(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 456 963**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2008** **E 08763515 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014** **EP 2164508**

(54) Título: **Agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y métodos para usar los mismos**

(30) Prioridad:

04.06.2007 US 924866 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2014

(73) Titular/es:

RAPPAPORT FAMILY INSTITUTE FOR RESEARCH IN THE MEDICAL SCIENCES (100.0%)
Efron Street P.O. Box 9697
31096 Haifa, IL

(72) Inventor/es:

KARIN, NATHAN;
ZOHAR, YANIV y
WILDBAUM, GIZI

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 456 963 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

Agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y métodos para usar los mismos

La presente invención se refiere al uso de CXCL11 para el tratamiento de enfermedades inflamatorias en general y esclerosis múltiple en particular.

Las quimioquinas constituyen una familia de proteínas secretadas de tipo citoquina estructuralmente pequeñas que regulan el tráfico celular. Se producen y secretan por una amplia diversidad de tipos celulares en respuesta a mediadores inflamatorios tempranos, tales como IL-1β o TNF-α, y en respuesta a infección bacteriana o vírica. Las quimioquinas funcionan principalmente como quimio-atrayentes para leucocitos, monocitos de reclutamiento, neutrófilos y otras células efectoras de la sangre a sitios de infección o daño. Pueden liberarse por muchos tipos celulares diferentes (por ejemplo, macrófagos) y pueden mediar un intervalo de efectos pro-inflamatorios sobre leucocitos, tales como activación de la quimiotaxis, desgranulación, síntesis de mediadores lipídicos, y activación de integrina.

Las quimioquinas pueden subdividirse en cuatro clases, las quimioquinas C, C-C, C-X-C y C-X3-C, dependiendo de la cantidad y disposición de motivos de cisteína amino-terminales conservados, donde "X" es un resto aminoacídico no conservado. La interacción de estas proteínas solubles con sus receptores específicos, que pertenecen a la súper-familia de receptores acoplados a proteína G con siete dominios transmembrana (GPCR), median sus efectos biológicos provocando, entre otras respuestas, un aumento rápido en la concentración de calcio intracelular, cambios en la forma de la célula, expresión aumentada de moléculas de adhesión celular, desgranulación y promoción de la migración celular.

El receptor de quimioquinas CXCR3, también conocido como receptor nueve acoplado a proteína G (GPR9) y CD 183, se expresa predominantemente en células T efectoras inflamatorias, incluyendo células Th1 [Qin et al., J Clin Invest (1998) 101:746-54; Sallusto et al., J Exp Med (1998) 187:875-83] así como las células Th_{17} que producen IL-17 definidas recientemente [Nakae et al., J Leukoc Biol (2007) 81:1258-68], pero también se expresa en otros linfocitos, incluyendo células B y células NK [Sallusto et al., supra]. CXCR3 se induce mucho después de activación celular. Tres ligandos de quimioquina compiten por la unión a este receptor: CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) y CXCL11 (I-TAC) [Colvin et al., J Biol Chem (2004) 279:30219-27]. Estos ligandos se unen a diferentes epítopos en CXCR3, aunque CXCL11 se une a CXCR3 con mayor afinidad que CXCL9 y CXCL10 [Cole et al., supra; Tensen et al., J. Invest. Derm. (1999) 112:716-722]. CXCL11 puede antagonizar la función de los otros dos ligandos de CXCR3 ya que conduce rápidamente a la internalización del receptor, que por tanto llega a estar inaccesible a los otros ligandos de CXCR3 [Colvin et al., supra].

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central (SNC). La MS y su modelo animal, encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), se cree que están provocados por células inmunes activadas mediadas de forma autoinmune, tales como linfocitos T y B así como macrófagos y microglía, y se considera que es una enfermedad neurodegenerativa inflamatoria. Patológicamente, la EM se caracteriza por infiltración perivenosa de linfocitos y macrófagos en el parénquima del SNC, provocando lesiones desmielinizantes llamadas placas. Estas placas, que son la característica distintiva de EM, están asociadas con muerte de oligodendrocitos, daño axonal y pérdida neuronal. El reclutamiento de células inflamatorias desde el lecho vascular al espacio perivascular, y desde allí al parénquima del SNC, es resultado de un proceso de múltiples etapas, que está orquestado en parte por las quimioquinas.

CXCR3 se ha implicado previamente en la patogénesis de EM [Sorensen et al., J Clin Invest. (1999) 103 (6):807-15]. Se ha demostrado que CXCR3 se expresa en células linfocíticas en casi cualquier infiltrado inflamatorio perivascular en lesiones activas de EM [Sorensen et al., supra]. Además, se encontraron niveles elevados de los dos ligandos de CXCR3, CXCL9 y CXCL10, en el fluido cefalorraquídeo (CSF) de sujetos durante ataque de EM que probablemente son responsables de la quimio-atracción de células que expresan CXCR3 (por ejemplo, células T $CD4^+$) desde la circulación sanguínea en el sitio de inflamación [Balashov et al. Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96:6873-8; Sorensen et al., supra]. Además, en ratones con EAE inducida, la administración de anticuerpos anti-CXCL10 disminuyó la incidencia de enfermedad clínica e histológica, la gravedad, así como la infiltración de células mononucleares y las células en el SNC [Fife et al, J Immunol (2001) 166:7617-24]. Tomados en conjunto, estos hallazgos proporcionan fuertes evidencias cumulativas que apoyan un papel central para el eje CXCR3/CXCL10/CXCL9 en el reclutamiento de células T al cerebro en EM. Aunque que el papel del eje CXCR3/CXCL11 desempeña en EM aún es impreciso.

Existen evidencias sustanciales que apoyan la hipótesis de que CXCL11 está implicado en la patogénesis de EM. Por ejemplo, Hamilton et al. han mostrado niveles elevados de ARNm de I-TAC murino en SNC de ratones con EAE inducida [Hamilton et al., Scand J Immunol. (2002) 55(2):171-7].

Lazzeri y Romagnani han propuesto la quimioquina CXCL11 como una posible diana terapéutica en esclerosis múltiple, sin embargo, de hecho se distancian del uso de CXCL11 para el tratamiento de EM ya que proponen el

tratamiento de EM usando fármacos que bloquean la actividad de CXCL11 [Lazzeri E. and Romagnani P., Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. (2005) 5(1): 109-18].

Clark-Lewis et al. construyeron un potente antagonista para el receptor CXCR3 que les posibilitaba explorar la relación estructura-función de CXCR3 con sus ligandos, en particular I-TAC. El antagonista se obtuvo por truncamiento NH(2)-terminal de I-TAC. Esta molécula (I-TAC (4-73)), carecía de los primeros tres restos y demostró que no comprender actividad agonista. En lugar de ello demostró competir con I-TAC por la unión a células que albergan CXCR3, inhibiendo la migración celular e inhibiendo los cambios de calcio en las células que expresan CXCR3 en respuesta a estimulación con quimioquinas de CXCR3. El antagonista de I-TAC no se contempló para fines terapéuticos [Clark-Lewis et al., J Biol Chem. (2003) 278(1):289-95].

La patente de Estados Unidos Nº 6.869.606 describe complejos I-TAC biotinilados que mantienen su funcionalidad (por ejemplo, unión a CXCR3 e inducción de quimiotaxis). La patente de Estados Unidos Nº 6.869.606 no menciona la esclerosis múltiple como enfermedad diana potencial para dichos complejos.

La publicación de Estados Unidos Nº 20060257359 describe medios para modular los fenotipos de células relacionadas con macrófagos para el tratamiento de enfermedades, tales como esclerosis múltiple. La publicación de Estados Unidos Nº 20060257359 muestra que la modulación del fenotipo celular puede conseguirse introduciendo efectores (por ejemplo, proteínas, anticuerpos o moléculas de ARN) en células relacionadas con macrófagos alterando de este modo la expresión génica y fenotipo celular (por ejemplo, secreción de citoquinas o migración celular). Entre una larga lista de efectores potenciales, se especifica I-TAC en la misma. La publicación de Estados Unidos Nº 20060257359 describe el tratamiento de una gran cantidad de enfermedades autoinmunes aunque no especifica qué enfermedades pueden aliviarse por regulación positiva o regulación negativa de I-TAC. Además, la publicación de Estados Unidos Nº 20060257359 no proporciona ningún soporte experimental que indique el tratamiento de EM con I-TAC.

La publicación PCT Nº WO06125077 describe un ligando del receptor polipeptídico CXCR3 no natural donde el dominio N-bucle es de I-TAC para el tratamiento trastornos fibróticos, trastornos angiogénicos y cáncer. No se contempló el tratamiento de EM.

La publicación PCT Nº WO05016241 describe un ligando polipeptídico sintético para CXCR3 para el tratamiento de trastornos fibróticos, trastornos angiogénicos, cáncer e infecciones bacterianas. Esta invención describe el uso de la secuencia consenso de I-TAC (restos aminoacídicos que existen en I-TAC) que incluye o carecen de una secuencia de señalización. Por tanto, dichos polipéptidos de CXCR3 pueden funcionar como agonistas o antagonistas de CXCR3. No se contempló el tratamiento de EM.

Por tanto existe la ampliamente reconocida necesidad de, y sería muy ventajoso tener, polipéptidos CXCL11 que puedan usarse en el tratamiento de esclerosis múltiple.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmune en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de CXCL11, tratando de este modo la enfermedad autoinmune en el sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar la esclerosis múltiple en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de CXCL11, tratando de este modo la esclerosis múltiple en el sujeto.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención se proporciona un uso de CXCL11 para la fabricación de un medicamento identificado por tratar una enfermedad autoinmune.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención se proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmune en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método poner en contacto células T ex vivo con CXCL11 en condiciones que provoquen la generación de células T reguladoras y administrar las células T reguladoras al sujeto, tratando de este modo la enfermedad autoinmune en el sujeto.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención se proporciona un método para tratar la esclerosis múltiple en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método poner en contacto células T ex vivo con CXCL11 en condiciones que provoquen la generación de células T reguladoras y administrar las células T reguladoras al sujeto, tratando de este modo la esclerosis múltiple en el sujeto.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención se proporciona un uso de células T cultivadas ex vivo con CXCL11 para la fabricación de un medicamento identificado por tratar una enfermedad autoinmune.

De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación las células T se obtienen del sujeto.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células T se obtienen de un donante.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el donante es alogénico con respecto al sujeto.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el donante es singénico con respecto al sujeto.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células T son células T CD4+.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células T reguladoras se seleccionan específicamente antes de administrarse al sujeto.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las condiciones que provocan la generación de células T reguladoras comprenden adicionalmente estimulación con un antígeno.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el antígeno es mAb anti-$CD3_{\varepsilon}$.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el antígeno es mAb anti-CD28.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células T reguladoras secretan IL-10.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células T reguladoras secretan IL-4.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención se proporciona un artículo de fabricación que comprende CXCL11 y un agente anti-esclerosis múltiple que se envasan en un material de envasado y se identifican de forma impresa, en o sobre el material de envasado para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID Nº 6.

De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo el polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID Nº 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente invención se proporciona un uso del polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID Nº 6, para la fabricación de un medicamento identificado por tratar una enfermedad inflamatoria.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el CXCL11 es capaz de regular positivamente la secreción de IL-10 y/o IL-4 de macrófagos y células T.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el CXCL11 es capaz de regular negativamente la secreción de una citoquina de macrófagos y células T, donde la citoquina se selecciona entre el grupo que consiste en TNF-α, IFN-γ, IL-2 e IL-12.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el CXCL11 es capaz de regular negativamente el receptor CXCR3.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad autoinmune.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la enfermedad autoinmune se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis, artritis gotosa, afecciones artríticas, articulaciones inflamadas, eccema, afecciones cutáneas inflamatorias, afecciones oculares inflamatorias, conjuntivitis, pirexia, necrosis tisular resultante de inflamación, rechazo tisular después de cirugía de trasplante, enfermedad de Crohn y colitis ulcerante, inflamación de las vías respiratorias, asma, bronquitis, lupus

sistémico eritematoso, esclerosis múltiple, miastenia grave, esclerosis sistémica progresiva, dermatitis atópica, hiperinmunoglobina E, hepatitis activa crónica negativa a antígeno de hepatitis B, tiroiditis de Hashimoto, fiebre mediterránea familiar, enfermedad de Grave, anemia hemolítica autoinmune, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria del intestino, infecciones víricas, infecciones por VIH y SIDA.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, una secuencia de aminoácidos del CXCL11 se une a una secuencia de aminoácidos heteróloga.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método comprende adicionalmente administrar al sujeto un agente adicional anti-esclerosis múltiple.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el agente anti-esclerosis múltiple se selecciona entre el grupo que consiste en Interferón Beta 1a, Interferón Beta 1B, acetato de glatiramer, mitoxantrona, metil-prednisolona, prednisona, prednisolona, dexametasona, hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y corticotropina.

La presente invención aborda satisfactoriamente los inconvenientes de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando un nuevo medio para tratar enfermedades inflamatorias.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un especialista en la técnica a la cual pertenece esta invención.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describe en este documento, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que las particularidades mostradas son a modo ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se hace intento de mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle que lo necesario para una comprensión fundamental de la invención, haciendo, la descripción tomada junto con los dibujos, que sea evidente para los especialistas en la técnica el modo en que pueden llevarse a la práctica varias formas de la invención.

En los dibujos:

FIG. 1A-B son gráficos de barras que representan la especificidad de anticuerpos anti-CXCL9, anti-CXCL10 y anti-CXCL11. La figura 1A muestra la selectividad de unión de cada uno de los anticuerpos basados en vacunación con ADN a cada uno de los tres ligandos de CXCR3; CXCL9, CXCL10 y CXCL11 detectados por ELISA. Se muestran resultados de triplicados como la media de la DO (450 nm) ± DT. La figura 1B muestra la neutralización de la quimiotaxis por cada uno de los anticuerpos basados en vacunación con ADN usando un ensayo de migración transpocillo. Se midió la capacidad de cada anticuerpo de inhibir la migración inducida por quimioquinas de células CXCR3+ (línea Th1 CD4+ MOG específica construida por el presente inventor) por cada quimioquina. Se analizaron resultados de mediciones por triplicado por citometría de flujo y se muestran como la cantidad relativa media de células ± DT.

La FIG. 2 es un gráfico que representa el valor de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) de ratones después de administración de anticuerpos anti-CXCL9, anti-CXCL10 o anti-CXCL11. El gráfico muestra los resultados de un experimento representativo (1 de 3 con observaciones similares) en que, justo después del inicio de la enfermedad (día 11), los ratones con EAE inducida se separaron en cinco grupos igualmente enfermos y se les administró (en los días 11, 13, 15 y 17) anticuerpos de neutralización basados en vacunación con ADN contra CXCL9 (cuadrados rellenos), CXCL10 (triángulos vacíos) o CXCL11 (triángulos rellenos). A los dos grupos restantes de ratones EAE se les administró anticuerpos purificados de ratas previamente inyectadas con un vector vacío solamente (círculos vacíos) o permanecieron sin tratar (cuadrados vacíos). Entonces un observador ciego al protocolo experimental controló el desarrollo y progresión de la enfermedad. Los resultados se muestran como el valor máximo medio ± DT.

La FIG. 3 es un gráfico que representa proteínas de fusión CXCL11-IgG y CXCL10-IgG que conservan sus propiedades funcionales. El gráfico muestra la capacidad de las proteínas de fusión CXCL11-IgG y CXCL10-IgG de atraer células T CXCR3+ en un sistema transpocillo y la competencia de anticuerpos neutralizantes anti-CXCL11 y anti-CXCL10 (R&D Systems) de inhibir selectivamente la migración inducida por quimioquinas de cada quimioquina. Se analizaron resultados de mediciones por triplicado por citometría de flujo y se muestran como la cantidad relativa media de células ± DT.

La FIG. 4 es un gráfico que representa el valor de EAE de ratones después de administración de las proteínas de fusión CXCL11-IgG o CXCL10-IgG. El gráfico muestra los resultados de un experimento representativo (1 de 4 con observaciones similares) en que, justo después del inicio de la enfermedad (día 11), los ratones con EAE inducida se separaron en cinco grupos igualmente enfermos y se les administró (en los días 11, 13, 15 y 17) CXCL10-IgG (triángulos vacíos) o CXCL11-IgG (triángulos rellenos). A los grupos restantes se les administró actina-β-IgG purificada (cuadrados rellenos), IgG1 de isotipo coincidente (círculos vacíos), o permanecieron sin tratar (cuadrados vacíos). Entonces un observador ciego al protocolo experimental controló el desarrollo y progresión de la enfermedad. Los resultados se muestran como el valor máximo medio ± DT.

Las FIG. 5A-F son gráficos de barras que representan la producción ex vivo de citoquinas en cultivos de células T primarias en respuesta al antígeno diana (MOG_{35-55}). Las células T primarias se recogieron de los ganglios linfáticos cervicales (CLN) de ratones con EAE inducida en el máximo de la enfermedad (en el día 15). Las células T se estimularon con el péptido MOG_{35-53} del antígeno diana y se cultivaron en presencia de CXCL10-IgG, CXCL11-IgG o PBS o anticuerpo de control hIgG durante 72 horas. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron por ELISA. La figura 5A muestra la secreción de TNF-α; la figura 5B muestra la secreción de IFN-γ; la figura muestra la secreción de IL-12; la figura 5D muestra la secreción de IL-2; la figura 5E muestra la secreción de IL-4; y la figura 5F muestra la secreción de IL-10. Se muestran resultados de triplicados como el nivel medio de citoquinas ± DT.

La FIG. 6 es un gráfico que representa el valor de EAE de ratones después de transferencia de células T desde donantes tratados o no tratados para EAE. Se cultivaron las células esplénicas primarias de ratones donantes con EAE inducida tratados con CXCL11-IgG o no tratados con antígeno diana MOG_{35-55} y se transfirieron a ratones receptores con EAE inducida, justo después del inicio de la enfermedad del siguiente modo: células de donantes tratados con CXCL11-IgG (cuadrados rellenos); células de ratones con EAE inducida de control (círculos vacíos); y ratones no sometidos a células T donantes (cuadrados vacíos). Entonces un observador ciego al protocolo experimental controló el desarrollo y progresión de la enfermedad. Los resultados presentados son resultados representativos de uno de dos experimentos con observaciones muy similares. Los resultados se muestran como el valor máximo medio de seis ratones por grupo ± DT.

Las FIG. 7A-E son gráficos de barras que representan la producción ex vivo de citoquinas en cultivos de células T primarias en respuesta al antígeno diana (MOG_{35-55}) suplementado o no suplementado con CXCL11-IgG. La producción de citoquinas se determinó por ELISA del siguiente modo: la figura 7A muestra la secreción de IL-10; la figura 7B muestra la secreción de IL-4; la figura 7C muestra la secreción de IFN-γ; la figura 7D muestra la secreción de TNF-α; y la figura 7E muestra la secreción de TGF-β. Se muestran resultados de triplicados como el nivel medio de citoquinas ± DT.

Las FIG. 8A-B son histogramas de análisis FACS que representan células T productoras de IL-10. El análisis de citometría de flujo se activó en CD4+ e IL-10 (eje horizontal). La figura 8A muestra células esplénicas activadas con MOG_{35-55} de control. La figura 8B muestra células esplénicas activadas con MOG_{35-55} que se co-cultivaron con CXCL11-IgG.

La FIG. 9 es un gráfico que representa el valor de EAE de ratones después de transferencia de células T primarias de cultivos previamente cultivados con el antígeno diana (MOG_{35-55}) suplementado o no suplementado con CXCL11-IgG. Las células esplénicas primarias se transfirieron a ratones receptores con EAE inducida, justo después del inicio de la enfermedad (en el día 11) del siguiente modo: receptores de células previamente cultivadas con CXCL11-IgG (cuadrados rellenos), receptores de células previamente cultivadas solamente con MOG_{35-55} (círculos rellenos), sin tratamiento (cuadrados vacíos), receptores de células que después de la administración de células T previamente cultivadas con CXCL11-IgG, se les administró anticuerpos neutralizantes anti-IL-10 (círculos vacíos, * este grupo se controló solamente durante 10 días para evitar la producción de anticuerpos xenográficos). Entonces un observador ciego al protocolo experimental controló el desarrollo y progresión de la enfermedad. Los resultados presentados resumen uno de dos experimentos independientes con el mismo patrón de datos. Los resultados se muestran como el valor máximo medio de seis ratones por grupo ± DT.

Las FIG. 10A-K son gráficos de barras que representan la re-polarización de células T efectoras y vírgenes en respuesta a estimulación in vitro con CXCL11. Las figuras 10A-F muestran la producción de citoquinas ex vivo por cultivos de células T primarias en respuesta al antígeno diana (MOG_{35-55}). Las células T primarias se aislaron de ratones con EAE inducida (en el día 9) y se cultivaron adicionalmente durante 72 horas con MOG_{35-55} (50 μg/ml) en presencia de rmCXCL10 o rmCXCL11 (50 ng/ml). Se determinaron los niveles de citoquinas TNF-α (figura 10A), IFN-γ (figura 10B), IL-12 (figura 10C), IL-2 (figura 10D), IL-4 (figura 10E) e IL-10 (figura 10F) en el medio de cultivo por ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los resultados se muestran como el nivel medio ± DT; las figuras 10G-K muestran la producción de citoquinas ex vivo por células T CD4+ vírgenes. Las células T CD4+ vírgenes se purificaron de bazos de ratones usando perlas magnéticas y se estimularon (300.000 células/ml) durante 48 horas con mAb anti-CD3ε inmovilizado y mAb anti-CD28 soluble en presencia de rmCXCL10 o rmCXCL11 (50 ng/ml). Se determinaron los niveles de citoquinas TNF-α (figura 10G), IFN-γ (figura

10H), IL-2 (figura 10I), IL-4 (figura 10J) e IL-10 (figura 10K) por ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los resultados se muestran como el nivel medio ± DT.

La FIG. 11 es un gráfico de barras que muestra que la actividad CXCL11 está mediada por CXCR3. Se purificaron células T CD4+ humanas de células mononucleares de sangre periférica usando perlas magnéticas anti-CD4 y se estimularon (300.000 células/ml) durante 48 horas con mAb anti-CD3ε en presencia de rhCXCL10 o rhCXCL11 (10 ng/ml). Algunos de los cultivos se suplementaron adicionalmente con el anticuerpo neutralizante anti-CXCR3 (0,5 μg/ml). Los niveles de IL-10 se determinaron por ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de IL-10 se muestran como niveles medios ± DT.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención es de métodos para tratar trastornos autoinmunes, tales como esclerosis múltiple usando CXCL11 y composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo.

Los principios y funcionamiento de los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención tiene capacidad para otras realizaciones o para ponerse en práctica o realizarse de diversos modos. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en este documento son con fines de descripción y no deben considerarse limitantes.

Tradicionalmente las quimioquinas se han visto principalmente como mediadores pro-inflamatorios que atraen leucocitos inflamatorios, particularmente células T efectoras y monocitos activados a sitios de inflamación, y por lo tanto muchas de ellas y sus receptores acoplados a proteína G, de siete dominios transmembrana han sido dianas principales para terapia de enfermedades autoinmunes inflamatorias.

CXCL9, CXCL10 y CXCL11 son todos potentes quimioquinas que median sus actividades uniéndose a un receptor común llamado CXCR3. Aunque existen potentes evidencias cumulativas que sugieren tanto CXCL9 como CXCL10 son mediadores pro-inflamatorios y que el eje CXCR3/CXCL10/CXCL9 desempeña un papel central en el reclutamiento de células T al cerebro en esclerosis múltiple (EM), se conoce poco a cerca de la función de CXCL11 en general y el papel que desempeña en EM en particular.

Al reducir la presente invención a la práctica, los presentes inventores han descubierto inesperadamente que CXCL11, a diferencia de sus activadores equivalentes de CXCR3, puede actuar como mediador antiinflamatorio y por consiguiente puede usarse como agente para el tratamiento de trastornos autoinmunes.

Específicamente, los presentes inventores han demostrado que el bloqueo mediado por anticuerpos de CXCL11 agrava la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) - una enfermedad autoinmune inducida experimentalmente del SNC, que sirve como modelo animal experimental para esclerosis múltiple. Esto está en agudo contraste con CXCL10 o CXCL9, donde la neutralización de los mismos demostró suprimir EAE (Figura 2).

Usando una proteína de fusión CXCL11-Ig, los presentes inventores ensayaron CXCL11 para su competencia en suprimir EAE en curso y demostraron que era capaz de suprimir la gravedad de la enfermedad (Figura 4). En contraste, la administración de CXCL10-IgG a ratones con EAE inducida durante una enfermedad en curso agravó significativamente su severidad. La terapia satisfactoria con CXCL11-IgG condujo a una reducción significativa en la secreción de mediadores pro-inflamatorios TNF-α, IFN-γ e IL-12 (Figuras 5A-D) y una producción elevada de los mediadores antiinflamatorios IL-4 e IL-10 (Figuras 5E-F).

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmune en un sujeto que lo necesite. El método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente de CXCL11.

Como se usa en este documento, el término "tratar" se refiere a prevenir, curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos nocivos de la enfermedad inflamatoria.

En este documento, la expresión "enfermedad autoinmune" se refiere a una enfermedad resultante de una reacción inmune alterada (por ejemplo, producción de anticuerpos) generada contra componentes del propio organismo (es decir, auto-antígenos). El sistema inmune del sujeto entonces activa una cascada inflamatoria dirigida a células y tejidos que presenten aquellos auto-antígenos específicos. La destrucción del antígeno, tejido, tipo celular, u órgano atacado por el propio sistema inmune del individuo da lugar a los síntomas de la enfermedad.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple, la enfermedad inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza típicamente por diversos síntomas de disfunción neurológica. Puede tratarse cualquier tipo de esclerosis múltiple de acuerdo con los contenidos de la presente invención incluyendo casos recidivantes-remitentes, progresivos secundarios, progresivos primarios, recidivantes progresivos y especiales de EM son comportamiento no convencional (también mencionadas como formas límite de EM), tales como por ejemplo sin limitación, neuromielitis óptica (NMO), esclerosis concéntrica de Balo, enfermedad de Schilder, esclerosis múltiple de Marburg, encefalomielitis diseminada aguda (EMDA) y variantes autoinmunes de neuropatías periféricas. La enfermedad puede tratarse en cualquier fase.

Se apreciará que el CXCL11 de la presente invención también puede usarse para tratar otras enfermedades inflamatorias.

La expresión "enfermedad inflamatoria", como se usa en este documento, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que incluya un componente de inflamación, que es imperativo para la aparición o progresión de la enfermedad. La enfermedad inflamatoria puede ser una enfermedad crónica o una recidivante remitente. Otros ejemplos de enfermedades autoinmunes y otras enfermedades inflamatorias se detallan a continuación en este documento.

La expresión "sujeto que lo necesite" como se usa en este documento, típicamente se refiere a un sujeto humano. Típicamente, se ha diagnosticado al sujeto con la enfermedad inflamatoria. El sujeto puede haber recibido o no tratamiento para la enfermedad inflamatoria.

Como se usa en este documento el término "CXCL11" (también mencionado en este documento como ITAC) se refiere a al menos una parte activa de un polipéptido de quimioquina C-X-C de mamífero (por ejemplo, humano) que tiene al menos una propiedad funcional específica para CXCL11 y no para los otros ligandos de CXCR3 (es decir, CXCL9 y CXCL10). Por consiguiente, el CXCL11 de la presente invención puede comprender la capacidad de inducir la internalización del receptor CXCR3, puede reducir la secreción de mediadores pro-inflamatorios tales como TNF-α, IFN-γ e IL-12 o aumentar la producción de mediadores antiinflamatorios tales como IL-4 e IL-10 a partir de células T o macrófagos. Preferiblemente, el CXCL11 de la presente invención comprende todas las propiedades funcionales anteriores. De acuerdo con una realización, el CXCL11 de la presente invención es capaz de suprimir la EM en curso como se ilustra en la Figura 4 (véase la siguiente sección de ejemplos). Se exponen ejemplos de secuencias de aminoácidos de CXCL11 en los números de acceso a GenBank AAH05292 o EAX05774. Cualquier CXCL11 conocido en la técnica puede usarse de acuerdo con los contenidos de la presente invención. Por ejemplo, está disponible CXCL11 humano recombinante en ProSpec-Tany Tech-noGene Ltd, Nº de Catalogo CHM-334, en Cell Sciences y en Biovision.

De acuerdo con una realización particularmente preferida de la presente invención, se une CXCL11 a una secuencia heteróloga de aminoácidos.

Como se usa en este documento, la expresión "secuencia heteróloga de aminoácidos" se refiere a una secuencia de aminoácidos que no forma parte de forma endógena de la secuencia de aminoácidos de CXCL11. Preferiblemente, la secuencia heteróloga de aminoácidos no regula negativamente la actividad biológica (por ejemplo, actividad anti-EM) del polipéptido CXCL11.

La secuencia heteróloga de aminoácidos por tanto puede servir para asegurar la estabilidad del CXCL11 de la presente invención sin comprometer su actividad. Por ejemplo, el polipéptido heterólogo puede aumentar la semivida de la molécula quimérica CXCL11 en el suero. Como alternativa, la secuencia heteróloga de aminoácidos puede ayudar al aislamiento de un CXCL11 recombinante como se describe adicionalmente en este documento a continuación. Ejemplos de secuencias heterólogas de aminoácidos que pueden usarse de acuerdo con los contenidos de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, inmunoglobulina, galactosidasa, glucuronidasa, glutatión-S-transferasa (GST), péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica (CGβ) y cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) [véase, por ejemplo, Suzuki et al., supra; y la publicación de Estados Unidos Nº 20030171551].

El sitio exacto en el cual realizar la fusión (conjugación) entre la secuencia heteróloga de aminoácidos y la secuencia de aminoácidos de CXCL11 no es crítico. Generalmente, la secuencia heteróloga de aminoácidos se localiza en el extremo amino o carboxilo (n-ter o c-ter, respectivamente) del polipéptido CXCL11 de la presente invención. Son bien conocidos en la técnica sitios particulares y pueden seleccionarse para optimizar la actividad biológica, la secreción o características de unión de las moléculas quiméricas de este aspecto de la presente invención.

La secuencia heteróloga de aminoácidos puede unirse a la secuencia de aminoácidos de CXCL11 mediante cualquier enlace peptídico o no peptídico. La unión de la secuencia de aminoácidos de CXCL11 a la secuencia heteróloga de aminoácidos puede realizarse por enlace covalente directo (enlace peptídico o un enlace péptido sustituido) o unión indirecta tal como por el uso de un enlazador que tiene grupos funcionales. Los grupos funcionales incluyen, sin limitación, un ácido carboxílico libre (C(=O)OH), un grupo amino libre (NH_2), un grupo éster (C(=O)OR, donde R es alquilo, cicloalquilo o arilo), un grupo acil haluro (C(=O) A, donde A es fluoruro, cloruro,

bromuro o ioduro), un haluro (fluoruro, cloruro, bromuro o ioduro), un grupo hidroxilo (OH), un grupo tiol (SH), un grupo nitrilo (C=N), un grupo C-carbámico libre (NR"-C(=O)-OR', donde cada uno R' y R" es independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o arilo).

Un ejemplo de una secuencia heteróloga de aminoácidos que puede usarse de acuerdo con este aspecto de la presente invención es una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, tal como las regiones de bisagra y Fc de un dominio pesado de inmunoglobulina (véase la patente de Estados Unidos Nº 6.777.196). El resto de inmunoglobulina en las quimeras de este aspecto de la presente invención puede obtenerse de los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM, como se analiza adicionalmente en este documento a continuación. Un polipéptido CXCL11 humano ejemplar unido a un resto IgG1 se expone en la SEC ID Nº 6.

Se conocen en la técnica las quimeras construidas a partir de una secuencia receptora unida a una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina apropiado (inmunoadhesinas). Las inmunoadhesinas presentadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de células T [Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:2936-2940 (1987)]; CD4 [Capon et al., Nature 337:525-531 (1989); Traunecker et al., Nature, 339: 68-70 (1989); Zettmeissl et al, DNA Cell Biol. USA, 9: 347-353 (1990); Byrn et al., Nature, 344: 667-670 (1990)]; L-selectina (receptor homing) [(Watson et al., J. Cell. Biol., 110:2221-2229 (1990); Watson et al., Nature, 349: 164-167 (1991)]; CD44 [Aruffo et al., Cell, 61: 1303-1313 (1990)]; CD28 y B7 (Linsley et al., J. Exp. Med., 173: 721-730(1991)]; CTLA-4 [Lisley et al., J. Exp. Med. 174: 561-569 (1991)]; CD22 [Stamenkovic et al., Cell, 66:1133-1144 (1991)]; receptor de TNF [Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-10539 (1991); Lesslauer et al., Eur. J. Immunol., 27:2883-2886(1991); Peppel e tal., J. Exp. Med., 174:1483-1489(1991)]; receptores NP [Bennett et al., J. Biol. Chem. 266:23060-23067 (1991)]; y el receptor α de IgE [Ridgway et al., J. Cell. Biol., 1 15: resumen 1448 (1991)].

Típicamente, en dichas fusiones la molécula quimérica retendrá al menos los dominios funcionalmente activos de bisagra, y CH2 y CH3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también pueden generarse en el extremo C-terminal de la parte Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminal al CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera.

Aunque puede ser posible conjugar la región constante de cadena pesada completa a la secuencia de aminoácidos de CXCL11 de la presente invención, es preferible fusionar secuencias más cortas. Por ejemplo, puede usarse en la fusión una secuencia que comience en la región bisagra cadena arriba del sitio de escisión con papaína, que define Fc de IgG químicamente; el resto 216, adoptando el primer resto de la región constante de cadena pesada como el 114, o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos de CXCL11 se fusiona a la región bisagra y CH2 y CH3, o a los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 de una cadena pesada de IgG1, IgG2 o IgG3 (véase la patente de Estados Unidos Nº 6.777.196).

Como se ha mencionado, las secuencias de inmunoglobulina usadas en la construcción de moléculas quiméricas de este aspecto de la presente invención pueden ser de un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina IgG. De acuerdo con una realización de la presente invención, la secuencia de inmunoglobulina IgG es por ejemplo la expuesta en las SEC ID Nº 3 y 21. Dicha secuencia de inmunoglobulina IgG puede purificarse de forma eficaz sobre proteína A inmovilizada. La selección de un compañero de fusión puede tener también en cuenta propiedades estructurales y funcionales de las inmunoglobulinas. Por tanto, por ejemplo, el péptido heterólogo puede ser la bisagra de IgG3 que es más larga y más flexible, de modo que puede acomodar secuencias de aminoácidos más largas de CXCL11 que no pueden plegarse o funcionar apropiadamente cuando se fusionan a IgG1. Otra consideración puede ser la valencia; IgG son homodímeros bivalentes, mientras que los subtipos de Ig como IgA e IgM pueden dar lugar a estructuras diméricas o pentaméricas, respectivamente, de la unidad homodimérica Ig básica. Otras consideraciones en la selección de la parte de inmunoglobulina de las moléculas quiméricas de este aspecto de la presente invención se describen en la patente de Estados Unidos Nº 6. 77.196.

Los polipéptidos de fusión de CXCL11 de la presente invención pueden generarse usando técnicas recombinantes tales como las descritas por Bitter et al. (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544; Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89; Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514; Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311; Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680; Brogli et al. (1984) Science 224:838-843; Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 y Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, pág. 421-463.

Los péptidos heterólogos también pueden unirse químicamente a CXCL11 tras la generación independiente de cada uno de ellos. Por tanto, los dos péptidos pueden unirse covalente o no covalentemente usando cualquier método de ligamiento o unión y/o cualquier enlazador químico adecuado conocido en la técnica. Dicha unión puede ser directa o indirecta, como mediante un enlace peptídico o mediante enlace covalente a un elemento enlazador intermedio, tal como un péptido enlazador u otro resto químico, tal como un polímero orgánico. Dichos péptidos quiméricos pueden unirse mediante enlace a los extremos carboxi (C) o amino (N) de los péptidos, o mediante enlace a grupos químicos internos tales como cadenas laterales lineales, ramificadas o cíclicas, átomos internos de carbono o nitrógeno, y similares. El tipo exacto y naturaleza química de dichos reticulantes y métodos de reticulación está adaptado preferiblemente al tipo y naturaleza de los péptidos usados.

Se apreciará que el tratamiento de las enfermedades autoinmunes de acuerdo con la presente invención puede combinarse con otros métodos de tratamiento conocidos en la técnica (es decir, terapia de combinación). Por tanto, por ejemplo, la esclerosis múltiple puede tratarse con el CXCL11 de la presente invención junto con otros agentes que incluyen, aunque sin limitación, interferón beta 1a, interferón beta 1b, acetato de glatiramer, mitoxantrona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, dexametasona, hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y corticotropina. La presente invención, por lo tanto, contempla artículos de fabricación que comprenden CXCL11 y un agente anti-esclerosis múltiple que se envasan en un material de envasado y se identifican de forma impresa, en o sobre el material de envasado para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Como se ha mencionado, los polipéptidos CXCL11 de la presente invención pueden usarse para tratar enfermedades inflamatorias diferentes a la esclerosis múltiple. Dichas enfermedades y trastornos asociados a inflamación se resumen infra.

Enfermedades inflamatorias asociadas con hipersensibilidad

Ejemplos de hipersensibilidad incluyen, aunque sin limitación, hipersensibilidad de tipo I, hipersensibilidad de tipo II, hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpos, hipersensibilidad mediada por el complejo inmune, hipersensibilidad mediada por linfocitos T y DTH.

Hipersensibilidad de tipo I o inmediata, tal como asma.

La hipersensibilidad de tipo II incluye, aunque sin limitación, enfermedades reumatoides, enfermedades autoinmunes reumatoides, artritis reumatoide (Krenn V. et al., Histol Histopathol 2000 Jul; 15 (3):791), espondilitis, espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel et al., Arthritis Res 2001; 3 (3): 189), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunes sistémicas, lupus sistémico eritematoso (Erikson J. et al., Immunol Res 1998;17 (1-2):49), esclerosis, esclerosis sistémica (Renaudineau Y. et al., Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar; 6 (2):156); Chan OT. et al., Immunol Rev 1999 Jun; 169:107), enfermedades glandulares, enfermedades autoinmunes glandulares, enfermedades autoinmunes pancreáticas, diabetes, diabetes de tipo I (Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct; 34 Supl: S125), enfermedades de tiroides, enfermedades autoinmunes de tiroides, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun; 29 (2):339), tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S, J Immunol 2000 Dic 15; 165 (12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., Nippon Rinsho 1999 Ago; 57 (8):1810), mixedema, mixedema idiopática (Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Ago; 57 (8):1759); enfermedades reproductoras autoinmunes, enfermedades de ovario, autoinmunidad en el ovario (Garza KM. et al., J Reprod Immunol 1998 Feb; 37 (2): 87), infertilidad autoinmune anti-espermática (Diekman AB. et al., Am J Reprod Immunol. 2000 Mar; 43 (3):134), pérdida repetida del feto (Tincani A. et al., Lupus 1998;7 Supl. 2:S107-9), enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, enfermedades neurológicas autoinmunes, esclerosis múltiple (Cross AH. Et al., J Neuroimmunol 2001 Ene 1; 112 (1-2):1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. et al., J Neural Transm Supl. 1997; 49:77), miastenia grave (Infante AJ. y Kraig E, Int Rev Immunol 1999; 18 (1-2):83), neuropatías motoras (Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May; 7 (3): 191), síndrome de Guillain-Barre, neuropatías y neuropatías autoinmunes (Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Abr; 319 (4):234), enfermedades miasténicas, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Abr; 319 (4):204), enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelar paraneoplásica, síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofias cerebelares, atrofias cerebelares progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatías, poliendocrinopatías autoinmunes (Antoine JC. y Honnorat J. Rev Neurol (París) 2000 Ene; 156 (1):23); neuropatías, neuropatías disinmunes (Nobile-Orazio E. et al., Electroencephalogr Clin Neurophysiol Supl. 1999; 50:419); neuromiotonía, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. et al., Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13; 841:482), enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes cardiovasculares, ateroesclerosis (Matsuura E. et al., Lupus. 1998;7 Supl. 2:S135), infarto de miocardio (Vaarala O. Lupus. 1998; 7 Supl. 2:S132), trombosis (Tincani A. et al., Lupus 1998; 7 Supl. 2:S107-9), granulomatosis, granulomatosis de Wegener, arteritis, arteritis de Takayasu y síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. et al., Wien Klin Wochenschr 2000 Ago 25; 112 (15-16):660); enfermedad autoinmune anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al., Semin Thromb Hemost. 2000; 26 (2):157); vasculitis, vasculitis necrotizante de vasos pequeños, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis, glomerulonefritis necortizante focal pauci-inmune, glomerulonefritis crescéntica (Noel LH. Ann Med Interne (París). 2000 May; 151 (3):178); síndrome antifosfolípido (Flamholz R. et al., J Clin Apheresis 1999; 14 (4): 171); fallo cardiaco, anticuerpos contra beta-adrenoceptor tipo agonista en fallo cardiaco (Wallukat G. et al., Am J Cardiol. 1999 Jun 17; 83(12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Abr-Jun; 14(2):114); anemia hemolítica, anemia hemolítica autoinmune (Efremov DG. et al., Leuk Lymphoma 1998 Ene; 28 (3-4):285), enfermedades gastrointestinales, enfermedades autoinmunes del tracto gastrointestinal, enfermedades intestinales, enfermedad inflamatoria crónica intestinal (Garcia Herola A. et al., Gastroenterol Hepatol. 2000 Ene; 23 (1):16), enfermedad celíaca (Landau YE. y Shoenfeld Y. Harefuah 2000 Ene 16; 138 (2):122), enfermedades autoinmunes de la musculatura, miositis, miositis autoinmune, síndrome de Sjogren (Feist E. et al., Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep; 123 (1):92); enfermedad autoinmune del músculo liso (Zauli D. et al., Biomed Pharmacother 1999 Jun; 53 (5-6):234), enfermedades hepáticas, enfermedades hepáticas autoinmunes, hepatitis autoinmune (Manns MP. J Hepatol 2000 Ago; 33 (2):326) y cirrosis biliar primaria (Strassburg CP. et al., Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Jun; 11 (6):595).

La hipersensibilidad de tipo IV o mediada por células T incluye, aunque sin limitación, enfermedades reumatoides, artritis reumatoide (Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Ene 18; 91 (2):437), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunes sistémicas, lupus sistémico eritematoso (Datta SK., Lupus 1998; 7 (9):591), enfermedades glandulares, enfermedades autoinmunes glandulares, enfermedades pancreáticas, enfermedades autoinmunes pancreáticas, diabetes de tipo I (Castano L. y Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647); enfermedades de tiroides, enfermedades autoinmunes de tiroides, enfermedad de Graves (Sakata S. et al., Mol Cell Endocrinol 1993 Mar; 92 (1):77); enfermedades de ovario (Garza KM. et al., J Reprod Immunol 1998 Feb; 37 (2):87), prostatitis, prostatitis autoinmune (Alexander RB. et al., Urology 1997 Dic; 50 (6):893), síndrome poliglandular, síndrome poliglandular autoinmune, síndrome poliglandular autoinmune de tipo I (Hara T. et al., Blood. 1991 Mar 1; 77 (5):1127), enfermedades neurológicas, enfermedades neurológicas autoinmunes, esclerosis múltiple, neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May; 57 (5):544), miastenia grave (Oshima M. et al., Eur J Immunol 1990 Dic; 20 (12):2563), síndrome del hombre rígido (Hiemstra HS. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Mar 27; 98 (7):3988), enfermedades cardiovasculares, autoinmunidad cardiaca en enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. et al., J Clin Invest 1996 Oct 15; 98 (8):1709), púrpura trombocitopénica autoinmune (Semple JW. et al., Blood 1996 May 15; 87 (10):4245), autoinmunidad anti-linfocitos T auxiliares (Caporossi AP. et al., Viral Immunol 1998; 11 (1):9), anemia hemolítica (Sallah S. et al., Ann Hematol 1997 Mar; 74 (3):139), enfermedades hepáticas, enfermedades hepáticas autoinmunes, hepatitis, hepatitis activa crónica (Franco A. et al., Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar; 54 (3):382), cirrosis biliar, cirrosis biliar primaria (Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996 Nov; 91 (5):551), enfermedades nefríticas, enfermedades nefríticas autoinmunes, nefritis, nefritis intersticial (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Ago; 1 (2):140), enfermedades del tejido conectivo, enfermedades auditivas, enfermedades autoinmunes del tejido conectivo, enfermedad auditiva autoinmune (Yoo TJ. et al., Cell Immunol 1994 Ago; 157(1):249), enfermedad del oído interno (Gloddek B. et al., Ann N Y Acad Sci 1997 Dic 29; 830:266), enfermedades de la piel, enfermedades cutáneas, enfermedades dérmicas, enfermedades bulosas de la piel, pénfigo vulgar, penfigoide buloso y pénfigo foliáceo.

Ejemplos de hipersensibilidad de tipo retardado incluyen, aunque sin limitación, dermatitis por contacto y erupción por fármacos.

Ejemplos de tipos de linfocitos T que median hipersensibilidad incluyen, aunque sin limitación, linfocitos T auxiliares y linfocitos T citotóxicos.

Ejemplos de hipersensibilidad mediada por linfocitos T auxiliares incluyen, aunque sin limitación, hipersensibilidad mediada por linfocitos T_h1 e hipersensibilidad mediada por linfocitos T_h2.

Enfermedades autoinmunes

Incluyen, aunque sin limitación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumatoides, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conectivo y enfermedades sistémicas.

Ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunes incluyen, aunque sin limitación ateroesclerosis (Matsuura E. et al., Lupus. 1998; 7 Supl. 2:S 135), infarto de miocardio (Vaarala O. Lupus. 1998; 7 Supl. 2:S132), trombosis (Tincani A. et al., Lupus 1998;7 Supl. 2:S107-9), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. et al., Wien Klin Wochenschr 2000 Ago 25; 112 (15-16):660), enfermedad autoinmune anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al., Semin Thromb Hemost. 2000; 26 (2):157), vasculitis necrotizante de vasos pequeños, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrotizante focal pauci-inmune y crescéntica (Noel LH. Ann Med Interne (Paris). 2000 May; 151 (3):178), síndrome antifosfolípido (Flamholz R. et al., J Clin Apheresis 1999; 14 (4):171), fallo cardiaco inducido por anticuerpos (Wallukat G. et al., Am J Cardiol. 1999 Jun 17; 83 (12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Abr-Jun; 14 (2):114; Semple JW. et al., Blood 1996 May 15; 87 (10):4245), anemia hemolítica autoinmune (Efremov DG. et al., Leuk Lymphoma 1998 Ene; 28 (3-4):285; Sallah S. et al., Ann Hematol 1997 Mar; 74 (3):139), autoinmunidad cardiaca en enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. et al., J Clin Invest 1996 Oct 15; 98 (8): 1709) y autoinmunidad anti-linfocitos T auxiliares (Caporossi AP. et al., Viral Immunol 1998; 11 (1):9).

Ejemplos de enfermedades reumatoides autoinmunes incluyen, aunque sin limitación artritis reumatoide (Krenn V. et al., Histol Histopathol 2000 Jun; 15 (3):791; Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci units S A 1994 Ene 18; 91 (2):437) y espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel et al., Arthritis Res 2001; 3 (3): 189).

Ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunes incluyen, aunque sin limitación, enfermedad pancreática, diabetes de tipo I, enfermedad de tiroides, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopática, autoinmunidad en el ovario, infertilidad autoinmune anti-espermática, prostatitis autoinmune y síndrome poliglandular autoinmune de tipo I. Enfermedades incluyen, aunque sin limitación enfermedades autoinmunes del páncreas, diabetes de tipo I (Castano L. y Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647; Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct; 34 Supl: S125), enfermedades autoinmunes de tiroides,

enfermedad de Graves (Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun; 29 (2): 339; Sakata S. et al., Mol Cell Endocrinol 1993 Mar; 92 (1):77), tiroiditis autoinmune espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S, J Immunol 2000 Dic 15; 165 (12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., Nippon Rinsho 1999 Ago; 57 (8):1810), mixedema idiopática (Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Ago; 57 (8):1759), autoinmunidad en el ovario (Garza KM. el al., J Reprod Immunol 1998 Feb; 37 (2):87), infertilidad autoinmune anti-espermática (Diekman AB. et al., Am J Reprod Immunol. 2000 Mar; 43 (3):134), prostatitis autoinmune (Alexander RB. Et al., Urology 1997 Dic; 50 (6):893) y síndrome poliglandular autoinmune de tipo I (Hara T. et al., Blood. 1991 Mar 1; 77 (5):1127).

Ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunes incluyen, aunque sin limitación, enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (Garcia Herola A. et al., Gastroenterol Hepatol. 2000 Ene; 23 (1): 16), enfermedad celíaca (Landau YE. y Shoenfeld Y. Harefuah 2000 Ene 16; 138 (2): 122), colitis, ileítis y enfermedad de Crohn.

Ejemplos de enfermedades cutáneas autoinmunes incluyen, aunque sin limitación, enfermedades bulosas autoinmunes de la piel tales como, aunque sin limitación, pénfigo vulgar, penfigoide buloso y pénfigo foliáceo.

Ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunes incluyen, aunque sin limitación, hepatitis, hepatitis autoinmune activa crónica (Franco A. et al., Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar; 54 (3):382), cirrosis biliar primaria (Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996 Nov; 91 (5):551; Strassburg CP. et al., Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Jun; 11 (6):595) y hepatitis autoinmune (Manns MP. J Hepatol 2000 Ago; 33 (2):326).

Ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunes incluyen, aunque sin limitación, esclerosis múltiple (Cross AH. et al., J Neuroimmunol 2001 Ene 1; 112 (1-2):1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. et al., J Neural Transm Supl. 1997; 49: 77), miastenia grave (Infante AJ. y Kraig E, Int Rev Immunol 1999; 18 (1-2):83; Oshima M. et al., Eur J Immunol 1990 Dic; 20 (12):2563), neuropatías, neuropatías motoras (Komberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May; 7 (3):191); síndrome de Guillain-Barre y neuropatías autoinmunes (Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Abr; 319 (4):234), miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Abr; 319 (4):204); enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelar paraneoplásica y síndrome del hombre rígido (Hiemstra HS. et al., Proc Natl Acad Sci units S A 2001 Mar 27; 98 (7):3988); síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofias cerebelares progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunes (Antoine JC. y Honnorat J. Rev Neurol (París) 2000 Ene; 156 (1):23); neuropatías disinmunes (Nobile-Orazio E. et al., Electroencephalogr Clin Neurophysiol Supl. 1999; 50:419); neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. et al., Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13; 841:482), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May; 57 (5):544) y enfermedades neurodegenerativas.

Ejemplos de enfermedades musculares autoinmunes incluyen, aunque sin limitación, miositis, miositis autoinmune y síndrome de Sjogren primario (Feist E. et al., Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep; 123 (1):92) y enfermedad autoinmune del músculo liso (Zauli D. et al., Biomed Pharmacother 1999 Jun; 53 (5-6):234).

Ejemplos de enfermedades nefríticas autoinmunes incluyen, aunque sin limitación, nefritis y nefritis intersticial autoinmune (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Ago; 1 (2):140).

Ejemplos de enfermedades autoinmunes relacionadas con la reproducción incluyen, aunque sin limitación, pérdida repetida del feto (Tincani A. et al., Lupus 1998; 7 Supl. 2: S 107-9).

Ejemplos de enfermedades autoinmunes del tejido conectivo incluyen, aunque sin limitación, enfermedades auditivas, enfermedades auditivas autoinmunes (Yoo TJ. et al., Cell Immunol 1994 Ago; 157 (1):249) y enfermedades autoinmunes del oído interno (Gloddek B. et al., Ann N Y Acad Sci 1997 Dic 29; 830:266).

Ejemplos de enfermedades sistémicas autoinmunes incluyen, aunque sin limitación, lupus sistémico eritematoso (Erikson J. et al., Immunol Res 1998; 17 (1-2):49) y esclerosis sistémica (Renaudineau Y. et al., Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar; 6 (2):156); Chan OT. et al., Immunol Rev 1999 Jun; 169:107).

Enfermedades infecciosas

Ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen, aunque sin limitación, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades víricas, enfermedades bacterianas, enfermedades por protozoos, enfermedades por parásitos, enfermedades fúngicas, enfermedades por micoplasma y enfermedades por priones.

Enfermedades de rechazo de injertos

Ejemplos de enfermedades asociadas con el transplante de un injerto incluyen, aunque sin limitación, rechazo de injerto, rechazo crónico de injerto, rechazo subagudo de injerto, rechazo hiperagudo de injerto, rechazo agudo de injerto y enfermedad de injerto contra hospedador.

Enfermedades alérgicas

Ejemplos de enfermedades alérgicas incluyen, aunque sin limitación, asma, verdugones, urticaria, alergia al polen, alergia a los ácaros del polvo, alergia a venenos, alergia a cosméticos, alergia al látex, alergia a agentes químicos, alergia a fármacos, alergia a la picadura de insectos, alergia a la caspa de animales, alergia a plantas urticantes, alergia a la hiedra venenosa y alergia a alimentos.

Enfermedades cancerosas

Ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos particulares de enfermedades cancerosas aunque sin limitación: leucemia mieloide tal como leucemia mielógena crónica. Leucemia mielógena aguda con maduración. Leucemia promielocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda con basófilos aumentados, leucemia monocítica aguda. Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia; linfoma maligno, tal como no Hodgkin de Birkitt; leucemia linfocítica, tal como leucemia linfoblástica aguda. Leucemia linfocítica crónica; enfermedades mieloproliferativas, tales como tumores sólidos, meningioma benigno, tumores mixtos de glándula salivar, adenomas colónicos; adenocarcinomas, tales como cáncer de pulmón microcítico, de riñón, útero, próstata, vejiga, ovario, colon, sarcomas, liposarcoma mixoide, sarcoma sinovial, rabdomiosarcoma (alveolar), condrosarcoma mixoide extraesquelético, tumor de Ewing; otros incluyen disgerminoma testicular y ovárico, retinoblastoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, melanoma maligno, mesotelioma, de mama, piel, próstata, y ovario.

El CXCL11 de la presente invención puede administrarse al sujeto per se, o como parte de una composición farmacéutica, que también incluye un vehículo fisiológicamente aceptable. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración del ingrediente activo a un organismo.

Como se usa en este documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en este documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

Como se usa en este documento, la expresión "ingrediente activo" se refiere a la preparación responsable del efecto biológico pretendido.

A partir de ahora en este documento, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse de forma intercambiable hacen referencia a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante se incluye en estas expresiones. Uno de los ingredientes incluidos en el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad en medios tanto orgánicos como acuosos [Mutter et al. (1979)].

En este documento el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Pueden encontrarse técnicas de formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora en este documento por referencia.

Las vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, suministro oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, inrtaperitoneales, intranasales, o intraoculares.

Como alternativa, se puede administrar una preparación de un modo local en lugar de sistémico, por ejemplo, mediante inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procesos de mezcla convencional, disolución, granulación, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, inclusión o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de un modo convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden usarse de forma farmacéutica. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para inyección, los ingredientes activos de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosa, se usan en la formulación penetrantes apropiados para penetrar la barrera. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos posibilitan que la composición farmacéutica se formule en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, papillas, suspensiones, y similares, para ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral pueden prepararse usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados según lo deseado, para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, y carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, goma de agar, o ácido algínico o una sal de los mismos, tal como alginato sódico.

Los núcleos de gragea se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, pueden usarse soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca, y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de gragea para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas, que pueden usarse por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina así como capsules selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía elegida de administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de un modo convencional.

Para administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran de forma conveniente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizado con el uso de un gas inerte adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un dispensador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las preparaciones descritas en este documento pueden formularse para administración parenteral, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma unitaria de dosificación, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, pueden prepararse suspensiones de los ingredientes activos como suspensiones de inyección apropiadas de base oleosa o acuosa. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, una solución estéril, libre de pirógenos, basada en agua, antes de su uso.

La composición farmacéutica de la presente invención también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases convencionales de supositorio tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito pretendido. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de ingredientes activos (por ejemplo, una construcción de ácido nucleico) eficaz para prevenir, aliviar, o mejorar los síntomas de un trastorno (por ejemplo, isquemia) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz pertenece a las capacidades de los especialistas en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en este documento.

Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la dosificación o la cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos in vitro y de cultivo celular. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir una concentración o título deseado. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en este documento pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales in vitro, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos in vitro y de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración, y dosificación puede elegirlas el médico individual en vista de la afección del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, E. et al. (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Cap. 1, p.1.)

La cantidad de dosificación e intervalos de administración pueden ajustarse individualmente para proporcionar suficientes niveles en plasma o cerebro del ingrediente activo para inducir o suprimir el efecto biológico (es decir, concentración mínima eficaz, CME). La CME variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos in vitro. Las dosificaciones eficaces para conseguir la CME dependerán de características individuales y la vía de administración. Pueden usarse ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

Dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una única administración o una pluralidad de administraciones, durante el curso de tratamiento desde varios días hasta varias semanas, o hasta se produzca la cura o se consigue una disminución en la patología.

La cantidad de una composición a administrarse dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección, el modo de administración, el criterio del médico, etc.

Las composiciones de la presente invención pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas unitarias de dosificación que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para su administración. El envase o dispositivo dispensador también puede estar acompañado por un aviso en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso, o venta de agente farmacéuticos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones para administración a seres humanos o en veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede incluir el etiquetado aprobado por la Food and Drug Administration estadounidense para la prescripción de fármacos o de un prospecto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéuticamente aceptable también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado, y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado antes adicionalmente.

El descubrimiento de que CXCL11 polariza las células T en células T reguladoras que secretan citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-10 e IL-4) en lugar de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-12 y TNF-α), véanse las Figuras 10A-K, sugiere el uso de CXCL11 en entornos aislados para evitar efectos secundarios indeseados. Como se representa en detalle en los Ejemplos 4 y 6 a continuación en este documento, el tratamiento de la esclerosis múltiple (en un modelo murino) por terapia ex vivo mediante la administración de células T productoras de IL-10 específicas de antígeno seleccionadas en presencia de CXCL11-IgG conduce a una rápida remisión en la enfermedad activa.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmune en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método poner en contacto células T ex vivo con CXCL11 en condiciones que provoquen la generación de células T reguladoras y administrar las células T reguladoras al sujeto, tratando de este modo la enfermedad autoinmune en el sujeto.

Como se usa en este documento, la expresión "poner en contacto ex vivo" se refiere al proceso de aislar células T de un organismo y cultivarlas con CXCL11, como por ejemplo en una placa de cultivo o por una máquina automatizada (por ejemplo, aparato de diálisis celular que por configuraciones automatizadas separa células de fluidos corporales y las cultiva con las sustancias apropiadas en un entorno estéril), para posibilitar el contacto directo de las células con CXCL11.

Por tanto, las células T pueden aislarse de un origen autólogo (es decir del sujeto afectado de esclerosis múltiple), de un donante singénico, de un donante alogénico o de un donante xenogénico. Las células T también pueden obtenerse de un sujeto afectado de esclerosis múltiple que está experimentando tratamiento con CXCL11.

Además, las células T pueden estar comprendidas en una muestra de sangre sin procesar, en PBMC, o purificadas adicionalmente. En una realización ejemplar, las células T aisladas son células T CD4+ purificadas tales como células T CD4+ vírgenes. Para evitar los efectos de la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) mostrada por células T CD8+ (es decir, células T citotóxicas), se realiza la purificación de células T CD4+, en lugar de las células T CD8+.

Se conocen varias técnicas en la técnica para aislar células T [véase por ejemplo, Leavitt et al., Hum. Gene Ther. 5: 1115-1120 (1994)]. La expresión de marcadores de superficie facilita la identificación y purificación de células T. Los métodos de identificación y aislamiento de células T incluyen FACS, selección con perlas magnéticas y columnas del subconjunto de células T humanas. Las células aisladas de acuerdo con los contenidos de la presente invención deben permanecer estériles y mantenerse preferiblemente fuera del organismo durante un periodo de tiempo mínimo.

Posterior al aislamiento celular, las células T se someten a cultivo en presencia de CXCL11. Dichas condiciones de cultivo se describen en detalle en el Ejemplo 7 (en la sección de Ejemplos a continuación en este documento). Por ejemplo, las células T aisladas (aproximadamente 300.000 células/ml) pueden cultivarse en presencia de rhCXCL11 (10 ng/ml) y un péptido estimulador (por ejemplo, mAb anti-CD3ε y/o mAb anti-CD28 a una concentración de 2 μg/ml), en una atmósfera humidificada de CO_2 al 7,5% a 37ºC durante 48 horas.

Dichas condiciones de cultivo posibilitan la polarización de las células T aisladas en células T reguladoras. En una realización ejemplar, dichas condiciones de cultivo polarizan las células T para que se conviertan en células secretoras de IL-10 y/o IL-4. Además, después de estas condiciones de cultivo, se aprecia una reducción en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IFN-γ).

Como se usa en este documento, la expresión "células T reguladoras" se refiere al subconjunto de células T, también conocidas como células T supresoras, que son una subpoblación especializada de células T que actúan suprimiendo la activación del sistema inmune y manteniendo de este modo la homeostasis del sistema inmune y la tolerancia a auto-antígenos. Las células T CD4+ reguladoras pueden expresar los marcadores de membrana CD25 y/o Foxp3.

Entonces se administran células T reguladoras tratadas con CXCL11 al sujeto (por ejemplo, un sujeto diagnosticado con esclerosis múltiple como se ha descrito previamente en este documento).

Los especialistas en la técnica son capaces de determinar el momento y el modo de administrar las células T para tratar de este modo la esclerosis múltiple. La administración puede realizarse mediante inyección local, por administración en el sistema de circulación sistémica (por ejemplo, mediante el torrente sanguíneo o la cavidad peritoneal) o portal, o por cualquier otro medio práctico (véase, por ejemplo, el documento WO/2001/078752).

De acuerdo con una realización de los presentes contenidos, las células T reguladoras se seleccionan específicamente (es decir, se aíslan del cultivo celular) antes de administrarse al sujeto. Los métodos para aislar células T reguladoras se han descrito previamente en este documento.

Como se ha descrito anteriormente, las células T usadas para terapia ex vivo de acuerdo con los presentes contenidos pueden ser de una fuente no singénica (es decir, de un donante alogénico o xenogénico). Aunque la administración de células T reguladoras purificadas no debería causar EICH, en casos en que existe un riesgo de EICH o la aparición de EICH, puede emplearse cualquier protocolo de tratamiento de EICH. Dichos tratamientos pueden incluir la administración de fármacos inmunosupresores (por ejemplo, sirolimus, tacrolimus, ciclosporina, CTLA4-lg, anticuerpo anti-CD40L o rapamicina) que pueden administrarse individualmente o en combinación. Los fármacos inmunosupresores pueden administrarse antes de, de forma concomitante con, o después de la administración de las células T reguladoras.

Además, la administración de células no singénicas puede causar rechazo de las células usadas para terapia ex vivo. Se han desarrollado varios enfoques para reducir la probabilidad de rechazo de estas células no singénicas. Estos incluyen suprimir el sistema inmune del destinatario (como se ha descrito anteriormente) o encapsular las células T no autólogas en membranas semipermeables inmunoaislantes antes de su administración.

Las técnicas de encapsulación generalmente se clasifican como microencapsulación, que implica vehículos esféricos pequeños, y macroencapsulación, que implica membranas más grandes de lámina plana y fibra hueca (Uludag, H. et al. (2000). Technology of mammalian cell encapsulation. Adv Drug Deliv Rev 42, 29-64).

Los métodos para preparar microcápsulas son conocidos en la técnica e incluyen por ejemplo los descritos en: Lu, M. Z. et al. (2000). Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine). Biotechnol Bioeng 70, 479-483; Chang, T. M. y Prakash, S. (2001) Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. Mol Biotechnol 17, 249-260; y Lu, M. Z., et al. (2000). A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine alpha-cyanocinnamylideneacetate). J Microencapsul 17, 245-521.

Por ejemplo, las microcápsulas se preparan usando colágeno modificado en un complejo con una capa exterior de terpolímero de 2-hidroxietil metilacrilato (HEMA), ácido metacrílico (MAA), y metil metacrilato (MMA), que producen un grosor de cápsula de 2-5 μm. Dichas microcápsulas pueden encapsularse adicionalmente con 2-5 μm adicionales de capas exteriores de terpolímero para conferir una superficie lisa cargada negativamente y para minimizar la absorción en plasma de la proteína (Chia, S. M. et al. (2002). Multi-layered microcapsules for cell encapsulation. Biomaterials 23, 849-856).

Otras microcápsulas se basan en alginato, un polisacárido marino (Sambanis, A. (2003). Encapsulated islets in diabetes treatment. Diabetes Thechnol Ther 5, 665-668), o sus derivados. Por ejemplo, las microcápsulas pueden prepararse por formación de complejos de polielectrolitos entre los polianiones alginato sódico y sulfato de celulosa sódica y el policatión clorhidrato de poli(metileno-co-guanidina) en presencia de cloruro de calcio.

Se apreciará que la encapsulación celular se mejora cuando se usan cápsulas más pequeñas. Por tanto, por ejemplo, el control de la calidad, la estabilidad mecánica, las propiedades de difusión, y las actividades in vitro de las células encapsuladas mejoraron cuando el tamaño de la cápsula se redujo de 1 mm a 400 μm (Canaple, L. et al. (2002). Improving cell encapsulation through size control. J Biomater Sci Polym Ed 13, 783-96). Además, se descubrió que biocápsulas nanoporosas con tamaño de poro bien controlado tan pequeño como 7 nm, químicas de superficie adaptadas, y microarquitecturas precisas inmunoaíslan satisfactoriamente microentornos para las células (Véase: Williams, D. (1999). Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices. Med Device Technol 10, 6-9; y Desai, T. A. (2002). Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation. Expert Opin Biol Ther 2, 633-646).

El tratamiento de una enfermedad autoinmune, tal como esclerosis múltiple, de acuerdo con los presentes contenidos, puede repetirse cuando sea necesario, tal como durante recidiva.

Por tanto, la presente invención proporciona composiciones y métodos para tratar la EM usando entornos in vivo y ex-vivo.

Como se usa en este documento el término "aproximadamente" se refiere a ± 10%.

Objetos, ventajas y nuevas características adicionales de la presente invención llegarán a ser evidentes para un especialista en la técnica tras examinar los siguientes ejemplos. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención definidos anteriormente en este documento y reivindicados en la siguiente sección de reivindicaciones encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las anteriores descripciones, ilustran la invención.

En líneas generales, la nomenclatura usada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas; microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Mariland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Serves", Vol. 1-4, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías expuestas en las patentes de Estados Unidos Nº 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles que se describen extensivamente en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" flames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And

Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como completamente expuestos en este documento. Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos de las mismas son bien conocidos en la técnica y se proporcionan por motivos de conveniencia para el lector.

EJEMPLO 1

La neutralización de CXCL10 y CXCL9 suprime la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) mientras que la neutralización de CXCL11 agrava su manifestación

Para dilucidar el papel de los diferentes ligandos de CXCR3 (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) en la regulación de la esclerosis múltiple, se produjeron anticuerpos generados contra cada uno de los tres ligandos de CXCR3 y se administraron a ratones durante encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) - una enfermedad autoinmune inducida experimentalmente del SNC, que sirve como modelo animal experimental para la esclerosis múltiple.

Materiales y métodos

Animales

Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra de 6 semanas de edad de Harlan (Jerusalén, Israel) y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos.

Antígenos peptídicos

La glucoproteína mielínica del oligodendrocito MOG_{35-55} (SEC ID Nº 31) se construyó mediante la instalación PAN del Beckman Center of Stanford University. Después de la purificación por HPLC, se confirmó la secuencia por análisis de aminoácidos y se comprobó la masa por espectroscopía de masas. La purificación del péptido usado en esta invención fue de > 95%.

Inducción de EAE activa

La inducción activa de EAE se indujo inmunizando ratones hembra C57BL\6 con MOG_{P35-55}/CFA como se ha descrito previamente por Tompkins et al. [Tompkins et al., J Immunol (2002) 168:4173-83]. Los ratones se controlaron diariamente para los signos clínicos por un observador ciego al protocolo de tratamiento. La EAE se valoró el siguiente modo: 0 - clínicamente normal; 1 - cola fláccida; 2 - parálisis de las extremidades posteriores; 3 - parálisis total de las extremidades posteriores, acompañada por una aparente parálisis de las extremidades anteriores; 4 - parálisis total de las extremidades posteriores y extremidades anteriores; y 5 - muerte.

Generación de anticuerpos neutralizantes anti-CXCL9, anti-CXCL10 y anti-CXCL11

Los anticuerpos policlonales (Ab) contra CXCL9, CXCL10 y CXCL11 se generaron como se ha descrito previamente [Goldberg et al., J Immunol (2004) 173:6465-6471]. En resumen, ratas Lewis hembra se sometieron a posteriores administraciones (en intervalos de dos semanas) de plásmidos de ADN que codifican CXCL9, CXCL10 o CXCL11 murino como se ha descrito previamente [Wildbaum et al., J Immunol (2002) 168:5885-92]. Diez días después de la última administración, se inyectó a las ratas 100 μg de producto génico recombinante comercial codificado por cada vacuna (R&D Systems, Minneapolis, MN) emulsionada en IFA (adyuvante incompleto de Freud). Diez días después, se purificaron anticuerpos anti-CXCL9, anti-CXCL10 o anti-CXCL11 de los sueros de estas ratas mediante una purificación de dos etapas: (1) la fracción de IgG se purificó usando una columna de proteína G High-Trap (BD Biosciences, Piscataway, NJ) y (2) los Ab específicos de citoquina se purificaron usando una columna de Sepharose activada con bromuro de cianógeno, como se describe posteriormente en este documento. Cada citoquina recombinante de ratón (a una concentración de 5 mg), se unión a la columna de Sepharose activada con bromuro de cianógeno de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Cada fracción de IgG se cargó en la columna y después se eluyó mediante un tampón ácido de elución (glicina, pH 2,5). La determinación del isotipo de los Ab purificados reveló que los Ab purificados eran principalmente del isotipo IgG2a (datos no mostrados).

Administración de anticuerpos neutralizantes anti-CXCL9, anti-CXCL10 y anti-CXCL11 a ratones

Justo después de la aparición de la enfermedad (día 11), los ratones con EAE inducida se separaron en cinco grupos basados en la gravedad de la enfermedad (6 por grupo). Tres de estos grupos se sometieron a inyecciones intramusculares (i.m.) de uno de los anticuerpos (contra CXCL9, CXCL10 o CXCL11) o anticuerpos de control de ratas previamente administradas con un vector vacío. Todos los anticuerpos se administraron desde el día 11 en adelante en días alternos. Un grupo de ratones permaneció sin tratar. Un observador ciego al protocolo experimental entonces controló el desarrollo y progresión de la enfermedad.

Ensayo de migración

Se realizó un ensayo de migración celular. Se cargaron células T CXCR3+ de una línea de células T CD4+ encefalitogénicas MOGp33-55 específicas en la cámara superior de un inserto de cultivo transpocillo de policarbonato de 6,5 mm de diámetro y 5 μm de poro (Costar, Cambridge, MA). La cámara inferior contenía cada quimioquina detectada, o proteína de fusión con Ig basada en quimioquina con, o sin, la adición de anticuerpos neutralizantes específicos de quimioquina. La incubación de las células se realizó a 37ºC en CO_2 al 7,5% durante 2 horas. Las células migradas recogieron y contaron usando un FACSCatibur (BD Biosciences). El porcentaje de la migración celular se calculó como la cantidad de células que migró hasta la cámara inferior dividida por la cantidad de células originalmente sembradas en la cámara superior.

Resultados

Los anticuerpos generados contra cada uno de los tres ligandos de CXCR3 (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) primero se determinaron por su especificidad. Como se muestra en la Figura 1A, cada anticuerpo se unió selectivamente a su producto génico diana recombinante, pero no cada uno de los otros ligandos de CXCR3. Además, estos anticuerpos no se unieron a otras numerosas quimioquinas que se habían asociado con la regulación de las respuestas inflamatorias incluyendo: CCL2, CCL5 y CXCL12 (datos no mostrados). El análisis de migración transpocillo se realizó entonces para verificar la neutralización por el anticuerpo de las quimioquinas. La Figura 1B muestra que, de hecho, cada anticuerpo bloqueó selectivamente la migración inducida por quimioquinas de su quimioquina diana (aproximadamente el 80% cada uno, $p < 0,001$), pero no la migración inducida por los otros ligandos de CXCR3.

El sometimiento de los ratones con EAE inducida a anticuerpos contra CXCL9, CXCL10 o CXCL11 afecto de forma diferencial a la gravedad de una enfermedad en curso como se muestra en la Figura 2. La neutralización de CXCL10 suprimió significativamente la enfermedad (valor máximo medio de 0,66 ± 0,23 en comparación con 2,83 ± 0,66 para los ratones de control, $p < 0,001$) mientras que la neutralización de CXCL9 también suprimió la enfermedad (valor máximo medio de 1,66 ± 0,35 en comparación con 2,83 ± 0,66 para los ratones de control, $p < 0,03$), pero significativamente menos que el efecto de la terapia anti-CXCL10 ($p < 0,03$). En agudo contraste, la administración de anticuerpos anti-CXCL11 agravaba la severidad de la enfermedad (valor máximo medio de 4 ± 0 en comparación con 2,83 ± 0,66 para los ratones de control, $p < 0,001$), lo que sugiere que mientras que CXCL9 y CXCL10 funcionan como citoquinas pro-inflamatorias, CXCL11 funciona como una citoquina reguladora que antagoniza las actividades pro-inflamatorias de los otros dos ligandos de CXCR3.

EJEMPLO 2

Construcción de proteínas de fusión CXCL11-Ig y CXCL10-Ig que mantienen sus propiedades funcionales

Las quimioquinas tienen una semi-vida muy corta. Por lo tanto, en un intento de estudiar la competencia terapéutica potencial de CXCL11, en comparación con CXCL10, se generaron moléculas de fusión recombinantes que comprendían CXCL11 o CXCL10 fusionado al Fc de cadena pesada de IgG1 que mantenían sus propiedades funcionales.

Materiales y métodos

Construcción de proteínas de fusión CXCL11-IgG y CXCL10-IgG

Los vectores de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión CXCL11-Ig o CXCL10-Ig de la presente invención se construyeron del siguiente modo: se generó el ADNc que codifica la región constante (bisagra-CH2-CH3, SEC ID Nº 3) de la cadena pesada de IgG1 humana por RT-PCR del ARN extraído de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activadas con LPS e IL-4 usando los cebadores: con sentido, 5' ctcgagCCCAAATCTTGTGACAAAAC 3' (SEC ID Nº 7) y antisentido: 5' gggcccTTTACCCGGGGACAGGGAGA 3' (SEC ID Nº 8). El ADNc que codifica la región constante (bisagra-CH2-CH3, SEC ID Nº 21) de la cadena pesada de IgG1 murina se generó por RT-PCR del ARN extraído de células esplénicas de ratón activadas con LPS e IL-4 usando los cebadores: con sentido, 5' CCGCTCGAGGTGCCCAGGGATTGTGGTTG 3' (SEC ID Nº 23) y antisentido: 5' TTGTTCGGGCCCTTTACCAGGAGAGTGGGAGA 3' (SEC ID Nº 24). Los productos de PCR se digirieron con XhoI y ApaI y se ligaron en el vector de expresión/secreción de mamífero pSecTag2/Hygro B (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA).

El ADNc que codifica CXCL11 de ratón (Nº de acceso a GenBank NM_019494, SEC ID Nº 9) se generó por RT-PCR del ARN extraído de esplenocitos de ratón usando los cebadores: con sentido, 5' gctagcATGAACAGGAAGGTCACAGCCATAGC 3' (SEC ID Nº 11) y antisentido, 5' ctcgagCATGTTTTGACGCCTTAAAAAATT 3' (SEC ID Nº 12). El ADNc que codifica CXCL10 de ratón (Nº de acceso a GenBank NM_ NM_021274 SEC ID Nº 15) se generó por RT-PCR del ARN extraído de esplenocitos de ratón usando los cebadores: con sentido, 5' gctagcATGAACCCAAGTGCTGCCGTCATTTT 3' (SEC ID Nº 17) y antisentido, 5' ctcgagAGGAGCCCTTTTAGACCT7TTTTG 3' (SEC ID Nº 18). El ADNc que codifica la β-actina (SEC ID Nº 25), usada como control, se generó por RT-PCR del ARN extraído de esplenocitos de ratón usando los

cebadores: con sentido, 5' gctagcATGGATGACGATATCGCTGCGCTGGTCGT 3' (SEC ID Nº 27) y antisentido, 5' ctcgagGAAGCACTTGCGGTGCACGATGGAG 3' (SEC ID Nº 28). Los productos de PCR se digirieron con NheI y XhoI y después de la verificación de la secuencia, los productos de PCR amplificados se subclonaron en el vector pSec-Tag2 (Invitrogen, San Diego, CA) cadena arriba de los fragmentos de IgG1 de ratón para crear las proteínas de fusión: CXCL11-Ig (SEC ID Nº 14), CXCL10-Ig (SEC ID Nº 29) o el péptido de control β-actina-Ig (SEC ID Nº 30).

Como alteraciones en la secuencia de aminoácidos en el extremo N-terminal de las quimioquinas podrían cambiar sus propiedades, se seleccionó NheI para el procedimiento de clonación y la secuencia líder de la cadena kappa murina original encontrada en pSecTag2/Hygro B se remplazó por la secuencia líder de CXCL11-IgG de ratón, la secuencia líder de CXCL10-IgG, o la secuencia líder de β-actina-IgG en consecuencia. Los fragmentos fusionados se secuenciaron por secuenciación con didesoxinucleótidos (Sequenase versión 2; Upstate Biotechnology, Cleveland, OH).

Expresión y purificación de proteínas de fusión CXCL11-IgG y CXCL10-IgG

Los plásmidos pSec-CXCL11-IgG, pSec-CXCL10-IgG o pSec-β-actina-IgG se contransfectaron por separado en células de ovario de hámster chino (CHO) DG44 que tienen una doble deleción para el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (células DG44 CHO $DHFR^{-/-}$, proporcionadas por Dr. Lawrence Chasin de Columbia University, EEUU, Nº de acceso a la ATCC CRL-9096), con el vector CHO DHFR minigene, que transfecta células CHO DHFR-deficientes con alta eficacia, usando jet PEI (Polypluse transfection - Illkirch Cedex, Francia) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células transfectadas de forma estable se seleccionaron en un medio de cultivo (MEM-alfa) que contenía higromicina (200 μg/ml) y dosis crecientes de metotrexato (2,5 nM a 0,1 mM). La proteína de fusión se expresó como un homodímero ligado a disulfuro similar a IgG1, y tenía un peso molecular de aproximadamente 72 kDa que consta de dos subunidades idénticas de 36 kDa. La proteína de fusión se purificó del medio de cultivo por columna de afinidad de proteína G High-Trap (BD Biosciences, Piscataway, NJ) y se verificó por análisis de transferencia de Western usando anticuerpo de ratón anti-hIg (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) como anticuerpo primario y anticuerpo de burro anti-ratón conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) como anticuerpo secundario.

Resultados

Las proteínas de fusión CXCL11-IgG y CXCL10-IgG recombinantes se generaron satisfactoriamente, conservando cada una su patrón de reconocimiento de diana selectivo y su capacidad de atraer células T CXCR3+ en un sistema transpocillo (Figura 3). Los anticuerpos neutralizantes específicos de quimioquina generados de acuerdo con los contenidos de la presente invención (véase el Ejemplo 1), así como anticuerpos neutralizantes disponibles en el mercado (datos no mostrados) podían neutralizan de forma selectiva la capacidad de cada proteína de fusión de atraer células T CXCR3+ (Figura 3).

Experimentos preliminares (datos no mostrados) demostraron que las proteínas de fusión construidas con IgG1 (Fc) humana o la IgG1 (Fc) de ratón ejercían las mismas propiedades biológicas, como se ilustra en la Figura 3. Como los estudios experimentales in vivo incluían intervenciones en una forma a largo plazo de EAE en curso, los inventores usaron las construcciones murinas que codifican IgG1 de ratón.

EJEMPLO 3

La proteína de fusión CXCL11-Ig suprime EAE en curso seleccionado células T que producen IL-10 e IL-4

Como los anticuerpos anti-CXCL11 demostraron agravar la severidad de EAE, los presentes inventores hipotetizaron que CXCL11 antagoniza CXCL10. Para ensayar esta hipótesis, se ensayó una proteína de fusión CXCL11-Ig para su competencia de suprimir EAE en curso.

Materiales y métodos

Animales

Se usaron ratones como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 1 anteriormente en este documento.

Inducción de enfermedad activa

La inducción de EAE activa se realizó como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 1 anteriormente en este documento.

Generación de proteínas de fusión CXCL11-hIg y CXCL10-hIg

Como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 2, anteriormente en este documento.

Administración de proteínas de fusión CXCL11-lg y CXCL10-lg a ratones con EAE inducida

Justo después de la aparición de la enfermedad EAE activa (día 11), los ratones C57BL\6 hembra se separaron en cinco grupos de ratones igualmente enfermos (6 por grupo). En los días 11, 13, 15, y 17 después de la inducción de la enfermedad, los ratones con EAE se sometieron a inyecciones i.m. de CXCL10-lgG o CXCL11-lgG a una concentración de 200 μg/ratón. A los tres grupos restantes se les administró IgG de control de isotipo coincidente, β-actina-IgG purificada o permanecieron sin tratar. Un observador ciego al protocolo experimental entonces controló el desarrollo y progresión de la enfermedad.

Aislamiento y activación ex-vivo de células T primarias de EAE

Se recogieron células esplénicas de los ganglios linfáticos cervicales (CLN) de ratones en el máximo de la enfermedad (18 días después de la inducción de EAE). Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada de CO_2 al 7,5% a 37ºC y se estimularon con 50 μg/ml de péptido MOG_{35-53} (antígeno diana). Se cultivaron 10 x 10^6 células esplénicas en placas de 24 pocillos en presencia de CXCL10-IgG, CXCL11-lgG o PBS durante 72 horas. Se recogieron los sobrenadante y se analizaron por ELISA.

ELISA

Los niveles secretados de IL-10, IL-12, TNF-α, IFNγ, IL-2 e IL-4 se midieron cada uno por kits ELISA disponibles en el mercado: IL-10, IL-2 e IFN-γ (BioLegend, San Diego, CA), IL-12 y TNF-α (Bender Medical Systems, Viena, Austria), e IL-4 (BioLegend, San Diego, CA).

Resultados

Como se muestra en la Figura 4, el tratamiento de los ratones con EAE inducida con CXCL11-lgG suprimió rápidamente la severidad de la enfermedad (en el día 20, el valor medio de EAE de los ratones tratados era de 0,83 ± 0,33 en comparación con 3 ± 0,66 en los ratones de control, $p < 0,001$). En contraste, la administración de CXCL10-lgG a ratones con EAE inducida durante una enfermedad en curso agravó significativamente su severidad (en el día 20, el valor medio de EAE de ratones tratados con CXCL10-lgG fue de 4 ± 0,5 en comparación con 3 ± 0,66 en los ratones de control, $p < 0,01$). El sometimiento de los ratones con EAE inducida a la proteína de fusión de control (β-actina-IgG) no tuvo efecto sobre la manifestación de la enfermedad (Figura 4).

Los resultados mostraron claramente que el tratamiento de ratones con EAE inducida con CXCL10-lgG conduce a una elevación significativa en la secreción de TNF-α desde células T primarias (Figura 5A, 728 ± 63 en comparación con 401 ± 38 pg/ml para el antígeno diana, $p < 0,001$). Se presentaron resultados similares para la secreción de IFN-γ (Figura 5B, 86,5 ± 6,3 en comparación con 46 ± 4,6 ng/ml para el antígeno diana, $p < 0,01$), la secreción de IL-12 (Figura 5C, 325 ± 38 en comparación con 176 ± 62 pg/ml para el antígeno diana, $p < 0,01$) y la secreción de IL-2 (Figura 5D, 4400 ± 460 en comparación con 2200 ± 300 pg/ml para el antígeno diana). En agudo contraste, la terapia satisfactoria con CXCL11-lgG conduce a una reducción significativa en la secreción de TNF-α (Figura 5A, 90 ± 12 en comparación con 401 ± 38 pg/ml para el antígeno diana, $p < 0,0001$), la secreción de IFN-γ (Figura 5B, 9 ± 2 en comparación con 46 ± 4,6 ng/ml para el antígeno diana, $p < 0,0001$), y la secreción de IL-12 (Figura 5C, 36 ± 4 en comparación con 176 ± 62 pg/ml para el antígeno diana, $p < 0,0001$). Además, el tratamiento con CXCL11-lgG condujo a una elevada producción de las citoquinas inmunorreguladoras IL-4 (Figura 5E, 1 ± 0,5 en comparación con 41 ± 6 pg/ml, $p < 0,0001$) e IL-10 (Figura 5F, 280 ± 33 en comparación con 133 ± 16 pg/ml para el antígeno diana, $p < 0,001$).

EJEMPLO 4

Células T específicas de antígeno de donantes protegidos suprimen EAE activa en experimentos de transferencia adoptiva

En un intento por dilucidar si CXCL11 selecciona células T reguladoras (T-reg) específicas de antígeno, se transfirieron selectivamente células T de ratones donantes con EAE inducida tratados con CXCL11-lgG, a ratones receptores con EAE inducida.

Materiales y métodos

Animales

Los ratones se usaron como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 1 anteriormente en este documento.

Inducción de enfermedad activa

La inducción de EAE activa se realizó como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 1 anteriormente en este documento.

Generación de proteína de fusión CXCL11-hIg

Como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 2, anteriormente en este documento.

Administración de la proteína de fusión CXCL11-Ig a ratones con EAE inducida

Como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 3, anteriormente en este documento.

Generación de células esplénicas a partir de ratones donantes y transferencia adoptiva a ratones receptores con EAE inducida

Se recogieron células esplénicas primarias de ratones donantes con EAE inducida tratados con CXCL11-IgG o no tratados de ratones 15 días después de la inducción de EAE. Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada de CO_2 al 7,5% a 37ºC y se estimularon con su antígeno autoinmune diana, péptido MOG_{35-53}, a una concentración de 50 μg/ml durante 3 días. Estas células después se administraron (30 x 10^6/ratón) a ratones receptores con EAE inducida, justo después de la aparición de la enfermedad (en el día 11).

Resultados

Como resulta evidente a partir de los resultados (Figura 6), la administración de células T de ratones donantes tratados con CXCL11-IgG a ratones receptores con EAE inducida conduce a una rápida remisión de la enfermedad EAE activa (en el día 25, el valor medio de EAE registrado fue de 0,5 ± 0,3 en comparación con 2,66 ± 0,3 para los ratones de control, $p < 0,001$). A la inversa, la administración de células T de ratones con EAE inducida no tratados durante enfermedad en curso agravó significativamente su severidad (en el día 25, el valor medio de EAE registrado fue de 4 ± 0,5 en comparación con 2,66 ± 0,3 para los ratones de control, $p < 0,005$).

EJEMPLO 5

CXCL11 redirige la polarización de células T efectoras-inflamatorias específicas de antígeno

Durante la fase acelerada de la enfermedad en EAE inducida por MOGp33-55/CFA, la inmensa mayoría de las células T CD4+ específicas de MOGp33-55 presentan el fenotipo efector IFN-$\gamma^{elevado}$ IL-4^{bajo} IL-10^{bejo} [Goldberg et al., J Immunol (2004) 173: 6465-6471]. Por lo tanto, se hizo un intento por determinar si CXCL11 redirige la polarización de estas células T específicas de antígeno en células T-reg IFN-γ^{bajo} IL-$4^{elevado}$ y/o IFN-γ^{bajo} IL-$10^{elevado}$.

Materiales y métodos

Animales

Los ratones se usaron como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 1 anteriormente en este documento.

Inducción de enfermedad activa

La inducción de EAE activa se realizó como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 1 anteriormente en este documento.

Generación de proteína de fusión CXCL11-hIg

Como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 2, anteriormente en este documento.

Generación de células esplénicas

Se aislaron células esplénicas primarias de ratones con EAE inducida (2 días después de la aparición de la enfermedad). Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada de CO_2 al 7,5% a 37ºC y se estimularon con su antígeno autoinmune diana, péptido MOG_{35-53}, a una concentración de 50 μg/ml. Los cultivos se suplementaron adicionalmente o no con CXCL11-IgG a una concentración de 20 μg/ml.

Análisis de citometría de flujo

El análisis de citometría de flujo se realizó de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Schif-Zuck et al. [Schif-Zucketal., J Immunol (2005) 174:4307-4315]. En resumen, se suspendieron 10^6 células en 1000 μl de tampón colorante que contiene un anticuerpo anti-CD4-APC (BioLegend, San Diego, CA) marcado durante 5 minutos en

hielo. Las células se lavaron tres veces en tampón colorante y se resuspendieron en 100 μl de PFA al 1% y se transfirieron a tubos FACS.

La tinción intracelular de IL-10 se realizó usando anticuerpo anti-IL-10 de ratón marcado con PE (BD Biosciences).

Resultados

Las Figuras 7A-E muestran claramente que en presencia de CXCL11-IgG, las células T específicas de antígeno redirigen su polarización en células T de producción elevada de IL-10, elevada de IL-4, baja de IFN-γ (Figuras 7A, 7B y 7C, respectivamente). Estas células también producen niveles significativamente reducidos de la citoquina pro-inflamatoria TNF-α (Figura 7D, 178 ± 32 en comparación con 460 ± 65 pg/ml para células T no tratadas, $p < 0,001$). No se observaron cambios significativos en la producción de TGF-β (Figura 7E). Además, la suplementación de células T primarias con control IgG o β-actina-IgG no condujo a un cambio significativo en la producción de citoquinas (datos no mostrados).

El análisis de citometría de flujo (Figuras 8A y 8B) reveló que sólo aproximadamente el 2% de las células T de control CD4+ (no suplementadas con CXCL11-IgG) se polarizaban en células T CD4+ de producción elevada de IL-10. A la inversa, la activación específica con MOGp33-55 en presencia de CXCL11-IgG provocó una inclinación masiva hacia células T CD4+ de producción elevada de IL-10 (42%). El análisis adicional de estas células reveló que eran células T $CD4^{+}CD25^{-}$ $FOXp3^{-}$ (datos no mostrados).

EJEMPLO 6

Células T primarias estimuladas ex-vivo con CXL11-IgG suprimen EAE activa en experimentos de transferencia adoptiva

En un intento por revelar la competencia terapéutica sobre EAE de células T-reg IFN-γ^{bajo} IL-$4^{elevado}$ IL-$10^{elevado}$ (generadas después de estimulación de células esplénicas primarias con CXCL11-IgG), se realizaron experimentos de transferencia adoptiva.

Materiales y métodos

Animales

Los ratones se usaron como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 1 anteriormente en este documento.

Inducción de enfermedad activa

La inducción de EAE activa se realizó como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 1 anteriormente en este documento.

Generación de proteína de fusión CXCL11-hIg

Como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 2, anteriormente en este documento.

Generación de células esplénicas

Las células esplénicas primarias se aislaron de ratones con EAE inducida (2 días después de la aparición de la enfermedad). Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada de CO_2 al 7,5% a 37ºC y se estimularon con su antígeno autoinmune diana, péptido MOG_{35-53}, a una concentración de 50 μg/ml. Además, algunos de los cultivos se suplementaron con CXCL11-IgG a una concentración de 20 μg/ml.

Transferencia adoptiva de esplenocitos primarios a ratones receptores con EAE inducida

Las células T primarias cultivadas descritas anteriormente en este documento se administraron (30 x 10^{6}/ratón) a ratones receptores con EAE inducida, justo después de la aparición de la enfermedad (en el día 11). Un grupo adicional de ratones recibió células previamente cultivadas con CXCL11-IgG seguido de administraciones repetidas (cada 3 días) de anticuerpos neutralizantes anti-IL-10 (100 μg/ratón, R&D). Este grupo se controló durante solamente 10 días para evitar la producción de anticuerpos xenográficos.

Resultados

Como se representa en la Figura 9, los presentes inventores demostraron que la administración de células T de control (que se cultivaron en ausencia de CXCL11-IgG) agravaba la severidad de la enfermedad (en el día 15, el valor máximo medio registrado era de 3,8 ± 0,5 en comparación con 3,2 ± 0,66 para ratones con EAE no tratados, p

< 0,05), mientras que la administración de células T productoras de IL-10 seleccionadas en presencia de CXCL11-IgG conduce a una rápida recuperación de EAE activa (en el día 18 el valor máximo medio registrado era de 0,5 ± 0,166 en comparación con 3,2 ± 0,66 para ratones con EAE no tratados, p < 0,001). De forma importante, administraciones repetidas de anticuerpos anti-IL-10 revertieron el efecto terapéutico de estas células (en el día 18 el valor máximo medio registrado fue de 28 ± 0,6 en comparación con 3 ± 0,66 para ratones con EAE no tratados). Se obtenía el mismo patrón de resultados cuando se cultivaban células T primarias con CXCL11 disponible en el mercado (R&D) demostrando que estas actividades funcionales de CXCL11 no son dependientes de su estabilización como una proteína de fusión (datos no mostrados).

EJEMPLO 7

CXCL11 redirige la polarización de células T vírgenes y efectoras de ratón y humanas en células T reguladoras productoras de IL-10

Materiales y métodos

Animales

Los ratones se usaron como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 1 anteriormente en este documento.

Inducción de enfermedad activa

La inducción de EAE activa se realizó como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 1 anteriormente en este documento.

Generación de células esplénicas

Se aislaron células esplénicas primarias de ratones C57BL/6 con EAE inducida (día 9).

Las células (10^6 células/ml) se cultivaron en una atmósfera humidificada de CO_2 al 7,5% a 37ºC durante 72 horas y se estimularon con su antígeno autoinmune diana, péptido MOG_{35-53}, a una concentración de 50 μg/ml. Además, los cultivos se suplementaron con mCXCL10 recombinante (R&D) o mCXCL11 (R&D) a una concentración de 50 ng/ml.

Aislamiento de células T CD4+ vírgenes

Se purificaron células T CD4+ vírgenes de bazos de ratones C57BL/6 vírgenes usando perlas magnéticas y se estimularon (300.000 células/ml) durante 48 horas con mAb anti-CD3ε inmovilizado (2 μg/ml, Biolegend) y mAb anti-CD28 soluble (2 μg/ml, Biolegend) en presencia de rmCXCL10 (R&D) o rmCXCL11 (R&D) a una concentración de 50 ng/ ml.

Células T humanas

Se purificaron células T CD4+ humanas de células mononucleares de sangre periférica usando perlas magnéticas anti-CD4 (perlas MACS, de acuerdo con el protocolo del fabricante) y se estimularon (300.000 células/ml) durante 48 horas con mAb anti-CD3ε (2 μg/ml, Biolegend) y mAb anti-CD28 soluble (2 μg/ml, Biolegend) en presencia de 10 ng/ml de rhCXCL10 (R&D) o rhCXCL11 (R&D) con o sin 0,5 μg/ml de anticuerpo neutralizante anti-CXCR3 (R&D).

ELISA

Como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 3, anteriormente en este documento.

Resultados

Como se muestra en las Figuras 10G-K, CXCL11 re-polariza directamente células T CD4+ vírgenes que experimentan activación de células T en células T reguladoras productoras de IL-10. Estos resultados presentaron un patrón muy similar de secreción de citoquinas como se observó con células T efectoras de ratones con EAE que se activaron in vitro por su antígeno diana en presencia de células presentadoras de antígeno (Figuras 10A-F y ejemplo 5 anteriormente en este documento). También se ilustraron resultados similares con células CD4+ humanas purificadas activadas en condiciones similares (Figura 11). Debe apreciarse que rCXCL11 de ratón y humano no reaccionaban de forma cruzada (resultados no mostrados).

EJEMPLO 8

CXL11 redirige la polarización de células T humanas de un modo dependiente de CXCR3

En un intento por dilucidar el modo en que CXCL11 redirige la polarización de células T en células T de producción elevada de IL-10, elevada de IL-4, baja de IFN-γ, se realizaron experimentos utilizando anticuerpos anti-CXCR3.

Materiales y métodos

Células T humanas

Como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 7, anteriormente en este documento.

ELISA

Como se ha descrito en detalle en el Ejemplo 3, anteriormente en este documento.

Resultados

CXCL11 se une a dos receptores diferentes, CXCR3 y CXCR7, aunque induce la migración solamente mediante CXCR3 [Burns et al., J Exp Med (2006) 203:2201-13]. Para dilucidar el papel que CXCR3 desempeña en la migración inducida por CXCL11 y la re-polarización de células T, se usó un bloqueo anti-CXCR3. Primero, se realizaron experimentos dependientes de dosis para determinar la concentración in vitro de anticuerpo necesaria para el bloqueo total de la migración inducida por CXCL11 (datos no mostrados). En esas condiciones, se realizó un experimento para ilustrar la contribución de CXCR3 a la polarización inducida por CXCL11 de células T CD4+. Como se muestra claramente en la Figura 11, el uso de anticuerpo anti-CXCR3 bloqueó la producción de IL-10 de células T en aproximadamente el 75%, que implica el papel central de CXCR3 en la re-polarización por CXCL11 de células T.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, por motivos de claridad, en el contexto de realizaciones diferentes, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención, que se describen, por motivos de brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Rappaport Family Institute for Research in the Medical Sciences
Karin, Nathan
Zohar, Yaniv
wildbaum, Gizi

<120> AGENTES PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y MÉTODOS PARA USAR LOS MISMOS

<130> 43435

<160> 31

<170> Patentln versión 3.4

<210> 1
<211> 285
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> CXCL11 humano

<400> 1

```
atgagtgtga agggcatggc tatagccttg gctgtgatat tgtgtgctac agttgttcaa     60
ggcttcccca tgttcaaaag aggacgctgt ctttgcatag gccctggggt aaaagcagtg    120
aaagtggcag atattgagaa agcctccata atgtacccaa gtaacaactg tgacaaaata    180
gaagtgatta ttaccctgaa agaaaataaa ggacaacgat gcctaaatcc caaatcgaag    240
caagcaaggc ttataatcaa aaaagttgaa agaaagaatt tttaa                    285
```

<210>2
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> CXCL11 humano

<400> 2

```
Met Ser Val Lys Gly Met Ala Ile Ala Leu Ala Val Ile Leu Cys Ala
1               5                   10                  15

Thr Val Val Gln Gly Phe Pro Met Phe Lys Arg Gly Arg Cys Leu Cys
            20                  25                  30

Ile Gly Pro Gly Val Lys Ala Val Lys Val Ala Asp Ile Glu Lys Ala
        35                  40                  45

Ser Ile Met Tyr Pro Ser Asn Asn Cys Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile
    50                  55                  60

Thr Leu Lys Glu Asn Lys Gly Gln Arg Cys Leu Asn Pro Lys Ser Lys
65                  70                  75                  80

Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe
                85                  90
```

<210>3
<211> 714
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante del fragmento derivado de Ig humana

<400> 3

```
ccgctcgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa     60
ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc    120
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc    180
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag    240
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg    300
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag    360
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgcccccca    420
tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat    480
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc    540
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct atagcaagct caccgtggac    600
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac    660
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tccccgggta aagggcccga acaa          714
```

<210>4
<211>238

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fragmento derivado de Ig humana

<400> 4

```
Pro Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1               5                   10                  15

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
            20                  25                  30

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
        35                  40                  45

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
    50                  55                  60

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
65                  70                  75                  80

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
                85                  90                  95

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
            100                 105                 110

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
        115                 120                 125

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
    130                 135                 140

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
                165                 170                 175

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
            180                 185                 190

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
        195                 200                 205

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
    210                 215                 220

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Gln
225                 230                 235
```

<210>5
<211>996
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante de la proteína de fusión CXCL11 humano-Ig

<400> 5

```
atgagtgtga agggcatggc tatagccttg gctgtgatat tgtgtgctac agttgttcaa     60
ggcttcccca tgttcaaaag aggacgctgt ctttgcatag gccctggggt aaaagcagtg    120
aaagtggcag atattgagaa agcctccata atgtacccaa gtaacaactg tgacaaaata    180
gaagtgatta ttaccctgaa agaaaataaa ggacaacgat gcctaaatcc caaatcgaag    240
caagcaaggc ttataatcaa aaaagttgaa agaaagaatt ttccgctcga gcccaaatct    300
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca    360
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc    420
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg    480
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg    540
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    600
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc    660
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc    720
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    780
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    840
tccgacggct ccttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    900
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag    960
agcctctccc tgtccccggg taaagggccc gaacaa                              996
```

<210>6
<211>332
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína de fusión CXCL11 humano-Ig

<400> 6

Met Ser Val Lys Gly Met Ala Ile Ala Leu Ala Val Ile Leu Cys Ala
1 5 10 15

Thr Val Val Gln Gly Phe Pro Met Phe Lys Arg Gly Arg Cys Leu Cys
20 25 30

Ile Gly Pro Gly Val Lys Ala Val Lys Val Ala Asp Ile Glu Lys Ala
35 40 45

Ser Ile Met Tyr Pro Ser Asn Asn Cys Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile
50 55 60

Thr Leu Lys Glu Asn Lys Gly Gln Arg Cys Leu Asn Pro Lys Ser Lys
65 70 75 80

Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe Pro Leu
85 90 95

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
100 105 110

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
115 120 125

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
130 135 140

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
145 150 155 160

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
165 170 175

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
180 185 190

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
195 200 205

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
210 215 220

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
225 230 235 240

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
245 250 255

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
260 265 270

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
275 280 285

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
290 295 300

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Gln
325 330

<210>7
<211>26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 7
ctcgagccca aatcttgtga caaaac 26

<210>8
<211>26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 8
gggcccttta cccggggaca gggaga 26

<210>9
<211> 303
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc feature
<223> CXCL11 murino

<400> 9

```
atgaacagga aggtcacagc catagccctg gctgcgatca tctgggccac agctgctcaa     60
ggcttcctta tgttcaaaca ggggcgctgt ctttgcatcg gccccgggat gaaagccgtc    120
aaaatggcag agatcgagaa agcttctgta atttacccga gtaacggctg cgacaaagtt    180
gaagtgattg ttactatgaa ggctcataaa cgacaaaggt gcctggaccc cagatccaag    240
caagctcgcc tcataatgca ggcaatagaa aaaaagaatt ttttaaggcg tcaaaacatg    300
tga                                                                  303
```

<210> 10
<211>94
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<223> CXCL11 murino

<400> 10

Met Ser Val Lys Gly Met Ala Ile Ala Leu Ala Val Ile Leu Cys Ala
1 5 10 15

Thr Val Val Gln Gly Phe Pro Met Phe Lys Arg Gly Arg Cys Leu Cys
20 25 30

Ile Gly Pro Gly Val Lys Ala Val Lys Val Ala Asp Ile Glu Lys Ala
35 40 45

Ser Ile Met Tyr Pro Ser Asn Asn Cys Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile
50 55 60

Thr Leu Lys Glu Asn Lys Gly Gln Arg Cys Leu Asn Pro Lys Ser Lys
65 70 75 80

Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe
85 90

<210>11
<211>32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 11
gctagcatga acaggaaggt cacagccata gc 32

<210> 12
<211>30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 12
ctcgagcatg ttttgacgcc ttaaaaaatt 30

<210>13
<211> 1002
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante de la fusión CXCL11 murino-Ig

<900> 13

```
atgaacagga aggtcacagc catagccctg gctgcgatca tctgggccac agctgctcaa      60
ggcttcctta tgttcaaaca ggggcgctgt ctttgcatcg gccccgggat gaaagccgtc     120
aaaatggcag agatcgagaa agcttctgta atttacccga gtaacggctg cgacaaagtt     180
gaagtgattg ttactatgaa ggctcataaa cgacaaaggt gcctggaccc cagatccaag     240
caagctcgcc tcataatgca ggcaatagaa aaaaagaatt ttttaaggcg tcaaaacatg     300
ccgctcgagg tgcccaggga ttgtggttgt aagccttgca tatgtacagt cccagaagta     360
tcatctgtct tcatcttccc cccaaagccc aaggatgtgc tcaccattac tctgactcct     420
aaggtcacgt gtgttgtggt agacatcagc aaggatgatc ccgaggtcca gttcagctgg     480
tttgtagatg atgtggaggt gcacacagct cagacgcaac cccgggagga gcagttcaac     540
agcactttcc gctcagtcag tgaacttccc atcatgcacc aggactgcct caatggcaag     600
gagttcaaat gcagggtcaa cagtgcagct ttccctgccc ccatcgagaa aaccatctcc     660
aaaaccaaag gcagaccgaa ggctccacag gtgtacacca ttccacctcc caaggagcag     720

atggccaagg ataaagtcag tctgacctgc atgataacag acttcttccc tgaagacatt     780
actgtggagt ggcagtggaa tgggcagcca gcggagaact acaagaacac tcagcccatc     840
atggacacag atggctctta cttcgtctac agcaagctca atgtgcagaa gagcaactgg     900
gaggcaggaa atactttcac ctgctctgtg ttacatgagg gcctgcacaa ccaccatact     960
gagaagagcc tctcccactc tcctggtaaa gggcccgaac aa                       1002
```

<210> 14
<211>334
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión CXCL11 murino-Ig

<400> 14

Met Asn Arg Lys Val Thr Ala Ile Ala Leu Ala Ala Ile Ile Trp Ala
1 5 10 15

Thr Ala Ala Gln Gly Phe Leu Met Phe Lys Gln Gly Arg Cys Leu Cys
20 25 30

Ile Gly Pro Gly Met Lys Ala Val Lys Met Ala Glu Ile Glu Lys Ala
35 40 45

Ser Val Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Cys Asp Lys Val Glu Val Ile Val
50 55 60

Thr Met Lys Ala His Lys Arg Gln Arg Cys Leu Asp Pro Arg Ser Lys
65 70 75 80

Gln Ala Arg Leu Ile Met Gln Ala Ile Glu Lys Lys Asn Phe Leu Arg
85 90 95

Arg Gln Asn Met Pro Leu Glu Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro
100 105 110

Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
145 150 155 160

Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met
180 185 190

His Gln Asp Cys Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
195 200 205

Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
210 215 220

```
Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
225                 230                 235                 240

Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
                245                 250                 255

Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe
        275                 280                 285

Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
    290                 295                 300

Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
305                 310                 315                 320

Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Gln
                325                 330
```

<210> 15
<211> 297
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<223>CXCL10

<400> 15

```
atgaacccaa gtgctgccgt cattttctgc ctcatcctgc tgggtctgag tgggactcaa      60

gggatccctc tcgcaaggac ggtccgctgc aactgcatcc atatcgatga cgggccagtg     120

agaatgaggg ccatagggaa gcttgaaatc atccctgcga gcctatcctg cccacgtgtt     180

gagatcattg ccacgatgaa aaagaatgat gagcagagat gtctgaatcc ggaatctaag     240

accatcaaga atttaatgaa agcgtttagc caaaaaaggt ctaaaagggc tccttaa        297
```

<210> 16
<211>98
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<223>CXCL10

<400> 16

Met Asn Pro Ser Ala Ala Val Ile Phe Cys Leu Ile Leu Leu Gly Leu
1 5 10 15

Ser Gly Thr Gln Gly Ile Pro Leu Ala Arg Thr Val Arg Cys Asn Cys
20 25 30

Ile His Ile Asp Asp Gly Pro Val Arg Met Arg Ala Ile Gly Lys Leu
35 40 45

Glu Ile Ile Pro Ala Ser Leu Ser Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala
50 55 60

Thr Met Lys Lys Asn Asp Glu Gln Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys
65 70 75 80

Thr Ile Lys Asn Leu Met Lys Ala Phe Ser Gln Lys Arg Ser Lys Arg
85 90 95

Ala Pro

<210> 17
<211>32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 17
gctagcatga acccaagtgc tgccgtcatt tt 32

<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 18
ctcgagagga gccctttag acctttttg 30

<210> 19
<211> 1008
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante de la fusión CXCL10 murino-Ig

<400> 19

```
atgaacccaa gtgctgccgt cattttctgc ctcatcctgc tgggtctgag tgggactcaa     60
gggatccctc tcgcaaggac ggtccgctgc aactgcatcc atatcgatga cgggccagtg    120
agaatgaggg ccatagggaa gcttgaaatc atccctgcga gcctatcctg cccacgtgtt    180
gagatcattg ccacgatgaa aaagaatgat gagcagagat gtctgaatcc ggaatctaag    240
accatcaaga atttaatgaa agcgtttagc caaaaaaggt ctaaaagggc tcctccgctc    300
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg    360
gggggaccgt cagtcttcct cttccccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg    420
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc    480
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag    540
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat    600
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc    660
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg    720
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc    780
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct    840

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc    900
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac    960
tacacgcaga agagcctctc cctgtccccg ggtaaagggc ccgaacaa                1008
```

<210> 20
<211> 336
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión CXCL10 murino-Ig

<400> 20

Met Asn Pro Ser Ala Ala Val Ile Phe Cys Leu Ile Leu Leu Gly Leu
1 5 10 15

Ser Gly Thr Gln Gly Ile Pro Leu Ala Arg Thr Val Arg Cys Asn Cys
20 25 30

Ile His Ile Asp Asp Gly Pro Val Arg Met Arg Ala Ile Gly Lys Leu
35 40 45

Glu Ile Ile Pro Ala Ser Leu Ser Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala
50 55 60

Thr Met Lys Lys Asn Asp Glu Gln Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys
65 70 75 80

Thr Ile Lys Asn Leu Met Lys Ala Phe Ser Gln Lys Arg Ser Lys Arg
85 90 95

Ala Pro Pro Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
115 120 125

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
130 135 140

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
145 150 155 160

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
165 170 175

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
180 185 190

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
195 200 205

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
210 215 220

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
225 230 235 240

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
245 250 255

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
260 265 270

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
275 280 285

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
290 295 300

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
305 310 315 320

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Gln
325 330 335

<210> 21
<211> 702
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante del fragmento derivado de Ig murina

<400> 21

ccgctcgagg tgcccaggga ttgtggttgt aagccttgca tatgtacagt cccagaagta 60

tcatctgtct tcatcttccc cccaaagccc aaggatgtgc tcaccattac tctgactcct 120

aaggtcacgt gtgttgtggt agacatcagc aaggatgatc ccgaggtcca gttcagctgg 180

tttgtagatg atgtggaggt gcacacagct cagacgcaac cccgggagga gcagttcaac 240

agcactttcc gctcagtcag tgaacttccc atcatgcacc aggactgcct caatggcaag 300

gagttcaaat gcagggtcaa cagtgcagct ttccctgccc ccatcgagaa aaccatctcc 360

aaaaccaaag gcagaccgaa ggctccacag gtgtacacca ttccacctcc caaggagcag 420

atggccaagg ataaagtcag tctgacctgc atgataacag acttcttccc tgaagacatt 480

actgtggagt ggcagtggaa tgggcagcca gcggagaact acaagaacac tcagcccatc 540

atggacacag atggctctta cttcgtctac agcaagctca atgtgcagaa gagcaactgg 600

gaggcaggaa atactttcac ctgctctgtg ttacatgagg gcctgcacaa ccaccatact 660

gagaagagcc tctcccactc tcctggtaaa gggcccgaac aa 702

<210> 22
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento derivado de Ig murina

<400> 22

Pro Leu Glu Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
1 5 10 15

Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45

Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
50 55 60

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
65 70 75 80

Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Cys
85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro
100 105 110

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp
130 135 140

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile
145 150 155 160

Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn
165 170 175

Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys
180 185 190

Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
195 200 205

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu
210 215 220

Ser His Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Gln
225 230

<210> 23
<211>29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220> .
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 23
ccgctcgagg tgcccaggga ttgtggttg 29

<210>24
<211>32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 24
ttgttcgggc cctttaccag gagagtggga ga 32

<210>25
<211> 2739
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 25

```
atggtggact accacgcagc gaaccaggcg taccagtacg gcccgaacag cggcggcggc    60
aatggcgcgg gtggcggcgg aagcatgggc gactacatgg cccaggagga tgactgggac   120
cgggacctgc tgttggaccc ggcctgggag aagcagcagc gcaagacctt cacagcctgg   180
tgcaactctc atcttcggaa ggctggcact cagatcgaga atatcgatga ggacttcagg   240
gatgggctca aacttatgct tctgttggag gtcatttcag gggagcgttt gcctaagcca   300
gagcggggga agatgcgagt gcacaagatc aacaatgtaa acaaagccct ggacttcatc   360
gccagcaagg gagtcaagct ggtgtccatc ggggcagaag agattgtgga tggcaatgca   420
aagatgaccc tgggaatgat ctggaccatc atcctcagat ttgccatcca ggacatctct   480
gtggaagaga cctctgctaa ggaaggactc ctcctctggt gccagagaaa gacagcccca   540
tataaaaacg tcaacgtcca gaacttccat atcagctgga aggacgggct ggccttcaat   600
gcactcatcc accggcacag gcctgagctg attgagtatg acaagctgcg gaaggatgat   660
ccagtcacca acctaaacaa tgcatttgaa gtggctgaga aatacctcga tatccccaag   720
atgttggatg ctgaggacat cgtgaacaca gcccggcccg acgagaaggc cataatgaca   780
tatgtgtcca gcttctacca tgccttttca ggagcgcaga aggctgagac cgctgccaac   840
cggatctgca aggtgctggc tgtgaaccag gaaaatgagc acctgatgga agactatgaa   900
cgcctggcca gtgatcttct agagtggatt cggcgcacca tcccctggct ggaggaccgg   960
gtgcctcaga agaccatcca ggaaatgcag cagaagctgg aggacttccg agactatagg  1020
cgtgtgcaca agccgcccaa ggtgcaggag aagtgtcagc tggagatcaa cttcaacaca  1080
ctgcagacca agctgcggct cagcaaccgg cctgccttca tgccctccga gggcaggatg  1140
gtctccgaca tcaacaatgg atggcagcac ctggagcagg ctgagaaggg ctatgaagaa  1200
tggctgctga atgaaatccg taggctggaa cggcttgacc acctggcaga gaagttccgg  1260
cagaaggctt ccatccacga ggcctggact gatgggaagg aggccatgct gaagcaacgg  1320
gactacgaga cagccaccct gtcagacatc aaagctctga tccgaaaaca tgaggccttt  1380
gaaagtgacc tggctgcaca ccaggaccga gtggagcaga ttgctgcaat tgctcaggag  1440
ctcaacgagc tggactacta tgactcccac aacgtcaaca cacggtgcca gaagatctgc  1500
gaccagtggg ataacctggg ctctctgaca cacagtcgca gggaagcctt ggagaaaaca  1560
gagaaacagc tagagaccat cgaccagcta catttggagt atgccaagcg ggctgcaccc  1620
ttcaacaact ggatggagag tgccatggag gacctgcagg acatgttcat cgtccacacc  1680
atcgaggaga tcgagggcct gatctcagcc catgaccagt tcaagtccac cctgccagat  1740
gctgacaggg agcgtgaggc catcctggcc atccacaagg aggcccagag gatcgctgag  1800
agcaatcaca tcaagctgtc gggcagcaat ccctacacca ctgttacccc ccagatcatc  1860
aactccaagt gggagaaggt gcagcagctg gtgccaaaga gggaccatgc actcctggag  1920
gagcagagca agcagcaatc caatgagcac cttcgccgac agttcgccag ccaagccaat  1980
atggtggggc cgtggatcca gaccaagatg gaggagatcg ggcgcatctc cattgagatg  2040
```

```
aacgggactc tggaagacca gctgagccac ctgaagcagt acgagcgcag catcgtggac   2100
tacaagccca gcctggacct gctggagcag cagcaccagc tcatccagga ggccctcatc   2160
ttcgacaaca agcacaccaa ctacacaatg gagcatatcc gtgtgggctg ggagcagctg   2220
ctcacgacca ttgcccgcac catcaatgag gtggaaaacc agatcctcac ccgagatgcc   2280
aagggtatca gccaggagca gatgcaggag ttccgggcat ccttcaacca ttttgacaag   2340
gaccatggcg gggcactggg gcctgaggaa ttcaaggcct gcctcatcag cctgggctat   2400
gacgtggaga atgaccggca gggtgatgct gagttcaacc ggatcatgag tgtggttgat   2460
cccaaccata gtggcctcgt gaccttccaa gccttcattg acttcatgtc aagggagacc   2520
acagacacag acacagctga tcaggtcatc gcctccttca aggtcctggc aggagacaag   2580
aacttcatca ctgctgagga actgcggaga gagctgcccc ccgaccaggc cgagtactgc   2640
atcgcccgca tggcacccta ccaggggcct gatgctgctc ctggcgccct tgactacaag   2700
tccttctcca cagccctcta tggggagagc gacctgtga                          2739
```

<210> 26
<211> 912
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 26

```
Met Val Asp Tyr His Ala Ala Asn Gln Ala Tyr Gln Tyr Gly Pro Asn
1               5                   10                  15

Ser Gly Gly Gly Asn Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Met Gly Asp Tyr
            20                  25                  30

Met Ala Gln Glu Asp Asp Trp Asp Arg Asp Leu Leu Leu Asp Pro Ala
        35                  40                  45

Trp Glu Lys Gln Gln Arg Lys Thr Phe Thr Ala Trp Cys Asn Ser His
    50                  55                  60

Leu Arg Lys Ala Gly Thr Gln Ile Glu Asn Ile Asp Glu Asp Phe Arg
65                  70                  75                  80

Asp Gly Leu Lys Leu Met Leu Leu Leu Glu Val Ile Ser Gly Glu Arg
                85                  90                  95

Leu Pro Lys Pro Glu Arg Gly Lys Met Arg Val His Lys Ile Asn Asn
            100                 105                 110

Val Asn Lys Ala Leu Asp Phe Ile Ala Ser Lys Gly Val Lys Leu Val
        115                 120                 125

Ser Ile Gly Ala Glu Glu Ile Val Asp Gly Asn Ala Lys Met Thr Leu
    130                 135                 140

Gly Met Ile Trp Thr Ile Ile Leu Arg Phe Ala Ile Gln Asp Ile Ser
145                 150                 155                 160

Val Glu Glu Thr Ser Ala Lys Glu Gly Leu Leu Leu Trp Cys Gln Arg
                165                 170                 175
```

Lys Thr Ala Pro Tyr Lys Asn Val Asn Val Gln Asn Phe His Ile Ser
180 185 190

Trp Lys Asp Gly Leu Ala Phe Asn Ala Leu Ile His Arg His Arg Pro
195 200 205

Glu Leu Ile Glu Tyr Asp Lys Leu Arg Lys Asp Asp Pro Val Thr Asn
210 215 220

Leu Asn Asn Ala Phe Glu Val Ala Glu Lys Tyr Leu Asp Ile Pro Lys
225 230 235 240

Met Leu Asp Ala Glu Asp Ile Val Asn Thr Ala Arg Pro Asp Glu Lys
245 250 255

Ala Ile Met Thr Tyr Val Ser Ser Phe Tyr His Ala Phe Ser Gly Ala
260 265 270

Gln Lys Ala Glu Thr Ala Ala Asn Arg Ile Cys Lys Val Leu Ala Val
275 280 285

Asn Gln Glu Asn Glu His Leu Met Glu Asp Tyr Glu Arg Leu Ala Ser
290 295 300

Asp Leu Leu Glu Trp Ile Arg Arg Thr Ile Pro Trp Leu Glu Asp Arg
305 310 315 320

Val Pro Gln Lys Thr Ile Gln Glu Met Gln Gln Lys Leu Glu Asp Phe
325 330 335

Arg Asp Tyr Arg Arg Val His Lys Pro Pro Lys Val Gln Glu Lys Cys
340 345 350

Gln Leu Glu Ile Asn Phe Asn Thr Leu Gln Thr Lys Leu Arg Leu Ser
355 360 365

Asn Arg Pro Ala Phe Met Pro Ser Glu Gly Arg Met Val Ser Asp Ile
370 375 380

Asn Asn Gly Trp Gln His Leu Glu Gln Ala Glu Lys Gly Tyr Glu Glu
385 390 395 400

Trp Leu Leu Asn Glu Ile Arg Arg Leu Glu Arg Leu Asp His Leu Ala
405 410 415

Glu Lys Phe Arg Gln Lys Ala Ser Ile His Glu Ala Trp Thr Asp Gly
420 425 430

Lys Glu Ala Met Leu Lys Gln Arg Asp Tyr Glu Thr Ala Thr Leu Ser
435 440 445

Asp Ile Lys Ala Leu Ile Arg Lys His Glu Ala Phe Glu Ser Asp Leu
450 455 460

Ala Ala His Gln Asp Arg Val Glu Gln Ile Ala Ala Ile Ala Gln Glu
465 470 475 480

Leu Asn Glu Leu Asp Tyr Tyr Asp Ser His Asn Val Asn Thr Arg Cys
485 490 495

Gln Lys Ile Cys Asp Gln Trp Asp Asn Leu Gly Ser Leu Thr His Ser
500 505 510

Arg Arg Glu Ala Leu Glu Lys Thr Glu Lys Gln Leu Glu Thr Ile Asp
515 520 525

Gln Leu His Leu Glu Tyr Ala Lys Arg Ala Ala Pro Phe Asn Asn Trp
530 535 540

Met Glu Ser Ala Met Glu Asp Leu Gln Asp Met Phe Ile Val His Thr
545 550 555 560

Ile Glu Glu Ile Glu Gly Leu Ile Ser Ala His Asp Gln Phe Lys Ser
565 570 575

Thr Leu Pro Asp Ala Asp Arg Glu Arg Glu Ala Ile Leu Ala Ile His
580 585 590

Lys Glu Ala Gln Arg Ile Ala Glu Ser Asn His Ile Lys Leu Ser Gly
595 600 605

Ser Asn Pro Tyr Thr Thr Val Thr Pro Gln Ile Ile Asn Ser Lys Trp
610 615 620

Glu Lys Val Gln Gln Leu Val Pro Lys Arg Asp His Ala Leu Leu Glu
625 630 635 640

Glu Gln Ser Lys Gln Gln Ser Asn Glu His Leu Arg Arg Gln Phe Ala
645 650 655

Ser Gln Ala Asn Met Val Gly Pro Trp Ile Gln Thr Lys Met Glu Glu
660 665 670

Ile Gly Arg Ile Ser Ile Glu Met Asn Gly Thr Leu Glu Asp Gln Leu
675 680 685

Ser His Leu Lys Gln Tyr Glu Arg Ser Ile Val Asp Tyr Lys Pro Ser
690 695 700

Leu Asp Leu Leu Glu Gln Gln His Gln Leu Ile Gln Glu Ala Leu Ile
705 710 715 720

Phe Asp Asn Lys His Thr Asn Tyr Thr Met Glu His Ile Arg Val Gly
725 730 735

Trp Glu Gln Leu Leu Thr Thr Ile Ala Arg Thr Ile Asn Glu Val Glu
740 745 750

Asn Gln Ile Leu Thr Arg Asp Ala Lys Gly Ile Ser Gln Glu Gln Met
755 760 765

Gln Glu Phe Arg Ala Ser Phe Asn His Phe Asp Lys Asp His Gly Gly
770 775 780

Ala Leu Gly Pro Glu Glu Phe Lys Ala Cys Leu Ile Ser Leu Gly Tyr
785 790 795 800

Asp Val Glu Asn Asp Arg Gln Gly Asp Ala Glu Phe Asn Arg Ile Met
805 810 815

Ser Val Val Asp Pro Asn His Ser Gly Leu Val Thr Phe Gln Ala Phe
820 825 830

Ile Asp Phe Met Ser Arg Glu Thr Thr Asp Thr Asp Thr Ala Asp Gln
835 840 845

Val Ile Ala Ser Phe Lys Val Leu Ala Gly Asp Lys Asn Phe Ile Thr
850 855 860

Ala Glu Glu Leu Arg Arg Glu Leu Pro Pro Asp Gln Ala Glu Tyr Cys
865 870 875 880

Ile Ala Arg Met Ala Pro Tyr Gln Gly Pro Asp Ala Ala Pro Gly Ala
885 890 895

Leu Asp Tyr Lys Ser Phe Ser Thr Ala Leu Tyr Gly Glu Ser Asp Leu
900 905 910

<210> 27
<211>35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 27
gctagcatgg atgacgatat cgctgcgctg gtcgt 35

<210> 28
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 28
ctcgaggaag cacttgcggt gcacgatgga g 31

<210> 29
<211> 3438
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante de la proteína de fusión beta-actina murina-lg

<400> 29

```
atggtggact accacgcagc gaaccaggcg taccagtacg gcccgaacag cggcggcggc     60
aatggcgcgg gtggcggcgg aagcatgggc gactacatgg cccaggagga tgactgggac    120
cgggacctgc tgttggaccc ggcctgggag aagcagcagc gcaagacctt cacagcctgg    180
tgcaactctc atcttcggaa ggctggcact cagatcgaga atatcgatga ggacttcagg    240
gatgggctca aacttatgct tctgttggag gtcatttcag gggagcgttt gcctaagcca    300
gagcggggga agatgcgagt gcacaagatc aacaatgtaa acaaagccct ggacttcatc    360
```

gccagcaagg gagtcaagct ggtgtccatc ggggcagaag agattgtgga tggcaatgca 420
aagatgaccc tgggaatgat ctggaccatc atcctcagat ttgccatcca ggacatctct 480
gtggaagaga cctctgctaa ggaaggactc ctcctctggt gccagagaaa gacagcccca 540
tataaaaacg tcaacgtcca gaacttccat atcagctgga aggacgggct ggccttcaat 600
gcactcatcc accggcacag gcctgagctg attgagtatg acaagctgcg gaaggatgat 660
ccagtcacca acctaaacaa tgcatttgaa gtggctgaga aatacctcga tatccccaag 720
atgttggatg ctgaggacat cgtgaacaca gcccggcccg acgagaaggc cataatgaca 780
tatgtgtcca gcttctacca tgccttttca ggagcgcaga aggctgagac cgctgccaac 840
cggatctgca aggtgctggc tgtgaaccag gaaaatgagc acctgatgga agactatgaa 900
cgcctggcca gtgatcttct agagtggatt cggcgcacca tcccctggct ggaggaccgg 960
gtgcctcaga agaccatcca ggaaatgcag cagaagctgg aggacttccg agactatagg 1020
cgtgtgcaca agccgcccaa ggtgcaggag aagtgtcagc tggagatcaa cttcaacaca 1080
ctgcagacca agctgcggct cagcaaccgg cctgccttca tgccctccga gggcaggatg 1140
gtctccgaca tcaacaatgg atggcagcac ctggagcagg ctgagaaggg ctatgaagaa 1200
tggctgctga atgaaatccg taggctggaa cggcttgacc acctggcaga gaagttccgg 1260
cagaaggctt ccatccacga ggcctggact gatgggaagg aggccatgct gaagcaacgg 1320
gactacgaga cagccaccct gtcagacatc aaagctctga tccgaaaaca tgaggccttt 1380
gaaagtgacc tggctgcaca ccaggaccga gtggagcaga ttgctgcaat tgctcaggag 1440
ctcaacgagc tggactacta tgactcccac aacgtcaaca cacggtgcca gaagatctgc 1500
gaccagtggg ataacctggg ctctctgaca cacagtcgca gggaagcctt ggagaaaaca 1560
gagaaacagc tagagaccat cgaccagcta catttggagt atgccaagcg ggctgcaccc 1620
ttcaacaact ggatggagag tgccatggag gacctgcagg acatgttcat cgtccacacc 1680
atcgaggaga tcgagggcct gatctcagcc catgaccagt tcaagtccac cctgccagat 1740
gctgacaggg agcgtgaggc catcctggcc atccacaagg aggcccagag gatcgctgag 1800
agcaatcaca tcaagctgtc gggcagcaat ccctacacca ctgttacccc ccagatcatc 1860
aactccaagt gggagaaggt gcagcagctg gtgccaaaga gggaccatgc actcctggag 1920
gagcagagca agcagcaatc caatgagcac cttcgccgac agttcgccag ccaagccaat 1980
atggtggggc cgtggatcca gaccaagatg gaggagatcg ggcgcatctc cattgagatg 2040
aacgggactc tggaagacca gctgagccac ctgaagcagt acgagcgcag catcgtggac 2100
tacaagccca gcctggacct gctggagcag cagcaccagc tcatccagga ggccctcatc 2160
ttcgacaaca agcacaccaa ctacacaatg gagcatatcc gtgtgggctg ggagcagctg 2220
ctcacgacca ttgcccgcac catcaatgag gtggaaaacc agatcctcac ccgagatgcc 2280
aagggtatca gccaggagca gatgcaggag ttccgggcat ccttcaacca ttttgacaag 2340
gaccatggcg gggcactggg gcctgaggaa ttcaaggcct gcctcatcag cctgggctat 2400
gacgtggaga atgaccggca gggtgatgct gagttcaacc ggatcatgag tgtggttgat 2460
cccaaccata gtggcctcgt gaccttccaa gccttcattg acttcatgtc aagggagacc 2520
acagacacag acacagctga tcaggtcatc gcctccttca aggtcctggc aggagacaag 2580
aacttcatca ctgctgagga actgcggaga gagctgcccc ccgaccaggc cgagtactgc 2640

```
atcgcccgca tggcacccta ccaggggcct gatgctgctc ctggcgccct tgactacaag   2700
tccttctcca cagccctcta tggggagagc gacctgccgc tcgaggtgcc cagggattgt   2760
ggttgtaagc cttgcatatg tacagtccca gaagtatcat ctgtcttcat cttccccccca   2820
aagcccaagg atgtgctcac cattactctg actcctaagg tcacgtgtgt tgtggtagac   2880
atcagcaagg atgatcccga ggtccagttc agctggtttg tagatgatgt ggaggtgcac   2940
acagctcaga cgcaaccccg ggaggagcag ttcaacagca ctttccgctc agtcagtgaa   3000
cttcccatca tgcaccagga ctgcctcaat ggcaaggagt tcaaatgcag ggtcaacagt   3060
gcagctttcc ctgcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaaggcag accgaaggct   3120
ccacaggtgt acaccattcc acctcccaag gagcagatgg ccaaggataa agtcagtctg   3180
acctgcatga taacagactt cttccctgaa gacattactg tggagtggca gtggaatggg   3240
cagccagcgg agaactacaa gaacactcag cccatcatgg acacagatgg ctcttacttc   3300
gtctacagca agctcaatgt gcagaagagc aactgggagg caggaaatac tttcacctgc   3360
tctgtgttac atgagggcct gcacaaccac catactgaga agagcctctc ccactctcct   3420
ggtaaagggc ccgaacaa                                                 3438
```

<210> 30
<211> 1146
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión beta-actina murina-lg

<400> 30

```
Met Val Asp Tyr His Ala Ala Asn Gln Ala Tyr Gln Tyr Gly Pro Asn
1               5                   10                  15

Ser Gly Gly Gly Asn Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Met Gly Asp Tyr
            20                  25                  30

Met Ala Gln Glu Asp Asp Trp Asp Arg Asp Leu Leu Leu Asp Pro Ala
        35                  40                  45

Trp Glu Lys Gln Gln Arg Lys Thr Phe Thr Ala Trp Cys Asn Ser His
    50                  55                  60

Leu Arg Lys Ala Gly Thr Gln Ile Glu Asn Ile Asp Glu Asp Phe Arg
65                  70                  75                  80

Asp Gly Leu Lys Leu Met Leu Leu Leu Glu Val Ile Ser Gly Glu Arg
                85                  90                  95

Leu Pro Lys Pro Glu Arg Gly Lys Met Arg Val His Lys Ile Asn Asn
            100                 105                 110

Val Asn Lys Ala Leu Asp Phe Ile Ala Ser Lys Gly Val Lys Leu Val
        115                 120                 125

Ser Ile Gly Ala Glu Glu Ile Val Asp Gly Asn Ala Lys Met Thr Leu
    130                 135                 140
```

Gly Met Ile Trp Thr Ile Ile Leu Arg Phe Ala Ile Gln Asp Ile Ser
145 150 155 160

Val Glu Glu Thr Ser Ala Lys Glu Gly Leu Leu Leu Trp Cys Gln Arg
165 170 175

Lys Thr Ala Pro Tyr Lys Asn Val Asn Val Gln Asn Phe His Ile Ser
180 185 190

Trp Lys Asp Gly Leu Ala Phe Asn Ala Leu Ile His Arg His Arg Pro
195 200 205

Glu Leu Ile Glu Tyr Asp Lys Leu Arg Lys Asp Asp Pro Val Thr Asn
210 215 220

Leu Asn Asn Ala Phe Glu Val Ala Glu Lys Tyr Leu Asp Ile Pro Lys
225 230 235 240

Met Leu Asp Ala Glu Asp Ile Val Asn Thr Ala Arg Pro Asp Glu Lys
245 250 255

Ala Ile Met Thr Tyr Val Ser Ser Phe Tyr His Ala Phe Ser Gly Ala
260 265 270

Gln Lys Ala Glu Thr Ala Ala Asn Arg Ile Cys Lys Val Leu Ala Val
275 280 285

Asn Gln Glu Asn Glu His Leu Met Glu Asp Tyr Glu Arg Leu Ala Ser
290 295 300

Asp Leu Leu Glu Trp Ile Arg Arg Thr Ile Pro Trp Leu Glu Asp Arg
305 310 315 320

Val Pro Gln Lys Thr Ile Gln Glu Met Gln Gln Lys Leu Glu Asp Phe
325 330 335

Arg Asp Tyr Arg Arg Val His Lys Pro Pro Lys Val Gln Glu Lys Cys
340 345 350

Gln Leu Glu Ile Asn Phe Asn Thr Leu Gln Thr Lys Leu Arg Leu Ser
355 360 365

Asn Arg Pro Ala Phe Met Pro Ser Glu Gly Arg Met Val Ser Asp Ile
370 375 380

Asn Asn Gly Trp Gln His Leu Glu Gln Ala Glu Lys Gly Tyr Glu Glu
385 390 395 400

Trp Leu Leu Asn Glu Ile Arg Arg Leu Glu Arg Leu Asp His Leu Ala
405 410 415

Glu Lys Phe Arg Gln Lys Ala Ser Ile His Glu Ala Trp Thr Asp Gly
420 425 430

Lys Glu Ala Met Leu Lys Gln Arg Asp Tyr Glu Thr Ala Thr Leu Ser
435 440 445

Asp Ile Lys Ala Leu Ile Arg Lys His Glu Ala Phe Glu Ser Asp Leu
450 455 460

Ala Ala His Gln Asp Arg Val Glu Gln Ile Ala Ala Ile Ala Gln Glu
465 470 475 480

Leu Asn Glu Leu Asp Tyr Tyr Asp Ser His Asn Val Asn Thr Arg Cys
485 490 495

Gln Lys Ile Cys Asp Gln Trp Asp Asn Leu Gly Ser Leu Thr His Ser
500 505 510

Arg Arg Glu Ala Leu Glu Lys Thr Glu Lys Gln Leu Glu Thr Ile Asp
515 520 525

Gln Leu His Leu Glu Tyr Ala Lys Arg Ala Ala Pro Phe Asn Asn Trp
530 535 540

Met Glu Ser Ala Met Glu Asp Leu Gln Asp Met Phe Ile Val His Thr
545 550 555 560

Ile Glu Glu Ile Glu Gly Leu Ile Ser Ala His Asp Gln Phe Lys Ser
565 570 575

Thr Leu Pro Asp Ala Asp Arg Glu Arg Glu Ala Ile Leu Ala Ile His
580 585 590

Lys Glu Ala Gln Arg Ile Ala Glu Ser Asn His Ile Lys Leu Ser Gly
595 600 605

Ser Asn Pro Tyr Thr Thr Val Thr Pro Gln Ile Ile Asn Ser Lys Trp
610 615 620

Glu Lys Val Gln Gln Leu Val Pro Lys Arg Asp His Ala Leu Leu Glu
625 630 635 640

Glu Gln Ser Lys Gln Gln Ser Asn Glu His Leu Arg Arg Gln Phe Ala
645 650 655

Ser Gln Ala Asn Met Val Gly Pro Trp Ile Gln Thr Lys Met Glu Glu
660 665 670

Ile Gly Arg Ile Ser Ile Glu Met Asn Gly Thr Leu Glu Asp Gln Leu
675 680 685

Ser His Leu Lys Gln Tyr Glu Arg Ser Ile Val Asp Tyr Lys Pro Ser
690 695 700

Leu Asp Leu Leu Glu Gln Gln His Gln Leu Ile Gln Glu Ala Leu Ile
705 710 715 720

Phe Asp Asn Lys His Thr Asn Tyr Thr Met Glu His Ile Arg Val Gly
725 730 735

Trp Glu Gln Leu Leu Thr Thr Ile Ala Arg Thr Ile Asn Glu Val Glu
740 745 750

Asn Gln Ile Leu Thr Arg Asp Ala Lys Gly Ile Ser Gln Glu Gln Met
755 760 765

Gln Glu Phe Arg Ala Ser Phe Asn His Phe Asp Lys Asp His Gly Gly
770 775 780

Ala Leu Gly Pro Glu Glu Phe Lys Ala Cys Leu Ile Ser Leu Gly Tyr
785 790 795 800

Asp Val Glu Asn Asp Arg Gln Gly Asp Ala Glu Phe Asn Arg Ile Met
805 810 815

Ser Val Val Asp Pro Asn His Ser Gly Leu Val Thr Phe Gln Ala Phe
820 825 830

Ile Asp Phe Met Ser Arg Glu Thr Thr Asp Thr Asp Thr Ala Asp Gln
835 840 845

Val Ile Ala Ser Phe Lys Val Leu Ala Gly Asp Lys Asn Phe Ile Thr
850 855 860

Ala Glu Glu Leu Arg Arg Glu Leu Pro Pro Asp Gln Ala Glu Tyr Cys
865 870 875 880

Ile Ala Arg Met Ala Pro Tyr Gln Gly Pro Asp Ala Ala Pro Gly Ala
885 890 895

Leu Asp Tyr Lys Ser Phe Ser Thr Ala Leu Tyr Gly Glu Ser Asp Leu
900 905 910

Pro Leu Glu Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
915 920 925

Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
930 935 940

Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp
945 950 955 960

Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
965 970 975

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
980 985 990

Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Cys
995 1000 1005

Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
1010 1015 1020

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro
1025 1030 1035

Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
1040 1045 1050

```
Ala Lys  Asp Lys Val Ser Leu  Thr Cys Met Ile Thr  Asp Phe Phe
    1055                 1060                 1065

Pro Glu  Asp Ile Thr Val Glu  Trp Gln Trp Asn Gly  Gln Pro Ala
    1070                 1075                 1080

Glu Asn  Tyr Lys Asn Thr Gln  Pro Ile Met Asp Thr  Asp Gly Ser
    1085                 1090                 1095

Tyr Phe  Val Tyr Ser Lys Leu  Asn Val Gln Lys Ser  Asn Trp Glu
    1100                 1105                 1110

Ala Gly  Asn Thr Phe Thr Cys  Ser Val Leu His Glu  Gly Leu His
    1115                 1120                 1125

Asn His  His Thr Glu Lys Ser  Leu Ser His Ser Pro  Gly Lys Gly
    1130                 1135                 1140

Pro Glu  Gln
    1145
```

<210>31
<211>21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido (MOG)p35-55 de la glucoproteína mielínica del oligodendrocito

<400> 31

```
Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu
1               5                   10                  15

Tyr Arg Asn Gly Lys
            20
```

REIVINDICACIONES

1. Uso de CXCL11 de acuerdo con la SEC ID Nº 2 expuesta en el Nº de acceso a GenBank AAH05292 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad autoinmune.

2. Uso de células T ex vivo cultivadas con CXCL11 de acuerdo con la SEC ID Nº 2 expuesta en el Nº de acceso a GenBank AAH05292 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad autoinmune.

3. El uso de la reivindicación 2, en el que dichas células T son células T CD4+.

4. Un artículo de fabricación que comprende CXCL11 de acuerdo con la SEC ID Nº 2 expuesta en el Nº de acceso a GenBank AAH05292 y una agente anti-esclerosis múltiple que se envasan en un material de envasado y de forma impresa, en o sobre dicho material de envasado para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple.

5. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID Nº 6.

6. Una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo el polipéptido aislado de la reivindicación 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. El uso o artículo de fabricación de la reivindicación 1, 2, ó 4, en el que dicho CXCL11 es capaz de regular positivamente la secreción de IL-10 y/o IL-4 desde macrófagos y células T.

8. El uso o artículo de fabricación de la reivindicación 1, 2, ó 4, en el que dicho CXCL11 es capaz de regular negativamente la secreción de una citoquina desde macrófagos y células T, en el que dicha citoquina se selecciona entre el grupo que consiste en TNF-α, IFN-γ, IL-2 e IL-12.

9. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha enfermedad autoinmune se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis, artritis gotosa, afecciones artríticas, articulaciones inflamadas, eccema, afecciones cutáneas inflamatorias, afecciones oculares inflamatorias, conjuntivitis, pirexia, necrosis tisular resultante de inflamación, rechazo de tejidos después de cirugía de transplante, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, inflamación de las vías respiratorias, asma, bronquitis, lupus sistémico eritematoso, esclerosis múltiple, miastenia grave, esclerosis sistémica progresiva, dermatitis atópica, hiperinmunoglobina E, hepatitis activa crónica negativa a antígeno de hepatitis B, tiroiditis de Hashimoto, fiebre mediterránea familiar, enfermedad de Grave, anemia hemolítica autoinmune, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria del intestino, pénfigo vulgar, enfermedad de injerto contra hospedador, diabetes, diabetes de tipo I, granulomatosis de Wegener, glomerulonefritis, esclerosis múltiple de Marburg, infecciones víricas, infecciones por VIH y SIDA.

10. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple.

11. El uso o artículo de fabricación de la reivindicación 1, 2 ó 4, en el que una secuencia de aminoácidos de dicho CXCL11 se une a una secuencia heteróloga de aminoácidos.

12. El uso o artículo de fabricación de la reivindicación 11, en el que dicho CXCL11 unido a dicha secuencia heteróloga de aminoácidos se expone en la SEC ID Nº 6.

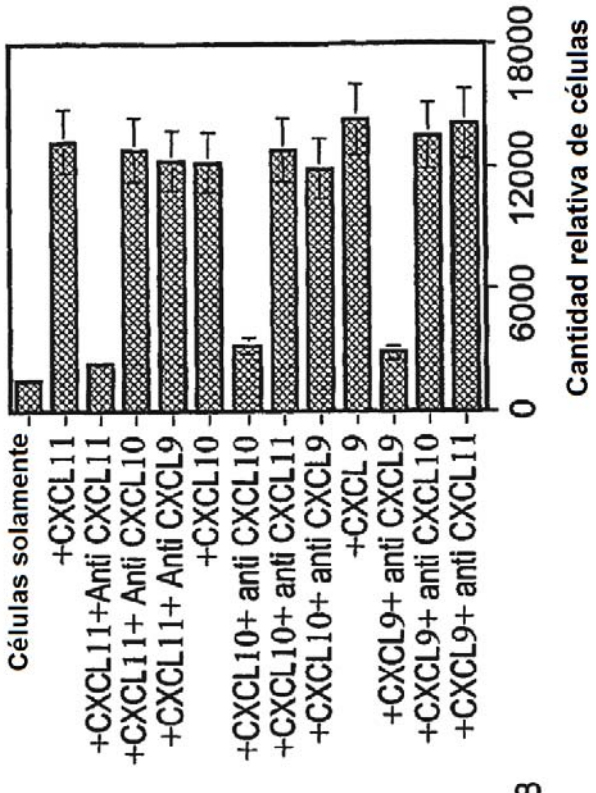
Células solamente
+CXCL11
+CXCL11+Anti CXCL11
+CXCL11+ Anti CXCL10
+CXCL11+ Anti CXCL9
+CXCL10
+CXCL10+ anti CXCL10
+CXCL10+ anti CXCL11
+CXCL10+ anti CXCL9
+CXCL 9
+CXCL9+ anti CXCL9
+CXCL9+ anti CXCL10
+CXCL9+ anti CXCL11
0
6000
12000
18000
Cantidad relativa de células

Fig. 1b

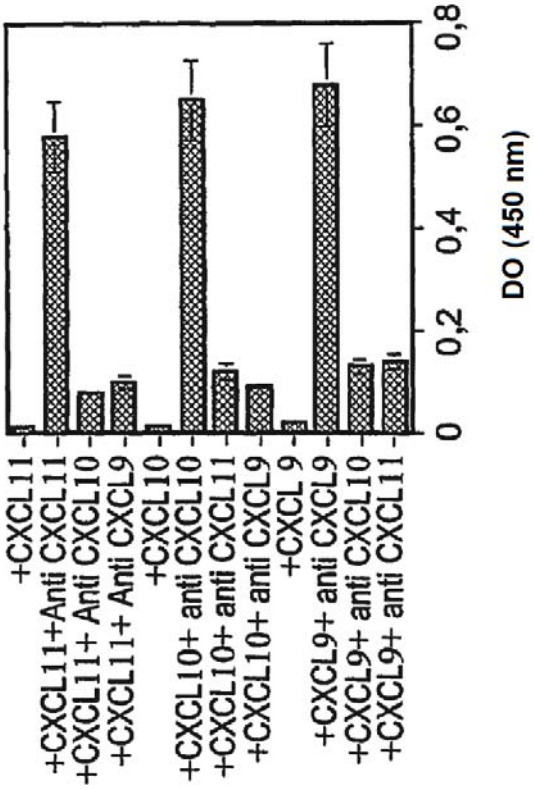
+CXCL11
+CXCL11+Anti CXCL11
+CXCL11+ Anti CXCL10
+CXCL11+ Anti CXCL9
+CXCL10
+CXCL10+ anti CXCL10
+CXCL10+ anti CXCL11
+CXCL10+ anti CXCL9
+CXCL 9
+CXCL9+ anti CXCL9
+CXCL9+ anti CXCL10
+CXCL9+ anti CXCL11
0
0,2
0,4
0,6
0,8
DO (450 nm)

Fig. 1a

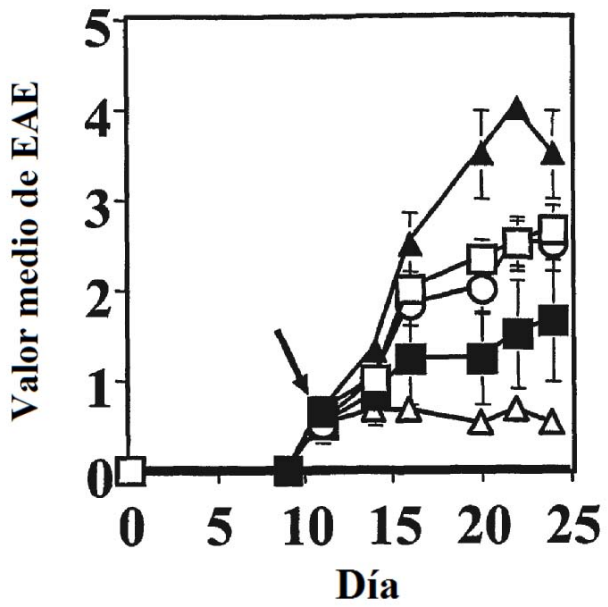
Valor medio de EAE
0
1
2
3
4
5
0
5
10
15
20
25
Día

Fig. 2

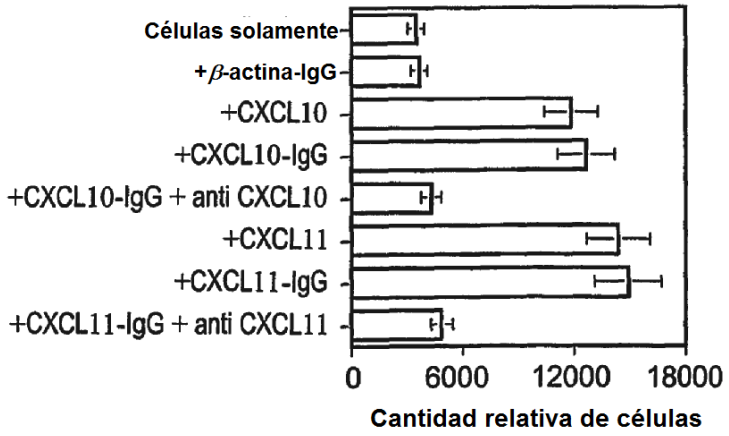
Células solamente
+β-actina-IgG
+CXCL10
+CXCL10-IgG
+CXCL10-IgG + anti CXCL10
+CXCL11
+CXCL11-IgG
+CXCL11-IgG + anti CXCL11
0
6000
12000
18000
Cantidad relativa de células

Fig. 3

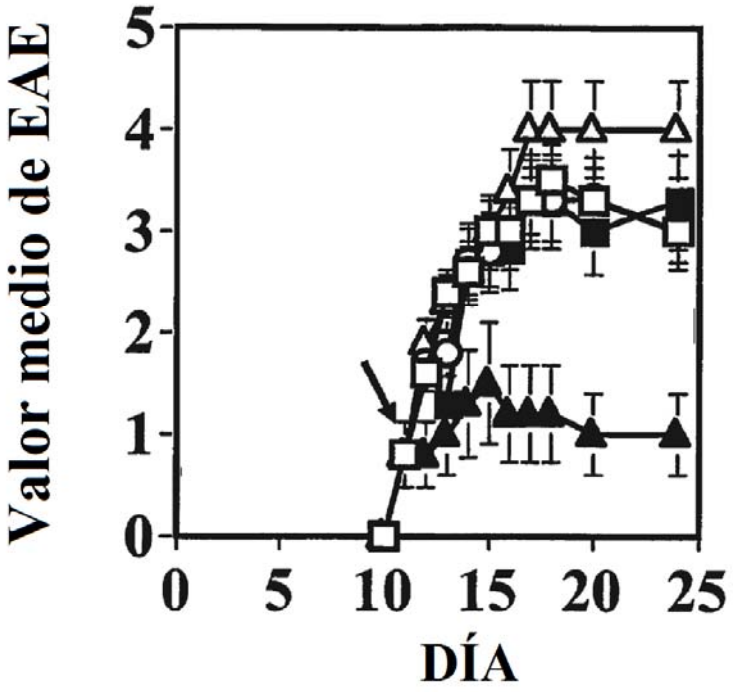

Fig. 4

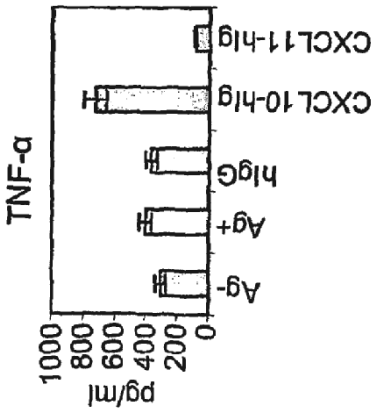

Fig. 5a

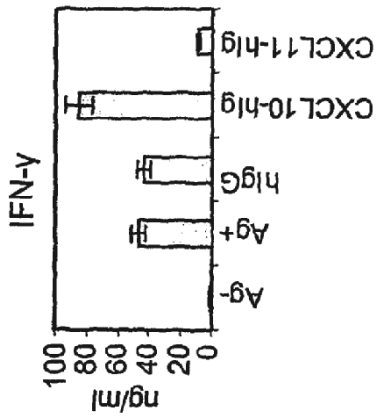

Fig. 5b

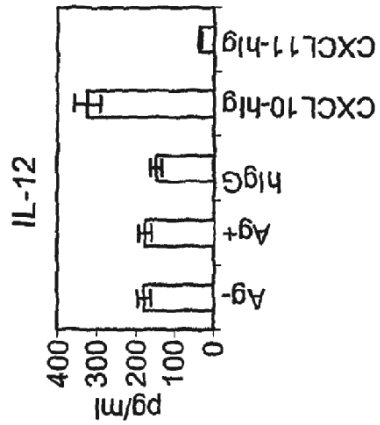

Fig. 5c

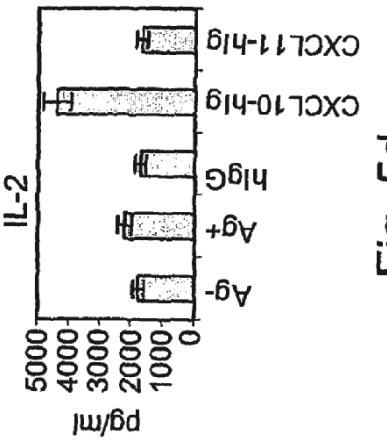

Fig. 5d

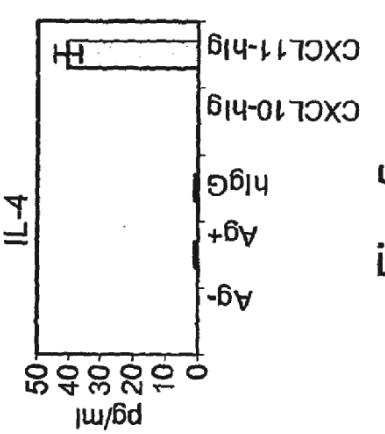

Fig. 5e

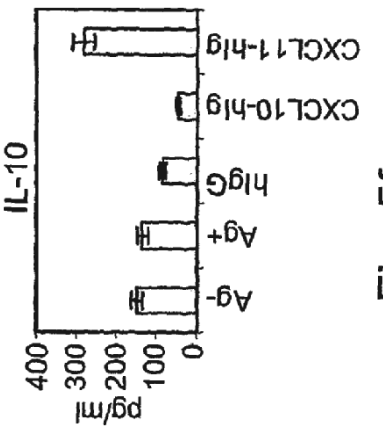

Fig. 5f

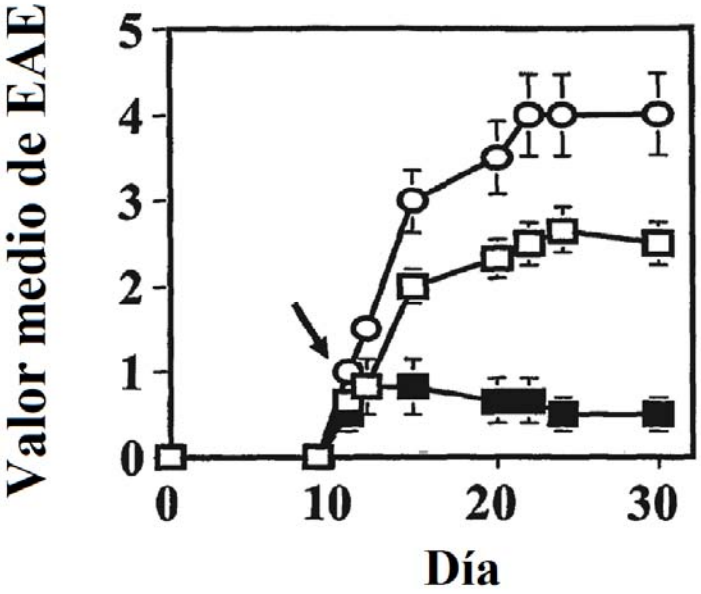

Fig. 6

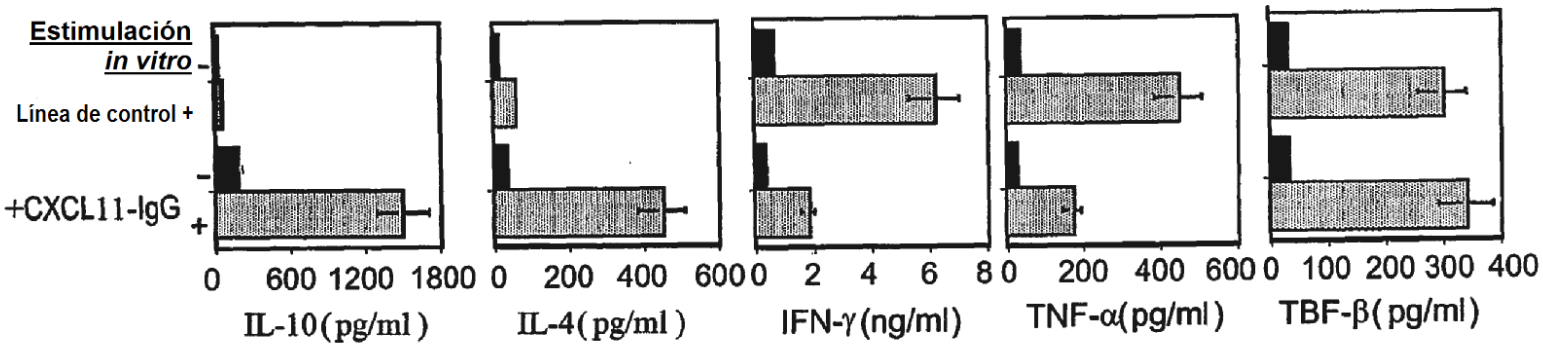

Fig. 7a Fig. 7b Fig. 7c Fig. 7d Fig. 7e

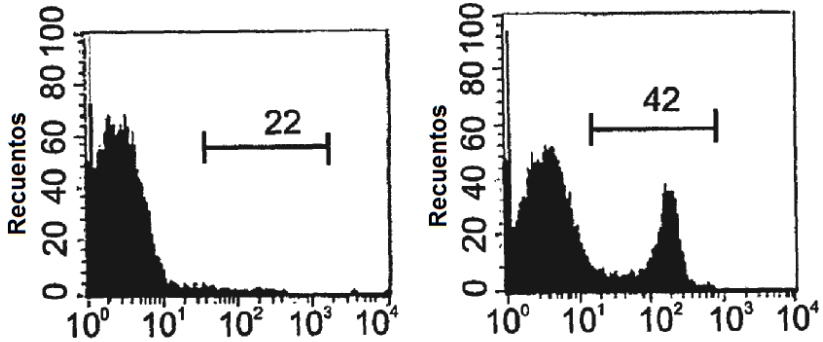

Fig. 8a Fig. 8b

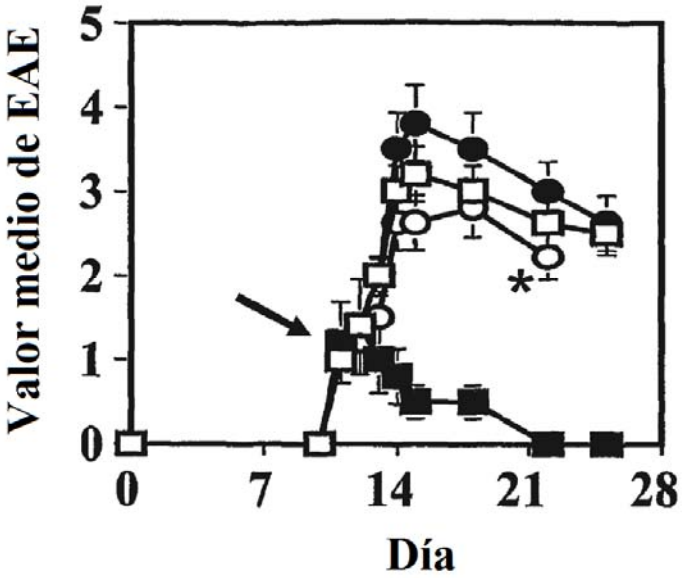

Fig. 9

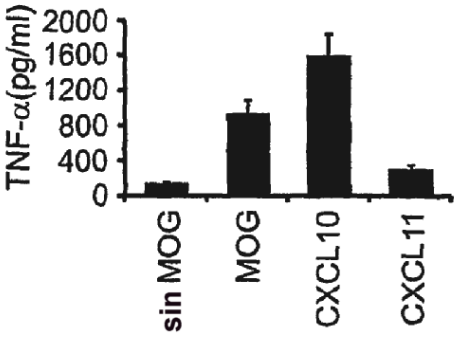

Fig. 10a

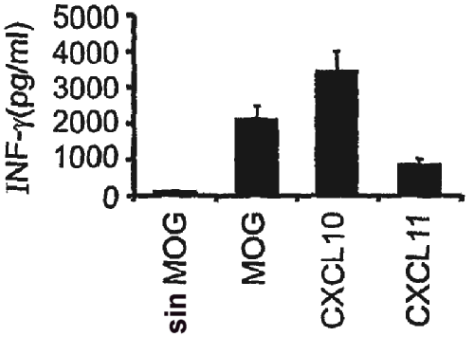

Fig. 10b

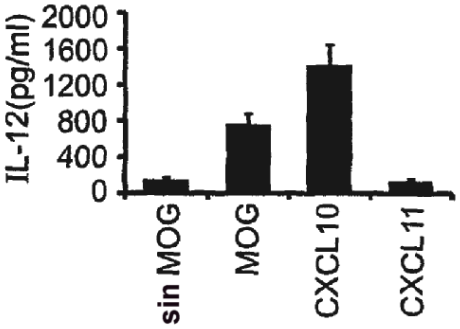

Fig. 10c

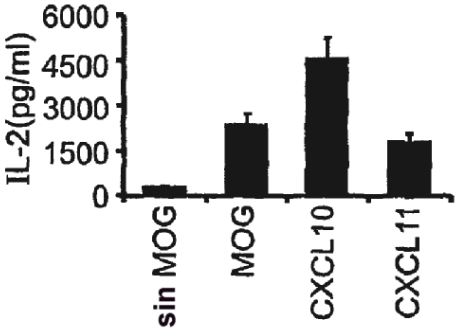

Fig. 10d

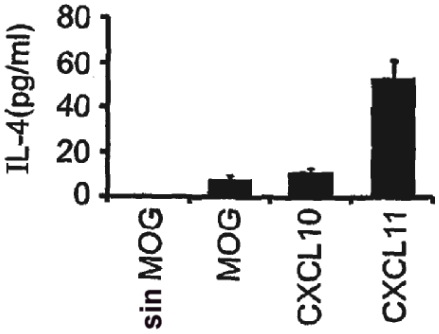

Fig. 10e

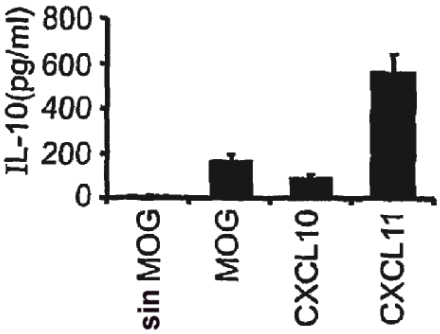

Fig. 10f

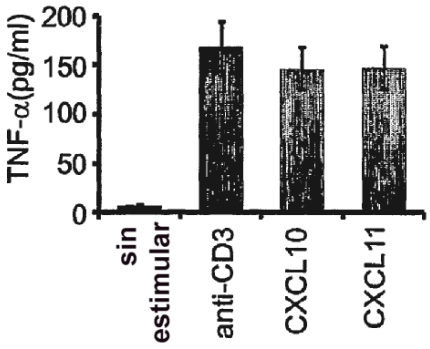

Fig. 10g

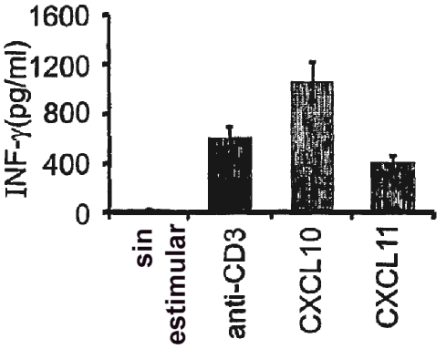

Fig. 10h

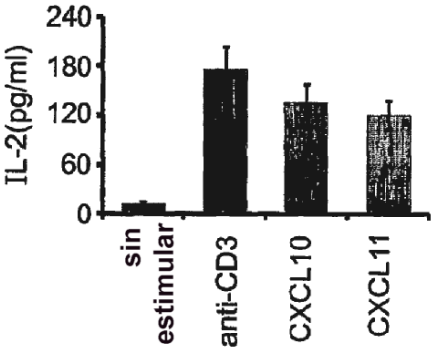

Fig. 10i

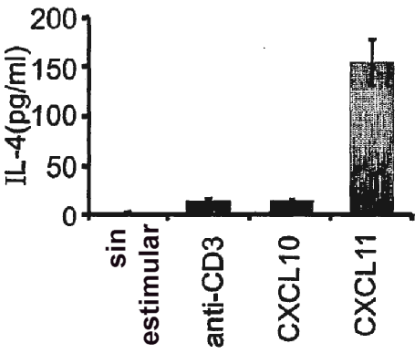

Fig. 10j

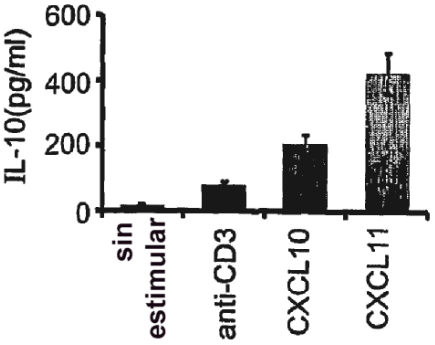

Fig. 10k

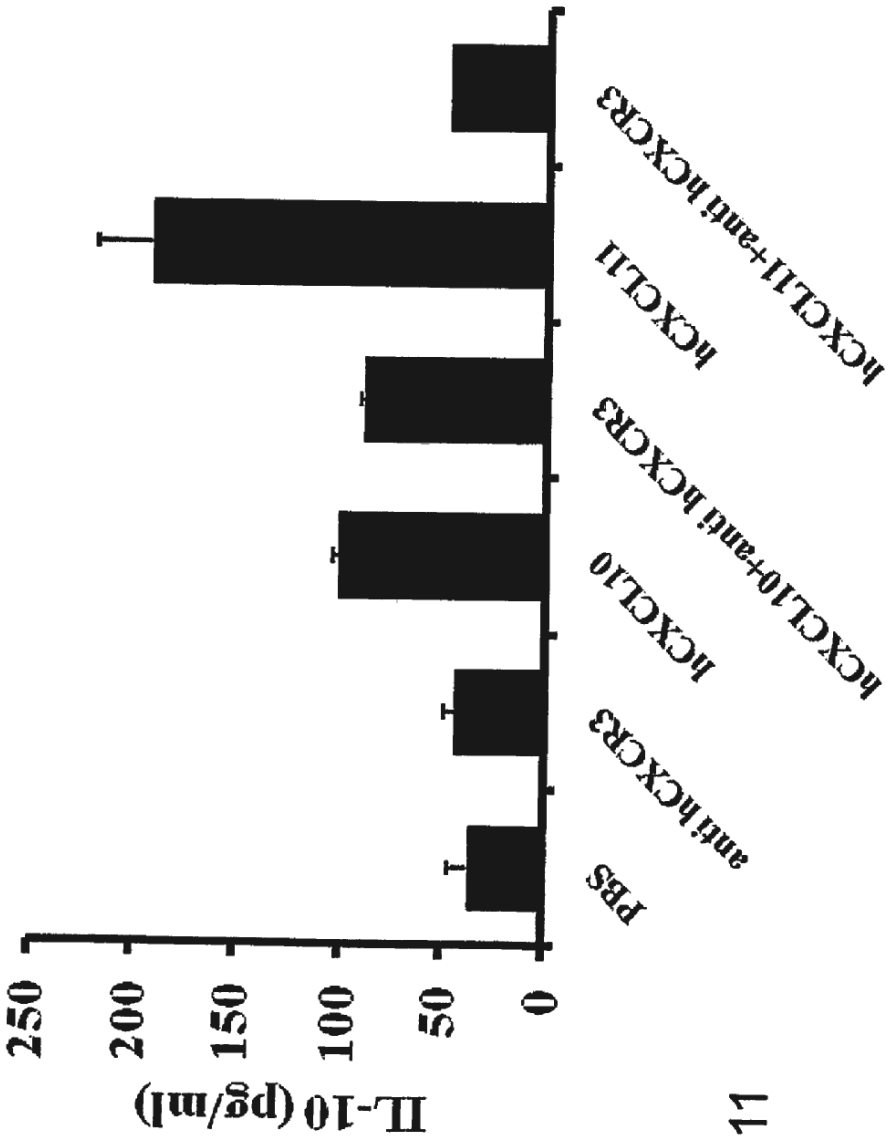
IL-10 (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
PBS
anti hCXCR3
hCXCL10
hCXCL10+anti hCXCR3
hCXCL11
hCXCL11+anti hCXCR3

Fig. 11