo de la tiroides, pulmón, riñón, órganos tubulares (por ejemplo, intestino, vasos sanguíneos, o esófago), etc. Se pueden utilizar órganos tubulares para reemplazar las porciones dañadas del esófago, vasos sanguíneos, o conducto biliar. No solo se pueden utilizar injertos de piel para quemaduras, sino también como un recubrimiento para el intestino dañado o para cerrar ciertos defectos tal como hernia diafragmática. El injerto se deriva de cualquier fuente de mamífero, que incluye humano, de cadáveres o donantes vivos. Preferiblemente el injerto es médula ósea o un órgano tal como corazón.

55

Como se utiliza aquí, "rechazo de trasplante" o variaciones del mismo se refiere al sistema inmunitario del anfitrión que monta una respuesta inmunitaria por el injerto, que resulta finalmente en que el injerto es rechazado por el anfitrión. De manera general existen dos tipos de "rechazo de trasplante", a saber la enfermedad de anfitrión versus injerto y la enfermedad injerto versus anfitrión.

5 Como se utiliza aquí, el término "la enfermedad de anfitrión versus injerto" se refiere a un ataque inmunitario del receptor por las células de un donante, que conduce frecuentemente al rechazo de las células trasplantadas. Aunque las células trasplantadas pueden ser de cualquier tipo de célula, típicamente solo los tejidos trasplantados que alojan suficientes células inmunes provocan enfermedad de anfitrión versus injerto se encuentran en la sangre y la médula ósea.

10 Como se utiliza aquí, el término "enfermedad injerto versus anfitrión" se refiere a reacciones mediadas por linfocitos de un anfitrión contra células alogénicas o xenogénicas adquiridas como un injerto o de otra forma, que puede conducir a daño y/o la destrucción de las células anfitrionas. Esta es la base común de rechazo de injerto.

Como se utiliza aquí, una "enfermedad degenerativa" es una afección que resulta en la pérdida de células. Preferiblemente, la enfermedad degenerativa es una enfermedad neurodegenerativa que está marcada por la pérdida de células nerviosas. Las enfermedades neurodegenerativas relevantes para la presente invención son enfermedad de Alzheimer y enfermedades relacionadas con priones tales como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alper, Kuru, síndrome de Gersymane-Straussler-Scheinker, insomnio familiar fatal, encefalopatía espongiiforme ovina, encefalopatía transmisible por leche, caquexia crónica, y encefalopatía espongiiforme bovina. En otra realización, la enfermedad degenerativa es una "enfermedad relacionada con material amiloide" y es enfermedad de Alzheimer.

15
20

El término "marcador del sistema inmunitario" se refiere de manera general a cualquier molécula o factor que proporciona una indicación del estado y/o actividad del sistema inmunitario. Estos marcadores se pueden ligar directamente a la actividad y/o producción de células reguladoras y/o células efectoras, y/o puede proporcionar una indicación más general de la respuesta general del sistema inmunitario a un antígeno. Ejemplos de un marcador adecuado del sistema inmunitario incluyen marcadores inflamatorios de fase aguda tal como proteína c reactiva y amiloide A en suero. Otro ejemplo de un marcador del sistema inmunitario son indicadores de la destrucción celular tal como, pero no limitado a, colesterol y β -2-microglobulina en suero. El colesterol y β -2-microglobulina son componentes integrales de las membranas celulares. En particular, la β -2-microglobulina es la molécula de acceso para el receptor principal de Histocompatibilidad Clase I o MHC- I. Posteriormente, con el ciclo de la respuesta inmunitaria antienfermedad junto con la destrucción de células objetivo, los niveles en suero en pacientes enfermos de estas dos moléculas se elevan frecuentemente. Así, las oscilaciones entre los indicadores de destrucción celular, tales como colesterol y β -2-microglobulina, también pueden probar ser útiles en determinar el inicio o final del ciclo de la respuesta inmunitaria. Naturalmente, luego el presente descubrimiento del ciclo del sistema inmunitario en una enfermedad caracterizada por la producción de células efectoras, así como también el ciclo en pacientes con una enfermedad degenerativa, el destinatario experto puede identificar fácilmente marcadores adicionales en los métodos de la invención.

25
30
35

Como se utiliza aquí, el término "una molécula asociada con la enfermedad" se refiere a cualquier molécula que se liga al estado de la enfermedad. En una realización preferida, el marcador es una proteína. Tales marcadores de proteína se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los niveles del péptido amiloide- β pueden ser un marcador de enfermedad de Alzheimer, y proteínas priónicas en su confirmación β puede ser un marcador de enfermedades relacionadas con priones.

40

Como se utiliza aquí, el término "la actividad de las células efectoras no se reduce significativamente" lo que significa que el tiempo de la administración del agente (para tratar una enfermedad degenerativa) es tal que el agente ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células reguladoras que contra las células efectoras. Se prefiere claramente que el agente se administre a la vez cuando sea mayor la relación del efecto contra las células reguladoras con el efecto contra las células efectoras.

45

Como se utiliza aquí, "ciclo" o variaciones del mismo se refiere a una oscilación repetitiva de un indicador (número de célula, actividad de, marcador de enfermedad, marcador del sistema inmunitario etc.), en donde el indicador cambia periódicamente de un máximo a un mínimo.

50 Como se utiliza aquí, el término "analizar el ciclo de la célula efectora y/o el ciclo de la célula reguladora" se refiere a la determinación de las células definidas, marcadores y/o moléculas para ganar una apreciación de la etapa del ciclo en cualquier momento dado. Preferiblemente, el número de puntos de tiempo analizados, el periodo entre cada análisis, y la longitud del tiempo realizado es suficiente para determinar cuándo se debe administrar el agente.

La "muestra" se refiere a un material que se sospecha contiene las células reguladoras, células efectoras, marcadores del sistema inmunitario y/o una molécula asociada con la enfermedad. Se puede utilizar la muestra

55

como se obtiene directamente de la fuente o siguiendo por lo menos una etapa de purificación (parcial). La muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente que no interfiere con el método de la invención. Típicamente, la muestra es una solución acuosa o fluido biológico como se describe en más detalle adelante. La muestra se puede derivar de cualquier fuente, tal como un fluido fisiológico, que incluye sangre, suero, plasma, saliva, esputo, fluidos del lente ocular, hisopo bucal, sudor, heces, orina, leche, fluido de ascitis, moco, fluido sinovial, fluido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, fluido cerebroespinal, semen, moco cervical, secreciones vaginales o uretrales, fluido amniótico, y similares. Preferiblemente, la muestra es sangre o una fracción de la misma. El pretratamiento puede implicar, por ejemplo, preparar plasma de sangre, diluir fluidos viscosos, y similares. Los métodos de tratamiento pueden implicar filtración, destilación, separación, concentración, inactivación para interferir los componentes, y la adición de reactivos. La selección y el pretratamiento de las muestras biológicas antes se prueba se conoce bien en la técnica y no se necesita describir adicionalmente.

Para los propósitos de esta invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique lo contrario, incluye fragmentos de anticuerpos completos que retienen su actividad de unión para un analito objetivo. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como también anticuerpos de cadena sencilla (scFv). Adicionalmente, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo como se describe en la EP-A-239400.

Marcadores inflamatorios de fase aguda

Algunos marcadores inflamatorios de fase aguda aumentan inicialmente durante una respuesta inmunitaria (denominada aquí adelante como marcadores inflamatorios de fase aguda positivas) mientras que otros se reducen inicialmente durante una respuesta inmunitaria (denominado aquí adelante como marcadores inflamatorios de fase aguda negativos). Los marcadores inflamatorios de fase aguda también se denominan en la técnica como reactivos de fase aguda o proteínas de fase aguda. El destinatario experto será consciente de los muchos ensayos que se pueden utilizar para supervisar los marcadores inflamatorios de fase aguda.

Ejemplos de marcadores inflamatorios de fase aguda positivos incluyen, pero no se limitan a, proteína c reactiva, amiloide A en suero, componente amiloide P en suero, proteínas complemento tales como el inhibidor C2, C3, C4, C5, C9, B, C1 y la proteína de unión C4, fibrinógeno, factor von Willebrand, al-antitripsina, α1-antiquimiotripsina, α2-antiplasmina, cofactor II heparina, inhibidor activador de plasminógeno I, haptoglobina, hemopexina, ceruloplasmina, dismutasa de superóxido de manganeso, glicoproteína de ácido α1, hemo oxigenasa, proteína de unión mannososa, proteína I de leucocito, lipoproteína (a), proteína de unión a lipopolisacárido, y interleuquinas tales como IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 y receptores de los mismos.

Ejemplo de marcadores inflamatorios de fase aguda negativos incluyen, pero no se limitan a, albúmina, pre-albúmina, transferrina, apoAI, apoAII, glicoproteína α2 HS, inhibidor inter-α-tripsina, glicoproteína rica en histidina.

Se descubre el amiloide A en suero (SAA) como un componente de plasma que comparte la antigenicidad con el amiloide AA, el principal componente fibrilar en los depósitos amiloides reactivos AA. Se ha mostrado que el SAA es un reactivo de fase aguda cuyo nivel en sangre se eleva a 1000 veces o más como parte de las respuestas al cuerpo de diversas lesiones que incluyen trauma, infección e inflamación.

Se pueden determinar los niveles SAA como se conoce en la técnica, ver por ejemplo Weinstein et al (1984), Liuzzo et al (1994), O'Hara et al (2000), Kimura et al (2001) y O'Hanlon et al (2002).

La proteína c reactiva (CRP) es una proteína de respuesta de fase aguda positiva importante, y su concentración en suero puede aumentar tal como 1,000 veces durante la respuesta de fase aguda. El CRP es un pentámero que consiste de cinco subunidades idénticas, cada una tiene un peso molecular de aproximadamente 23,500.

Se pueden determinar los niveles de la proteína c reactiva utilizando técnicas conocidas en el arte, estas incluyen, pero no se limitan a, aquellas descritas en Senju et al (1983), Weinstein et al (1984), Price et al (1987), Liuzzo et al (1994), Eda et al (1998), Kimura et al (2001) y O'Hanlon et al (2002).

Las proteínas de complemento son un grupo de por lo menos 20 componentes inmunológicamente distintos. Estas circulan normalmente en la sangre en una forma inactiva. Estas son capaces de interactuar secuencialmente con los complejos de antígeno - anticuerpo, entre sí y con las membranas celulares en un complejo pero la forma adaptable para destruir virus y bacterias y patológicamente, aún las propias células anfitrionas. Los niveles de suero anormales de las proteínas complemento se pueden deber a enfermedades heredadas o enfermedades adquiridas. Por lo menos los niveles circulantes de C3 y C4 reflejan un balance entre el consumo de complemento debido a la formación de complejo inmune y síntesis aumentada debido a respuesta de fase aguda. Los métodos para medir los niveles de la proteína complemento se conocen bien en la técnica.

Los niveles de diferentes interleuquinas también se pueden determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tal como utilizar el equipo de ensayo de citoquina ProteoPlex™ (EMD Biosciences Inc., CA, USA).

Agentes

La presente descripción se relaciona ampliamente con el uso de tres tipos diferentes de agentes. Existen:

- 5 1) agentes que son específicos para células efectoras (tales como anticuerpos específicos CD8+) que se pueden utilizar para tratar una enfermedad caracterizada por la producción de células efectoras,
- 2) agentes que son específicos para las células reguladoras (tal como anticuerpos específicos CD4+) que se pueden utilizar para tratar una enfermedad degenerativa, y
- 10 3) agentes no selectivos que influyen las células efectoras y las células reguladoras, sin embargo, el tiempo de administración del agente indica el tipo de célula que se va a tratar.

Agentes para tratar una enfermedad caracterizados por la producción de células efectoras

El agente puede ser cualquier factor o tratamiento que resulta selectivamente o no selectivamente en la destrucción, limita la función de, o la inhibición de la producción, de células efectoras. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo específico CD8+ para dirigir específicamente las células T CD8+. Sin embargo, en algunos casos se puede utilizar un agente no selectivo, tal como un fármaco antiproliferativo, un fármaco anti-metabólico o radiación, cada uno de los cuales dirige la división de las células. En particular, con otros tipos de células, las células efectoras son particularmente vulnerables a la destrucción mediante fármacos anti-mitóticos (anti-proliferativos) o venenos fusiformes (por ejemplo vinblastina o paclitaxel) cuando se dividen y específicamente en mitosis.

El término "fármaco anti-proliferativo" y "fármaco anti-metabólico" es un término que se entiende bien en la técnica y se refiere a cualquier compuesto que destruye las células divididas o las inhibe de experimentar proliferación adicional. Los fármacos anti-proliferativos incluyen, pero no se limitan a, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucil, hexametilmelamina, tiotepa, busulfan, carmustina, lomustina, semustina, estrepto-zocina, dacarbazina, metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentoestatina, vinblastina, vinblastina anhidra, vincristina, etoposida, teniposida, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, cisplatina, mitoxantrona, hidroxiaurea, procarbazona, mitotano, aminoglutetimida, prednisona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroprogesterona, acetato de megestrol, dietilstilbestrol, etinil estradiol, tamoxifeno, propionato de testosterona, isótopos radioactivos, cadena de ricina A, taxol, toxina difteria, colchicina y exotoxina A pseudomonas.

Los agentes se administran usualmente en las formas de dosificación que están fácilmente disponibles al experto, y se administran en general en cantidades normalmente prescritas (como por ejemplo, las cantidades descritas en the Physician's Desk Reference, 55th Edition, 2001, o las cantidades descritas en la bibliografía de fabricación para el uso del agente).

En una realización, el agente se administra como una inyección de bolo único. En otra realización, el agente se administra mediante infusión. El periodo de infusión puede ser, por ejemplo, por lo menos 3 horas, por lo menos 12 horas o por lo menos 24 horas.

Otro ejemplo de un agente que se puede administrar en un método de la invención es dsARN. El dsARN se utiliza en interferencia de ARN (ARNi) que es un fenómeno en donde luego de la introducción en la célula, el mRNA homólogo al dsARN se degrada específicamente de tal manera que se suprime la síntesis de los productos de gen. Ejemplos de tal agente que provoca ARNi incluyen, pero no se limitan a, una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente 70% de homología a la secuencia de ácido nucleico de un gen objetivo o de una secuencia hibridable bajo condiciones exigentes, el ARN contiene una porción de hebra doble que tiene una longitud de por lo menos 10 nucleótidos o variantes de los mismos. Ejemplos de genes objetivo incluyen, pero no se limitan a, un gen requerido para replicación o supervivencia de una célula efectora.

Se puede utilizar dsARN que tiene una longitud de aproximadamente 20 bases (por ejemplo, representativamente aproximadamente 21 a 23 bases) o menos de aproximadamente 20 bases, lo que se llama siARN en la técnica. La expresión de siARN en células puede suprimir la expresión de un gen objetivo mediante el siARN. En otra realización, un agente capaz de provocar ARNi puede tener una estructura de horquilla que tiene una porción pegajosa en el terminal 3' (shARN; ARN horquilla corta). Como se utiliza aquí, el término "shARN" se refiere a una molécula de aproximadamente 20 o más pares de bases en los que un ARN de cadena sencilla contiene parcialmente una secuencia base palindrómica y forma una estructura de hebra doble allí (es decir, una estructura de horquilla). El shARN se puede sintetizar químicamente artificialmente. Alternativamente, se puede producir shARN mediante el ligado de hebras codificantes y anticodificantes de una secuencia de ADN en direcciones inversas y sintetizar el

- ARN in vitro con polimerasa de ARN T7 utilizando el ADN como una plantilla. La longitud de la porción de hebra doble no se limita particularmente, pero tiene preferiblemente aproximadamente 10 o más nucleótidos, y más preferiblemente aproximadamente 20 o más nucleótidos. El extremo que protruye 3' puede ser preferiblemente ADN, más preferiblemente ADN de por lo menos 2 nucleótidos de longitud, y aún más preferiblemente ADN de 2-4 nucleótidos de longitud.
- Un agente capaz de provocar ARNi útil para la invención se puede sintetizar artificialmente (químicamente o bioquímicamente) u ocurre en forma natural. No existe sustancialmente diferencia en términos del efecto de la presente invención. Un agente químicamente sintetizado se purifica preferiblemente mediante cromatografía líquida o similar.
- Un agente capaz de provocar ARNi utilizado en la presente invención también se puede producir in vitro. En este sistema de síntesis, la polimerasa de ARN T7, y el promotor T7 se puede utilizar para sintetizar los ARN codificante y anticodificante del ADN de plantilla. Estos ARN se hibridan y después de esto se introducen dentro de una célula.
- Se puede suministrar dsARN al paciente utilizar cualquier medio conocido en la técnica. Ejemplos de métodos para suministrar dsARN a un paciente se describen en, por ejemplo, US 20040180357, US 20040203024 y 20040192629.
- Agentes para tratar una enfermedad degenerativa
- Cuando se trata una enfermedad degenerativa, el agente puede ser cualquier factor o tratamiento que resulta selectivamente o no selectivamente en la destrucción, limita la función de, o la inhibición de la producción, de las células reguladoras. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo específico CD4+ para dirigir específicamente células T CD4+. Sin embargo, en algunos casos se puede utilizar un agente no selectivo, tal como un fármaco anti-proliferativo, un fármaco anti-metabólico o radiación, cada uno de los cuales dirige la división de las células. En particular, con otros tipos de células, las células efectoras son particularmente vulnerables a la destrucción por fármacos antimitóticos (anti-proliferativos) o venenos fusiformes (por ejemplo vinblastina o paclitaxel) cuando se divide y específicamente en mitosis.
- Aparte de la referencia los anticuerpos específicos CD8+, cada unión de los agentes mencionados anteriormente también es útil para tratar una enfermedad degenerativa. Con respecto a dsARN, la molécula dsARN puede ser específica para los mARN expresados solo en las células reguladoras.
- Estudios recientes han sugerido que las células T CD4+CD25+ cumplen una función importante en regular las células inmunes dirigidas contra los autoantígenos (Salomon et al., 2000; Suri-Payer y Cantor, 2001). Adicionalmente, se ha mostrado que las células T CD4+CD25+ objetivo mejoran la capacidad de un animal para controlar el crecimiento del tumor (Onizuka et al., 1999; Shimizu et al., 1999; Suttmuller et al., 2001). De acuerdo con lo anterior, las células T CD4+CD25+ pueden actuar como las células reguladoras como se utiliza aquí. La actividad de las células T CD4+CD25+ se puede regular por disminución mediante anti-GITR, anti-CD28 y/o anti-CTLA-4 (Read et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Shimizu et al., 2002). Así, estos anticuerpos pueden ser útiles como agentes para el uso en los métodos de la presente invención.
- Supervisión de Pacientes
- En la mayor parte de los casos, puede variar el punto de tiempo que el agente se administra necesitará ser determinado empíricamente en los sujetos en diferentes etapas de enfermedad como las cinéticas de la respuesta inmunitaria. Otros factores tal como la salud general del sujeto y/o la composición genética del sujeto también impactará cuando sea el tiempo apropiado para administrar el agente.
- Se pueden utilizar técnicas conocidas en el arte para supervisar el crecimiento de la población de células efectoras durante el "ciclo".
- Se pueden recolectar muestras seriales de sangre y se detectan cuantitativamente para subconjuntos de célula T (tal como CD4+ y/o CD8+) mediante análisis FACS.
- La supervisión puede necesitar ser muy frecuente, por ejemplo tan frecuente como cada pocas horas, para asegurar el punto de tiempo correcto que se selecciona para administración del agente. Preferiblemente, la supervisión se realiza por lo menos cada 48 horas. Más preferiblemente, la supervisión se realiza por lo menos cada 24 horas.
- Óptimamente, la supervisión se continúa para determinar el efecto del agente. La eliminación insuficiente, re-emergencia de las células efectoras o las células reguladoras (dependiendo del estado de la enfermedad que se va a tratar) significará que el método de la presente invención se debe repetir. Tales ciclos repetidos de tratamiento pueden generar memoria inmunológica. Por lo tanto es posible que la presente invención, utilizada en modo repetitivo, pueda proporcionar algún efecto protector profiláctico.

Vacunas

Las vacunas utilizadas en la presente invención resultarán inmunes contra la característica de una proteína (antígeno) de una enfermedad degenerativa. Tal vacuna comprenderá por lo menos un antígeno, o un polinucleótido que codifica dicho antígeno. La vacuna se puede proporcionar como cualquier forma conocida en la técnica tal como, pero no se limita a, una vacuna de ADN, ingestión de un organismo transgénico que expresa el antígeno, o composición que comprende el antígeno.

Como se utiliza aquí, un "antígeno" es cualquier secuencia de polipéptido que contiene un epítipo que es capaz de producir una respuesta inmunitaria contra la enfermedad.

Los antígenos que son capaces de elevar una respuesta inmunitaria contra una enfermedad degenerativa se conocen en la técnica. Ejemplos se describen en la WO 2005/072777 y Gelinas et al. (2004) para elevar una respuesta inmunitaria para tratar la enfermedad de Alzheimer, y WO 2005/034995 para elevar una respuesta inmunitaria para tratar enfermedades relacionadas con priones.

El antígeno se puede proporcionar en cualquier forma conocida en la técnica que conduce a una respuesta inmunitaria. Un antígeno puede ser, por ejemplo, natural, recombinante o sintético.

Se pueden preparar vacunas de uno o más antígenos. La preparación de vacunas que contienen un antígeno se conoce por un experto en la técnica. Típicamente, se preparan tales vacunas como inyectables, u orales, como soluciones o suspensiones líquidas; también se puede preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de inyección o consumo oral. La preparación también se puede emulsificar, o la proteína se encapsula en liposomas. El antígeno se muestra frecuentemente con portadores/excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los portadores/excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos.

Adicionalmente, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, agentes reguladores de pH, y/o adyuvantes que mejoran la efectividad de la vacuna.

Típicamente, las vacunas comprenden un adyuvante. Como se utiliza aquí, el término "adyuvante" significa una sustancia que no mejora específicamente la respuesta inmunitaria a un antígeno. Ejemplos de adyuvantes que pueden incluir efectivamente pero no se limitan a: N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado como nor-MDP), N-acetiluramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil- sn-glicero-3-hidroxfosforoloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominado como MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, lípido A monofosforilo, trehalosa dimicolato y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de 2% de escualeno/Tween 80. Ejemplos adicionales de adyuvantes incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio (alum), endotoxina bacteriana, lípido X, *Corynebacterium parvum* (*Propionobacterium acnes*), *Bordetella pertussis*, poliribonucleótidos, alginato de sodio, lanolina, lisolecitina, vitamina A, saponina, liposomas, levamisol, DEAE-dextrano, copolímeros de bloque u otros adyuvantes sintéticos. Tales adyuvantes están comercialmente disponibles de diversas fuentes, por ejemplo, Merck Adjuvant 65 (Merck y Company, Inc., Rahway, N.J.) o Adyuvante Completo y Adyuvante Incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

La proporción del antígeno y adyuvante puede variar sobre un amplio rango siempre que ambos estén presentes en cantidades efectivas. Por ejemplo, puede estar presente hidróxido de aluminio en una cantidad de aproximadamente 0.5% de la mezcla de vacuna (base Al_2O_3). Convenientemente, las vacunas se formulan para que contengan una concentración final del polipéptido antigénico en el rango de 0.2 a 200 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente 5 a 50 $\mu\text{g/ml}$, más preferiblemente 15 $\mu\text{g/ml}$.

Después de formulación, la vacuna se puede incorporar en un contenedor estéril que luego se sella y se almacena a baja temperatura, por ejemplo 4°C, o se puede secar por congelamiento. La liofilización permite almacenamiento a largo plazo en una forma establecida.

Las vacunas se administran convencionalmente parenteralmente, mediante inyección, por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, los ligadores y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de 0.5% a 10%, preferiblemente 1% a 2%. Las formulaciones orales incluyen tales excipientes empleados normalmente como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10% a 95% del ingrediente activo,

preferiblemente 25% a 70%. Cuando se liofiliza la composición de vacuna, el material liofilizado se puede reconstituir antes de administración, por ejemplo como una suspensión. La reconstitución se efectúa preferiblemente en el regulador.

5 Las cápsulas, comprimidos y píldoras para administración oral a un paciente se pueden proporcionar con un recubrimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa o hidroxipropilmetil celulosa.

10 La vacunación de ADN implica la introducción directa in vivo del ADN que codifica un antígeno en los tejidos de un sujeto para la expresión del antígeno mediante las células del tejido del sujeto. Tales vacunas se llaman aquí "vacunas de ADN" o "vacunas basadas en ácido nucleico". Las vacunas de ADN se describen en la US 5,939,400, US 6,110,898, WO 95/20660 y WO 93/19183, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

15 Hasta la fecha, la mayor parte de las vacunas de ADN en sistemas de mamífero en que se basan los promotores víricos derivados de citomegalovirus (CMV). Existe buena eficacia en la inoculación de músculo y piel en un número de especies de mamífero. Un factor conocido por afectar la respuesta inmunitaria provocada por la inmunización de ADN es el método de suministro de ADN, por ejemplo, las rutas parenterales pueden producir índices bajos de transferencia de gen y produce variabilidad considerable de expresión de gen. La inoculación a alta velocidad de los plásmidos, utilizando una pistola de genes, mejora las respuestas inmunitarias de los ratones, presumiblemente debido a la mayor eficiencia de la transfección de ADN y la presentación de antígenos más efectivos mediante células dendríticas. Los vectores que contienen la vacuna basada en ácido nucleico utilizado en la invención también se puede introducir en el anfitrión deseado mediante otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, dextrano DEAE, precipitación de fosfato de calcio, lipofección (fusión de lisosoma), o un transportador del vector de ADN.

25 Las plantas transgénicas que producen un polipéptido antigénico se pueden construir utilizando los procedimientos bien conocidos en la técnica. Un número de vacunas comestibles derivadas de planta se desarrollan actualmente para los patógenos de animal y humano. Las respuestas inmunitarias también han resultado de la inmunización oral con plantas transgénicas que producen partículas similares a virus (VLP), o virus de planta quiméricos que exhiben epítopos antigénicos. Se ha sugerido que la forma es partículas de estos VLP o virus quiméricos puede resultar en mayor estabilidad del antígeno en el estómago, que aumenta efectivamente la cantidad del antígeno disponible para retoma en el intestino.

30 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se proporcionan adelante ejemplos de ensayos típicos utilizados para supervisar algún marcador inflamatorio de fase aguda.

Proteína C reactiva

35 Se mide la proteína c reactiva utilizando un Analizador de la Química RxL de Dimensión DADE Behring, con reactivos y calibradores suministrados por Dade Behring Diagnostics (Sydney, Australia) (reactivo Cat No. DF-34; calibradores Cat. No. DC-34).

40 El método CRP es con base en una técnica de inmunoensayo turbidimétrico mejorado de partícula. Las partículas de látex cubiertas con el anticuerpo para la proteína c reactiva agregada en la presencia de Proteína c reactiva en la muestra. El aumento en la turbidez que acompaña la agregación es proporcional a la concentración de la proteína c reactiva.

ES 2 383 103 T3

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO			PRECISIÓN INTRA-ENSAYO		
MEDIA	CV	N	MEDIA	CV	N
			mg/L		
3.4	4.3%	20	4.6	5.6%	64
57.5	2.3%	20	37.0	3.0%	64
225.8	2.0%	20			

RANGO DE REFERENCIA: 0-5 mg/L

RANGO ANALÍTICO: 0.5 - 500 mg/L

Receptor de Interleuquina 2 (IL2R)

5 El receptor de la interleuquina de citoquina 2 (IL2R) se mide por un Inmunoensayo de Enzima quimioluminiscente automático comercial (EIA) utilizando un Analizador Immulite de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA, USA).

Este es un inmunoensayo competitivo utilizando Fosfatasa Alcalina marcado IL2R como traza y adamantil dioxetano como sustrato luminiscente para la enzima ALP.

Todos los reactivos y calibradores se suministran en forma de equipo por DPC - Cat No. LKIPZ.

10 Desempeño analítico:

	MEDIA	DE	CV %
NIVEL 1	213 U/mL	13	6.1
NIVEL 2	752 U/mL	49	6.5
NIVEL 3	2463 U/mL	189	7.7

RANGO ANALÍTICO: 5-7,500 U/ml

RANGO de REFERENCIA: 223-710 U/mL*

*Estudio realizado en 87 adultos aparentemente saludables.

Interleuquina 6

La interleuquina de citoquina 6 se mide por un Inmuno Ensayo de Enzima quimioluminiscente automático comercial (EIA) utilizando un Analizador Immulite de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA, USA).

15 Este es un inmunoensayo competitivo utilizando IL-6 marcado con Fosfatasa Alcalina como indicador y adamantil dioxetano como sustrato luminiscente para la enzima ALP.

Todos los reactivos y calibradores se suministran en forma de equipo por DPC - Cat No. LK6PZ.

Desempeño Analítico:

ES 2 383 103 T3

	MEDIA	DE	CV %
NIVEL 1	88 U/mL	4.5	5.1
NIVEL 2	230 U/mL	12.2	5.3
NIVEL 3	638 U/mL	46.6	7.3

RANGO ANALÍTICO: 2-1000 pg/ml

RANGO de REFERENCIA: < 4.1 pg/mL*

*Estudio realizado en 60 voluntarios de laboratorio aparentemente saludables.

Interleuquina 10

La interleuquina citoquina 10 se mide mediante un Inmunoensayo de Enzima quimioluminiscente automático comercial (EIA) utilizando un Analizador Immulite de Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, Ca USA.

5 Este es un inmunoensayo competitivo utilizando IL-10 marcado con Fosfatasa Alcalina.

Como indicador y adamantil dioxetano como sustrato luminiscente para la enzima ALP.

Todos los reactivos y calibradores se suministran en forma de equipo por DPC - Cat No. LKXPZ.

Desempeño analítico:

	MEDIA	DE	CV %
NIVEL 1	18.2 pg/mL	1.8	9.9
NIVEL 2	46.0 pg/mL	2.2	4.8
NIVEL 3	177 pg/mL	8.0	4.5

RANGO ANALÍTICO: 5-1000 pg/ml

RANGO de REFERENCIA: < 9.1 pg/mL*

*Estudio realizado en 55 adultos aparentemente saludables.

10 Amiloide A en suero

Las partículas de poliestireno cubiertas con anticuerpos al SAA humano se aglutinan cuando se mezcla con muestras que contienen SAA. La intensidad de luz dispersa en el nefelómetro depende de la concentración del analito en la muestra y posteriormente su concentración se puede determinar mediante comparación con diluciones de un estándar de concentración conocida.

15

IMPRECISIÓN:	CV 4.7% @ 192 mg/L	N=404
	CV 2.8% @ 7.0 mg/L	N=40

RANGO DE REFERENCIA: En una población con niveles CRP de suero normal (percentil 95 = 5.0 mg/L N=483) el percentil 95 para N Latex SAA se encuentra que es 6.4 mg/L

RANGO ANALÍTICO: 3.0 - 200 mg/L

Complemento C3

5 El método automático utilizado para medir la concentración de complemento C3 en muestras de suero mediante análisis nefelométrico utilizando un analizador Dade Behring ProSpect con reactivos y calibradores suministrados por Dade Behring Diagnostics (Sydney, Australia).

10 La solución de antígeno soluble (muestra) y anticuerpos específicos (antisuero Cat No. OSAP15) se mezclan en las cubetas de reacción. Los complejos de anticuerpo-antígeno insolubles se forman inmediatamente, que produce turbidez en la mezcla y aumenta la cantidad de luz dispersa mediante la solución. Siguiendo un periodo de incubación la absorbancia de la solución se mide en la longitud de onda analítica.

IMPRECISIÓN:	CV 5.5% @ 1.05 mg/L	N=61
	CV 3.2% @ 2.70 mg/L	N=61

RANGO DE REFERENCIA: 0.81-1.85 g/L

RANGO ANALÍTICO: 0.10- 3.50 g/L

Complemento C4

15 El método automático utilizado para medir la concentración de complemento C4 en muestras de suero mediante análisis nefelométrico utilizando un analizador Dade Behring ProSpect con reactivos y calibradores suministrados por Dade Behring Diagnostics (Sydney, Australia).

La solución de antígeno soluble (muestra) y anticuerpos específicos (antisuero Cat No. OSAO 15) se mezclan en las cubetas de reacción. El antígeno insoluble – complejos de anticuerpo se forman inmediatamente, produciendo turbidez en la mezcla y aumentando la cantidad de luz dispersa mediante la solución. Luego de un periodo de incubación la absorbancia de la solución se mide en la longitud de onda analítica.

IMPRECISIÓN:	CV 4.7% @ 0.20 g/L	N=61
	CV 3.8% @ 0.53 mg/L	N=61

RANGO DE REFERENCIA: 0.10-0.40 g/L

RANGO ANALÍTICO: 0.03- 1.50 g/L

20 Ejemplo 2

25 Como es consciente el experto, existen similitudes entre una enfermedad autoinmunitaria y cáncer. Más específicamente, una enfermedad autoinmunitaria se caracteriza por una respuesta inmunitaria contra los autoantígenos. En una forma similar, el sistema inmunitario de un paciente con cáncer reconoce la sobreexpresión de los antígenos (antígenos de cáncer) mediante células cancerosas y eleva una respuesta inmunitaria contra estas células. Sin embargo, por lo menos en algunas circunstancias, la respuesta inmunitaria a las células de cáncer no controla efectivamente el cáncer que resulta en la persistencia de la enfermedad. Así, el ciclo del sistema inmunitario

en pacientes con cáncer es un modelo adecuado para mostrar el ciclo similar en sujetos con una enfermedad autoinmunitaria.

El paciente es una mujer de 71 años de edad designada aquí como "Sra FO". Previamente la Sra FO fue diagnosticada con cáncer de ovario, quien recibió cirugía y diversas series de quimioterapia estándar. El paciente representado con CA125 elevado a 200 µg/ml antes de supervisión.

El paciente se monitorea (mezcla) cada lunes, miércoles y viernes durante 4 semanas. Una oscilación regular y cuasi sincrónica bien descrita y con una periodicidad de 7 /14 días muestra una correlación cercana entre mediciones de suero CRP, SAA & IL-2 (ver Figuras 1 y 2). De forma más interesante, la Figura 3 que muestra CRP & CA125 versus tiempo, las oscilaciones CRP y CA125 están fuera de fase, lo que indica una relación inversa entre el sistema inmunitario y el marcador de cáncer.

La Figura 4 muestra la relación durante el tiempo entre SAA y factor de complemento C3. Observe que los dos picos C3 principales son aproximadamente 14 días aparte y coincide con los picos alternantes SAA que también son de aproximadamente 14 días aparte.

Ejemplos adicionales del ciclo del sistema inmunitario en pacientes con cáncer se describen en la WO 2005/040816.

15 **Ejemplo 3**

Se realiza una búsqueda para un donante adecuado para un paciente con glomerulonefritis crónica que requiere un aloinjerto renal cadavérico. El aloinjerto se realiza utilizando procedimientos quirúrgicos estándar. Luego de la terminación del aloinjerto el paciente se supervisan los niveles amiloides A en suero (SAA). Cuando los niveles SAA empiezan a aumentar, esto indica que una respuesta inmunitaria se monta contra el injerto caracterizado por la producción de células efectoras contra el injerto (también denominado en la técnica como rechazo).

Un ejemplo de los niveles de proteína SAA y c-reactiva (CRP) seguido por aloinjerto renal cadavérico se describe por Maury y Teppo (1984). Como se puede ver en la Figura 4 de Maury y Teppo (1984), existe un periodo de aproximadamente 15 días entre los niveles pico de CRP y SAA ligado a episodios de rechazo luego de trasplante lo que indica que las células efectoras tienen ciclo en el paciente estudiado.

La vinblastina se administra en una dosis estándar tal como 3-4 mg/m² intravenosamente (Casciato and Lowitz, 1995) como niveles SAA que se empiezan a elevar. En este caso, la vinblastina controlará las células que se dividen, tal como las células efectoras, que alivian el episodio de rechazo.

30 **Ejemplo 4**

Se supervisan los niveles de SAA en un paciente con artritis crónica juvenil. Luego del establecimiento de un ciclo claro en niveles de SAA se administra vincristina, utilizando una dosificación estándar, cuando se empiezan a elevar los niveles SAA. En este caso, la vincristina dirigirá las células divididas, tal como las células efectoras en este punto en el ciclo inmunitario, aliviando los síntomas de la enfermedad.

Elliott et al. (1997) describe un ejemplo de ciclos de niveles de proteína SAA en un paciente con artritis crónica juvenil. Como se puede ver de la Figura 2 de Elliott et al. (1997), existe un periodo de aproximadamente 14 días entre los niveles pico de SAA. Si se realiza una supervisión más frecuentemente también se considera que el ciclo similar sería más claro para los niveles CRP.

35 **Ejemplo 5**

Se supervisan los niveles de proteína c reactiva en un paciente con enfermedad de Alzheimer. Luego del establecimiento en un ciclo claro en los niveles de proteína c reactiva se administra vincristina, utilizando una dosificación estándar, cuando la proteína c reactiva ha aumentado. En este caso, la vincristina controlará las células divididas, tal como las células reguladoras en este punto en el ciclo inmunitario, aliviando los síntomas de la enfermedad.

Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional No. 2004905118 presentada el 8 de septiembre 2004.

REFERENCIAS

- Annunziato, F. et al. (2002) *J. Exp. Med.* 193:1285-1294.
- Babbe, H. et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192:393-404.
- Bottazzo, G.F. et al. (1985) *New Engl. J. Med.* 313:353-360.
- Bretz, J.D. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:25433-25438.
- 5 Casciato, D.A. and Lowitz, B.B. (1995) *Manual of Clinical Oncology*. Third Edition. Little Brown and Company, Boston.
- Eda, S., et al. (1998) *J. Clin. Lab. Analysis* 12:137-144.
- Elliot, M. J. et al. (1997) *Br. J. Rheumatol.* 36:589-593.
- Fu, S. et al. (2004) *Am. J. Transplant.* 4:65-78.
- 10 Gelinas, D.S. et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 101:14657-14662.
- Goverman, J. (1999) *Immunol. Rev.* 169:147-159.
- Hill, G.R. et al. (1997) *Blood* 90:3204-3213.
- Jonuleit, H. et al. (2001) *J. Exp. Med.* 193:1285-1294.
- Kimura, M., et al. (2001) *Cancer* 92:2072-2075.
- 15 Kohm, A.P. et al. (2002) *J. Immunol.* 169:4712-4716.
- Liuzzo, G., et al. (1994) *New Engl. J. Med.* 331:417-424:
- Maury, C.P.J. and Teppo, A.M. (1984) *Clin. Nephrol.* 22:284-292.
- Monsonogo, A. and Weiner, H.L. (2003) *Science* 302:834-838.
- 20 Morgan, M.E. et al. (2003) *Arthritis Rheum.* 48:1452-1460.
- Murphy, W.J. and Blazar, B.R (1999) *Curr. Opin. Immunol.* (1999) 11:509-515.
- O'Hanlon, D.M., et al. (2002) *Anticancer Res.* 22:1289-1294.
- O'Hara, R., et al. (2000) *Arthritis Res.* 2:142-144.
- Onizuka, S., et al. (1999) *Cancer Res.* 59:3128-3133.
- 25 Price, C.P., et al. (1987) *J. Immunol. Methods* 99:205-211.
- Read, S, et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192:295-302.
- Salomon, B. et al. (2000) *Immunity* 12:431-440.
- Santamaria, P. (2001) *Curr. Opin. Immunol.* 13:663-669.
- Senju, O., et al. (1983) *Jap. J. Clin. Lab. Automation* 8:161-165.
- 30 Shimizu, J., et al. (1999) *J. Immunol.* 163:5211-5218.
- Shimizu, J., et al. (2002) *Nature Immunol.* 3:135-142.

Speiser, D.E. et al. (1997) *J. Immunol.* 158:5185-5190.

Suri-Payer, E. and Cantor, H. (2001) *J. Autoimmunity* 16:115-123.

Sutmuller, R. P., et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:823-832.

Takahashi, T., et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192:303-310.

5 Verma, S. (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:1191-1202.

von Herrath, M.G. and Harrison, L.C. (2003) *Nature Rev.* 3:223-232.

Weinstein, P.S. et al. (1984) *Scand. J. Immunol.* 19:193-198.

Wong, F. et al. (1999) *Nat. Med.* 9:1026-1031.

Wu, A.J. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 99:12287-12292.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar el ciclo del sistema inmunitario para determinar cuándo se debe administrar un agente a un paciente que sufre de una enfermedad caracterizado por la producción de células T efectoras o una enfermedad degenerativa, el método comprende supervisar el paciente, o las muestras obtenidas del mismo, para fluctuaciones en por lo menos uno de:
- 5 a) cifras de células T efectoras y/o actividad,
- b) cifras de células T reguladoras y/o actividad,
- c) una molécula marcadora asociada con la enfermedad, y/o
- d) un marcador del sistema inmunitario;
- 10 en donde si la enfermedad se caracteriza por la producción de células T efectoras:
- (i) la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria o rechazo de trasplante;
- (ii) el agente inhibe la producción, limita la función de y/o actividad de las células T efectoras y se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, fármacos anti-metabólicos, radiación, dsARN y anticuerpos; y
- 15 (iii) el tiempo de cuando el agente se debe administrar es cuando, o justo antes, las células T efectoras se expanden clónicamente de tal manera que no ocurre expansión de célula T efectora, y/o los números de célula T efectora se reducen o eliminan;
- y en donde si la enfermedad es una enfermedad degenerativa:
- (i) la enfermedad es una afección que resulta en la pérdida de células, y es enfermedad de Alzheimer o una enfermedad relacionada con priones; y
- 20 (ii) el agente:
- (a) inhibe la producción, limita la función de y/o actividad de células T reguladoras y se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, fármacos anti-metabólicos, radiación, dsARN, y anticuerpos; y el tiempo de cuando el agente se debe administrar es tal que el agente ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T efectoras; o
- 25 (b) es una vacuna; y el tiempo de cuando la vacuna se debe administrar es tal que la vacuna refuerza la respuesta inmunitaria innata, que produce aumento en las cifras y/o actividad de células T efectoras, antes de la emergencia de células T reguladoras.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el marcador del sistema inmunitario es un marcador inflamatorio de fase aguda.
- 30 3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el paciente sufre de una enfermedad caracterizada por la producción de células T efectoras, y en donde el agente se administra entre cuando los niveles de un marcador inflamatorio de fase aguda ha alcanzado su punto más bajo y antes que el marcador alcance el siguiente ciclo.
- 35 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células T efectoras son células T CD8+CD4.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células T reguladoras son células T CD4+CD8.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el paciente se supervisa durante un periodo de por lo menos 7 días.
- 40 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el paciente se supervisa por lo menos aproximadamente cada 3 días.

8. Uso de un agente que inhibe la producción, limita la función de y/o actividad de células T efectoras en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la producción de células T efectoras, el tratamiento comprende:

- 5 i) analizar el ciclo del sistema inmunitario al supervisar un paciente que sufre de la enfermedad para fluctuaciones en por lo menos uno de:
- a) número y/o actividad de células T reguladoras,
 - b) número y/o actividad de células T efectoras,
 - c) una molécula marcadora asociada con la enfermedad, y/o
 - d) un marcador del sistema inmunitario, y
- 10 ii) exponer el paciente a un agente para tratar la enfermedad, en donde:
- (a) la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria o rechazo de trasplante;
 - (b) el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, fármacos anti-metabólicos, radiación, dsARN y anticuerpos; y
 - (c) el agente se administra cuando, o justo antes, las células T efectoras se expandan clónicamente de tal manera que no ocurra expansión de células T efectoras, y/o se reduzca o eliminen la cantidad de células T efectoras.
- 15

9. Uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad degenerativa, el tratamiento comprende:

- i) analizar el ciclo del sistema inmunitario al supervisar un paciente que sufre de la enfermedad para fluctuaciones en por lo menos uno de:
- 20 a) número y/o actividad de células T reguladoras,
- b) número y/o actividad de células T efectoras,
- c) una molécula marcadora asociada con la enfermedad, y/o
- d) un marcador del sistema inmunitario, y
- ii) exponer el paciente a un agente para tratar la enfermedad, en donde:
- 25 (a) la enfermedad es una afección que resulta en la pérdida de células y es enfermedad de Alzheimer o una enfermedad relacionada con priones; y
- (b) el agente:
- (i) inhibe la producción, limita la función de y/o actividad de células T reguladoras y se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, fármacos anti-metabólicos, radiación, dsARN y anticuerpos; y el tiempo de administración del agente es tal que el agente ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T efectoras; o
- 30 (ii) es una vacuna; y el tiempo de administración de la vacuna es tal que la vacuna refuerza la respuesta inmunitaria innata, que produce números aumentados y/o actividad de células T efectoras, antes de la emergencia de células T reguladoras.

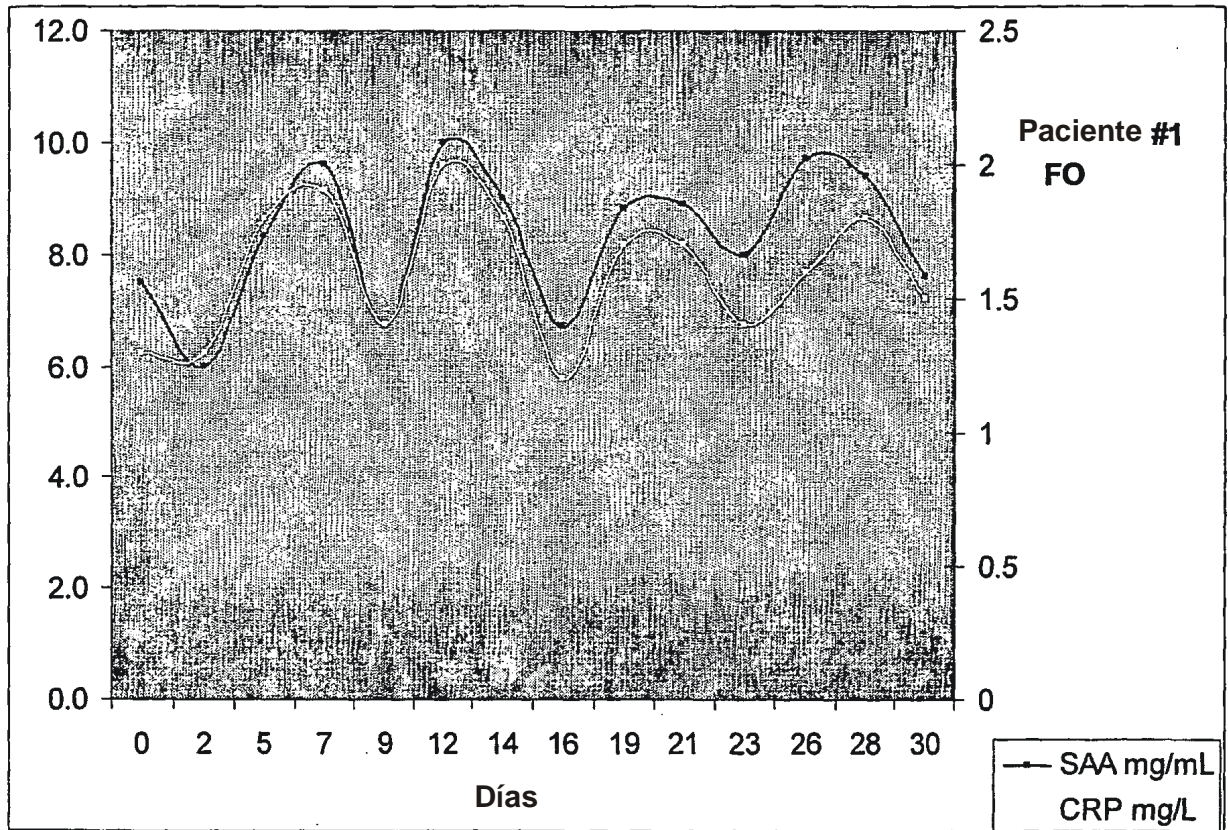


Figura 1

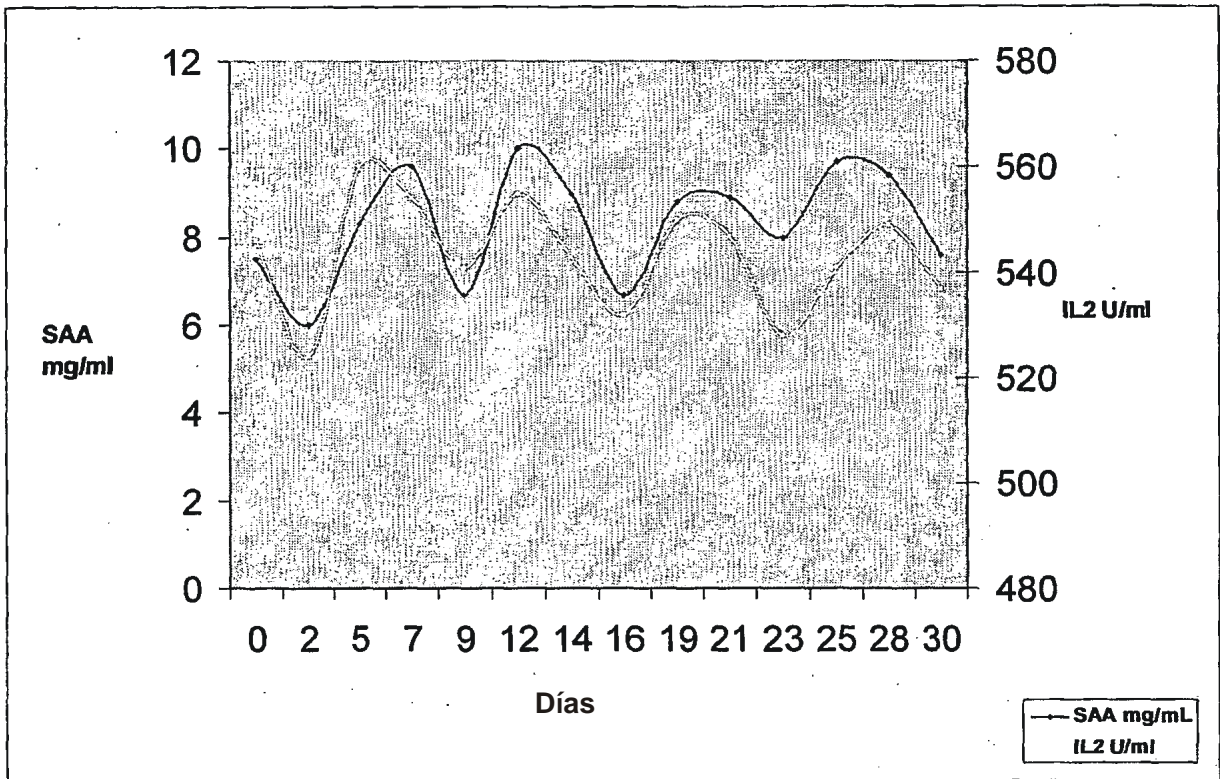


Figura 2

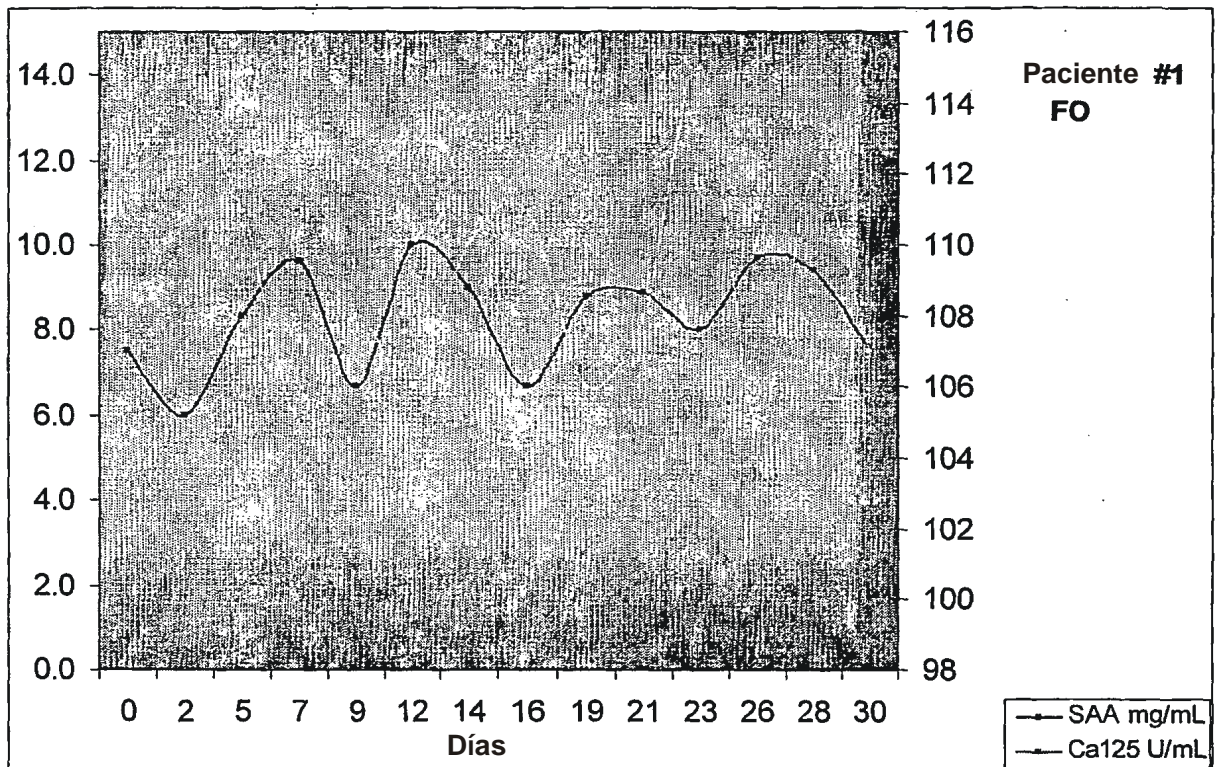


Figura 3

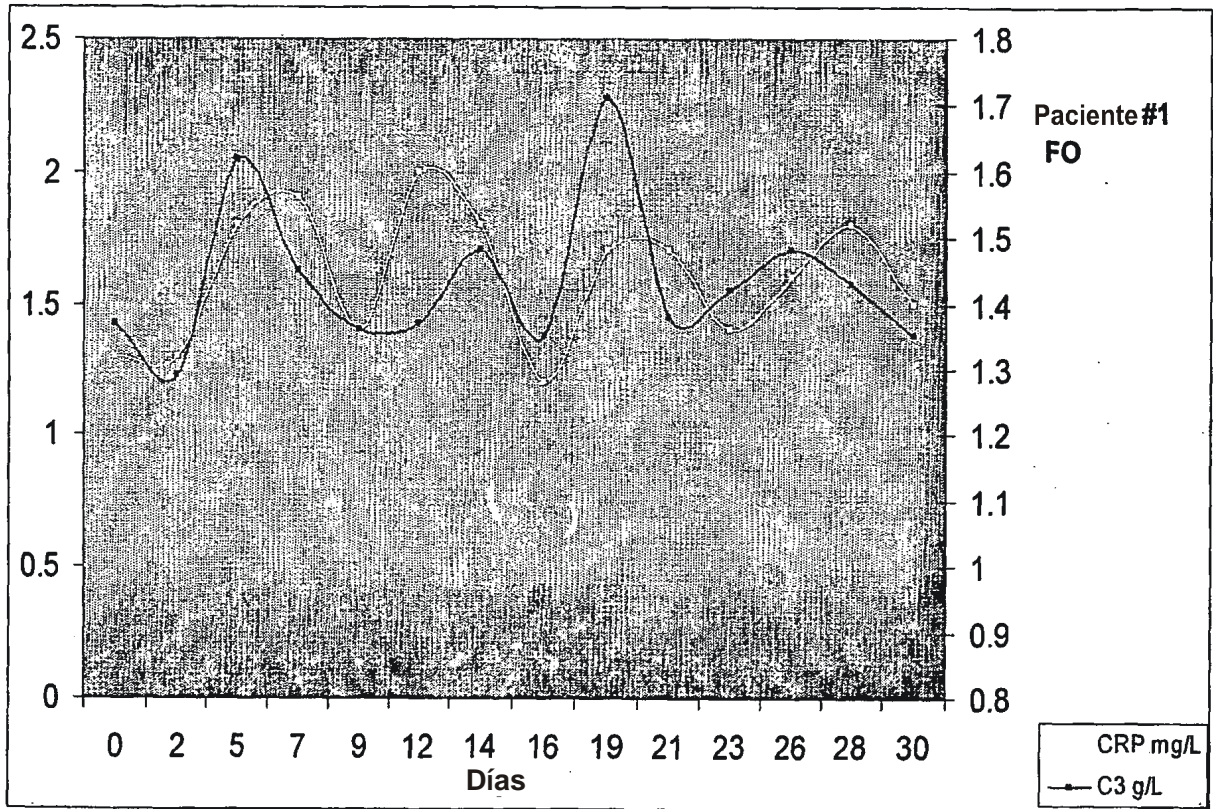


Figura 4