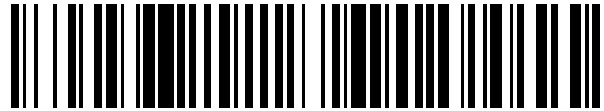


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 681**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2003 E 03726601 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1507555**

54 Título: **Inducción de tolerancia inmunológica específica de antígeno**

30 Prioridad:

06.05.2002 US 141668

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

23.04.2013

73 Titular/es:

**LOS ANGELES BIOMEDICAL RESEARCH
INSTITUTE AT HARBOR-UCLA MEDICAL
CENTER (100.0%)
1124 West Carson Street
Torrance, CA 90502 , US**

72 Inventor/es:

**KAKKIS, EMIL, D. ;
PASSAGE, MERRY ;
LESTER, THOMAS ;
YANG, REBECCA y
TANAKA, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 401 681 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

Inducción de tolerancia inmunológica específica de antígeno

5 **Campo de la invención**

La siguiente solicitud está dirigida a métodos y composiciones para inducir tolerancia inmunológica en un mamífero. Los métodos comprenden la administración de un tolerógeno de absorción rápida en combinación con agentes inmunosupresores en un régimen de tolerización.

10

Antecedentes de la invención

La tolerancia inmunológica es altamente relevante en un amplio rango de aplicaciones clínicamente importantes. La inducción de tolerancia específica de antígeno es un objetivo principal para el tratamiento o prevención de la enfermedad autoinmune y el rechazo de tejido, que a menudo se controlan mediante terapias inmunosupresoras no específicas que resultan en tasas incrementadas de infecciones, cánceres y patologías relacionadas con fármacos. Otras aplicaciones de inducción de tolerancia inmunológica incluyen alergias y asma, sustitución de la médula ósea y terapias basadas en proteína.

15

20

Una de las primeras aplicaciones prácticas de biología molecular ha sido la habilidad de producir grandes cantidades de agentes biológicos escasos, muchos de los cuales tienen actividad terapéutica. Se ha descubierto, sin embargo, que durante la administración de estos agentes, un paciente puede organizar una respuesta inmunológica, llevando a la producción de anticuerpos que unen e interfieren con la actividad terapéutica así como causan reacciones inmunológicas crónicas o agudas. Este problema es más significativo para terapias que son proteínas porque las proteínas son antígenos complejos y en muchos casos, el paciente es inmunológicamente inexperto a los antígenos.

25

Este tipo de respuesta inmunológica se ha descubierto en al menos algunos pacientes con trastornos por deficiencia tales como la hemofilia A (Aledort (1994) *Am. J. Hemat.* 47:208-217), la diabetes mellitus (Gossain *et al.* (1985) *Ann. Allergy* 55:116-118), la deficiencia de deanimasa de adenosina (Chaffee *et al.* (1993) *J. Clin. Inv.* 89:1643-1651), la enfermedad de Gaucher (Richards *et al.* (1993) *Blood* 82:1402-1409), y la enfermedad de Pompe (Amalfitano (2001) *Genet Med* 3:132-138). En la hemofilia A, los anticuerpos pueden inhibir la función de factor VIII que requieren tratamiento alternativo con concentrados de complejo de protrombina activados. En la deficiencia de deanimasa de adenosina, los anticuerpos en deanimasa de adenosina modificada de PEG aumentan la liquidación de la encima y reducen su eficacia. En la enfermedad de Gaucher, la inducción de anticuerpos IgG1 ha sido asociada con reacciones anafilactoides debido a la activación de complemento durante las infusiones. En la enfermedad de Pompe, la terapia de remplazo con alfa-glucosidasa recombinante resultó en la inducción de anticuerpos en dos de tres pacientes tratados, que resultó en eficacia en declive de la terapia.

30

35

Se han descubierto respuestas inmunológicas similares en el reparto de terapias de proteína mediante terapia de genes. Por ejemplo, las proteínas virales asociadas con vectores son objetivos de una respuesta inmunológica que puede causar inflamación, expresión reducida y evitar la administración repetida de vector (Wilson y Kay (1995) *Nature Med.* 1:887-889). Las respuestas de anticuerpos a la proteína terapéutica también han sido observadas en experimentos de terapia de genes y son parte de una respuesta inmunológica general que evita expresiones a largo plazo (Shull *et al.* (1996) *Blood* 88:377-379). Inmunosupresión generalizada, bloqueo y desviación inmunológica desde respuestas humorales a celulares han sido utilizadas para abordar este problema, pero no es probable asegurar tolerancia de larga duración al antígeno.

40

45

La tolerancia puede ser definida como la ausencia de una respuesta inmunológica a un antígeno específico en la configuración de un sistema inmunológico de otro modo normal. Este estado de tolerancia inmunológica específica a autocomponentes incluye tanto mecanismos centrales como periféricos. La tolerancia central (selección negativa) es una consecuencia de células T inmaduras que reciben señales intracelulares fuertes mientras todavía residen en el timo, resultando en la reducción clonal de células autoreactivas. La tolerancia periférica ocurre cuando el sistema inmunológico se vuelve no reactivo a un antígeno presentado en la periferia, donde, en contraste con el timo, se asume que las células T son funcionalmente maduras. Se ha propuesto que la tolerancia periférica sea el resultado de varios mecanismos, incluido el desarrollo de células supresoras específicas de antígenos u otros medios de tolerancia activa, reducción clonal, y anergia. Las células autoreactivas pueden ser físicamente borradas por la inducción de apoptosis después del reconocimiento de antígeno tolerizante, puede volverse anérgico sin reducción, o puede ser inhibido funcionalmente por citosinas o células reguladoras. Aunque se ha descubierto mucho en años recientes, todavía es difícil predecir los resultados de exposición antigénica *in vivo*, y se necesita elucidación adicional de los mecanismos de tolerancia a nivel básico.

50

55

60

Han sido desarrolladas numerosas estrategias para inducir tolerancia específica de antígeno en modelos de animal, por ejemplo con respecto a los desórdenes autoinmunes, tales como esclerosis múltiple (o encefalitis alérgica experimental, EAE) o diabetes, así como para evitar el rechazo de trasplantes de tejido alogénico. Los principales métodos desarrollados en modelos de ratón y rata incluyen la administración de altas dosis de antígeno soluble, ingestión oral de antígenos o inyección intratímica. La eficacia de estos modelos depende de grados variados de

65

reducción clonal, anergia clonal, supresión activa mediante células T específicas de antígeno y desviación inmunológica desde respuestas inmunológicas celulares a humorales.

5 Aunque la administración de grandes cantidades de antígenos solubles se conoce desde hace tiempo para inducir no sensibilidad al estímulo inmunológico subsiguiente, los estudios de EAE también han resaltado las dificultades en este enfoque. Las altas dosis requeridas y la inconsistencia de la tolerancia contra la desviación inmunológica hacen la administración de antígeno soluble sola impracticable para la mayoría de las situaciones de terapia de genes.

10 La administración de muy altas dosis de antígeno oralmente a ratones también se ha demostrado que induce tolerancia a antígenos de proteína. Sin embargo, se requieren dosis extraordinarias, y los resultados son complejos. Se encuentra que ciertas dosis resultan en anergia, mientras que otras dosis inducen una forma de supresión presencial específica de antígeno, caracterizada por respuestas de tipo TH2 específico de antígeno. Adicionalmente, el antígeno oral puede sensibilizar el sistema inmunológico y llevar a una enfermedad más grave.

15 La inyección intratímica de antígenos o células ha sido ampliamente explorada como una técnica para inducir tolerancia inmunológica central. Los antígenos inyectados y presentados dentro del timo pueden causar apoptosis o anergia de las células T CD4⁺, CD8⁺ en un proceso que puede llevar diez días. Como la tolerancia de antígeno soluble u oral, el efecto de tolerización depende de la dosis: bajas dosis de antígeno son sensibilizadoras o proporcionan solo protección parcial, mientras que las dosis más altas de antígeno son tolerizantes. El contexto de presentación de antígeno dentro del timo es también importante. La tolerancia es inducida más eficientemente cuando los antígenos se presentan mediante células que presenten antígenos de huésped (APC). Una vez tolerizado, la presencia continuada de antígeno dentro del animal se necesita para el mantenimiento de tolerancia, y también puede requerirse la reducción de células T maduras.

25 Una estrategia para la inducción de tolerancia se basa en el descubrimiento de que la activación de la célula T óptima requiere tanto señales específicas de antígeno como señales específicas de no antígeno. Durante la presentación de antígeno, una variedad de interacciones parecidas bidireccionales importantes tienen lugar, con señales tanto en la célula T como la célula que presenta antígeno. La mejor señal coestimuladora entendida es proporcionada por la molécula CD28 de superficie de célula T. La CD28 tiene dos ligandos, las moléculas homólogas CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2); ambas se expresan en APC activado y otros tipos de célula. Otro camino que ha recibido atención significativa y es importante en coestimulación de célula T es el mediado por CD40 y su ligando CD154. CD154 se expresa en células T activadas, principalmente células T CD4⁺.

35 Durante los últimos años, una variedad de laboratorios ha mostrado que el bloqueo de las señales coestimuladora de célula T puede mejorar las tasas de supervivencia de aloinjerto a largo plazo e inducir la tolerancia de trasplante. La mayoría de estos estudios han usado CTLA4Ig, una proteína de fusión de CTLA-4 e Ig humano que une competitivamente CD80 y CD86, o un anticuerpo monoclonal de bloqueo a CD154. El bloqueo coestimulador ha sido parcialmente exitoso en modelos de ratón y rata de trasplantes cardíaco, hepático, islote, renal, pulmonar y de médula ósea. Aunque un único agente solo tal como el anticuerpo CTLA4Ig o anti-CD154 puede mejorar las tasas de supervivencia de tejido a largo plazo, estos agentes por ellos mismos es improbable que den como resultado la supervivencia de tejido indefinida; la pérdida de aloinjerto reciente como resultado del rechazo crónico es la norma. Más comúnmente, tanto una transfusión de linfocitos de donante específico como la combinación de CTLA4Ig y anti-CD154 se requiere para la supervivencia a largo plazo, con o sin tolerancia. Adicionalmente, los resultados en primates no humanos no son tan buenos como los de modelos roedores.

45 En modelos de murino en los que el anticuerpo CTLA4Ig y/o anti-CD40 ha sido usado para inducir tolerancia, se ha mostrado que la administración concomitante de ciclosporina evita la inducción de tolerancia. Parece que la inducción de tolerancia en células T carentes de señales coestimuladoras es un proceso activo que incluye acontecimientos de señalización TCR que son sensibles a la ciclosporina. Por lo tanto, en presencia de la ciclosporina, la tolerancia no puede lograrse por estos medios. Estas referencias por lo tanto desaconseja el uso de ciclosporina en regímenes de inducción de tolerancia.

55 En un protocolo en el que la combinación de CTLA4Ig dado dos días después del trasplante y los linfocitos de donante específico se usa para inducir tolerancia de aloinjerto cardíaca en ratones, el bloqueo de CTLA-4 en el momento del trasplante evita la inducción de tolerancia y lleva a un rechazo temprano. Por lo tanto, las señales CTLA-4 tempranas pueden ser permisivas para algunas estrategias inhibitorias/tolerogénicas de célula T; sin estas señales, puede ser difícil apagar la respuesta inmunológica. Similarmente, en modelos de murino de enfermedad autoinmune, el bloque de CTLA-4 exacerba la duración y severidad de la enfermedad. Porque agentes tales como CTLA4Ig evitan que CD80 y CD86 se unan tanto a CD28 como a CTLA-4, ambos tienen el potencial para bloquear señales positivas (mediante CD28) y la indeseable habilidad de bloquear señales negativas (mediante CTLA-4).

60 En todos estos métodos, la tolerancia se induce de forma poco fiable, no se ha logrado en humanos o no es terapéuticamente o clínicamente útil. Hay una necesidad clínica de métodos de evitar respuestas inmunológicas a antígenos. La presente invención aborda este problema.

65

Sumario de la invención

Se proporcionan métodos para inducir tolerancia inmunológica específica de antígeno en un huésped mamífero. Un tolerógeno, que comprende substancialmente todos los epitopos mamíferos presentes en el antígeno de interés, se administra en un huésped mamífero por un periodo de tiempo en combinación con un inmunosupresor de célula T, en una dosis suficiente para proporcionar una inmunosupresión profunda. El régimen comprende además la administración de un agente antiproliferativo. En una realización de la invención, este régimen de tolerización es precedido de un periodo de condicionamiento, en el que el inmunosupresor de célula T se administra en la ausencia del tolerógeno. Después del régimen de tolerización, el huésped es retirado del agente inmunosupresor, pero es capaz de mantener tolerancia inmunológica específica en los epitopos inmunogénicos presentes en el tolerógeno. Las dosis de mantenimiento del tolerógeno se administran opcionalmente después de que el régimen de tolerización se complete.

El tolerógeno comprende un antígeno péptido soluble, por ejemplo proteínas terapéuticas, cocteles de antígenos de trasplante, etc., y puede ser idénticos al antígeno de interés, o pueden ser una forma modificada de antígeno con propiedades tolerogénicas aumentadas, por ejemplo para incrementar la absorción mediante células que presentan antígeno no profesional. El tolerógeno comprende o se conjuga en manosa-6-fosfato como una fracción de absorción rápida, y es tomado eficazmente por un receptor de alta afinidad ampliamente presente, por ejemplo el receptor de manosa-6-fosfato, etc. otros receptores que están ampliamente presentes e iguales en afinidad son también adecuados. Un antígeno sin una capacidad de absorción rápida adecuada puede ser modificado para contener una fracción que proporciona que esta función permita la absorción mediante tipos de célula tolerizantes.

En una realización de la invención el huésped es inmunológicamente inexperto al antígeno de interés, es decir, no hay respuesta inmunológica de memoria o preexistente al antígeno. En otra realización de la invención el huésped ha sido expuesto al antígeno. Para el último caso puede ser necesario extirpar células del sistema inmunológico responsables de la respuesta inmunológica preexistente.

La invención contempla además el uso de un tolerógeno comprendiendo dicho tolerógeno un antígeno polipéptido soluble que comprende o conjuga una manosa-6-fosfato como fracción de rápida absorción, para la fabricación de un medicamento para el uso en terapia de combinación con un agente inmunosupresor de célula T y un agente antiproliferativo en la inducción de tolerancia inmunológica en un huésped mamífero en el componente antígeno del tolerógeno, en el que dicho huésped mamífero primero se mantiene con una combinación del antígeno polipéptido soluble, el agente inmunosupresor de célula T y el agente antiproliferativo durante un régimen de tolerización y después se mantiene con el antígeno polipéptido soluble después de retirar el agente inmunosupresor de célula T y el agente antiproliferativo.

En aspectos particulares de la presente invención, debería señalarse que la dosis del agente inmunosupresor ha de ser suficiente para suprimir substancialmente las células T. Las variaciones en la dosis de los fármacos pueden ser combinadas para alcanzar el mismo grado de supresión de célula T en diferentes sujetos y bajo diferentes circunstancias. El nivel de supresión de célula T es monitorizado como el nivel al que las células T no proliferan en respuesta a la estimulación de antígeno. Se conocen métodos para monitorizar la proliferación de célula T para los expertos en la técnica, y pueden ser usados en conjunción con la presente invención.

En realizaciones preferidas, la gama de dosis para el antígeno/tolerógeno puede estar entre 0,001 mg/kg y 5 mg/kg/semana. Más preferentemente, la gama de dosis del tolerógeno está entre 0,01 mg y 1 mg/kg y más preferentemente 0,03 mg/kg/semana y 0,1 mg/kg/semana. En realizaciones preferidas, la dosis para el antígeno/tolerógeno es 0,056 mg/kg de peso corporal una vez a la semana.

En esas realizaciones preferidas en las que el agente inmunosupresor es CsA, CsA es dada para alcanzar una concentración de plasma de >400 ng/ml aunque 300 ng/ml o más puede ser usada también. Una gama de dosis preferida puede estar entre 1 mg/kg a 30 mg/kg, más preferentemente en humanos la gama de dosis puede estar entre 5 y 15 mg/kg/día. Tal dosis diaria puede ser administrada dividiendo la dosis en dos, tres, cuatro o más fracciones de la dosis completa, que sería administrada a intervalos espaciados durante el día. Alternativamente, la dosis puede ser administrada como una única dosis.

Los medicamentos de la invención pueden comprender además un nucleótido análogo. En estas realizaciones en las que el análogo es azatioprina, la gama de dosis de este agente puede ser de 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día administrado diariamente o cada dos días.

Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1. Se muestra un diagrama del régimen de tolerancia. El ejemplo común para el régimen de tolerancia requiere solo el tratamiento CsA+Aza (con dosis de CsA de 25 mg/kg/día) junto con infusiones de tolerógeno en el horario mostrado. Los tratamientos adicionales indicados tales como inyección intratímica y anticuerpos clonales se muestran como ejemplo de tratamientos que no funcionaron o importaron en la inducción de tolerancia. Estos regímenes no efectivos se incluyen en los ejemplos para proporcionar contraste con la respuesta a esos caninos

óptimamente tolerizados en el antígeno por la invención.

Para el régimen de tolerancia común, los caninos recibieron diariamente CsA (25 mg/kg/día) más cada dos días Aza desde el día 0 al día 18 como se muestra en la línea de tiempo en la parte baja de la figura. Se inician infusiones de
 5 enzima iduronidasa semanalmente en el día 18 como se indica mediante las flechas hacia arriba sobre la línea de tiempo. Los caninos recibieron después infusiones semanales de tolerógeno a 0,056 mg/kg/semana. En intervalos de dos semanas después de esto, la dosis de CsA+Aza fue dividida en dos, y finalmente en cuatro desde la dosis inicial en el segmento de dos semanas final. Los fármacos CsA+Aza se terminaron después de un total de 60 días y las infusiones de tolerógenos continuaron semanalmente.

10 Para regímenes de inducción de no tolerancia, los caninos recibieron una inyección intratímica o anticuerpos monoclonales y dosis de 25 mg/kg de CsA y 5 mg/kg de Aza en días alternos (es decir, cada fármaco cada dos días). En el día 4, los caninos reciben una inyección intratímica, si se programa. En el diagrama de protocolo superior para fármacos IT+, el canino recibe CsA+Aza de 0 a 4 días, y después recibe una inyección intratímica (Inj. IT o ITI). Si se indican anticuerpos monoclonales, se dan en los días previos a la inyección IT. La dosificación exacta realizada depende del experimento. La dosis CsA y Aza administrada en días alternos fue dividida en dos en el día 18, el primer día que se infundió al canino. Los caninos empezaron recibiendo 0,56 mg/kg de enzima semanalmente. Para las dos semanas subsiguientes, los caninos recibieron CsA y Aza a ½ de las dosis iniciales en días alternos. Después, la dosis de fármaco fue dividida otra vez a ¼ de la inicial y después de dos semanas adicionales, fue dividida otra vez a 1/8 de la dosis inicial. Después de dos semanas a 1/8 de la dosis inicial, los fármacos se terminaron y el canino continuó para recibir infusiones de enzima semanalmente.

25 FIGURA 2. Inducción de tolerancia con CsA diaria y Aza cada dos días durante infusiones de iduronidasa humana recombinante (rhIDU). En la figura, el título de anticuerpos de la iduronidasa de seis caninos tolerantes (símbolos abiertos) y once no tolerantes (símbolos cerrados) se muestra como sérum no diluido de Unidades OD /µL mientras se mide mediante ELISA trazada contra la semana de infusión de enzima. Empezando 18 días antes de la infusión de iduronidasa, los caninos recibieron un régimen de tolerancia como se describe en el ejemplo 1. Empezando en la semana 1, el canino se infunde con infusiones intravenosas semanales rh-Idu a iduronidasa 0,056 mg/kg/semana. Niveles de anticuerpos bajos (<20 para la iduronidasa ELISA) con estímulo de iduronidasa continuado indican tolerancia en los perros que reciben el régimen de tolerancia óptimo y títulos que exceden 50 y hasta 500 indican una respuesta inmunológica activa. El régimen de fármaco CsA+Aza termina en la semana 7 de estímulo de enzima y respuesta de anticuerpos baja más allá de ese punto indica que la tolerancia no depende de la inmunosupresión continuada.

35 FIGURA 3. Inducción exitosa de tolerancia en perros MPS I con deficiencia de iduronidasa y tolerancia a niveles terapéuticos altos de enzima subsiguientes. Tres perros MPS I fueron tolerizados usando el régimen de tolerancia y un perro MPS I sirvió como control y no recibió el régimen de tolerancia. El título de anticuerpos de la iduronidasa en los tres perros MPS I tolerantes (símbolos abiertos) y un perro MPS I no tolerante (símbolo cerrado) se muestra con sérum no diluido unidades OD /µL mientras se mide mediante ELISA trazada contra la semana de estímulo de
 40 enzima. Los caninos tolerantes recibieron el Régimen de Tolerancia de Fármaco como se describe en el ejemplo 2; el control no tolerante no recibió tratamiento de fármaco. Los niveles bajos de anticuerpos (<20 OD) con estímulo de antígeno continuado indican tolerancia. El régimen de fármaco tolerizante termina en la semana 7 de estímulo de enzima y niveles bajos de anticuerpos más allá de ese punto es indicativo de tolerancia inducida. Los cuatro caninos recibieron infusiones de iduronidasa intravenosa de 0,056 mg/kg/semana en las semanas 1 a 12. Subsiguientemente, los caninos recibieron un incremento escalonado en dosis de iduronidasa durante tres semanas en dosis terapéuticas de 0,500 mg/kg/semana en la semana 15 de estímulo de enzima. Los niveles de anticuerpos en caninos tolerantes permanecieron <20 unidades OD en la semana 15 comparado con los niveles de anticuerpos RU de control de >500 Unidades OD en la semana 15 en respuesta a incrementar la dosis de antígeno de iduronidasa. En la semana 16, el canino RU no tolerante tuvo una reacción anafiláctica clínica seria durante la infusión y el tratamiento fue finalizado. Los caninos tolerantes no mostraron anafilaxis durante las infusiones.

50 FIGURA 4. Inducción exitosa de tolerancia específica de antígeno a rhGAA, siendo desarrollada una segunda enzima lisosomal para tratar la enfermedad de Pompe. El título de anticuerpos de la rh-alfa-glucosidasa (rhGAA) para un canino tolerante (SC, símbolo abierto) y un canino no tolerante (ST, símbolo cerrado) se muestra como sérum no diluido de unidades OD /µL mientras se mide mediante ELISA contra la semana de estímulo de enzima. El canino tolerante recibió el régimen de fármaco de tolerancia como se describe en el ejemplo 3. En la semana 1, el canino es tolerizado con infusiones intravenosas semanales de rhGAA a 0,056 mg/kg/semana. La ciclosporina y azatioprina (CsA (diariamente)+Aza) es continuada y después la dosis dividida cada dos semanas hasta que el canino no tenga fármacos en la semana 7 de estímulo de enzima. El control no tolerante no recibió tratamiento de fármacos. El régimen de fármacos tolerizante termina en la semana 7 de estímulo de enzima y niveles bajos de anticuerpos más allá de ese punto es indicativo de tolerancia inducida que se mantiene en la ausencia de inmunosupresión continuada. Los dos caninos recibieron infusiones de rhGAA intravenosas de 0,056 mg/kg/semana en las semanas 1 a 12. Los niveles de anticuerpos en el canino tolerante permanecieron <5 unidades OD en el punto más alto comparado con los niveles de anticuerpos de control de no tolerante de >150 unidades OD en el punto más alto. El resultado confirma que el régimen de tolerancia puede tener éxito con otra enzima inmunogénica de rápida absorción con implicaciones terapéuticas.

FIGURA 5. Se muestran los datos de los seis caninos no tolerantes comparados con un canino (JH) que se volvió tolerante. Los caninos no tolerantes tienen títulos ELISA que exceden las 50 y en algunos casos que exceden las 200 U/ μ l/sérum. En contraste, JH tuvo un título de anticuerpos de menos de 20 U OD / μ l/sérum durante 18 semanas de infusiones de iduronidasa. JH se distinguió por niveles de ciclosporina mayores de 500 ng/ml en sangre, mientras que los otros caninos tuvieron menos de 400 ng/ml en sangre y a menudo menos de 200 ng/ml en sangre.

FIGURA 6. La tolerancia específica de antígeno es de larga duración. La figura muestra el título de anticuerpos de caninos tolerizados (JO, RO) y no tolerizados (RU) en el tiempo. En el primer segmento, se muestra el título durante y después de la tolerización. RU tiene un título alto, mientras que otros caninos tienen un título bajo. Después de huecos en el tiempo de cinco semanas, 4,5 meses, 6 meses y 2,5 años, los caninos fueron restimulados con iduronidasa. Los perros tolerantes (PE, RO) no mostraron respuesta inmunológica a la iduronidasa incluso después de cinco semanas a seis meses de interrupción desde las infusiones de tolerógeno. El canino RU no tolerante mostró una respuesta al antígeno de >20 veces después de sólo dos dosis de estímulos de enzima siguiendo una interrupción de 4,5 meses. El perro JH tolerante original muestra una respuesta parcial después de 2,5 años de interrupción. Los datos muestran un efecto de larga duración del estado tolerante inducido.

FIGURA 7. El régimen de tolerancia evita la inducción de otros subtipos Ig, adicionalmente a IgG. Las figuras 7A y 7B muestran títulos de ELISA de perros de control no tolerantes antes y después de doce infusiones semanales con iduronidasa. Las figuras 7C y 7D muestran títulos ELISA de perros de control tolerantes antes y después de doce infusiones semanales con iduronidasa.

FIGURA 8. El régimen de tolerancia puede ser usado para inducir tolerancia relativa o reducir el título Ig con el régimen en caninos con respuesta inmunológica preexistente. A Nitro se le permitió una interrupción de seis meses de exposición de antígeno. En la reexposición a antígeno después de este periodo, el título IgG inicialmente se elevó durante la administración del régimen CsA+Aza a más de 100 en una respuesta anamnésica típica y rápidamente cayó a menos de 20. La respuesta inmunológica fue reducida por la reinducción de tolerancia usando el régimen de tolerización combinado.

FIGURA 9. Confirmación de que la fracción de rápida absorción de iduronidasa (el grupo manosa-6-fosfato) es requerida para la tolerancia inmunológica con iduronidasa. Para mostrar que una fracción de alta absorción M6P ayuda en la inducción de tolerancia al antígeno, la iduronidasa recombinante fue desfosforilada mediante incubación con fosfatasa ácida unido a gotas. La enzima iduronidasa desfosforilada fue aplicada con el régimen de tolerancia (CsA+Aza) a caninos. El estudio mostró que el canino tratado con iduronidasa desfosfo no fue tolerizado a la iduronidasa, sugiriendo por ello que la afinidad de alta absorción (la fracción manosa-6-fosfato) se necesita para la tolerancia.

Descripción detallada de las realizaciones

La tolerancia inmunológica específica de antígeno es inducida en un huésped de mamífero mediante la administración de un tolerógeno en combinación con un régimen de inmunosupresión por un periodo de tiempo suficiente para tolerizar el huésped. La inmunosupresión se consigue mediante la administración de un agente inmunosupresor de célula T. Los métodos comprenden la administración de un agente antiproliferativo. Los métodos incluyen opcionalmente un periodo de condicionamiento que precede a la administración del tolerógeno, donde el agente inmunosupresor es administrado en la ausencia del tolerógeno. Después del régimen tolerizante, el huésped es retirado de la inmunosupresión, pero es capaz de mantener tolerancia inmunológica específica en los epitopos inmunogénicos presentes en el tolerógeno. Las dosis de mantenimiento del tolerógeno pueden ser administradas después de que se complete el régimen tolerizante.

En una realización de la invención el huésped es inmunológicamente inexperto al antígeno de interés, es decir no hay respuesta inmunológica de memoria o preexistente al antígeno. En otra realización de la invención el huésped ha sido expuesto al antígeno. El último caso puede ser necesario extirpar células del sistema inmunológico responsable de la respuesta inmunológica preexistente. Los inventores han mostrado que el régimen de tolerancia de la presente invención puede ser usado para inducir tolerancia relativa o reducir el título de inmunoglobulina en caninos con respuesta inmunológica preexistente contra un antígeno dado.

Los métodos son útiles en el establecimiento proactivo de tolerancia donde una proteína u otro agente inmunogénico ha de ser administrado a un huésped inexperto. Por ejemplo, la administración de anticuerpos terapéuticos, de factores de crecimiento, enzimas, y otros polipéptidos no presentes previamente en el huésped pueden elevar una respuesta inmunológica significativa, que disminuye la efectividad del tratamiento. Mediante el establecimiento proactivo de tolerancia, la efectividad a largo plazo de tal tratamiento es aumentada. Los métodos de la invención también encuentran uso en establecer tolerancia previa al trasplante; y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

En estudios ejemplares, los inventores demostraron que un método para reducir o evitar una respuesta inmunológica específica de antígeno clínicamente significativa en α -L-iduronidasa (rIDU) de humano recombinante solía tratar

mucopolisacaridosis I canina (MPS I). El método emplea un régimen inicial de 30 a 60 días de un agente inmunosupresor de célula T tal como ciclosporina A (CsA) y un agente antiproliferativo, tal como azatioprina (Aza), combinado con infusiones intravenosas semanales de dosis bajas de rHIDU. La típica respuesta IgG fuerte a infusiones semanales de rHIDU en caninos fue ampliamente reducida o evitada usando un régimen de 60 días de fármacos inmunosupresores, ciclosporina A (CsA) y azatioprina (Aza), combinada con infusiones intravenosas semanales de bajas dosis de rHIDU. Más específicamente, usando el régimen, ocho caninos tuvieron una reducción de 20 veces en título de anticuerpos después de infusiones de doce semanas de rHIDU (seis semanas sin CsA+Aza) y los títulos bajos no se incrementaron con infusiones rHIDU adicionales hasta seis meses y dosis de rHIDU terapéuticas completas (las ocho caninos MPS I y normales tuvieron un título de anticuerpos medio de 7,2 unidades OD / μ l sérum por ELISA comparado con 149 unidades OD / μ l en ocho caninos de control). Los caninos toleraron dosis terapéuticas más altas de iduronidasa para hasta seis meses sin un incremento en el título (sérum medio de 7,5 OD/ μ l, n=6) mientras que los caninos receptivos inmunológicos tuvieron incrementos de 2-3 veces en título de anticuerpos (sérum medio de 369 OD/ μ l, n=2). El antisérum de caninos receptivos inmunológicos impidió la absorción celular de iduronidasa in vitro por >95% mientras que el antisérum de los caninos no receptivos no lo impidió. Los datos sugieren que un simple protocolo puede evitar o reducir la respuesta inmunológica clínicamente significativa en la terapia de remplazo de enzima lisosomal, así como reducir la respuesta inmunológica a otros antígenos clínicamente significativos.

Los estudios demostraron que un factor clave que determina el éxito del régimen tolerizante fue un alto nivel valle de sérum de CsA preferentemente >400 ng/ml. Adicionalmente, los estudios del antígeno tolerizante demostraron que las enzimas (rHIDU, alfa-glucosidasa) de manosa-6-fosforilada (M6P) pueden actuar como tolerógenos mientras que la ovalbúmina de proteína no fosforilada no pudo. Los fabricantes de M6P de alta afinidad parecen esenciales desde que el desfosforilado rHIDU no permitió inducción del estado tolerante. Se propone un modelo en el que la tolerancia se induce bajo circunstancias en las que toda la activación de la célula T es suprimida por CsA+Aza, mientras las células (APC) que presentan antígenos inmaduros y no profesionales están cargadas eficientemente con antígeno vía el receptor M6P y células T receptoras de antígeno inactivas o células T reguladoras activadas para inducir un estado tolerante en los caninos. Los métodos y composiciones para explotar estos descubrimientos se discuten más detalladamente aquí a continuación.

30 Definiciones

Antes de que sean descritos los presentes métodos, ha de entenderse que esta invención no está limitada a métodos particulares descritos, ya que tales pueden, por supuesto, variar. También ha de entenderse que la terminología usada aquí es para el propósito de describir realizaciones particulares sólo, y no está destinada a ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención será limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Donde se provee una gama de valores, se entiende que cada valor que interviene, hasta el décimo de la unidad del límite inferior a no ser que el contexto claramente dicte de otro modo, entre el límite superior e inferior de esa gama y cualquier otro valor enunciado o que interviene en esa gama enunciada se incluye en la invención. Los límites superior e inferior de esas gamas más pequeñas pueden ser incluidos en gamas más pequeñas, sujetas a cualquier límite específicamente incluido en la gama enunciada.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método o materiales similares o equivalentes a los descritos aquí pueden ser usados también en la práctica o comprobación de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora. Todas las publicaciones mencionadas aquí divulgan y describen los métodos y/o materiales en conexión con los que las publicaciones citan.

Debe señalarse que como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “el”, “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente de otro modo.

Las publicaciones mencionadas aquí son proporcionadas solamente por su divulgación previa a la fecha de archivo de la presente solicitud. Nada aquí ha de ser interpretado como una admisión de que la presente invención no está autorizada a anteceder tal publicación por virtud de la invención previa. Además, las fechas de publicación provistas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

Antígeno. Como se usa aquí, el término antígeno está destinado a referirse a una molécula capaz de obtener una respuesta inmunológica en un huésped de mamífero, particularmente una respuesta inmunológica humoral, es decir, caracterizada por la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los antígenos de interés son agentes terapéuticos, por ejemplo, polipéptidos, y fragmentos de estos; autoantígenos, por ejemplo, polipéptidos propios; antígenos de trasplantes. En respuesta a los antígenos, se producen anticuerpos de una variedad de clases, subclases e isotipos.

La porción del antígeno unida por el anticuerpo es referida como un epitopo. Los antígenos, antígenos complejos

particulares tales como polipéptidos, normalmente comprenden múltiples epitopos. Donde el antígeno es una proteína, los epitopos lineales están en una gama de unos 5 a 20 aminoácidos de longitud. Los anticuerpos pueden también reconocer determinantes conformacionales formados por residuos no contiguos en un antígeno, y un epitopo puede por lo tanto requerir que un fragmento mayor del antígeno esté presente para unir, por ejemplo, un campo de proteína, o substancialmente toda una secuencia de proteína. Será apreciado por lo tanto que una proteína terapéutica, que puede ser de varias centenas de aminoácidos en longitud, puede comprender un número de distintos epitopos.

El nivel de afinidad de unión de anticuerpos que se considera que es "específico" será determinado en parte por la clase de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos específicos de antígeno de la clase IgM pueden tener una afinidad inferior que los anticuerpos de, por ejemplo, las clases IgG. Como se usa aquí, con el fin de considerar que una interacción de anticuerpos sea "específica", la afinidad será al menos unos 10^{-7} M, normalmente unos 10^{-8} M a 10^{-9} M, y puede ser hasta 10^{-11} M y mayor para el epitopo de interés. Será entendido por los expertos en la técnica que el término "especificidad" se refiere a tal unión de alta afinidad, y no está destinado a significar que el anticuerpo no puede unirse a otras moléculas también, o que alguna reacción cruzada menor en un epitopo no pueda estar presente en el huésped.

Tolerancia inmunológica específica de antígeno. Para los propósitos de la presente invención, la tolerancia es la ausencia de una respuesta inmunológica a un antígeno específico en la configuración de un sistema inmunológico de otro modo substancialmente normal. La tolerancia es distinta de la inmunosupresión generalizada, en la que todo, o toda una clase tal como las respuestas inmunológicas mediadas de célula B, de las respuestas inmunológicas son disminuidas.

La tolerancia inmunológica específica de antígeno terapéutica proporciona un estado específico en un huésped, donde una molécula terapéutica de interés, por ejemplo una proteína terapéutica, puede ser administrada múltiples veces a la dosis efectiva normal. Cuando tal tolerancia específica de antígeno está ausente, la administración sucesiva de una dosis normal del agente terapéutico lleva a una eficacia disminuida, debido a la interferencia de anticuerpos con el agente terapéutico, y por lo tanto la cantidad del agente requerido para una dosis efectiva se incrementará. Cuando se logra la tolerancia inmunológica específica de antígeno de acuerdo con los métodos de la presente invención, la cantidad requerida para una dosis efectiva de un agente terapéutico se incrementará por no más de unas cinco veces después de administración sucesiva, normalmente por no más de unas 2,5 veces después de administración sucesiva, y puede no ser incrementada sobre la dosis inicial.

Alternativamente o en combinación con el beneficio de eficacia descrito anteriormente, el estado de tolerancia inmunológica proporciona un incremento en la seguridad de proteína terapéutica o administración de otro fármaco. Las respuestas inmunológicas a los fármacos pueden causar anafilaxis o reacciones complejas anafilactoides o inmunológicas basadas en la producción de anticuerpos específicos cuando la tolerancia está ausente. La respuesta inmunológica disminuida o ausente en la presencia de tolerancia de acuerdo con los métodos de la presente invención también disminuirá y limitará la seguridad disminuida de la administración de tales fármacos debido a acontecimientos adversos mediados de anticuerpos disminuidos.

Donde el antígeno de interés es un autoantígeno, la inducción de tolerancia inmunológica específica de antígeno será suficiente para disminuir los síntomas de la enfermedad autoinmunológica en el paciente, por ejemplo un paciente puede estar suficientemente mejorado como para mantener actividades normales en la ausencia, o en la presencia de cantidades reducidas, de inmunosupresores generales, por ejemplo corticoides.

Cuando el antígeno de interés es uno o más antígenos trasplantados, la inducción de tolerancia inmunológica específica de antígeno permite que el órgano trasplantado sobreviva y funcione en el huésped de recipiente en la ausencia, o en la presencia de cantidades reducidas, de inmunosupresores generales.

Un método alternativo para determinar la tolerancia inmunológica específica de antígeno es observar la presencia de anticuerpos específicos de antígeno en el suero del animal huésped después de la administración sucesiva del agente terapéutico. En un huésped no tolerante, el título de anticuerpos específicos para un antígeno, por ejemplo un agente terapéutico, autoantígeno, antígeno de trasplante, etc. se incrementará por muchas órdenes de magnitud en la administración sucesiva, o exposición. Por ejemplo, se muestra aquí que los títulos de anticuerpos específicos pueden elevarse a unas 50 veces después de ocho semanas de administración sucesiva de una proteína terapéutica, a menudo más de 100 veces, y con el tiempo puede incrementarse por tanto como 1000 veces o más. En un huésped tolerante, el aumento en título de anticuerpos específico no será más del 10% del incremento para un huésped no tolerante correspondiente, y puede que no sea más de un 5% del incremento. Por ejemplo, un incremento de menos de 50 veces en el título de anticuerpos específico puede ser observado durante un periodo de desde unas ocho semanas, a varios meses. El nivel específico de incremento observado contra un agente particular varía dependiendo de la naturaleza del agente, previa exposición del huésped al agente, el modo en que el agente se administra, el método por el que la respuesta es medida y similares. Los métodos son bien conocidos en la técnica para determinar la presencia de un anticuerpo específico en suero de paciente, por ejemplo RIA, ELISA, etc., y no necesita ser elaborado aquí.

Otro aspecto de tolerancia es la presencia de un sistema inmunológico de otro modo substancialmente normal. Los métodos de la presente invención no están dirigidos a una inmunosupresión general, y después del régimen tolerizante la respuesta inmunológica a los antígenos más que a los antígenos de interés son substancialmente normales, normalmente reducidos por no más de unas 5 veces como se compara con un control no tratado, y puede ser indistinguible de una respuesta normal.

Las especies mamíferas que pueden beneficiarse de los métodos de la invención incluyen caninos, felinos, equinos, bovinos, ovinos, etc., y primates, particularmente humanos. Los modelos de animales, particularmente pequeños mamíferos, por ejemplo, murinos, lagomorfos, etc. pueden ser usados para investigaciones experimentales. Los modelos de animales de interés incluyen aquellos modelos de administración de proteína terapéutica, autoinmunidad, rechazo de tejido.

Tolerógeno que comprende una fracción de rápida absorción. El tolerógeno es la forma del antígeno de interés que se administra al huésped durante el régimen de tolerización, y comprenderá substancialmente todos los epitopos presentes en el antígeno, cuyos epitopos pueden ser provistos como uno o un coctel de agentes. En algunos casos el tolerógeno y el antígeno serán idénticos, pero también pueden diferenciarse en la presencia de modificaciones, formulaciones. Los tolerógenos se administran en forma soluble, es decir, substancialmente libres de agregados, y en una forma no celular, mientras que el antígeno de interés puede no ser soluble. Los tolerógenos también pueden comprender portadores para mejorar la interacción con el sistema inmunológico, pueden comprender múltiples fragmentos derivados del antígeno de interés; pueden ser conjugados en grupos que incrementan la toleragenicidad, pueden ser proteínas de fusión que comprenden fracciones de polipéptido de interés, y similares.

Los tolerógenos comprenden o están conjugados de forma covalente en una fracción de rápida absorción. Las fracciones de rápida absorción son polipéptidos que son ampliamente reconocidos e internalizados por receptores presentes en células presentadoras de antígeno no profesional. Preferentemente se elige un receptor que es ampliamente expresado en células periféricas y centrales que se están tolerizando cuando presentan el antígeno, y que no es exclusivamente expresado en macrófagos, células dendríticas, u otras células presentadoras de antígeno profesional. Las células que tolerizan cuando los antígenos se presentan incluyen, por ejemplo, células endoteliales sinusoidales de hígado, células de epitelio tímicas medulares/corticales, y tipos de célula similares.

Es especialmente preferido que el receptor tenga una $K_{\text{absorción}}$ para el ligando de al menos unos 10^{-6} M, normalmente al menos unos 10^{-7} M más normalmente al menos unos 10^{-8} M y preferentemente al menos unos 10^{-9} M donde $K_{\text{absorción}}$ representa la concentración de ligando a la que la mitad de la absorción máxima ocurre en una célula. Los receptores de interés incluyen el receptor de transferrina, el receptor melanotransferrina, el receptor de manosa-6-fosfato, el receptor de hormona de crecimiento. Los ligandos parecidos incluyen: factor II (IGF2) de crecimiento tipo insulina, transferrina, hormona de crecimiento, insulina, y fragmentos de unión de estas, particularmente polipéptidos que tienen receptores de afinidad específica y alta en tipos de célula diversos. Los anticuerpos de cadena únicos y los agentes de unión desde sistemas de exposición de fago aleatorios podrían ser usados si tuvieran la afinidad adecuada para el receptor. Para determinar la $K_{\text{absorción}}$ de una combinación de ligando y receptor, pueden ser usados los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo véase Kakkis *et al* (1994) *Protein Expr Purif* 5(3):225-32 para ensayos usados para determinar la $K_{\text{absorción}}$ de alfa-L-iduronidasa. Los métodos divulgados son fácilmente adaptados a cualquier combinación de ligando y receptor. Tales ensayos son también útiles en verificar la absorción de tolerógenos que comprenden fracciones de rápida absorción exógenas.

Donde el antígeno es un polipéptido tomado por tales receptores, el antígeno y el tolerógeno pueden ser idénticos. Donde el antígeno de interés es un polipéptido que no está ampliamente tomado por células presentes de antígeno no profesional, el tolerógeno puede ser una forma modificada del antígeno, por ejemplo puede ser un conjugado del antígeno y una fracción de rápida absorción (ligando), tal como manosa-6-fosfato, transferrina, etc.

Alternativamente el tolerógeno puede ser una forma modificada del polipéptido antigénico, que comprende cambios de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones, eliminaciones, adiciones, que proporcionan al polipéptido secuencias para absorción rápida. Por ejemplo, se pueden añadir o alterar motivos de glicosilación, con el fin de proporcionar modificaciones pos-trasplante adecuadas, por ejemplo un motivo para adición de manosa-6-fosfato (véase Cantor *et al.* (1992) *J Biol Chem* 267(32):23349-56). En una realización de la invención el tolerógeno es una proteína de fusión que comprende (a) toda o una parte del antígeno de interés y b) un fragmento de una proteína que tiene una fracción de rápida absorción, donde el fragmento es suficiente para conferir las propiedades de rápida absorción. Por ejemplo, un fragmento de α -L-iduronidasa que comprende los motivos necesarios para la glicosilación post-trasplante y adición de manosa-6-fosfato puede ser fusionado a un antígeno de interés.

Los métodos de conjugar grupos químicos en un polipéptido son bien conocidos en la técnica. Los grupos químicos que encuentran uso en la unión incluyen carbamato; amida (amina más ácido carboxílico); éster (alcohol más ácido carboxílico), tioéter (haloalkano más sulfidril; maleimida más sulfidril), base de Schiff (amina más aldehído), urea (amina más isocianato), tiourea (amina más isotiocianato), sulfamida (amina más cloruro de sulfonilo), disulfuro; hidrazona, lípidos, como se conocen en la técnica. La conexión de éster y disulfuro son preferidos si la conexión ha de ser inmediatamente degradada en el citosol después del transporte de la substancia. Las entidades ilustrativas

incluyen: acidobenzoil-hidracida, N-[4-(p-acidosalicil-amino)-butil]-3'-[2'-piridil-ditio]-priopionamida), suberato de bis-sulfo-succinimidilo, adipimidato de dimetilo, tartrato de disuccinimidilo, éster N- γ -maleimido-butiril-oxisuccinimida, N-hidroxi-sulfo-succinimidil-4-acidobenzoato, [4-acidofenil]-1,3'-ditiopropionato de N-succinimidilo, [4-yodo-acetil]-amino-benzoato de N-succinimidilo, glutaraldehído, NHS-PEG-MAL, succinimidil 4-[N-maleimido-metil] ciclohexano-1-carboxilato; 3-(2-piridil-ditio), ácido propionico N-hidroxisuccinimida éster (SPDP); N, N'-(1,3-fenileno)bismaleimida; N, N'-etileno-bis-(iodoacetamida); o 4-(N-maleimido-metil-(ciclohexano-1-ácido carboxílico N-éster hidroxisuccinimidina (SMCC); m-maleimido-benzoil-N-éster hidroxisuccinimida (MBS), y succinimida 4-(p-maleimido-fenil) butirato (SMPB), una cadena extendida análoga a MBS. El grupo de succinimidilo de estos enlaces cruzados reacciona con una amina primaria, y la maleimida tiolreactiva forma un enlace covalente con el tiol de un residuo de cisteína.

Agentes supresores

Agente inmunosupresor de célula T. Los agente inmunosupresores de célula T son compuestos que impiden la actividad de las células T, particularmente células T cooperadoras, normalmente sin supresión general de la proliferación y actividad de otras células, tales como células B, monocitos, células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea, etc. Los métodos de evaluar para la inmunosupresión de célula T son bien conocidos en la técnica, incluyen ensayos *in vitro* tales como liberación de IL-2 por células T cooperadoras en la presencia del antígeno, incorporación de ^3H timidina en el ADN en la presencia del antígeno o un estimulante tal como Con A, liberación de ^{51}Cr en la presencia de células estimuladoras alogénicas, etc. Los ensayos *in vivo* pueden depender de medir la proliferación de las células T, la liberación de citosinas, inhabilidad para rechazar un tejido mientras que se suprimido activamente.

Un grupo de compuestos de particular interés para estos propósitos son las inmunofilinas, también referidas como inhibidores de calcineurina, que impiden células T cooperadoras. La calcineurina es una S/T proteína fosfatasa 2B dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, que ha sido declarada importante en el camino de señalización del calcio. Esta enzima es un heterodímero de una subunidad catalítica de unión de calmodulina de 61 kDa (calcineurina A) y una pequeña (19 kDa) subunidad reguladora (calcineurina B). Los fármacos inmunosupresores, ciclosporina A, rapamicina, FK506, etc. inhiben la calcineurina, que es necesaria para la importación nuclear de NF-AT (factor nuclear de células T activadas). La dosis de agente inmunosupresor de célula T para el proceso de tolerización puede ser mayor de lo que normalmente se usa para la inmunosupresión general, como se hablará en detalle después.

Las inmunofilinas pueden ser administradas de una manera que se practica convencionalmente. Véase, por ejemplo, *The Pharmacological Basis Of Therapeutics* de Goodman y Gilman, 7^a edición, 1985, p. 1299. Por ejemplo, la CSA puede ser provista como una solución oral de 100 mg/ml con 12,5% de alcohol, y para la administración intravenosa como una solución de 50 mg/ml con un 33% de alcohol y 650 mg de aceite de ricino polioxi-etileno. Cuando se administra intravenosamente, la CSA puede ser dada como una solución diluida de 50 mg en 20 a 100 mg de solución salina normal o 5% de dextrosa en agua, por infusión lenta por un periodo de varias horas. La dosis intravenosa es típicamente un tercio de la dosis oral. Más preferentemente, la administración de CSA es oralmente, tanto en forma de cápsula como de tableta. Tales formulaciones pueden ser preparadas por cualquier método adecuado de farmacia que incluya el paso de poner en asociación el compuesto activo y un portador adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios). En general, las formulaciones pueden ser preparadas mezclando uniforme y cercanamente el compuesto activo con un portador líquido o sólido dividido finamente, o ambos, y después, si es necesario, conformar la mezcla resultante. La preparación de CSA se divulga en la patente US 4117118. La CSA que puede ser usada en la práctica de la invención está disponible comercialmente con el nombre de SANDIMMUNE® de Sandoz Pharmaceuticals Corporation. FK506, también conocida como tacrolimus, está comercialmente disponible con el nombre comercial PROGRAF® de Fujisawa Healthcare. Rapamycin, también conocido como sirolimus está comercialmente disponible bajo el nombre comercial RAPAMUNE® de Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals Inc.

Agente antiproliferativo. Los agentes antiproliferativos, para los propósitos de los métodos de la presente invención, son compuestos farmacéuticamente activos que deprimen la proliferación celular. Mientras que las células del sistema inmunológico se dividen a menudo activamente, incluso los agentes antiproliferativos generales tienen frecuentemente un efecto inmunosupresor. Muchos de tales fármacos antiproliferativos son conocidos en la técnica, por ejemplo como se usan en quimioterapia.

Los fármacos antiproliferativos de interés incluyen antimetabolitos, por ejemplo, análogos de nucleótido tales como azatioprina, 6-mercaptapurina, tioguanina, citarabina, etc; otros análogos, tales como metotrexato, ácido micofenólico, o 6-(1,3-Dihidro-4-hidroxi-6-motoxi-7-metil-3-oxi-5-isobenzofuranil)-4-metil-4-ácido hexanoico. Aunque menos preferidos, los agentes alquilantes tales como ciclofosfamida, clorambucil, etc. pueden también encontrar uso como antiproliferativos inmunosupresores, por ejemplo donde hay una respuesta inmunológica preexistente al antígeno de interés.

En una realización de la invención, el agente antiproliferativo es azatioprina (AZA) o 6-mercaptapurina (6-MP). Como se usa aquí, el término "fármaco 6-mercaptapurina" o "fármaco 6-MP" se refiere a cualquier fármaco que puede ser

metabolizado en un metabolito de 6-mercaptopurina activo que tiene eficacia terapéutica. Los fármacos de 6-mercaptopurina ejemplares como se define aquí incluyen 6-mercaptopurina (6-MP) y azatioprina (AZA). Otros fármacos 6-MP incluyen, por ejemplo, ribósido de metilmercaptopurina y 6-TG. 6-TG es un fármaco 6-MP particularmente útil en pacientes que tienen actividad TPMT alta. Los pacientes que muestran actividad TPMT alta se espera que conviertan más fácilmente fármacos 6-MP tales como 6-MP y AZA en 6-MMP. Como se usa aquí, el término "6-tioguanina" o "6-TG" se refiere a 6-tioguanina o análogos de esta, incluidas moléculas que tienen la misma estructura base, por ejemplo, 6-tioguanina ribonucleósido, 6-tioguanina ribonucleótido mono-, di- y tri-fosfato, 6-tioguanina deoxiribonucleósido y 6-tioguanina deoxiribonucleótido mono-, di, y trifosfato. El término "6-TG" también incluye derivados de 6-tioguanina, incluidas modificaciones químicas de 6-TG, tanto tiempo como la estructura de la base 6-TG sea preservada. Como se usa aquí, el término "6-metil-mercaptopurina" o "6-MMP" se refiere a 6-metil-mercaptopurina o análogos de este, incluidos análogos que tienen la misma estructura de base, por ejemplo, 6-metil-mercaptopurina ribonucleósido, 6-metil-mercaptopurina ribonucleótido mono-, di-, y tri-fosfato, 6-metil-mercaptopurina deoxiribonucleósido, y 6-metil-mercaptopurina deoxiribonucleótido mono-, di- y tri-fosfato. El término "6-MMP" también incluye derivados de 6-metil-mercaptopurina, incluidas modificaciones químicas de 6-MMP, tanto tiempo como la estructura de la base 6-MMP sea preservada.

Los fármacos 6-MP pueden ser suministrados como una suspensión, solución, o emulsión en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener tales agentes formularios tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Los vehículos acuosos adecuados incluyen solución salina, solución salina amortiguadora de fosfatos, y otros vehículos para suministro de fármaco parenteral, referidos genéricamente como "soluciones intravenosas". Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de sólido estéril o liofilizado de solución, con un vehículo adecuado, por ejemplo, estéril, agua libre de pirógeno, antes de usar.

Métodos de la invención

La tolerancia inmunológica específica de antígeno es inducida en un huésped mamífero administrando al mismo tiempo un tolerógeno y un agente inmunosupresor de célula T, que se combina adicionalmente con la administración de un agente antiproliferativo, como se describe anteriormente. Estos agentes pueden ser formulados de forma separada o juntos, normalmente de forma separada. Se dice que los agentes se administran al mismo tiempo cuando se introducen en el huésped simultáneamente en el tiempo o en diferentes momentos durante el transcurso de un horario de tratamiento común. En el último caso, los compuestos se administran suficientemente cerca en tiempo para lograr el efecto deseado. Típicamente, si un agente se administra aproximadamente dentro de media vida *in vivo* del otro agente, se considera que los dos agentes son administrados al mismo tiempo. Cualquier agente activo debería estar presente en el paciente a niveles combinados suficientes para ser terapéuticamente efectivos.

El régimen de tolerización es opcionalmente precedido por un periodo de condicionamiento, donde durante el periodo de condicionamiento el agente o agentes supresores se administran en la ausencia del tolerógeno por un periodo de una a tres semanas. El periodo de tiempo para el condicionamiento será suficiente para suprimir las respuestas de célula T en el huésped previamente a la administración del tolerógeno. El periodo de tiempo para el condicionamiento puede variar dependiendo del huésped, los agentes supresores, etc. El periodo de tiempo puede ser empíricamente determinado, u obtenido de las fuentes publicadas.

El régimen de tolerización requiere que el agente inmunosupresor de célula T se mantenga por un periodo de tiempo suficiente para inducir tolerancia inmunológica. Normalmente el agente inmunosupresor de célula T será administrado al huésped durante al menos unas tres semanas, normalmente al menos unas cinco semanas, y puede ser al menos unas ocho semanas o más. El fármaco antiproliferativo se administra también durante este periodo de tiempo, en un horario apropiado al fármaco, normalmente al menos cada dos días, a diario, dos veces al día o más. Mientras el régimen de tolerización puede ser continuado durante periodos más largos de tiempo, normalmente es deseable minimizar el periodo de tiempo en el que el paciente es tratado con agentes supresores.

Un aspecto importante de la invención es mantener una alta dosis de agentes inmunosupresores de célula T durante los estados del procedimiento de tolerización. En farmacocinética, se observa que la concentración de un fármaco en el torrente sanguíneo alcanza un "pico" después de la administración, y después los niveles en sangre caen hasta el punto más bajo, o "valle", antes de la administración de la siguiente dosis. En los métodos de la presente invención, es importante mantener los niveles terapéuticos del agente inmunosupresor de célula T durante este periodo de tiempo, de manera que los niveles "valle" no caigan a niveles no supresores. Esto puede ser determinado empíricamente midiendo periódicamente la concentración del fármaco en el torrente sanguíneo para determinar los valores valle para un protocolo de administración dado. El nivel de inmunosupresión para una concentración dada de fármaco puede ser determinado empíricamente, como se ha dicho previamente, u obtenido de los valores publicados. La concentración del fármaco será suficiente para evitar la iniciación o mantenimiento *in vivo* de una respuesta inmunológica mediada de célula T.

Incrementar los niveles valle para mantener los niveles supresores del fármaco puede ser conseguido administrando dosis más altas del fármaco, o administrando una dosis estándar más frecuentemente. Por ejemplo, en humanos, con ciclosporina A, es deseable tener un nivel valle en sangre de no menos de unos 200 ng/ml, normalmente no menos de unos 300 ng/ml, y puede ser unos 500 ng/ml o mayor. Los niveles que se sabe que inducen tolerancia en

la especie canina son unos 400 ng/ml en el valle, sin embargo el nivel apropiado en otras especies tomará en cuenta la sensibilidad del huésped en el inmunosupresor que se está administrando. En particular, los humanos pueden ser más sensibles a los efectos de la ciclosporina que los caninos. La gama de dosis para humanos puede ser inferior para caninos debido a la tasa disminuida de metabolismo en general en humanos relativa a caninos. Se espera que la dosis humana pueda ser aproximadamente la mitad de la dosis canina (de unos 10 mg/kg/día a unos 15 mg/kg/día) basada en las diferencias en tasas metabólicas con el fin de lograr los mismos niveles de plasma o el mismo grado de efecto fisiológico. Los niveles requeridos pueden ser comparables a los usados en los trasplantes novorenales u otros (unos 8 +/- 3 mg/kg/día) en los que el nivel valle de unos 350+/-150 ng/ml fue logrado, *Physicians Desk Reference*, ed. 56 publicado por Medical Economics Co., Montvale, NJ, p 2381.

Por ejemplo, la dosis inicial del agente inmunosupresor de célula T puede estar a una dosis equivalente a al menos un 125% de la dosis estándar para inmunosupresión, al menos un 125% de la dosis estándar, o 200% de la dosis estándar, o más. En otras realizaciones, la dosis puede ser la dosis convencional, administrada más frecuentemente, por ejemplo, dos veces al día en lugar de a diario, etc. Una dosis convencional para tacrolimus oral es 0.2 mg/kg/día. Una dosis convencional para sirolimus es 2 mg/kg/día. Será apreciado por un experto en la técnica que la dosis estándar variará dependiendo del fármaco específico, del método de administración, es decir oral, intravenoso, etc., y del huésped.

Al final del periodo de dosis alta, la dosis del agente inmunosupresor de célula T será disminuida hasta el final del régimen de tolerización, en cuyo punto será interrumpida. Cualquier protocolo conveniente puede ser usado, por ejemplo dividiendo en dos la dosis cada semana o dos semanas.

La dosis alta será mantenida durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el tolerógeno sea tomado por células de tolerización, procesado y presentado en la superficie de célula, y para que las células T interactúen con tales células de tolerización, normalmente durante al menos dos semanas, más normalmente al menos unas tres semanas, y puede ser durante cuatro semanas o más. El nivel de dosis e intervalo de tiempo puede ser determinado para ser suficiente midiendo el título de anticuerpos usando un método tal como ELISA para evaluar el sérum o plasma del huésped en las semanas 6 a 8 en el régimen. Los huéspedes que no son tolerantes tendrán montada una respuesta inmunológica cerca del fin de la retirada gradual de los fármacos inmunosupresores. El periodo de tiempo para el que la dosis alta es necesaria puede incluir el periodo de condicionamiento, de manera que si hay un periodo de dos semanas de condicionamiento, entonces la dosis alta puede ser disminuida en breve después de la iniciación del régimen de tolerización.

Cuando un agente antiproliferativo se incluye en el régimen, será administrado en una dosis convencional mientras que el agente inmunosupresor de célula T se administra, normalmente durante al menos unas dos semanas, más usualmente al menos unas tres semanas, y puede ser durante cuatro semanas o más. Por ejemplo, la dosis estándar de azatioprina es desde 1 a 5 mg/kg/día, donde el extremo superior, desde unos 3 a 5 mg/kg/día se usa inicialmente, y la gama inferior, desde 1 a 3 mg/kg/día se da después del establecimiento del régimen. El agente antiproliferativo puede también darse cada dos semanas. Como se describe anteriormente para el agente inmunosupresor, el periodo de tiempo para el que la dosis inicial es necesaria puede incluir el periodo de condicionamiento, de manera que si hay un periodo de condicionamiento de dos semanas, entonces la dosis alta puede ser interrumpida en breve después del inicio del régimen de tolerización. Normalmente es preferible interrumpir la dosis, sobre el régimen de tolerización, por cualquier protocolo conveniente.

El tolerógeno se administra al menos dos veces, normalmente al menos unas cuatro veces, y puede ser administrado seis veces o más, durante el periodo de tolerización. El tolerógeno no será administrado durante el periodo de condicionamiento, si lo hay. En contraste con los agentes supresores, el tolerógeno se administrará menos frecuentemente, por ejemplo después de unos cuatro días, unos siete días, unos diez días. La administración semanal es conveniente.

La dosis de tolerógeno generalmente será inferior que la dosis terapéutica del antígeno correspondiente, y puede variar desde tanto como la dosis terapéutica normal del antígeno a tan poco como un 5% de la dosis terapéutica, un 10% de la dosis terapéutica, 50% de la dosis terapéutica. Donde el tolerógeno es polipéptido se administrará a una dosis de al menos unos 0,005 mg/kg/semana, normalmente al menos un 0,01 mg/kg/semana, más normalmente al menos unos 0,05 mg/kg/semana; y normalmente no más de alrededor de 1 mg/kg/semana. Sin embargo, se apreciará que la dosis específica dependerá de la ruta de administración, actividad del agente, etc.

La dosis del tolerógeno se eleva gradualmente para alcanzar dosis terapéuticas normales empezando después de unas tres semanas, normalmente después de unas cuatro semanas, y puede ser después de unas seis semanas u ocho semanas. Donde el tolerógeno y el antígeno no son idénticos, el paciente puede ser cambiado al antígeno después del régimen de tolerización, cuyo cambio puede incluir administrar una mezcla de los dos durante un periodo de tiempo.

El tolerógeno se administrará por cualquier ruta conveniente, normalmente de forma intravenosa, en una forma soluble. Más particularmente, el tolerógeno puede ser formulado por combinación con portadores farmacéuticamente aceptables apropiados y diluyentes, y puede ser formulado en preparaciones en formas sólidas, semisólidas,

líquidas o gaseosas, tales como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhaladores, geles, microesferas, y aerosoles. Como tales, la administración de los compuestos puede ser lograda de varias maneras, incluida la administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intraqueal, etc.

5 En formas de dosis farmacéutica, el tolerógeno puede ser administrado en forma de sales aceptables farmacéuticas. También pueden usarse en asociación apropiada con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son meramente ejemplares y no son en modo alguno limitativos. El tolerógeno puede ser formulado en preparaciones para inyecciones disolviéndolo, suspendiéndolo o emulsionándolo en un disolvente acuoso o no acuoso, tales como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifáticos mayores o propileno glicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizadores, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulgentes, estabilizadores y preservativos.

15 El término "forma de dosis de unidad", como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente farmacéuticamente aceptable, portador o vehículo. Las especificaciones para las formas de dosis de unidad de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y el efecto a ser logrado, y las farmacodinámicas asociadas con cada compuesto en el huésped.

20 Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, están fácilmente disponibles para el público. Lo que es más, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste y amortiguación, agentes de ajuste de tonicidad, estabilizadores, agentes de humedad están fácilmente disponibles para el público.

25 Los antígenos adecuados para los métodos de la invención incluyen un número de agentes terapéuticamente activos, particularmente polipéptidos, que pueden ser inmunológicamente activos, factores de crecimiento, hormonas, factores coagulantes, enzimas metabólicas, etc. ejemplos de proteínas terapéuticas de interés incluyen factores coagulantes de sangre, tales como Factor VIII; alfaglicosidasa; iduronidasa, anticuerpos terapéuticos tales como herceptina; deoxiribonucleasa; factor de crecimiento humano; insulina.

30 Donde el antígeno de interés es un autoantígeno, o donde el huésped ha sido previamente expuesto a un agente terapéutico, puede ser necesario extirpar algunas o todas las células inmunológicas maduras presentes en los pacientes. Tales métodos se conocen en la técnica, por ejemplo puede utilizar un agente inmunosupresor fuerte, por ejemplo ciclofosfamida, globulina antitímocito, irradiación de cuerpo total (TBI), etc.

40 Los autoantígenos de interés para la tolerización incluyen lo siguiente. El tolerógeno puede comprender uno o un coctel de autoantígenos. Para esclerosis múltiple, proteína proteolipídica (PLP); proteína mielina básica (MBP), proteína mielina oligodendrocita (MOG), fosfodiesterasa nucleótido cíclico (CNPasa); glicoproteína asociada de mielina (MAG), y proteína básica oligodendrocítica asociada de mielina (MBOP); alfa-B-cristalina (una proteína de golpe de calor); OSP (proteína específica de oligodendrocita; MBP modificada de citrulina (la isoforma C8 de MBP en la que seis argininas han sido desaminadas en la citrulina), etc.

45 Los autoantígenos en artritis reumatoide incluyen colágeno tipo II; hnRNP; A2/RA33; Sa; filagrina; keratina; citrulina; proteínas de cartilago incluido gp39; colágenos tipo I, III, IV; V, IX, XI; HSP-65/60; IgM (factor reumatoide); RNA polimerasa; hnRNP-B1; hnRNP-B1; hnRNP-D; cardiolipina; aldolasa A; filagrina y fibrina modificadas de citrulina.

50 Los autoantígenos en diabetes mellitus dependiente de insulina humana incluyen tirosina fosfatasa IA-2; IA-2 β ; ácido glutámico decarboxilasa (GAD) ambas formas de 65 kDa y 67 kDa; carboxipeptidasa H; insulina; proinsulina; proteínas de golpe de calor (HSP); glima 38; antígeno de célula islote de 69 kDa (ICA69); p52; dos antígenos gangliósido (GT3 y GM2-1); y en un transportador de glucosa de célula de islote (GLUT 2).

55 Los autoantígenos para la miastenia gravis pueden incluir epitopos dentro del receptor acetilcolina. Los autoantígenos meta en el pénfigo pueden incluir desmogleina-3. Los antígenos de síndrome de Sjogren pueden incluir SSA (Ro); SSB (La); y fodrina. El autoantígeno dominante para pénfigo puede incluir desmogleina-3.

60 El rechazo inmunológico de trasplantes de tejido, incluido el pulmón, corazón, hígado, riñón, páncreas, y otros órganos y tejidos, es mediado por respuestas inmunológicas en el receptor de trasplante dirigidas contra el órgano trasplantado. Los órganos trasplantados alogeneicos contienen proteínas con variaciones en sus secuencias de aminoácido cuando las comparas con las secuencias de aminoácido del receptor de trasplante. Como las secuencias de aminoácido del órgano trasplantado difieren de las del receptor de trasplante obtienen frecuentemente una respuesta inmunológica en el receptor contra el órgano trasplantado. El rechazo de órganos trasplantados es una gran complicación y limitación de trasplante de tejido, y puede causar fallo del órgano trasplantado en el receptor. La inflamación crónica que resulta del rechazo frecuentemente lleva a la disfunción en el

65 órgano trasplantado.

5 El tolerógeno para un receptor de trasplante destinado puede incluir uno o más antígenos de histocompatibilidad grandes, por ejemplo, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, etc., y puede comprender un cóctel de tales antígenos, donde los antígenos incluirán los que no coinciden entre el receptor y el donante. Como estas son proteínas de superficie de célula, la forma administrada puede ser una forma soluble, es decir una que está truncada en el campo de la transmembrana.

10 Mientras no se requiera, con el fin de mejorar la tolerancia después de cese de los agentes supresores, puede ser provista una dosis de mantenimiento del tolerógeno, donde la dosis de mantenimiento es proporcionada a una dosis equivalente a 0,056 mg/kg por semana o inferior en dosis, o de 1/10 esa dosis o inferior, o menos frecuente como en una vez al mes o una vez cada pocos meses o menos, o ambas dosis y frecuencia. En casos donde el tolerógeno es diferente del antígeno, el tolerógeno será usado para la fase de mantenimiento, si se requiere una fase de mantenimiento.

15 Los agentes utilizados en los métodos de la invención pueden ser proporcionados en un kit, el cual puede comprender además instrucciones para el uso. Tal kit comprenderá un tolerógeno que comprende un antígeno de péptido soluble que comprende o conjugado en una manosa-6-fosfato como una fracción de rápida absorción, normalmente en una dosis y forma adecuada para la administración al huésped. El kit comprenderá además un agente inmunosupresor de célula T, en una forma adecuada para la administración, y puede incluir además reactivos de evaluación para monitorizar los niveles en sangre del agente, y/o para determinación de supresión de actividad de célula T. Una agente antiproliferativo también se incluye, en una forma adecuada para la administración.

20 También se enseña aquí un kit para la conjugación de un antígeno, particularmente un antígeno polipéptido, en una fracción de rápida absorción, con el fin de generar una composición tolerogénica. Por ejemplo, una fracción tal como un grupo de manosa-6-fosfato, conjugada a un enlace adecuado para unir azúcares y polipéptidos, como se describe anteriormente, puede ser provista. La fracción de rápida absorción puede también ser provista en una forma no conjugada, en combinación con un enlace adecuado, e instrucciones de uso.

Ejemplos

30 Los siguientes ejemplo se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica ordinarios una divulgación y descripción completa de cómo hacer y usar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores ven como su invención ni está destinados a representar que los experimentos posteriores son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero algunos errores experimentales y desviaciones deberían ser tenidos en cuenta. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes por peso, peso molecular es peso molecular medio de peso, temperatura son grados centígrados, y presión es atmosférica o casi.

Experimental

40 EJEMPLO 1

Inducción de tolerancia en α -L-iduronidasa humana en perros MPS I y normales

45 La mucopolisacaridosis I es una enfermedad genética causada por mutaciones en el gen alpha-L-iduronidasa que lleva a una deficiencia en la enzima iduronidasa. Esta deficiencia lleva a un desorden de almacenamiento lisosomal multisistema progresivo que incluye rasgos faciales toscos, lengua grande, hígado y bazo grande, problemas respiratorios, problemas de corazón, rigidez de articulaciones y enfermedades óseas. La enfermedad lleva a la muerte en pacientes normalmente en la primera o segunda década de vida.

50 La enzima iduronidasa deficiente es una hidrolasa lisosomal que se adhiere al residuo de iduronida terminal de sulfato de heparán y dermatán. La enzima puede ser hecha en células recombinantes y es producida con un marcador de manosa-6-fosfato en carbohidratos unidos postranlacionalmente, que es importante para su absorción en las células. La terapia de remplazo de enzima ha sido propuesta como un método de tratamiento, en el que una forma recombinante de la enzima se administra intravenosamente, distribuye a los tejidos y es tomada en las células vía el receptor de manosa-6-fosfato. La terapia ha sido estudiada en perros y más recientemente en humanos (Kakkis et al. (2001) NEJM 344:182).

60 La administración de α -L-iduronidasa humana recombinante en perros MPS I o normales induce una respuesta inmunológica fuerte en la enzima (Shull *et al.* (1994) P.N.A.S.91:12937-12941; Kakkis *et al.* (1996) *Biochem Mol. Med* 58:156-167) que imita la observada en pacientes MPS I humanos. Estas respuestas pueden interferir con la eficacia de terapia de enzima. Para estudiar métodos para inducir tolerancia, se les administró a perros normales la proteína α -L-iduronidasa heterólogo bajo varias condiciones diseñadas para evitar una respuesta inmunológica activa y permitir la inducción de tolerancia. Los estudios demuestran que la dosis apropiada de ciclosporina y azatioprina, seguida por la administración semanal de la α -L-iduronidasa humana recombinante y la retirada gradual de fármacos inmunosupresores puede inducir tolerancia a la enzima que duraba al menos seis meses de administración de enzima semanal. Una dosis menos frecuente de ciclosporina, con o sin la adición de la adición de

inyección intratímica o anticuerpos monoclonales de anti célula T no tienen impacto en la inducción de tolerancia. La CsA sola en la dosis correcta sin la Aza no indujo tolerancia.

5 El régimen de tolerancia utilizó el tratamiento CsA+Aza (con dosis CsA a 25 mg/kg/día), junto con infusiones de tolerógeno en el horario mostrado en la figura 1. Los tratamientos adicionales indicados, tales como inyección intratímica y anticuerpos monoclonales, se muestran como ejemplos de tratamientos que no funcionaron o no mejoraron la inducción de tolerancia. Estos regímenes no efectivos se incluyen en los ejemplos para proporcionar contraste con la respuesta de esos caninos óptimamente tolerizados al antígeno por la invención.

10 Para regímenes inductores de no tolerancia que usan inyección intratímica o anticuerpos monoclonales pero no la dosis de 25 mg/kg/día de CsA, el día 4 es el día que los caninos reciben inyección intratímica. En el diagrama de régimen inferior (figura 1) para fármacos IT+, el canino recibe CsA+Aza de cero a cuatro días, y después recibe una inyección intratímica (IT Inj. O ITi). Si los cuerpos monoclonales son indicados, son dados en los días previos a la inyección IT. La dosis exacta realizada depende del experimento. En experimentos de tolerantes, los caninos
15 recibieron cada dos días CsA a 25 mg/kg en días alternos con la Aza. En experimentos de tolerización, los caninos recibieron a diario CsA con día alterno Aza. En ambos casos, la dosis administrada fue dividida en la secuencia descrita. Para caninos que reciben el régimen de tolerización, el diagrama de régimen describe el curso de tratamiento. El canino PA recibió CsA sólo, empezando 4 días antes de que las infusiones empiecen y reduciendo siguiendo el régimen de inducción de tolerancia superior.

20 Materiales y métodos

Animales. Caninos normales y MPS I fueron obtenidos de la colonia canina MPS I en Harbor-UCLA. Los perros son un cruce entre beagle y plott hound y una media de peso de 12 a 20 kg. Los caninos eran menores de dos años y al
25 menos tenían cuatro meses para estos experimentos.

Los caninos BI, BE, BC, BO, JA, JO, ME, MA, MO y PA fueron caninos normales o portadores desde la colonia canina MPS I y por lo tanto no están afectadas con MPS I, y recibieron una serie de regímenes diferentes que no indujeron tolerancia. Cuando CsA+Aza fueron parte del régimen, recibieron la CsA cada dos días. BI recibió la
30 inyección intratímica amortiguadora de fosfatos (ITI); BE y BC recibieron iduronidasa ITI; BO recibió CsA(qod)+Aza+ITI; JA, JO, ME, MA, y MO recibieron CsA+Aza, ITI y varios anticuerpos monoclonales que disminuyen células T maduras. PA recibió a diario dosis CsA pero al contrario que los perros se volvió tolerante, no recibió Aza.

35 Los caninos RH, RI, y Ro fueron caninos normales o portadores desde la colonia MPS I que recibieron al mínimo el régimen CsA+Aza que induce tolerancia y en el caso de RH y RI, también recibieron inyección intratímica. La CsA fue administrada a diario.

40 El canino RU es un perro afectado MPS I que recibió régimen de no tolerancia y sirvió como un control. Los caninos PE, SA y NI son perros afectados MPS I que recibieron el régimen de inducción de tolerancia de CsA+Aza.

Anticuerpos monoclonales. Una serie de anticuerpos monoclonales fueron obtenidos de Peter Moore (*UC Davis Veterinary School*) y fueron específicos para receptores de célula T caninos (anti-TCR), antígeno CD3 canino (anti-CD3; IgG2b) y el equivalente canino de Thy-1 (anti-Thy1; IgG1). El anticuerpo anti-TCR fue preparado cultivando la
45 hibridoma en suero bajo que contiene medio y purificación del anticuerpo mediante cromatografía de proteína A. Los anticuerpos anti-CD3 y anti-Thy1 fueron preparados por producción de ascitos en ratones usando las hibridomas, CA17.6B3 y CA1.4G8 y purificación de proteína A, en un laboratorio de contrato (Strategic Biosolutions). Cuando fueron utilizados, los anticuerpos monoclonales fueron administrados en 2 ó 3 dosis justo previos a ITI.

50 *Fármacos inmunosupresores.* La ciclosporina (Neoral o Sandimmune) y Azatioprina (Imuran) fueron obtenidas de una farmacia local. Ambos fármacos fueron dosificados oralmente en la dosis y frecuencia anotada en los experimentos. Los dos regímenes probados se muestran inmediatamente debajo.

Régimen de fármaco inmunosupresor con dosis de CsA diaria que induce tolerancia:

55 CsA Neoral® 25mg/kg/día dividida vía oral dos veces al día

CsA+Aza dado a plena dosis desde el día 0 a 32, ½ dosis desde el día 33 a 36, y ¼ la dosis desde 47 a 60, y
60 después terminado.

Animales monitorizados para reacciones adversas

Pico de CsA y niveles valle están monitorizados y dosis ajustada para mantener un nivel valle objetivo de 400-500 ng/ml en la circulación

65 Régimen de fármaco inmunosupresor con dosis de CsA cada dos días que no induce tolerancia:

CsA Neoral® 25mg/kg/cada dos días dividida vía oral dos veces al día

Aza Imuran® 5 mg/kg cada dos días en días alternos desde CsA

5 CsA+Aza dado a plena dosis desde el día 0 a 18, ½ dosis desde el día 19 a 32, y ¼ la dosis desde 33 a 46, y después terminado.

Animales monitorizados para reacciones adversas

10 Pico de CsA y niveles valle monitorizados y un nivel valle de 100-200 ng/ml en la circulación.

15 *Inyección intratímica.* Durante la anestesia general se hizo una incisión de 7'6 cm en el lado izquierdo en el tercer espacio intercostal. La incisión fue continuada por todas las capas de los músculos hasta que se alcance la cavidad del pecho. Fue empleado un separador de costillas y el timus fue observado directamente como un órgano lobulado y vascularizado bajo los pulmones. La solución de enzima fue inyectada en el timus con una jeringa y una aguja 25 G. Se hizo un patrón de "zig-zag" cuando se insertó la aguja en el timus en un intento de evitar una pérdida de enzima al retirar la aguja. El timus fue inspeccionado visualmente para que cualquier pérdida de solución de enzima se hiciese visible mediante tinte azul de Evan. El lugar de cirugía fue cerrado y la función respiratoria restablecida

20 usando el vacío retirado a través de un catéter Foley insertado en la cavidad del pecho. Se aplicaron antibióticos en todos los sitios de incisión y la cirugía fue seguida de un curso corto de antibióticos y medicación para el manejo de dolor cuando fue necesario.

25 Solución de inyección, 1,5 mL total: 1 mg/kg de 12,1 mg/mL de iduronidasa (3×10^6 U/mL). Llévase a 1,5 mL con 40% PEG+2 mg/mL tinte azul de Evan en PBS ácido (solución final aproximadamente 6% PEG, 0,3 mg/mL de Evan).

30 *Infusiones de enzima.* La iduronidasa se prepara de una forma altamente purificada y se ha demostrado que tiene potencial de rápida absorción con la mitad de la absorción máxima en los fibroblastos Hurler en una concentración de enzima de alrededor de un nanomolar ($K_{\text{absorción}}$) y una especificación de absorción menor de 3,3 nanomolares. Para infusiones tolerogénicas, 14000 U/kg/semana de α -L-iduronidasa en infusión de 50 mL en solución salina con 1 mg/mL de albúmina canina, y 10 mM NaPO₄ fue administrado intravenosamente durante dos horas (1ª hora 3000 U/kg/hr; 2ª hora 11000 U/kg/hr). Animales monitorizados para una reacción anafiláctica. 250000 U es igual a 1 mg de proteína.

35 Resultados

40 La línea básica del plan experimental se muestra en la figura 1. La cohorte entera de perros fue pretratada con fármacos inmunosupresores, seguido de una inyección IT si fue programada, y después empezando dos semanas después, una serie de estímulos semanales de iduronidasa. Los caninos recibieron tanto el régimen de inducción de no tolerancia con CsA cada dos días (véase regímenes anteriormente) con o sin otros tratamientos (inyección intratímica, anticuerpos monoclonales), como el régimen de inducción de tolerancia con dosis de CsA diarias con o sin los otros tratamientos. Un perro, PA recibió la dosis CsA diaria pero no Aza.

45 Se inició a los caninos en fármacos inmunosupresores en el día 0, equivalente a 18 días previos al primer estímulo de enzima. Si se programó, los caninos recibieron anticuerpos monoclonales por infusión intravenosa (2-5 mg) justo previo a ITI. En el día 4, los perros recibieron, si se programó una inyección intratímica de iduronidasa de 1 mg/kg. Dos semanas después, se empezó con los perros en un horario semanal de infusiones de enzima de iduronidasa que consiste en una infusión intravenosa semanal de 14000 U/kg (0,056 mg/kg/semana) de iduronidasa recombinante humana. La dosis de CsA y Aza fue dividida en dos cada dos semanas como se señala en los

50 materiales y métodos como se indica.

Después de seis a ocho semanas de estímulos de enzima, los caninos que recibieron el protocolo óptimo de CsA (diario)+Aza con o sin inyección ITI (símbolos abiertos de la figura 2), fueron tolerantes a la iduronidasa mientras que los perros que reciben otros regímenes tuvieron respuestas inmunológicas fuertes como fue evaluada por ELISA (símbolos cerrados de la figura 2). El canino RO tolerante de iduronidasa fue continuado en estímulos de enzima semanales durante seis meses sin inducción de un título ELISA significativo a la iduronidasa.

60 El título de anticuerpos en la iduronidasa en los caninos no tolerantes y tolerantes se muestra en la tabla 1. Solo los caninos que completaron al menos doce semanas se incluyen en la tabla; los caninos no tolerantes BE, BI, BC y BO fueron parados a las siete semanas con títulos ya de sérum de 21-74 OD/ μ l. Los caninos no tolerantes tuvieron inducción de 181 veces desde un nivel de vaselina de 0,8 en un nivel de inducción medio de 144,6 unidades ELISA OD por microlitro de sérum. Los perros tolerantes tuvieron un incremento de título de 13 veces, desde un inicial de 0,4 en vaselina a 5,2 después de tratamiento con iduronidasa. Los perros no tolerantes tuvieron una inducción ~28 veces mayor de anticuerpos en la iduronidasa que los perros tolerantes. Un perro NI tuvo el mayor título en el grupo

65 tolerante de 13,8. Este perro vomitó la dosis CsA en múltiples ocasiones lo que puede explicar la inducción menos completa de tolerancia, y además soporta la naturaleza crítica de la dosis de CsA. PA recibió la dosis diaria preferida

de CsA pero no recibió Aza y no la tolerizó. Aunque dos de los perros normales tolerantes, RH y RI, también recibieron inyección intratímica, la inyección no fue necesaria como la tolerancia mostró en el canino RO mostrado.

Tabla 1

5 Respuesta inmunológica en caninos tolerantes y no tolerantes

		Título de anticuerpo en iduronidasa (sérum no diluido de unidades OD/ μ L)				
	Canino	Tratamiento	Pre-tratamiento	Media	Post-tratamiento	Media
No tolerante (CsA cada dos días más otros tratamientos)	JA	(CsA+Aza+ITI+TCR mAb)	0	0,8	230,7	144,6
	JO	(CsA+Aza+ITI+TCR mAb)	2,6		101,2	
	ME	(CsA+Aza+ITI+TCR mAb)	0,3		60,2	
	MA	(CsA+Aza+ITI+CD3/Thy1/TCRmAb)	1,5		120,8	
	MO	(CsA+Aza+ITI+CD3/Thy1/TCRmAb)	0		377,9	
	PA	(CsA)	0,3		64,4	
	RU	(Sin control de fármaco afectado de MPS I)	1,2		56,7	
	RH	(CSA (diario)+Aza+ITI)	0,3	0,4	8,7	5,2
	RI	(CSA (diario)+Aza+ITI)	0,3		0,5	
	RO	(CSA (diario)+Aza)	0,2		0,7	
	PE	(CSA (diario)+Aza+afectado de MPS I)	0,6		0,8	
	SA	(CSA (diario)+Aza+afectado de MPS I)	0,4		6,8	
	NI	(CSA (diario)+Aza+afectado de MPS I)	0,8		13,8	

10 En la tabla 1, el título de anticuerpos en la iduronidasa para seis caninos tolerantes y siete caninos no tolerantes se muestra como sérum no diluido unidades OD/ μ L como se mide mediante ELISA. Los caninos recibieron el fármaco u otros tratamientos como se describió en el ejemplo 1, y se les fue administrada iduronidasa. Todos los caninos recibieron estímulos intravenosos de iduronidasa de 0,056 mg/kg/semana. Los valores pretratamiento ELISA representan niveles de anticuerpos de sérum en la semana 12 de estímulo de enzima, o en el último punto medido (ME, MA, MO en la semana 11; PA en la semana nueve). Los títulos de anticuerpos postratamiento medios para caninos tolerantes (5,2 OD/microlitro) es 1/25 el título de caninos no tolerantes (144,6 OD/microlitro).

15 La respuesta enormemente reducida en la iduronidasa en los perros tolerantes ocurre después del hecho de que los perros estuviesen sin todos los fármacos inmunosupresores al final de la semana 6. El título en los perros de tolerancia permaneció bajo durante varios meses y fue estudiado en RO y SA durante seis meses de infusiones semanales (figura 2). Los intentos de inducir tolerancia en otro ovalbúmina de antígeno con oligosacáridos N-ligados terminados de manosa no tuvo éxito. Estos datos sugieren que la absorción rápida y el receptor ampliamente presente de manosa-6-fosfato puede ser requerido o que la absorción mediada de receptor de manosa no es suficiente para el tolerógeno para inducir tolerancia exitosamente.

25 *Inducción de tolerancia en una proteína terapéutica ha sido lograda en caninos.* Los caninos tratados con un régimen óptimo de CsA y Aza mostraron una respuesta inmunológica dramáticamente reducida a infusiones semanales de enzima iduronidasa que duró al menos de 4 a 6 semanas. La tolerancia no depende de otros reagentes o procedimientos tales como anticuerpos monoclonales o inyección intratímica. El estado tolerante es mantenido en la ausencia de fármacos inmunosupresores durante al menos seis meses.

30 La diferencia clave entre los perros tolerantes y los otros perros fue el uso de CsA diario. CsA sola, sin embargo, no fue suficiente en perros, mientras que el canino PA no tolera usar a diario CsA sola. Los fármacos inmunosupresores solos no pueden inducir tolerancia en perros, y el uso de infusiones de antígeno bajo la cubierta protectora de fármacos inmunosupresores es una parte clave del protocolo de tolerancia. La enzima está siendo presentada probablemente como un antígeno de tolerización mientras que las células T que podrían ser activadas son retenidas mediante los fármacos.

35 Otras partes del régimen estaban destinadas a mejorar las posibilidades de inducir tolerancia pero no tuvieron efecto. La inyección intratímica fue diseñada para presentar el antígeno en un sitio que se sabe que es tolerogénico, pero este no tuvo efecto y si tuvo alguno, fue llevado a respuesta inmunológica temprana. Parece que tal presentación periférica y tolerización en este modelo es más efectiva.

40 Los anticuerpos monoclonales en marcadores de célula T tampoco contribuyeron a la tolerancia. Estos monoclonales fueron destinados para disminuir tanto como el 90% de células T maduras de la circulación como se ha mostrado en experimentos piloto, pero su uso no añadió, y no fue requerida, tolerancia.

45 Mientras que el canino huésped podría haber sido un factor importante, de hecho, tolerancia en iduronidasa humana se indujo en caninos normales con iduronidasa endógena así como en caninos afectados de MPS I sin iduronidasa endógena.

EJEMPLO 2

Inducción de tolerancia en iduronidasa terapéutica en perros afectados de MPS I y mantenimiento de tolerancia durante altas infusiones de dosis terapéutica

5 La inducción de tolerancia debe evitar una respuesta inmunológica clínicamente significativa en la proteína terapéutica para ser útil en la clínica. Los caninos MPS I en terapia de remplazo de enzima con respuesta de iduronidasa con anticuerpos de título alto que retrasan la liberación o alteran la estabilidad de la enzima, evitan la absorción de la enzima y limitan probablemente la eficacia de la terapia de enzima. Se ha informado del mismo fenómeno en otros modelos de animal.

15 Para estudiar si los caninos MPS I inexpertos pueden ser tolerizados en la iduronidasa y subsiguientemente recibir altos niveles terapéuticos de dosis de enzima semanalmente, una serie de cuatro perros afectados de MPS I fueron tolerizados (tres perros) o mantenidos como control (un perro). Después de doce semanas, los caninos tolerantes recibieron una dosis semanal incrementada de iduronidasa y finalmente recibieron al menos seis semanas de dosis terapéuticas de enzima, sin una respuesta inmunológica significativa. El perro de control no tolerante tuvo un título rápidamente elevador en la enzima como se ha observado previamente y las infusiones se terminaron en la semana 16 debido a una reacción anafiláctica.

20 Materiales y métodos

Animales. Los perros MPS I fueron obtenidos de la colonia canina MPS I en Harbor-UCLA. Los perros son un cruce entre beagle y plott hound y una media de peso de 12 a 20 kg. Los caninos eran menores de dos años y al menos tenían cuatro meses para estos experimentos.

25 *Fármacos inmunosupresores.* La ciclosporina (Neoral o Sandimmune) y Azatioprina (Imuran) fueron obtenidas de una farmacia local. Ambos fármacos fueron dosificados oralmente en la dosis y frecuencia anotada en los experimentos. El régimen probado se muestra inmediatamente debajo.

30 El régimen de fármaco inmunosupresor con dosis de CsA diaria que induce tolerancia: este régimen fue como se describió en el ejemplo 1.

35 *Infusiones de enzima.* La iduronidasa recombinante se prepara de una forma altamente purificada y se ha demostrado que tiene potencial de rápida absorción con la mitad de la absorción máxima en los fibroblastos Hurler en una concentración de enzima de alrededor de un nanomolar ($K_{\text{absorción}}$) y una especificación de absorción menor de 3,3 nanomolares. A los caninos se les administró 14000 U/kg/semana de α -L-iduronidasa o dosis mayor mientras la dosis fue aumentada, en una infusión de 50 mL en solución salina con 1 mg/mL de albúmina canina, y 10 mM NaPO₄, PH 5.8. Administrado intravenosamente durante dos horas (1^a hora 3000 U/kg/hr; 2^a hora 11000 U/kg/hr, o una mayor tasa en la 2^a hora dependiendo de la dosis). Los animales fueron monitorizados para una reacción anafiláctica.

Resultados

45 La inducción de tolerancia en tres perros MPSI pero no un perro MPS I de control. Tres perros MPS I fueron tolerizados usando el régimen de tolerancia incluidos 18 días de CsA+Aza previos a iniciar infusiones de enzima semanales. Un perro MPS I sirvió como control y no recibió el régimen de tolerancia. Los cuatro caninos recibieron infusiones de iduronidasa intravenosa de 0,056 mg/kg/semana en las semanas 1 a 12. El título de anticuerpos en la iduronidasa en los tres perros MPS I tolerantes (figura 3; símbolos abiertos) y un perro MPS I tolerante (figura 3; símbolos cerrados) se muestran como medidos por ELISA. Los niveles de anticuerpos bajos (<20 OD) con estímulo de antígeno continuado indican tolerancia. El régimen de fármaco de tolerización (CsA+Aza) termina en la semana 7 de estímulo de enzima y niveles de anticuerpos bajos más allá de este punto son indicativos de tolerancia inducida.

55 Los perros MPS I tolerantes son tolerantes en terapia de enzima de dosis terapéutica completa. Los cuatro caninos MPS I recibieron un incremento escalonado en dosis de iduronidasa durante tres semanas de dosis terapéuticas de 0,500 mg/kg/semana en la semana 15 de estímulo de enzima. Esta es la misma dosis usada en ensayos terapéuticos previos en los perros MPS I y se usa en terapia de enzima MPS I humana (Kakkis *et al* 2001, *supra*). Los niveles de anticuerpos en caninos tolerantes permanecieron <20 unidades OD en la semana 15 comparado con niveles de anticuerpos RU de control de >500 unidades OD en la semana 15 en respuesta a la dosis de antígeno en aumento. Dos caninos MPS I previamente tratados con esta dosis de enzima (0,5 mg/kg/semana) tuvieron títulos de 1800 y 2000 en la semana 14 de terapia de enzima por comparación.

En la semana 16, el canino RU no tolerante tuvo una reacción anafilactoide clínica seria durante la infusión y se terminó el tratamiento. Los caninos tolerantes no mostraron reacciones anafilactoides durante las infusiones.

65 Los perros MPS I completamente deficientes en la iduronidasa de antígeno, canino o humano, pueden ser tolerizado en la reproductibilidad de proteína de iduronidasa humana. Estos perros tolerantes también pueden recibir dosis

terapéuticas completas de enzima sin una respuesta inmunológica significativa. Este resultado indica que la tolerancia inducida es robusta y puede proteger a un perro de niveles mayores de exposición a un antígeno incluidos niveles que podrían ser esperados durante la administración de proteína terapéutica.

5 EJEMPLO 3

Inducción de tolerancia en alfa-glucosidasa

10 La inducción de tolerancia en infusiones de iduronidasa ha sido demostrada en perros normales y MPS I usando un régimen de CsA+Aza diario, seguido de infusiones semanales de antígeno de tolerización mientras reduce los fármacos inmunosupresores. Para demostrar que la tolerancia puede ser inducida en otra enzima con características de absorción de gran afinidad, la alfa-glucosidasa humana recombinante fue preparada y estudiada con el régimen de tolerancia. Dos caninos normales fueron estudiados, uno con el régimen de tolerancia y otro de control. Las infusiones semanales con glucosidasa empezaron y a la semana 3, el perro de control tuvo un título inmunológico creciente. A la semana 5, el perro de control un título mayor de 100 veces, y el perro tratado tuvo un título no significativo. Los datos muestran que el régimen de tolerancia puede ser usado exitosamente con otros antígenos.

Materiales y métodos

20 *Animales.* Los perros MPS I fueron obtenidos de la colonia canina MPS I en Harbor-UCLA. Los perros son un cruce entre beagle y plott hound y una media de peso de 12 a 20 kg. Los caninos eran menores de un año y al menos tenían cuatro meses para estos experimentos.

25 *Fármacos inmunosupresores.* La ciclosporina (Neoral o Sandimmune) y Azatioprina (Imuran) fueron obtenidas de una farmacia local. Ambos fármacos fueron dosificados oralmente en la dosis y frecuencia anotada en los experimentos. El régimen probado se muestra inmediatamente debajo.

Régimen de fármaco inmunosupresor con dosis de CsA diaria que induce tolerancia:

30 CsA Neoral® 25mg/kg/día dividida vía oral dos veces al día

Aza Imuran® 5 mg/kg vía oral cada dos días

35 Dosis divididas para todos los fármacos cada dos semanas después de la primera infusión de enzima

Animales monitorizados para reacciones adversas

40 Pico de CsA y niveles valle fueron monitorizados para mantener un nivel valle objetivo de 400-500 ng/ml en la circulación

45 *Infusiones de enzima.* La alfa-glucosidasa recombinante se prepara de una forma altamente purificada y se ha demostrado que tiene potencial de rápida absorción con la mitad de la absorción máxima en los fibroblastos Hurler en una concentración de enzima de alrededor de 1 nanomolar ($K_{\text{absorción}}$) y una especificación de absorción menor de 3,3 nanomolar. Las infusiones fueron realizadas alfa-glucosidasa humana recombinante de 0,056 mg/kg/semana en una infusión de 50 mL en solución salina y 10 mM NaPO₄, PH 5.8. Las infusiones fueron administradas intravenosamente durante dos horas (1ª hora 21% del total de la dosis; 2ª hora el balance de la enzima). Los animales fueron monitorizados para una reacción anafiláctica.

Resultados

50 El canino ST de control recibió tratamiento sin fármaco y empezó recibiendo alfa-glucosidasa mediante infusiones intravenosas semanales. Durante tres semanas, un título significativo fue detectado y el título incrementado a más de 100 unidades OD por microlitro de sérum en la semana 4. Subsiguientemente, el título en una gama entre casi 100-200 unidades por microlitro de sérum. En contraste, el canino SC recibió el régimen CsA+Aza y tuvo una respuesta inmunológica mínima si la tuvo durante doce semanas de infusiones. Esto incluye las semanas 7 a 12 en las que no se administraron fármacos inmunosupresores.

60 El régimen de CsA+Aza con infusiones de antígeno de tolerización semanalmente puede inducir tolerancia en otros antígenos. El resultado demuestra la utilidad más amplia del régimen y protocolo de antígeno de tolerización induciendo un profundo estado de tolerancia inmunológica. En particular, se ha informado de la respuesta inmunológica en la alfa-glucosidasa para inhibir o limitar la utilidad de la terapia de remplazo de enzima en pacientes de Pompe. Este resultado demuestra la utilidad del régimen de tolerancia en evitar una respuesta inmunológica a esta proteína terapéutica.

65

EJEMPLO 4

La inducción de tolerancia depende de la dosis de CsA

- 5 El trabajo anterior en desarrollar un protocolo de tolerancia centrado en una combinación de inyección intratímica, fármacos inmunosupresores y anticuerpos monoclonales disminuidores de célula T madura. Se pensó que una combinación completa de expresión de antígeno de tolerización (inyección intratímica), la supresión de respuestas de célula T específica de antígeno madura (CsA y Aza) así como la disminución de células T maduras capaz de responder al antígeno, fue necesaria para bloquear una respuesta inmunológica de activación y preparar el sistema
- 10 inmunológico para aceptar la exposición de antígeno. Durante el desarrollo de este trabajo, un canino JH se volvió tolerante aunque el canino recibió sólo ITI y CsA+Aza. Análisis adicionales de este canino demostraron que su metabolismo de CsA llevó a niveles de sérum de CsA substancialmente mayores. Este descubrimiento se convirtió en el resultado central que permitió experimentos adicionales en la inducción de tolerancia con los fármacos inmunosupresores y tolerógenos sólo.

- 15 Materiales y métodos

Animales. Los caninos normales y MPS I fueron obtenidos de la colonia canina MPS I en Harbor-UCLA. Los perros son un cruce entre beagle y plott hound y una media de peso de 12 a 20 kg. Los caninos eran menores de dos años y al menos tenían cuatro meses para estos experimentos.

Anticuerpos monoclonales. Una serie de anticuerpos monoclonales fueron obtenidos de Peter Moore (*UC Davis Veterinary School*) y fueron específicos para receptores de célula T caninos (anti-TCR), antígeno CD3 canino (anti-CD3; IgG2b) y el equivalente canino de Thy-1 (anti-Thy1; IgG1). El anticuerpo anti-TCR fue preparado cultivando la

25 hibridoma en sérum bajo que contiene medio y purificación del anticuerpo mediante cromatografía de proteína A. Los anticuerpos anti-CD3 y anti-Thy1 fueron preparados por producción de ascitos en ratones usando las hibridomas, CA17.6B3 y CA1.4G8 y purificación de proteína A, en un laboratorio de contrato (Strategic Biosolutions). Cuando fueron utilizados, los anticuerpos monoclonales fueron administrados en 2 ó 3 dosis justo previas a ITI.

30 *Fármacos inmunosupresores.* La ciclosporina (Neoral o Sandimmune) y Azatioprina (Imuran) fueron obtenidas de una farmacia local. Ambos fármacos fueron dosificados oralmente en la dosis y frecuencia anotada en los experimentos. El uso de Neoral o Sandimmune fue evaluado como un factor en si la tolerancia fuera inducida o no se encontró que fuese factor.

35 Régimen de fármaco inmunosupresor con dosis de CsA cada dos días que no induce tolerancia:

CsA Neoral® 25mg/kg/cada dos días dividida vía oral dos veces al día

Aza Imuran® 5 mg/kg cada dos días en días alternos desde CsA

40 CsA+Aza dado a plena dosis desde el día 0 a 18, ½ dosis desde el día 19 a 32, y ¼ la dosis desde 33 a 46, y después terminado.

Animales monitorizados para reacciones adversas

45 Pico de CsA y niveles valle monitorizados y un nivel valle de 100-200 ng/ml en la circulación.

Inyección intratímica. Durante la anestesia general se hizo una incisión de 7'6 cm en el lado izquierdo en el tercer espacio intercostal. La incisión se continuó por todas las capas de los músculos hasta que se alcance la cavidad del

50 pecho. Fue empleado un separador de costillas y el timus observado directamente como un órgano lobulado y vascularizado bajo los pulmones. La solución de enzima fue inyectada en el timus con una jeringa y aguja 25 G. Se hizo un patrón de "zig-zag" cuando se insertó la aguja en el timus en un intento de evitar una pérdida de enzima al retirar la aguja. El timus fue inspeccionado visualmente para que cualquier pérdida de solución de enzima se hiciese visible mediante tinte azul de Evan. El lugar de cirugía fue cerrado y la función respiratoria restablecida usando vacío

55 retirado a través de un catéter Foley insertado en la cavidad del pecho. Se aplicaron antibióticos en todos los sitios de incisión y la cirugía fue seguida de un curso corto de antibióticos y medicación para el manejo de dolor cuando fue necesario.

Solución de inyección, 1,5 mL total: 1 mg/kg de 12,1 mg/mL iduronidasa (3x10⁶ U/mL). Llévase a 1,5 mL con 40% PEG+2 mg/mL tinte Evans Blue en PBS ácido (solución final aproximadamente 6% PEG, 0,3 mg/mL Evans). Inyección de enzima: 14000 U/kg/semana de α -L-iduronidasa en una infusión de 50 mL en solución salina con 1 mg/mL de albúmina canina, y 10 mM NaPO 4 administrado intravenosamente durante dos horas (1^a hora 3000 U/kg/hr; 2^a hora 11000 U/kg/hr). Los animales fueron monitorizados para una reacción anafiláctica.

65

Resultados

Los experimentos de tolerancia anteriores incluída la dosis de CsA en un intervalo cada dos días. Estos experimentos anteriores buscaron establecer si ITI, fármacos inmunosupresores y/o anticuerpos monoclonales que disminuyen células T son requeridos para la inducción de tolerancia. La figura 5 muestra los resultados para algunos caninos estudiados antes usando ITI y fármacos.

BI es un perro de control que recibió un ITI de PBS sólo, y BE y BC fueron dos perros tratados con ITI de iduronidasa. Ninguno de los tres fue tolerante mientras que los títulos excedieron 20 por siete semanas. BO recibió cada dos días CsA+Aza en adición a ITI y tampoco fue tolerante con un título de 42 por siete semanas. JA y JO tuvieron el mismo régimen pero adicionalmente, un anticuerpo monoclonal anti-TCR fue infundido previamente al ITI para determinar si disminuir células T podría permitir la inducción de tolerancia. Ambos caninos montaron respuestas inmunológicas y alcanzaron títulos de 148 y 135 por doce semanas. Curiosamente, el perro JH de control no montó una respuesta inmunológica incluso cuando tuvo CsA+Aza y protocolo ITI que previamente no había funcionado con BO. La tolerancia incluyó un periodo de título modesto en la iduronidasa alcanzando un pico de 15,1 en la semana 1 y después disminuyendo a 7,1 en la semana 18.

La evaluación de los niveles CsA de rutina mostraron un patrón que explica este resultado. La mayoría de los perros con CsA cada dos días tuvo niveles valle de 60-190 ng/ml aunque un perro (JO) alcanzó 342 (tabla 2). Ninguno de estos perros fue tolerante. JH tuvo un nivel de 570 que excedió a los otros perros por al menos 200 ng/ml. El perro recibió el régimen correcto basado en una reseña de los archivos de caja y administración de fármacos y todavía el nivel era mucho mayor.

JH fue tolerizado en infusiones de iduronidasa usando un régimen de CsA+Aza e ITI. Curiosamente, tuvo un nivel mucho más alto de CsA en su sérum que sugirió que el nivel de CsA podría ser un factor crítico. Siguiendo este experimento, el trabajo adicional en dosis CsA demostró que la dosis de CsA diaria podría mantener los niveles through sobre 400 ng/ml y que esto, con dosis de Aza cada dos días, fue suficiente para inducir tolerancia.

Tabla 2

Comparación de niveles de sangre valle de ciclosporina en caninos no tolerantes a la iduronidasa y tolerantes a la iduronidasa

	Canino	Tratamiento	Nivel de CsA valle (ng/mL)	Media
No tolerante (CsA cada dos días más otros tratamientos)	BO	(CsA+Aza+ITI)	190	148
	JA	(CsA+Aza+ITI+TCR mAb)	63	
	ME	(CsA+Aza+ITI+TCR mAb)	60	
	MA	(CsA+Aza+ITI+CD3/Thy1/TCR mAb)	120	
	MO	(CsA+Aza+ITI+CD3/Thy1/TCR mAb)	110	
Tolerante (CsA cada dos días más otros tratamientos)	JH	(CsA+Aza+ITI)	570	
Tolerante (Régimen de fármaco de tolerancia: CsA diario más Aza)	RH	(CsA (diario)+Aza+ITI)	520	545
	RI	(CsA (diario)+Aza+ITI)	450	
	RO	(CsA (diario)+Aza)	680	
	PE	(CsA (diario)+Aza, afectado de MPS I)	440	
	SA	(CsA (diario)+Aza, afectado de MPS I)	520	
	NI	(CsA (diario)+Aza, afectado de MPS I)	660	
No tolerante(CsA diario, no Aza)	PA		490	

En la tabla 2, los niveles en sangre valle de ciclosporina para caninos tolerantes y no tolerantes se muestran como sangre ng/mL. Los niveles de ciclosporina fueron medidos después de al menos cuatro dosis consecutivas de ciclosporina. PA recibió tratamiento de ciclosporina a diario empezando cuatro días antes del estímulo de iduronidasa inicial y no fue tolerizado en la iduronidasa. Todos los otros caninos recibieron fármacos inmunosupresores empezando 18 días antes del estímulo de iduronidasa intravenoso (cuatro días antes de ITI). Todos los caninos recibieron estímulos intravenosos de iduronidasa rh de 0,056 mg/kg/semana. La tolerancia exitosa en iduronidasa fue asociada consistentemente con niveles valle de ciclosporina de 400-700 ng/mL. Los caninos con niveles valle de ciclosporina menores de 400 ng/mL no fueron tolerizados en la iduronidasa. (CsA=Ciclosporina A; Aza= Azatioprina; ITI=inyección intratímica de iduronidasa; mAb=anticuerpo monoclonal).

La tabla 2 muestra datos adicionales de otros perros tolerizados corroborando el rol de dosis de CsA en el régimen de tolerización. Los perros no tolerantes en la sección superior de la tabla recibieron CsA cada dos días a 25 mg/kg y los seis perros tratados con fármacos con o sin otros tratamientos tuvieron niveles de CsA valle de 60-190 ng/ml, con un caso JO a 342 ng/ml. Estos niveles se toman después de que al menos cuatro dosis de los fármacos hayan sido dadas durante el régimen. El nivel de CsA medio de los perros no tolerantes es 148 ng/ml. En la tercera sección, los perros tolerantes tuvieron niveles de CsA valle de 440-680 y un medio de 545 ng/ml, más de 3 veces más alto. JH tuvo niveles mostrados en la segunda sección de la mesa de 570 ng/ml y aunque su dosis fue solo

cada dos días, el nivel era lo bastante alto y se volvió tolerante. En contraste, PA mostrado en la cuarta sección de la tabla tuvo un nivel de CsA adecuado de 490, pero no tuvo Aza también, no llegó a ser tolerante. Estos datos demuestran la importancia de un efecto de CsA adecuado en el protocolo de tolerancia.

5 EJEMPLO 5

La inducción de tolerancia es duradera sin estimulación de tolerógeno crónico

10 La inducción de tolerancia por un tolerógeno es particularmente útil si el estado tolerante es duradero, incluso en la ausencia de la administración de tolerógeno. Para dirigir la estabilidad del estado tolerante, los caninos que fueron tolerantes y no tolerantes fueron retenidos durante intervalos variados de tiempo y después reestimulados con infusiones de iduronidasa. Los datos muestran que durante al menos seis meses, un animal tolerante permanece tolerante a la infusión de iduronidasa incluso sin exposición de tolerógeno o antígeno continua.

15 Métodos y materiales

La tolerancia fue inducida como se describió en los ejemplos anteriores para cada canino anotado (se usan las mismas iniciales). JO fue el canino tolerizado con dosis de CsA cada dos días, a diferencia de otros caninos. Este canino no tuvo tolerancia completa inicialmente sino una respuesta de anticuerpos débil. Otros caninos de tolerancia fueron totalmente tolerantes basados en estudios descritos en otros ejemplos. La iduronidasa fue la misma iduronidasa de absorción rápida como se describe anteriormente. Los caninos fueron estimulados con 0,58 mg/kg de enzima administrada intravenosamente semanalmente para 3 a 6 dosis.

Resultados y discusión

25 En la figura 6, los títulos de caninos que fueron tolerantes o no tolerantes son mostrados con un hueco indicado durante el periodo en el que ocurrieron infusiones terapéuticas o de no tolerógeno. Como poco cinco semanas y como mucho seis meses de interrupción de tolerógeno no cambiaron la respuesta de los perros tolerantes, que permanecieron tolerantes y no montaron una respuesta inmunológica significativo. El perro no tolerante RU mostro
30 una inducción >20 veces en título de anticuerpos después de recibir dos dosis de enzima después de una interrupción de 4,5 meses. El perro JH mostro algunas respuestas en tres semanas de reinducción que excedieron la de la mayoría de perros tolerantes pero no alcanzaron la de un perro RU no tolerante sensibilizado. JH también tuvo una respuesta más significativa cuando fue estimulado originalmente y no era tan tolerante como los perros tolerizados con el régimen óptimo. Su patrón de título original también se estabilizó y decayó con infusiones
35 continuadas, que será estudiado en este caso.

Estos casos demuestran que la tolerancia inducida por los métodos y las composiciones de la presente invención son duraderos y clínicamente útiles.

40 EJEMPLO 6

Inducción de tolerancia en humanos

Materiales y métodos

45 *Pacientes.* Se seleccionan pacientes con mucopolisacaridosis para el tratamiento. Los pacientes son evaluados en la línea de base y en 6, 12, 26 y 52 semanas por examinación clínica detallada, imagen de resonancia magnética del abdomen y cerebro, ecocardiograma, medidas de gama de moción, polisomnografía, evaluaciones de laboratorio clínico, medidas de actividad de α -L iduronidasa de leucocito, y excreción de glicosaminoglicano urinaria.

50 *Fármacos inmunosupresores.* La ciclosporina (Neoral o Sandimmune) y Azatioprina (Imuran) se obtienen de una farmacia local. Ambos fármacos se dosifican oralmente en la dosis y frecuencia como sigue: CsA Neoral® 12,5 mg/kg/cada día dividida vía oral dos veces al día; Aza Imuran® 5 mg/kg vía oral cada dos días para un periodo de condicionamiento de dos semanas. Los fármacos se administran después a esa dosis para dos semanas adicionales
55 en la presencia de tolerógeno. Las dosis se dividen para todos los fármacos cada dos semanas después de la primera infusión de tolerógeno. Los pacientes se monitorizan para reacciones adversas, y para pico de CsA y niveles valle.

60 *Tolerógeno.* La α -L-iduronidasa recombinante se produce en células de CHO con el uso de bioreactores y cromatografía de columna estándar, y analizada extensivamente para seguridad y pureza. La actividad de la α -L-iduronidasa se mide de acuerdo con el método de Shull et al. supra., o con un ensayo cuyos resultados se presentan en unidades SI (Kakkis et al., 2001, supra). Cuando el último ensayo se usa, una dosis de 125000 U de α -L iduronidasa por kilogramo es equivalente a 100 SI unidades por kilogramo. La excreción de glicosaminoglicano urinaria se mide de acuerdo con una adaptación del método de Bjornsson. Los ensayos inmunosorbentes
65 relacionados con la enzima para anticuerpos en α -L-iduronidasa usa una variación del método de Shull et al., e

inmunoblot es realizado de acuerdo con un método estándar.

El tolerógeno se administra por infusión intravenosa (diluido en solución salina normal con 0,1 por ciento de albúmina de sérum humano) en una dosis de 14000 U (0,056 mg/kg), repartido semanalmente. La primera dosis es dada después del término del periodo de condicionamiento de dos semanas, y semanalmente después. Los pacientes son premedicados con difenhidramina (0,5 a 1,25 mg por kilogramo de peso corporal).

Después de la inducción de tolerancia, normalmente seis u ocho semanas después del inicio del periodo de condicionamiento, la dosis se incrementa una vez a la semana, 125000 U (0,58 mg) por kilogramo; la tasa es 3000 U por kilogramo durante la primera hora y 61000 U por kilogramo durante cada una de las siguientes dos horas.

Ejemplo 7

El régimen de tolerancia inmunológica evita la inducción de otras inmunoglobulinas en adición a IgG

El régimen de tolerancia en el canino evita la inducción de IgG como se manifestó por un descenso en la respuesta IgG total como se manifestó por un descenso en la respuesta IgG total contra la iduronidasa como se comparó a la respuesta IgG observada en caninos no tolerantes. El presente ejemplo proporciona la prueba adicional que muestra que además de evitar la inducción de IgG, el régimen de tolerización evita la inducción de otros subtipos de inmunoglobulina también. Los análisis del sérum inmunológico de caninos que fueron tanto tolerantes (perros PE y SA) o controles de canino (perros RU y UM) que no habían recibido el régimen de tolerización fueron estudiados para la presencia de anticuerpos IgG, IgA e IgE en iduronidasa.

Los datos de estas determinaciones se muestran en las figuras 7A a 7D. Estos datos muestran que los perros tolerantes no tuvieron un incremento significativo (>3 veces) en título en estos otros subtipos y perros no tolerantes no tuvieron una respuesta IgA o IgE significativo ~10 veces en algunos casos. Aunque los títulos IgA e IgE no fueron altos relativos a IgG, estos títulos fueron significativos y positivos en los caninos no tolerantes. Los datos muestran que el régimen de tolerancia también evita que otros subtipos IgG sean inducidos consistentes con un efecto más amplio en la respuesta humoral.

EJEMPLO 8

Inducción de tolerancia en animales con respuesta inmunológica preexistente

En otro aspecto de la presente invención, los inventores demostraron que es posible reducir o eliminar una respuesta inmunológica existente. El presente ejemplo discute datos generados del canino Nitro. Nitro fue originalmente tolerizado, pero después de un periodo de casi seis meses de interrupción de exposición de antígeno, una reexposición indujo una respuesta anamnésica profunda con un título que alcanza 400+. Después de varias semanas sin exposición al antígeno, el canino fue colocado en el régimen de tolerancia y se le dieron infusiones de iduronidasa semanalmente de dosis baja (0,056 mg). El título inicialmente se elevó durante la administración del régimen CsA+Aza a más de 100 en una respuesta anamnésica típica y que rápidamente cayó por debajo de 20 (véase la figura 8). La respuesta fue reducida por el régimen y la respuesta inmunológica en la enzima es relativamente débil comparada con el nivel >400 previamente en infusiones de 0,5 mg/kg/semana. Estos datos demuestran que es posible reinducir la tolerancia al tolerógeno incluso si el animal ya posee una respuesta inmunológica contra el antígeno en la composición de tolerógeno.

EJEMPLO 9

Presencia de residuo de absorción de alta afinidad en el antígeno vuelve el antígeno más efectivo como un tolerógeno

Los efectos de una fracción de alta afinidad en el tolerógeno fueron discutidos en el ejemplo 1 anterior, que mostró que el uso de una fracción tal como manosa-6-fosfato puede ser útil en aumentar la capacidad de tolerización en un antígeno. Este aspecto de las composiciones de tolerógeno fue investigado adicionalmente y los resultados se presentan en el presente ejemplo y en la figura 9. La iduronidasa normalmente comprende una manosa-6-fosfato y esta fracción de rápida absorción facilita la absorción de la iduronidasa por las células objetivo vía un receptor de manosa-6-fosfato.

En el presente ejemplo, la iduronidasa fue desfosforilada por incubación con ácido fosfatado bound to beads. La enzima fue exitosamente desfosforilada como se demostró mediante la falta de absorción eficiente en los fibroblastos Hurler y un $K_{\text{absorción}}$ que era demasiado bajo para ser calculado. La desfosfo-iduronidasa fue usada en un régimen de tolerización similar a los experimentos de tolerización conducidos con la iduronidasa discutida en los ejemplos anteriores. Los datos se muestran en la figura 9. Este estudio mostró que el canino tolerizado con desfosfo-iduronidasa no pudo tolerizar, sugiriendo otra vez que la afinidad de absorción rápida se necesita para la tolerancia.

EJEMPLO 10

Métodos de inducir tolerancia al Factor VIII

- 5 El tratamiento de hemofilia A se basa en la habilidad de repartir una cantidad efectiva de Factor VIII en el hemofílico. Sin embargo, los anticuerpos o inhibidores en terapia de Factor VIII puede ser un problema significativo en pacientes con la enfermedad hemofilia A. El paciente hemofílico que ha desarrollado inhibidores de anticuerpos al Factor VIII puede experimentar sangrado incontrolado haciendo la terapia de Factor VIII inefectiva. Los ejemplos 1 a 9 describen métodos y composiciones para inducir una administración de tolerancia inmunológica específica de
- 10 antígeno de α -L-iduronidasa o alfa-glucosidasa como un tolerógeno en combinación con un régimen de inmunosupresión para un periodo de tiempo suficiente para tolerizar el huésped en el tolerógeno. El presente ejemplo está dirigido a inducir tolerancia inmunológica en el Factor VIII. El presente ejemplo proporciona un protocolo para ser usado para evitar e invertir la formación de inhibidor contra el Factor VIII.
- 15 *Preparación de un factor VIII tolerogénico:* el Factor VIII tolerogénico se hace conjugando la proteína en una proteína de absorción rápida. En el enfoque más sencillo la proteína de Factor VIII se conjuga usando una enzima lisosomal, la iduronidasa que contiene un marcador de absorción de gran afinidad en sus carbohidratos N-ligados. Las proteínas se conjugan usando un agente de reticulación heterobifuncional (SBDB por ejemplo). Óptimamente, la reticulación ocurriría en un ratio de 1:1 y las proteínas reticuladas purificadas.
- 20 Tolerización de un paciente de hemofilia: el paciente recibiría ciclosporina A en una dosis que se espera que sea 12,5 mg/kg/d dividida para lograr un nivel de sangre de más de 400 ng/ml. El paciente recibiría Azatioprina a 2-5 mg/kg cada dos días como es apropiado para un paciente humano. Después de 18 días de los fármacos, el paciente recibiría 0,6 mg/kg de tolerógeno en una infusión semanalmente. Después del día 32, la CsA y la Aza se cortan a la
- 25 mitad en tamaño dosis y después del día 46 los fármacos son cortados en $\frac{1}{4}$. En el día 60, CsA+Aza se termina y las infusiones semanales continuaron. La monitorización de la respuesta inmunológica mostraría sólo una respuesta modesta si hay alguna que era menos del 20% veces la respuesta previa sin tolerancia. El paciente recibe infusiones de Factor VIII normales y el tolerógeno se termina. Si se necesita, puede ser administrado tolerógeno adicional para mantener el estado tolerante a intervalos.
- 30

EJEMPLO 11

Tolerancia a antígenos de célula β en diabetes

- 35 Tolerancia a los antígenos de célula β , tales como, el ácido glutámico decarboxilasa (GAD) son responsables de la destrucción de la célula β pancreática y el comienzo de diabetes. La inducción de tolerancia en estos antígenos proporcionaría un importante método para evitar la progresión y el comienzo de diabetes en pacientes en riesgo o que tiene comienzo de síntomas de diabetes tipo 1. GAD es un importante antígeno pero otros antígenos tales como IA2 e insulina también podrían ser estudiados de este modo.
- 40 *Preparación de un GAD tolerogénico.* El tolerogénico desde GAD puede ser hecho por fusión con una fracción de péptido de absorción rápida. El gen para GAD humano está conectado en marco con el gen para un péptido de absorción rápida tal como IGF2, que es conocido para unir el receptor manosa-6-fosfato. Tal fusión permitiría que ambas proteínas fuesen hechas en la estructura correcta y con la antigenicidad y forma correctas.
- 45 *Tolerización de pacientes de diabetes tipo 1.* Un paciente de diabetes de nuevo comienzo que estuvo antes en el transcurso de la enfermedad y retuvo alguna función de célula β , sería usado preferentemente. El paciente recibiría ciclosporina A en una dosis que se esperaba que fuese 12,5 mg/kg/d dividida vía oral para lograr un nivel de sangre de más de 400 ng/ml. El paciente también recibiría azatioprina a 2-5 mg/kg cada dos días como es apropiado para un paciente humano. Después de 18 días de los fármacos, el paciente recibiría 0,06 mg/kg de tolerógeno en una
- 50 infusión semanalmente. Después del día 32, la CsA y la Aza pueden ser cortadas a la mitad en tamaño dosis y después del día 46 los fármacos pueden ser cortados a $\frac{1}{4}$. En el día 60, CsA+Aza se termina y las infusiones semanales continuaron. La dosis de tolerógeno puede ser entonces incrementada a 0,6 mg/kg cada semana. La monitorización de la respuesta inmunológica mostraría probablemente solo una respuesta modesta si hay alguna que fue menos de 20% veces la respuesta previa sin tolerancia. El paciente habría normalizado la tolerancia de
- 55 glucosa y el tolerógeno se terminaría. Si fuese necesario, el tolerógeno adicional podría ser administrado para mantener el estado tolerante a intervalos para ser determinado por la condición clínica del paciente.

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de un tolerógeno, comprendiendo dicho tolerógeno un antígeno polipeptido soluble que comprende o conjugado a una manosa-6-fosfato como una fracción de absorción rápida, para la fabricación de un medicamento para el uso en terapia de combinación con un agente inmunosupresor de célula T y un agente antiproliferativo en la inducción de tolerancia inmunológica en un huésped mamífero en el componente antígeno del tolerógeno; en el que dicho huésped mamífero se mantiene primero en una combinación del antígeno polipeptido soluble, el agente inmunosupresor de célula T y el agente antiproliferativo durante un régimen de tolerización y después se mantiene en el antígeno polipeptido soluble después de la retirada del agente inmunosupresor de célula T y el agente antiproliferativo.
- 2.- El uso de la reivindicación 1, en el que dicho régimen de tolerización es precedido por un periodo de condicionamiento, dicho periodo de condicionamiento comprendiendo agente inmunosupresor de célula T de administración en la ausencia de dichos polipeptidos solubles durante un periodo de tiempo suficiente para suprimir respuestas de célula T de huésped.
- 3.- El uso de la reivindicación 1, en el que durante dicho régimen de tolerización, dicho huésped se mantiene en una combinación de agente inmunosupresor de célula T y un agente antiproliferativo durante un periodo de al menos seis semanas.
- 4.- El uso de la reivindicación 1, en el que durante dicho régimen de tolerización, dicho huésped se mantiene en una combinación de agente inmunosupresor de célula T y un agente antiproliferativo durante un periodo de al menos tres semanas.
- 5.- El uso de la reivindicación 1, en el que dicho agente inmunosupresor de célula es ciclosporina A.
- 6.- El uso de la reivindicación 5, en el que un nivel valle de ciclosporina A durante dicho régimen de tolerización es de 200 ng/ml a 500 ng/ml, y dicho nivel valle es suficiente para suprimir respuestas de célula T de huésped.
- 7.- El uso de la reivindicación 6, en el que una dosis de dicha ciclosporina A se administra de manera que el nivel valle de ciclosporina A es al menos 200 ng/mL.
- 8.- El uso de la reivindicación 6, en el que una dosis de dicha ciclosporina A se administra de manera que el nivel valle de ciclosporina A es al menos 300 ng/mL.
- 9.- El uso de la reivindicación 6, en el que una dosis de dicha ciclosporina A se administra de manera que el nivel valle de ciclosporina A es al menos 500 ng/mL o mayor.
- 10.- El uso de la reivindicación 5, en el que dicha ciclosporina A está presente en una cantidad de entre 0,5 mg y 10 mg.
- 11.- El uso de la reivindicación 1, en el que dicho agente antiproliferativo es un nucleótido análogo.
- 12.- El uso de la reivindicación 11, en el que dicho nucleótido análogo es un fármaco de 6-mercaptopurina.
- 13.- El uso de la reivindicación 12, en el que dicho fármaco de 6-mercaptopurina es azatioprina.
- 14.- El uso de la reivindicación 13, en el que dicha azatioprina se mantiene a una dosis de 1 a 5 mg/kg/día durante al menos dos semanas.
- 15.- El uso de la reivindicación 13, en el que dicha azatioprina se mantiene a una dosis de 3 a 5 mg/kg/día.
- 16.- El uso de la reivindicación 13, en el que la azatioprina se administra a una dosis de 1 a 3.
- 17.- El uso de la reivindicación 13, en el que la azatioprina se administra a una dosis de 5 mg/kg cada dos días.
- 18.- El uso de la reivindicación 1, en el que dicho agente proliferativo es un fármaco antimetabolito.
- 19.- El uso de la reivindicación 18, en el que dicho fármaco antimetabolito es un inhibidor de dihidrofolato reductasa u otras enzimas incluidas en el metabolismo nucleótido.
- 20.- El uso de la reivindicación 18, en el que dicho fármaco antimetabolito es metrotexato, o un análogo de éste.
- 21.- El uso de la reivindicación 13, en el que dicha azatioprina está formulada en una composición que comprende de 0,5 mg a 10 mg.

- 22.- El uso de la reivindicación 1, que comprende administrar una dosis efectiva de dicho tolerógeno al menos dos veces, opcionalmente al menos cuatro veces, durante el periodo de tolerización, en el que dicho tolerógeno se administra de manera preferente semanalmente.
- 5 23.- El uso de la reivindicación 1, en el que dicho tolerógeno es un conjugado de manosa-6-fosfato de un antígeno de interés.
- 24.- El uso de la reivindicación 3, en el que dicho tolerógeno es un polipéptido terapéutico.
- 10 25.- El uso de la reivindicación 24, en el que dicho polipéptido terapéutico comprende una fracción de absorción rápida y es aceptado por el receptor de manosa-6-fosfato (MSP).
- 26.- El uso de la reivindicación 25, en el que dicho polipéptido terapéutico es alfa-glucosidasa o iduronidasa.
- 15 27.- El uso de la reivindicación 24, en el que dicho polipéptido terapéutico es seleccionado entre un grupo que consiste en anticuerpos, factores de coagulación, enzimas y factores de crecimiento.
- 28.- El uso de la reivindicación 24, en el que dicho polipéptido terapéutico es Factor VIII.
- 20 29.- El uso de la reivindicación 28, en el que dicho Factor VIII es conjugado en una fracción de absorción rápida de manosa-6-fosfato.
- 30.- El uso de la reivindicación 29, en el que dicha fracción de absorción rápida es iduronidasa que comprende un marcador de absorción de rápida afinidad de manosa-6-fosfato en sus carbohidratos N-ligados.
- 25 31.- El uso de la reivindicación 1, en el que dicho tolerógeno comprende un antígeno de célula β .
- 32.- El uso de la reivindicación 31, en el que dicho antígeno de célula β es seleccionado desde el grupo que consiste en ácido glutámico decarboxilasa (GAD), IA2 e insulina.
- 30 33.- El uso de la reivindicación 32, en el que el antígeno de célula β es GAD.
- 34.- El uso de la reivindicación 33, en el que dicho GAD es conjugado a una fracción de absorción rápida de manosa-6-fosfato.
- 35 35.- El uso de la reivindicación 1, en el que dicho tolerógeno es un autoantígeno.
- 36.- El uso de la reivindicación 35, en el que dicho tolerógeno comprende una pluralidad de autoantígenos.
- 40 37.- El uso de la reivindicación 1, en el que dicho tolerógeno comprende un antígeno de trasplante.
- 38.- El uso de la reivindicación 37, en el que dicho tolerógeno comprende una pluralidad de antígenos de trasplante.
- 45 39.- Un kit que comprende un tolerógeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, y un agente inmunosupresor de célula T y un agente antiproliferativo, en el que el agente inmunosupresor de célula T es ciclosporina A, rapamicina o FK506, preferentemente ciclosporina A, y en el que el agente antiproliferativo es un fármaco antimetabolito o un nucleótido análogo, preferentemente azatioprina.

FIG. 1

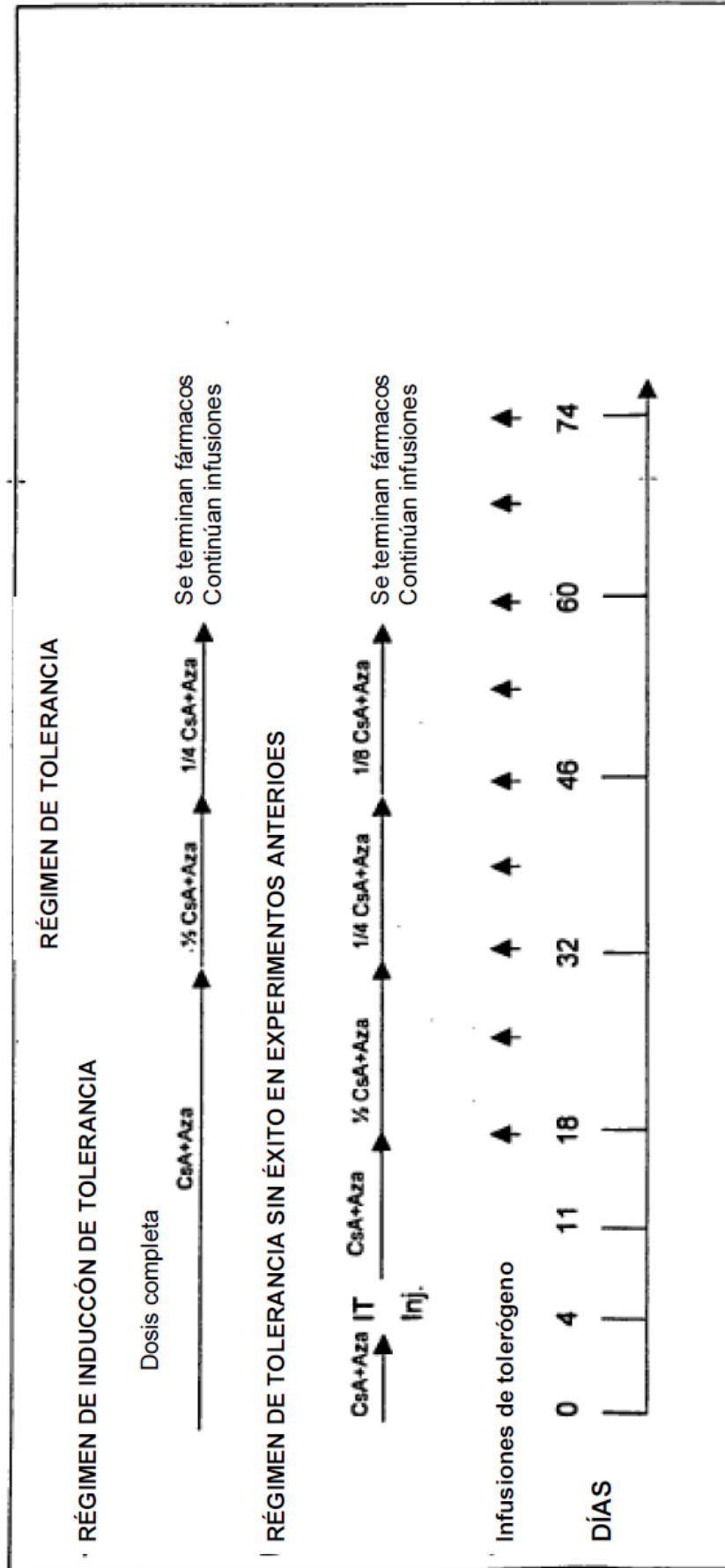


FIG. 2

Respuesta inmunológica a la administración de iduronidasa bajo varios regímenes de tolerancia

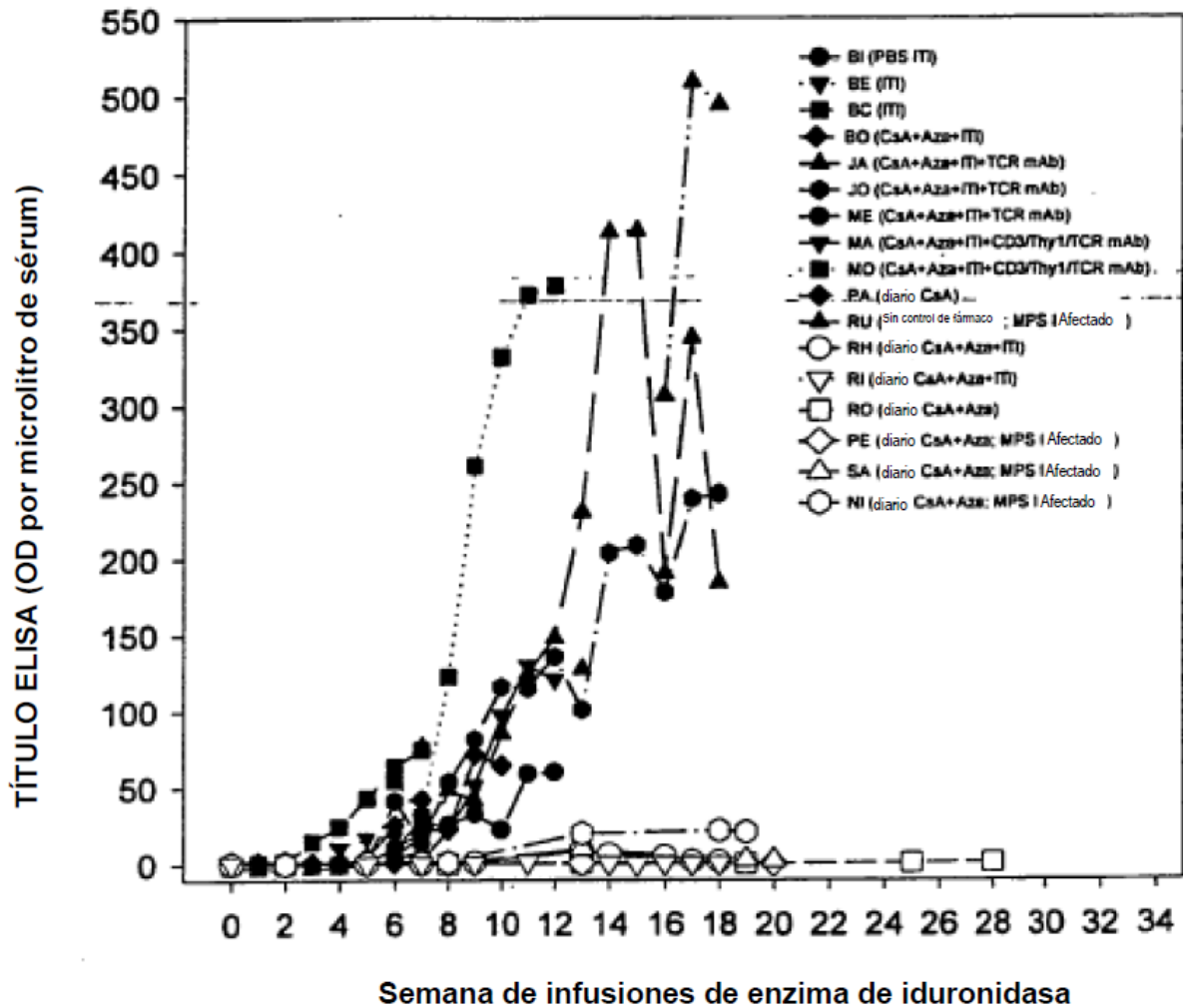


FIG. 3

Título de anticuerpo en iduronidasa en perros afectados de MPS I

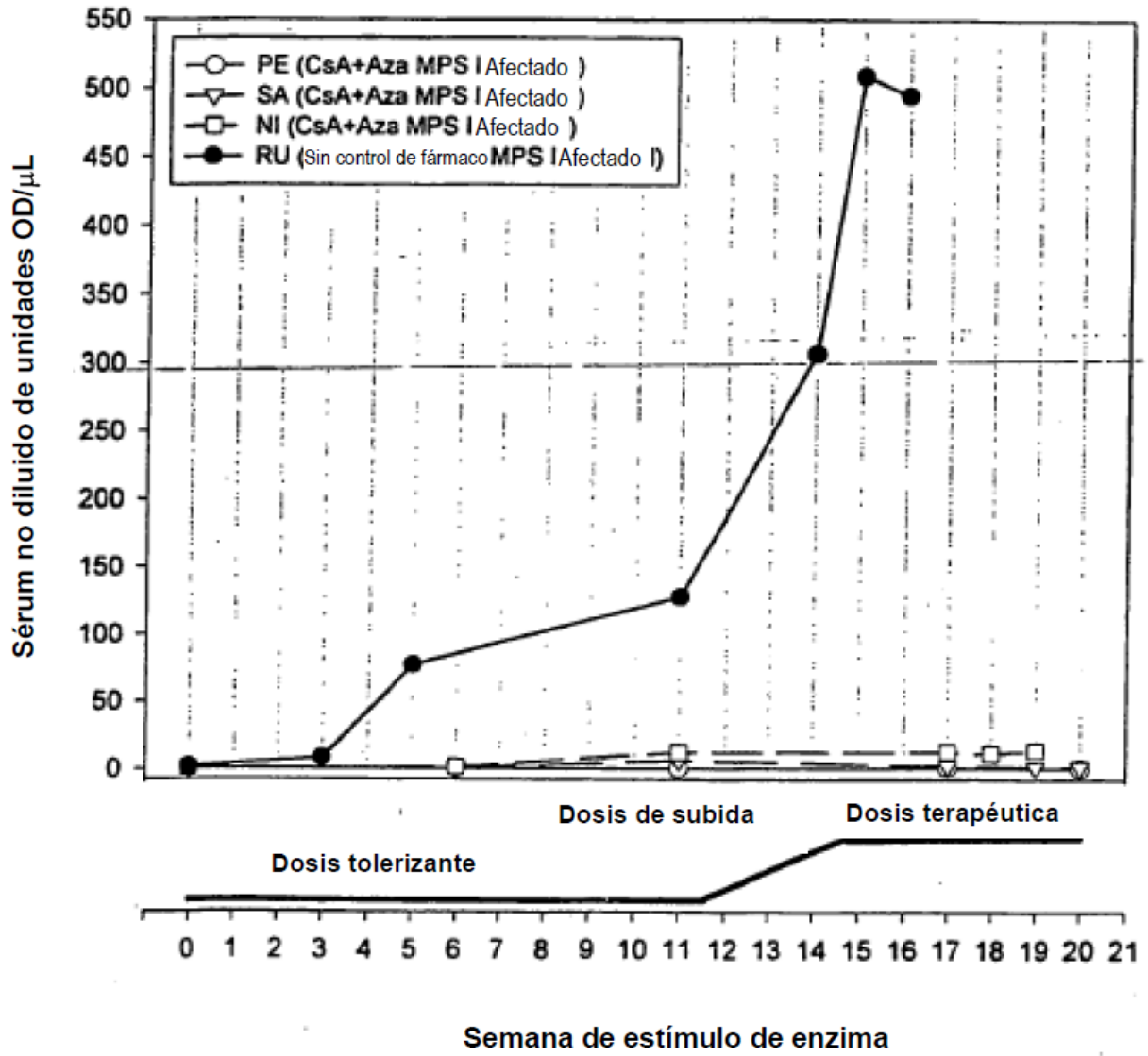


FIG. 4

Respuesta inmunológica por ELISA a infusión de alfa glucosidasa con y sin el régimen de fármaco de tolerización

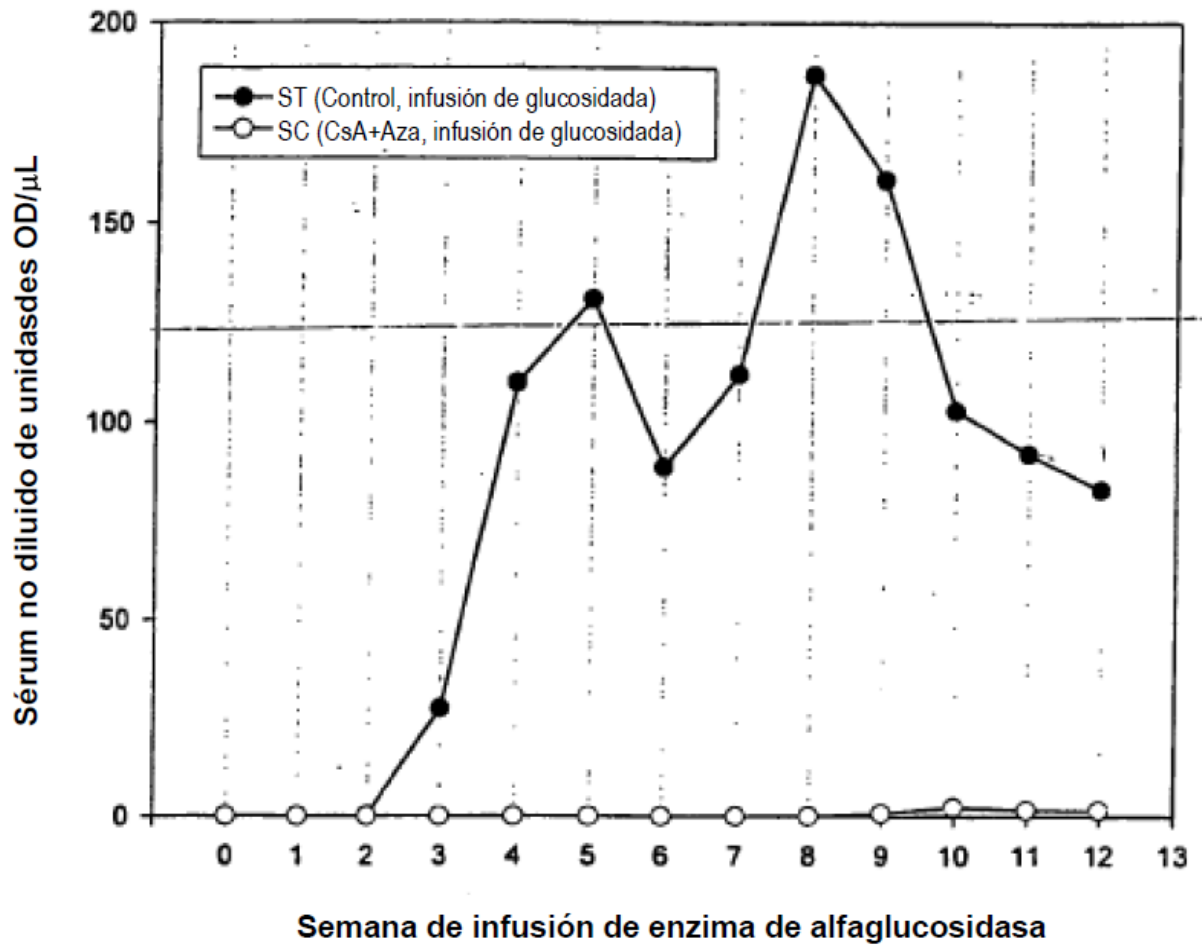


FIG. 5

Tolerancia inmunológica durante infusiones de iduronidasa

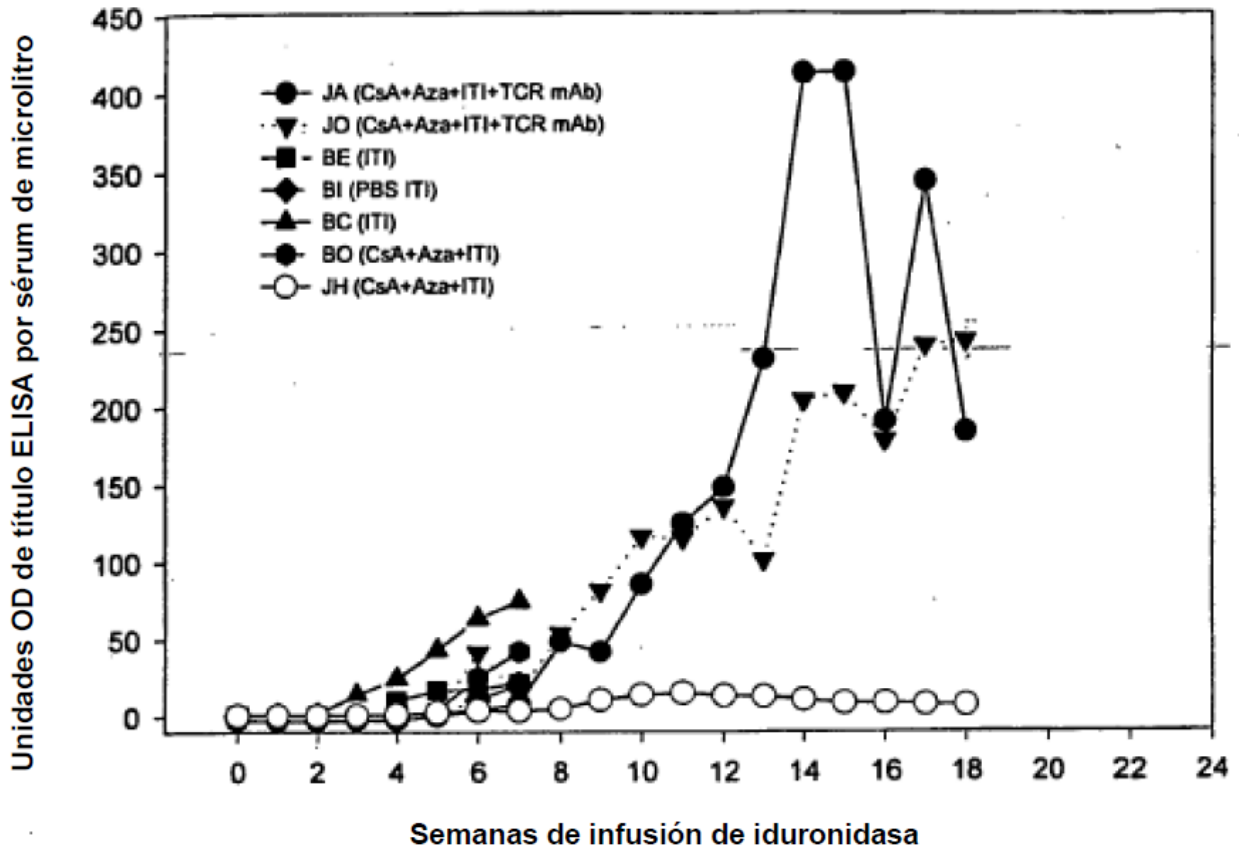


FIG. 6

Respuesta inmunológica a segundas series de estímulo de administración de iduronidasa después de interrupción

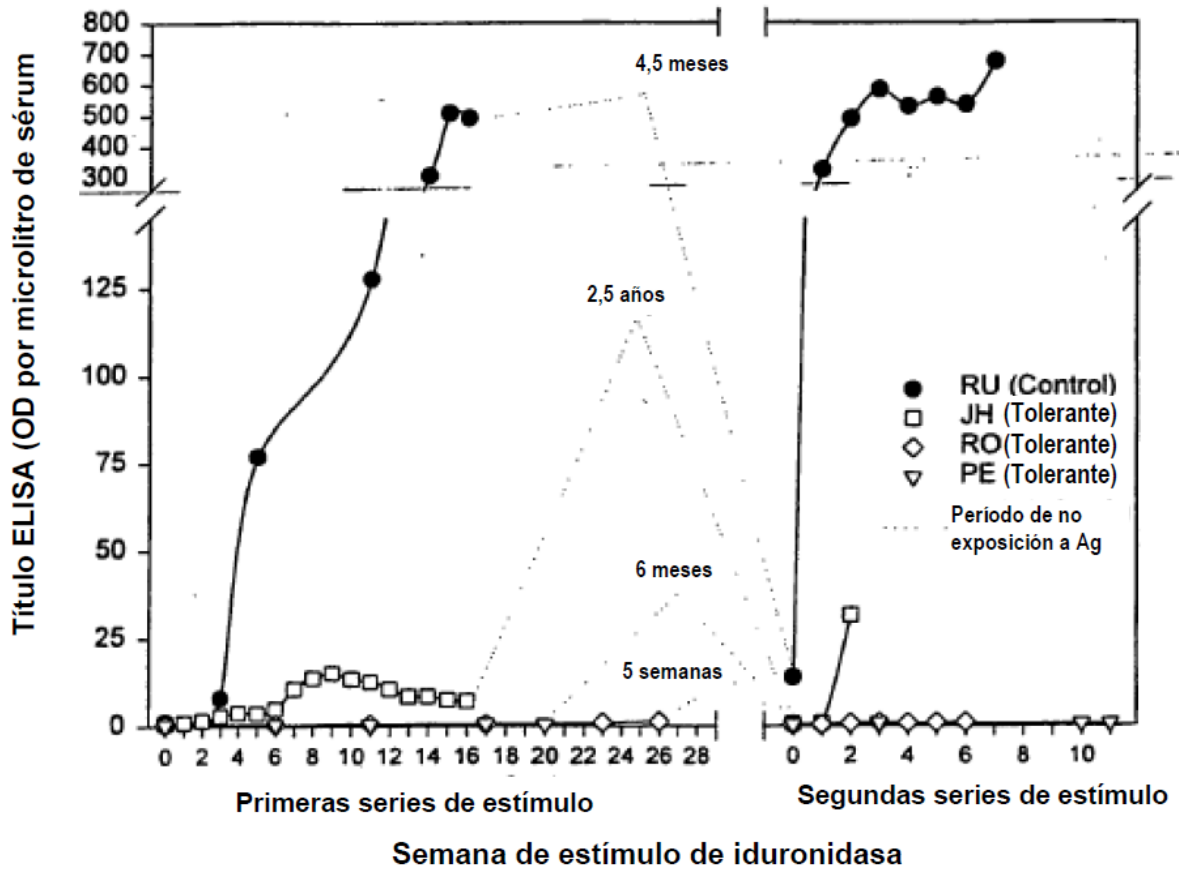
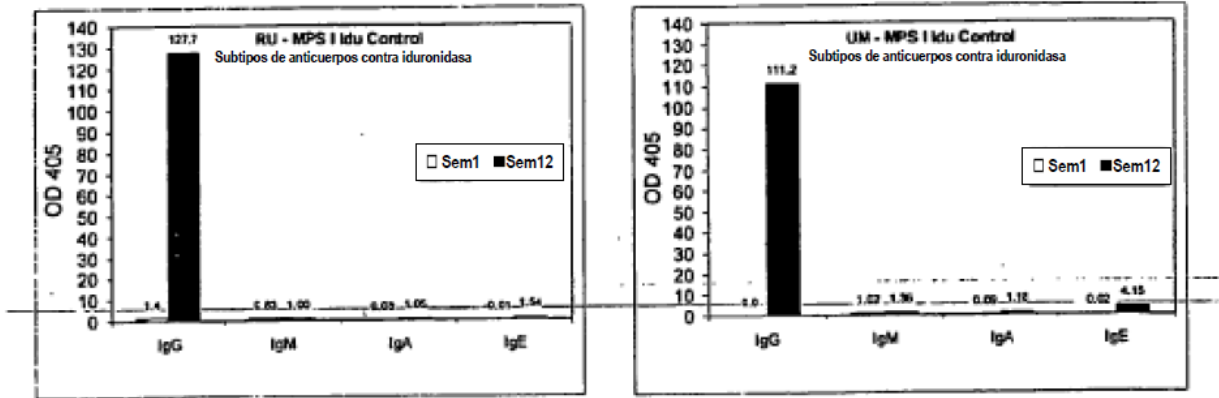


FIG. 7A-7D

Título ELISA de perros de control no tolerantes antes y después de 12 infusiones semanales con iduronidasa



Título ELISA de perros de control tolerantes antes y después de 12 infusiones semanales con iduronidasa

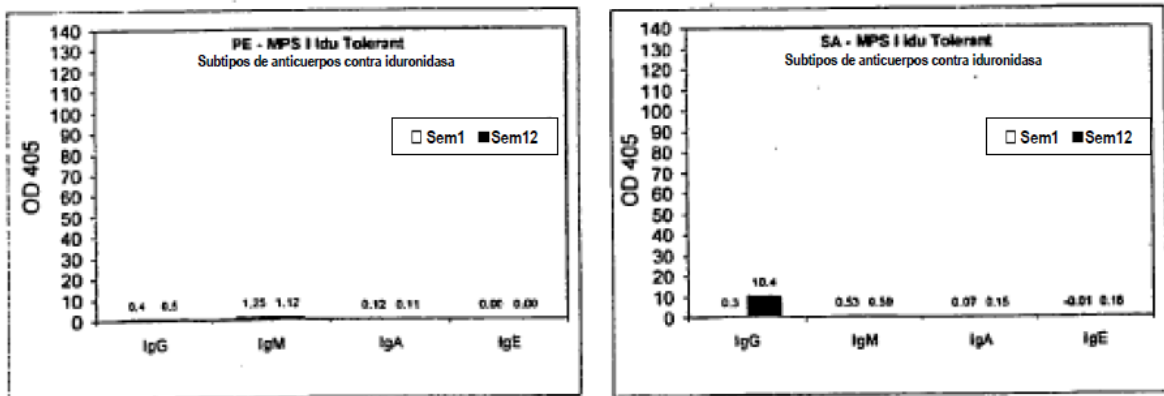


FIG. 8

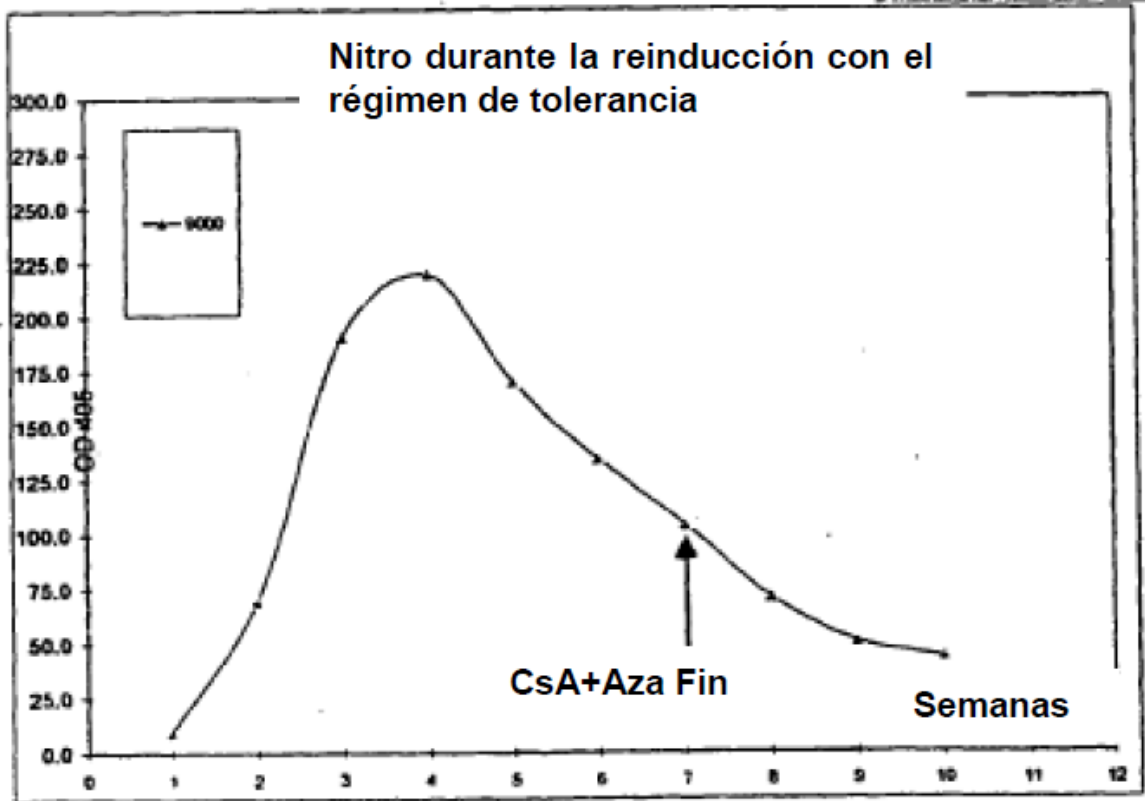


FIG. 9

