(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 516 690**

(51) Int. CI.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2006 E 06772664 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 1909810**

(54) Título: **Inhibidores de la actividad de serina proteasa y su uso en métodos y composiciones para el tratamiento de rechazo de injertos y promoción de supervivencia de injertos**

(30) Prioridad:

07.06.2005 US 687850 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2014

(73) Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO (100.0%)
4001 Discovery Drive, Suite 390, Campus Box 588 UCB
Boulder, CO 80309, US

(72) Inventor/es:

SHAPIRO, LELAND;
LEWIS, ELI C. y
DINARELLO, CHARLES A.

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Inhibidores de la actividad de serina proteasa y su uso en métodos y composiciones para el tratamiento de rechazo de injertos y promoción de supervivencia del injertos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto para usar en un método de tratamiento.

Antecedentes de la invención

Serina proteasas

Las serina proteasas cumplen un papel importante en la fisiología humana mediando la activación de las funciones vitales. Además de su función fisiológica normal, las serina proteasas fueron implicadas en una cantidad de condiciones patológicas en seres humanos. Las serina proteasas se caracterizan por una tríada catalítica que consiste en ácido aspártico, histidina y serina en el sitio activo.

Los inhibidores de serina proteasa naturales fueron clasificados en familias primariamente sobre la base del patrón de ligación de disulfuro y la homología de secuencia del sitio reactivo. Los inhibidores de serina proteasa, incluyendo el grupo conocido como serpinas, fueron hallados en microbios, en los tejidos y los fluidos de plantas, animales, insectos y otros organismos. Al menos nueve proteínas separadas bien caracterizadas se han identificado ahora, que comparten la capacidad de inhibir la actividad de diversas proteasas. Varios de los inhibidores fueron agrupados juntos, a saber, inhibidor de α1-antitripsina proteinasa, inhibidor de proteasa de leucocitos secretorios o SLPI, antitrombina III, antiquimiotripsina, inhibidor de C1 y α2-antiplasmina, que se dirigen contra diversas serina proteasas, es decir, elastasa de leucocitos, trombina, catepsina G, quimiotripsina, activadores de plasminógeno y plasmina. Estos inhibidores son miembros de la clase de inhibidores de α1-antitripsina-proteinasa. La α2-macroglobulina de proteína inhibe los miembros de las cuatro clases de proteasas endógenas: serina, cisteína, ácido aspártico y metaloproteasas. Sin embargo, otros tipos de inhibidores de proteasa son específicos de la clase. Por ejemplo, el inhibidor de α1-antitripsina-proteinasa (también conocido como (α1-antitripsina o AAT) y el inhibidor de inter-alfa-tripsina inhiben sólo las serina proteasas, el inhibidor de α1-cisteína proteasa inhibe las cisteína proteasas y la α1-anticolagenasa inhibe las enzimas colagenolíticas de la clase de las metaloenzimas.

La concentración plasmática normal de ATT varía de 1,3 a 3,5 mg/ml, a pesar de que se puede comportar como un reactivo de fase aguda y aumenta 3-4 veces durante la respuesta del huésped a la inflamación y/o lesión del tejido como con embarazo, infección aguda y tumores. Se difunde fácilmente en los espacios tisulares y forma un complejo 1:1 con proteasas objeto, principalmente elastasa neutrofílica. Otras enzimas tales como tripsina, quimiotripsina, catepsina G, plasmina, trombina, calicreína tisular y factor Xa también pueden servir como sustratos. El complejo de enzima/inhibidor se retira de la circulación por enlace con el receptor de complejo de serpina-enzima (SEC) y es catabolizado por el hígado y el bazo. Parece que ATT representa una parte importante del mecanismo de defensa contra la actividad de las serina proteasas.

La α1-antitripsina es uno de algunos inhibidores de serina proteasa de mamífero naturales actualmente aprobados para la terapia clínica del desequilibrio de proteasa. La α1-antitripsina terapéutica es asequible en comercios desde mediados de los años ochenta y se prepara por medio de diversos métodos de purificación (ver, por ejemplo, Bollen et al., patente U. S. N.º 4.629.567; Thompson et al., patentes U. S. Nros. 4.760.130, 5.616.693, WO 98/56821). La prolastina es una marca registrada para una variante purificada de α1-antitripsina y actualmente es comercializada por Talectris Company (patente U. S. N.º 5.610.285 Lebing et al., 11 de marzo de 1997). Las variantes no modificadas y mutantes recombinantes de α1-antitripsina producidas por métodos de ingeniería genética también son conocidas (patente U. S. N.º 4.711.848); también se conocen métodos de uso, por ejemplo, (terapia génica / suministro de α1-antitripsina (patente U. S. N.º 5.399.346).

Rechazo de injerto

Hay muchas enfermedades que culminan en la disfunción o falla orgánica. Los ejemplos no limitativos representativos incluyen insuficiencia renal debida a diabetes mellitus, hipertensión, obstrucción de la segregación de orina, toxicidad inducida por drogas o hipoperfusión, así como disfunción cardíaca debida a enfermedad arterial coronaria isquémica, cardiomiopatía / infección o valvulopatía. Las enfermedades pulmonares incluyen daño sustancial debido a enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, que incluye bronquitis crónica y enfisema), deficiencia de AAT, fibrosis quística y fibrosis intersticial. En determinadas condiciones, la única opción terapéutica para el tratamiento de un sujeto puede ser el trasplante de órganos. El trasplante de islotes pancreáticos proporciona a pacientes diabéticos la única opción para un nivel de glucosa en sangre muy controlado, probado como esencial para la prevención de complicaciones diabéticas. En el caso de los islotes, la inflamación postrasplante, que precede al rechazo inmune, es un determinante crítico de la supervivencia del injerto. Esta inflamación temprana es mediada por células distintas de las células inmunes aloespecíficas inminentes.

Un desafío del trasplante terapéutico consiste en los efectos dañinos del sistema inmune del huésped sobre el trasplante. Las moléculas de MHC existen sobre las superficies de células y las estructuras particulares de

moléculas de MHC son típicamente exclusivas de cada individuo (a excepción de gemelos idénticos, donde los complementos de la molécula de MHC son idénticos). El sistema inmune se programa para atacar los tejidos extraños o no propios portadores de MHC. Por estas razones, cuando un órgano o tejido se trasplanta a un receptor, se hace un esfuerzo por optimizar el grado de coincidencia del tejido entre donante y receptor. Los antígenos de MHC son caracterizados para el receptor y los donantes. La coincidencia de un donante con un receptor de aloinjerto por la estructura de MHC reduce la magnitud de la respuesta de rechazo. Un ejemplo arquetípico es el grupo sanguíneo coincidente. La mayoría de los trasplantes son aloinjertos que se producen entre miembros no idénticos de la misma especie. Como estas coincidencias son imperfectas, hay una respuesta inmune esperada al rechazo al injerto asociada con los aloinjertos. Los métodos actuales usados, a fin de mejorar la supervivencia del injerto, incluyen medicaciones para suprimir la respuesta inmune que pueden dar como resultado el rechazo del injerto. Estas medicaciones se denominan inmunosupresor o fármacos antirrechazo, tales como prednisona, ciclosporina A y ciclofosfamida, para nombrar algunos. Como se mencionó con anterioridad, se experimenta una inflamación local después del injerto y las células que son particularmente sensibles a la inflamación no específica tales como islotes pueden soportar la disfunción del injerto más severamente que otros tipos.

A pesar de los avances en el campo de la terapia antirrechazo, el mantenimiento del injerto sigue siendo un desafío dado que las terapias antirrechazo disponibles son imperfectas. Por ejemplo, la inmunosupresión aumenta el riesgo de una infección oportunista o neoplasia. Las toxicidades abundan e incluyen, pero sin limitación, diabetes, disfunción orgánica, insuficiencia renal, disfunción hepática, defectos hematológicos, efectos colaterales neuromusculares y psiquiátricos y muchos otros. En consecuencia, hay una necesidad de un tratamiento médico antirrechazo más efectivo que prolongue la supervivencia del injerto y mejora la calidad de vida.

El trasplante de médula ósea en un tipo de trasplante en el que las células inmunes de un donante son transferidas a un receptor, confiriendo el sistema inmune del donante al receptor. Aquí, el injerto es capaz de generar una respuesta inmune contra el huésped y se denomina enfermedad de “injerto versus huésped” (GVHD). Se requiere un tratamiento inmunosupresor y antimicrobiano para bloquear las consecuencias adversas de GVHD y hay una necesidad inhibidores más seguros y más efectivos de los efectos adversos por parte del injerto.

Debido a algunas de las dificultades e insuficiencias de una terapia convencional para el tratamiento de complicaciones del trasplante y efectos colaterales asociados, se necesitan nuevas modalidades terapéuticas.

El documento US 2003/053998 A1 revela un método de protección de órganos o tejidos susceptibles a disfunción inducida por reperfusión después de isquemia, donde tal método comprende la administración parenteral a un paciente de una composición terapéutica que contiene glucoproteína natural de alfa-1 ácido, alfa1-antitripsina natural o una mezcla de ellos.

Daemen MARC et al. (Daemen MARC et al., Circulation, vol. 102, no. 12, pp. 1420-1426) propusieron que los efectos antiapoptóticos y antiinflamatorios de la glucoproteína de de alfa-1 ácido y alfa1-antitripsina contribuyan con el tipo retardado de protección asociado con el preacondicionamiento isquémico y otros ultrajes.

Breit SN et al. (Breit SN et al., Clinical Immunology and Immunopathology, vol. 35, pp. 363-380 (1985)) informaron acerca del papel de la deficiencia de alfa1-antitripsina en la patogénesis de trastornos inmunes.

Song S et al. (Song S et al., Gene Therapy (2004), vol. 11, pp. 181-186) informaron acerca de la prevención de la diabetes de tipo I en ratones NOD usando alfa1-antitripsina mediada por virus adenoasociados recombinantes.

El documento WO 00/51624 A2 revela un método de tratamiento de un animal que padece de una enfermedad caracterizada por apoptosis excesiva por administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un inhibidor de serina proteasa y, después de ello, controla una reducción de la apoptosis.

Compendio de la invención

El problema subyacente de la presente invención es solucionado por el objeto de la reivindicación independiente adjunta. Las realizaciones preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención es solucionado por un compuesto que comprende alfa1-antitripsina, un péptido de aminoácido carboxiterminal correspondiente a alfa1-antitripsina o un análogo de alfa1-antitripsina para usar en un método para reducir un rechazo de trasplante no orgánico o para reducir el riesgo de un rechazo de trasplante no orgánico o enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), en donde el trasplante no orgánico se selecciona del grupo que consiste en córnea, médula ósea, islote pancreático y una combinación de ellos.

En una realización, la composición también comprende uno o varios agente anti-rechazo de trasplante, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores, agentes inmunomoduladores, agentes antimicrobianos o una combinación de ellos.

En una realización, el compuesto comprende un péptido carboxiterminal derivado de alfa1-antitripsina.

En una realización, el trasplante no orgánico comprende trasplante de células de islotes pancreáticos.

En otra realización, el fragmento de alfa1-antitripsina comprende uno o varios péptidos de aminoácidos carboxiterminales correspondientes al carboxiterminal de alfa1-antitripsina seleccionado del grupo que consiste en AGAMFLEAIP (SEQ. ID NO. 56); MSIPPEVKFN (SEQ. ID NO. 57); KPFVFLMIEQ (SEQ. ID NO. 58); y NTKSPLFMGK (SEQ. ID NO. 59).

En una realización preferida, el compuesto comprende FVFLM (SEQ ID NO. 1) o análogo de FVFLM (SEQ ID NO. 1) o una combinación de ellos.

En una realización, AAT o péptido de aminoácido carboxiterminal correspondiente a alfa1-antitripsina es una parte de un polipéptido de fusión.

En otra realización, AAT o péptido de aminoácido carboxiterminal correspondiente a alfa1-antitripsina se fusiona con una región constante de inmunoglobulina.

De acuerdo con estas realizaciones, un sujeto se puede tratar con una composición para reducir el riesgo de un rechazo de trasplante o un efecto colateral de un rechazo de trasplante en un sujeto. De acuerdo con este método, al sujeto se puede administrar una composición que incluye un compuesto de la invención que es capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa. La composición se puede administrar antes del trasplante, durante el trasplante, después del trasplante o una combinación de ellos. Además, la composición también puede incluir uno o varios agentes anti-rechazo de trasplante, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores, agentes inmunomoduladores, agentes antimicrobianos o una combinación de ellos.

Una composición capaz de reducir de modo significativo la actividad de la serina proteasa puede incluir alfa1-antitripsina, uno de sus análogos o una combinación de ellos. Un trasplante de la presente invención es un trasplante no orgánico, a saber, se contemplan córnea, médula ósea, islote pancreático, una combinación de ellos.

En realizaciones de la presente invención, se proporcionan métodos de incluyen métodos para mejorar los síntomas o los signos experimentados por un sujeto que tiene o que necesita un trasplante. De acuerdo con estas realizaciones, los síntomas o signos pueden incluir condiciones asociadas con enfermedad de injerto versus huésped (GVHD) o rechazo al injerto. En un ejemplo, los métodos revelados en la presente se pueden usar para tratar un sujeto que se somete a trasplante de médula ósea. En otra realización, los síntomas o signos pueden incluir, pero sin limitación, uno o varios de los siguientes: insuficiencia renal, insuficiencia pulmonar, insuficiencia cardíaca, malestar, fiebre, tos seca, anorexia, pérdida de peso, mialgias y dolores de pecho, compromiso ventilatorio, sudoración, náuseas, vómitos, fiebre, dolor abdominal, diarrea con sangre, ulceraciones de mucosa, función renal reducida (mayor creatinina, menor producción de orina), menor función pulmonar (mayor acortamiento de la respiración, fiebre, tos, esputo, hipoxemia), menor función cardíaca (acortamiento de la respiración, dolor de pecho, fatiga, edema pulmonar o periférico, valvulopatía), función de islotes reducida (glucosa incrementada, diabetes mellitus), enfermedad de injerto versus huésped (ulceración gastrointestinal (GI), insuficiencia pulmonar, ulceración de la piel, coagulopatía, disfunción del SNC (cambios del estado mental, coma), CMV (infección por citomegalovirus, infección viral, fúngica, parasitaria)).

Las realizaciones de la presente invención incluyen métodos para promover la supervivencia prolongada del injerto y la función en un sujeto que incluye la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que incluye una sustancia que exhibe α1-antitripsina o análogo de α1-antitripsina o inhibidor de la actividad de serina proteasa o un de sus derivados funcionales.

Las realizaciones de la presente invención incluyen métodos para tratar un sujeto que necesita de una terapia de inmunotolerancia. De acuerdo con estas realizaciones, un sujeto se puede tratar con una composición para reducir el riesgo de una respuesta inmune disfuncional o un efecto colateral de una respuesta inmune disfuncional en un sujeto. En otra realización, los métodos de la presente proporcionan la inducción de inmunotolerancia específica de un injerto y/o reducen la necesidad de una terapia inmunosupresora. De acuerdo con esta realización, el sistema inmune del receptor del trasplante puede haber reducido o perdido la capacidad específica de ataque del injerto, mientras mantiene su capacidad de afrontar cualquier otro tipo de ataque inmune. De acuerdo con este método, al sujeto se puede administrar una composición que incluye un compuesto que es capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa u otra actividad asociada con α1-antitripsina o un análogo de α1-antitripsina. En determinadas realizaciones, una composición capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa puede incluir alfa1-antitripsina, uno de sus análogos o una combinación de ellos. De acuerdo con estas realizaciones, un ejemplo para la terapia de inmunotolerancia puede incluir la inhibición de la producción de citoquinas.

Las realizaciones de la presente invención incluyen métodos para reducir los niveles de TNFα (factor de necrosis tumoral alfa) en un sujeto que incluye la administración de una composición que incluye alfa1-antitripsina, uno de sus análogos o una combinación de ellos a un sujeto que necesita de tal tratamiento.

Las realizaciones de la presente invención incluyen métodos para tratar un sujeto que necesita de una terapia de inmunotolerancia. De acuerdo con estas realizaciones, se proporcionan métodos para reducir la producción de NO y/o reducir la apoptosis y/o inhibir citomegalovirus (infección y reactivación) incluyendo administración de una composición que incluye un compuesto que es capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa y/u otra actividad de alfa1-antitripsina. En determinadas realizaciones de la invención, una composición capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa y/o imitar otra actividad de alfa1-antitripsina puede incluir alfa1-antitripsina, uno de sus análogos o una combinación de ellos.

En determinadas realizaciones de la presente invención, el compuesto antiinflamatorio o el fármaco inmunomodulador puede incluir, pero sin limitación, uno o varios de interferón, derivados de interferón incluyendo betaserona, beta-interferón, derivados de prostano incluyendo iloprost, cicaprost; glucocorticoides incluyendo cortisol, prednisolona, metil-prednisolona, dexametasona; inmunosupresores incluyendo ciclosporina A, FK-506, metoxsaleno, talidomida, sulfasalazina, aza-tioprina, metotrexato; inhibidores de lipoxigenasa que comprenden zileutona, MK-886, WY-50295, SC-45662, SC-41661A, BI-L-357; antagonistas de leucotrieno; derivados peptídicos que incluyen ACTH y sus análogos; receptores solubles de TNF; anticuerpos de TNF; receptores solubles de interleuquinas, otras citoquinas, proteínas de células T; anticuerpos contra receptores de interleuquinas, otra citoquina, proteínas de células T; y calcipotrioles; Celcept®, micofenolato mofetilo y sus análogos tomados ya sea solos o combinados.

Las realizaciones de la presente invención incluyen métodos para reducir el rechazo al injerto en un sujeto. De acuerdo con estas realizaciones, un sujeto se puede tratar con una composición para reducir el riesgo de respuestas del rechazo al injerto o un efecto colateral de una respuesta de rechazo al injerto en un sujeto. De acuerdo con este método, al sujeto se puede administrar una composición que incluye un compuesto que es capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa. En determinadas realizaciones, una composición capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa puede incluir α1-antitripsina, uno de sus análogos o una combinación de ellos. En un ejemplo, la reducción del rechazo al injerto puede incluir la reducción de los síntomas asociados con el rechazo al injerto en un sujeto que tiene un trasplante de órgano como un trasplante de riñón o un trasplante de intestino o un trasplante no orgánico, como un trasplante de médula ósea, trasplante de tejido blando.

En otra realización más, la presente invención puede incluir terapias combinadas que incluyen composiciones que exhiben α1-antitripsina, uno de sus análogos o sustancia con actividad inhibidora de serina proteasa. Por ejemplo, una composición puede incluir α1-antitripsina y otro inhibidor de serina proteasa administrado simultáneamente o en composiciones separadas.

De acuerdo con realizaciones reveladas en la presente, cualquiera de las composiciones reveladas se puede usar para mejorar los síntomas asociados con un trasplante. Estos síntomas pueden incluir, pero sin limitación, infiltración del injerto con células y/o factores séricos (por ejemplo, anticuerpos antiinjeto de complemento), mayor producción de citoquinas y/o quimioquinas, mayor producción de óxido nítrico, mayor apoptosis y muerte celular y mayor respuesta inmune contra el tejido y/o células de trasplante.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método de mejora de un síntoma o signo asociado con el trasplante en un sujeto que necesita de dicha mejora. De acuerdo con esta realización, una composición se puede administrar a un sujeto como una cantidad farmacéuticamente efectiva de una sustancia de α1-antitripsina, uno de sus análogos o actividad inhibidora de serina proteasa, en donde la composición es capaz de reducir, prevenir o inhibir la actividad de serina proteasa o proteasa y/o se une con el receptor sec u otra actividad.

En determinadas realizaciones, los péptidos sintéticos y/o naturales se pueden usar en composiciones y métodos de la presente invención, por ejemplo, proporcionando una actividad inhibidora de serina proteasa. Se pueden usar homólogos, péptidos naturales, con homologías de secuencia con AAT incluyendo péptidos directamente derivados de la escisión de AAT u otros péptidos tales como péptidos que inhiben las serina proteasas o tienen actividad de tipo AAT. Otros derivados de peptidilo, por ejemplo, derivados de aldehído o cetona de tales péptidos también están contemplados en la presente. Sin estar limitados a AAT y derivados peptídicos de AAT, se pueden usar compuestos como peptoides de oxadiazol, tiadiazol y triazol y sustancias que comprenden determinados ésteres de fenilendialcanoato, CE-2072, UT-77 y peptoides de triazol. Los ejemplos de análogos son TLCK (tosil-L-lisina clorometilcetona) o TPCK (tosil-L-fenilalanina clorometilcetona).

En otras realizaciones, un agente que reduce la aparición de un rechazo al injerto, promueve una función prolongada del injerto o promueve una prolongada supervivencia del aloinjerto también puede ser un inhibidor de la actividad de serina proteasa, un inhibidor de elastasa o un inhibidor de proteinasa-3. Un inhibidor de la actividad de serina proteasa puede incluir, pero sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas que incluyen moléculas naturales, sintéticas y biosintéticas, moléculas inorgánicas pequeñas que incluyen moléculas naturales y sintéticas, productos naturales que incluyen aquellos producidos por plantas y hongos, péptidos, variantes de α1-antitripsina, péptidos y proteínas químicamente modificados.

En algunas realizaciones, los péptidos de AAT contemplados para usar en las composiciones y los métodos de la presente invención también pretenden incluir cualquiera y todos los péptidos ATT específicos distintos de los péptidos ATT de aminoácidos de la SEQ ID NO. 1 representados supra. Se puede usar cualquier combinación de

aminoácidos consecutivos que representa una parte de AAT o actividad de tipo AAT, como aminoácidos 2-12, aminoácidos 3-13, 4-14, etc. de SEQ ID NO. 1, así como cualquiera y todos los fragmentos de péptidos de AAT correspondientes a aminoácidos seleccionados de la SEQ ID NO. 1. Los solicitantes tienen derecho aquí a composiciones a base de cualquiera y todas las variantes de péptidos de AAT a base de la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO. 1.

En un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por vía oral, sistémica, a través de un implante, por vía intravenosa, tópica, intratecal, intratraqueal, intracraneal, subcutánea, intravaginal, intaventricular, intranasal como inhalación, mezcladas con injertos por inundación de órganos o suspensión de células o cualquier combinación de ellos.

Como tales, los expertos en la técnica apreciarán que la concepción, en la que se basa esta descripción, se puede usar con facilidad como una base para diseñar otros métodos para llevar a cabo las diversas características y ventajas de la presente invención tal como se define por las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para demostrar más determinadas realizaciones de la presente invención. Las realizaciones se pueden comprender mejor por referencia a uno o varios de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en este documento.

Fig. 1A-1D ilustra un método de ejemplo de tratamiento de aloinjertos de islotes con AAT. Los islotes de ratones DBA/2 (H-2d) se trasplantaron debajo de la cápsula renal de ratones hiperglucémicos C57BL/6 inducidos con estreptozotocina (H-2b). (A) Niveles de glucosa de los días 6-18. (B) Protocolos de tratamiento. El tratamiento de control y el tratamiento completo de AAT se describen en el panel A. El tratamiento de AAT temprano consiste en el tratamiento en los días -1, 1 y 3 (2 mg, n = 3). El tratamiento de AAT tardío consiste en el tratamiento del día 2 y cada 2 días (2 mg, n = 3). (C) Efecto de anticuerpos ATT anti-humanos de ratón. La línea punteada indica los niveles de glucosa postrasplante de un ratón bajo protocolo de tratamiento de AAT completo (ver A, B) que se inmunizó por administraciones múltiples de AAT humano anterior al trasplante (1 representante, n = 3). La línea sólida indica niveles de glucosa de un ratón no inmunizado tratado bajo el protocolo de tratamiento de AAT completo (1 representante, n = 10). La flecha indica la detección de anticuerpos ATT anti-humano inducida por tratamiento en el ratón representativo no inmunizado. (D) Comparación de los niveles de glucosa postrasplante del día 15 en ratones que estaban bajo protocolo de tratamiento completo con ALB (n = 3) o AAT (no inmunizados n = 10, inmunizados n = 3). Del grupo tratado con AAT, se detectaron anticuerpos en el día 15 en 3/3 ratones inmunizados y en 6/10 ratones no inmunizados.

Fig. 2A-2D ilustra un método de ejemplo del efecto de AAT en infiltrados celulares peritoneales producidos por tioglicolato. (A) Población celular total de células lavadas de (o) solución fisiológica o ( ) ratones inyectados con tioglicolato tratados con AAT (5Δmg). (B) Porcentaje de población celular de ratones tratados con solución fisiológica a 48 horas. (C) Oxidación de AAT. (D) Identificación de macrófagos y neutrófilos producidos.

Fig. 3A-3C ilustra un método de ejemplo del efecto de AAT en infiltrados celulares peritoneales incompatibles con MHC, producidos por fibroblastos NIH-3T3. (A) Cantidades de células. La cantidad de células en cada subpoblación se calculó a partir de los porcentajes obtenidos por análisis de FACS y la cantidad total de células en el infiltrado. (B) Análisis representativo de FACS. (C) Efecto de AAT sobre la intensidad y función del infiltrado producido por aloinjerto de islotes. Izquierda, tinción de hematoxilina y eosina (H&E) de aloinjertos de islotes del día 7. Derecha, inmunohistoquímica (IHC) con anticuerpos anti-insulina de injertos de islotes del día 15. R, parénquima renal, G, injerto, C, cápsula renal.

Fig. 4A-4H ilustra un método de ejemplo del efecto de AAT en respuestas de islotes. (A-D) Media ± SEM de A. niveles nítricos, B. viabilidad celular y C. Niveles de MIP-1α. La línea punteada representa islotes incubados a un 30avo de la concentración de IFNγ/IL-1β. D. Niveles de TNFα. (E) Ensayo de inducción insulínica. (F) Toxicidad por estreptozotocina. Cada imagen muestra un islote representativo de un páncreas. (G) Contenido celular de islotes. (H) Expresión de clase II de MHC.

Fig. 5A-5D ilustra el efecto de AAT en TNFα. (A) Islotes de ratones C57BL/6 se cultivaron (100 islotes/cavidad por triplicado) en presencia de AAT (0,5 mg/ml) o inhibidor TACE (10 mM) 1 hora antes de la estimulación por IFNγ (5 ng/ml) más IL-1β (10 ng/ml). Izquierda, cambio medio ± SEM en TNFα en sobrenadantes después de 72 horas de incubación. Derecha, cambio en veces medio ± SEM en TNFα de membrana en células de islotes después de 5 horas de incubación, de acuerdo con el análisis de FACS. (B) Análisis representativos de FACS de TNFα de membrana en células de islotes estimuladas en ausencia (área abierta) o presencia (área sombreada) de AAT. (C) Hiperglicemia inducida por estreptozotocina.

Fig. 6A-6D ilustra el efecto de AAT sobre trasplante de aloinjerto de islote. 6A ilustra el estudio del curso del tiempo después del trasplante. 6B ilustra un infiltrado inmune hallado fuera del área de injerto. 6C ilustra un incremento en presencia de CD4+ y una reducción comparativa en monocitos y neutrófilos. 6D ilustra niveles de glucosa que

reflejan un nivel de tolerancia con respecto a días después del aloinjerto del mismo donante (izquierda) y un tercer reinjerto de donante (derecha), que indica la inducción de la inmuntolerancia esoecífica.

Fig. 7A-7E ilustra la producción de AAT por células de islotes y reflejo de la supervivencia de injerto de islotes. 7A ilustra una expresión en el curso del tiempo de ARNm de AAT de ratón después de la producción de citoquinas (IL-1β e IFNγ) (izquierda) y a las 8 horas (derecha). 7B ilustra un ejemplo de lesión de islotes durante la pancreatitis; la histología islotes normales (izquierda arriba), la histología de islotes de un páncreas inflamado (derecha arriba) y expresión de AAT de ratón en islotes obtenidos de los páncreas en un modelo de pancreatitis aguda (abajo). 7C ilustra un ejemplo de muestras de aloinjertos de islotes tomados después del injerto y se evaluó el cambio en porcentaje en niveles de ARNm de AAT. 7D ilustra un ejemplo de la protección de islotes de la lesión de citoquina con AAT endógeno por introducción de oncostatina M (un miembro de la familia de interleuquina 6 (IL-6)) que induce la expresión de AAT en islotes, niveles de oncostatina M y AAT (arriba izquierda); niveles de óxido nítrico y viabilidad evaluados (arriba derecha) y la producción de óxido nítrico que representa la viabilidad de los islotes después de una exposición de 4 días a oncostatina M y la producción de AAT que reduce los efectos de citoquina sobre los islotes (abajo).

Fig. 8A-8D ilustra el efecto de AAT en islotes humanos y la producción de óxido nítrico (8A), la producción de TNF-α (8B) IL-6 (8C) e IL-8 (8D).

Descripción de las realizaciones ilustrativas

Definiciones

Los términos que no se definen de otro modo en la presente se usan de acuerdo con su significado pleno y ordinario.

Como se usa en la presente, “un” o “una” pueden significar uno o más de uno de un artículo.

Como se usa en la presente, “análogo de alfa1-antitripsina” puede significar un compuesto que tiene actividad de tipo alfa1-antitripsina. En una realización, un análogo de alfa1-antitripsina es un derivado funcional de alfa1-antitripsina. En una realización particular, un análogo de alfa1-antitripsina es un compuesto capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa. Por ejemplo, un inhibidor de la actividad de serina proteasa tiene la capacidad de inhibir la capacidad proteolítica de tripsina, elastasa, calicreína, trombina, catepsina G, quimiotripsina, activadores de plasminógeno, plasmina y/u otras serina proteasas.

Como se usan en la presente, “fármacos o agentes inmunomoduladores”, se entienden, por ejemplo, agentes que actúan sobre el sistema inmune, directa o indirectamente, por ejemplo, por estimulación o supresión de una actividad celular de una célula en el sistema inmune, por ejemplo, células T, células B, macrófagos o células que presentan antígeno (APC, células dendríticas) o por actuación en componentes fuera del sistema inmune que, a su vez, estimulan, suprimen o modulan el sistema inmune, por ejemplo, citoquinas, por ejemplo, hormonas, agonistas o antagonistas de receptores y neurotransmisores; inmunomoduladores pueden ser, por ejemplo, inmunosupresores o inmunoestimulantes.

Se ha de entender que la terminología y la fraseología empleada en la presente son con fines descriptivos y no se deben considerar limitantes.

Descripción detallada de la invención

En las secciones siguientes, se describen diversas composiciones y métodos de ejemplo tal como se define por las reivindicaciones, a fin de detallar diversas realizaciones de la invención. Será obvio para un experto en la técnica que la práctica de las diversas realizaciones no requiere el empleo de todos o incluso algunos de los detalles específicos destacados en la presente, sino más bien las concentraciones, tiempos y otros detalles específicos se pueden modificar por medio de experimentación de rutina. En algunos casos, no se han incluido métodos o componentes bien conocidos en la descripción.

Las realizaciones de la presente invención incluyen métodos para tratar un sujeto que tiene o que necesita un trasplante. De acuerdo con estas realizaciones, un sujeto se puede tratar con una composición capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa. Además, una realización de la presente invención proporciona métodos que incluyen el tratamiento de un sujeto con una composición que comprende un compuesto que tiene una actividad de α-1-antitripsina. En una realización, la composición puede incluir α-1-antitripsina, su análogo o un inhibidor de serina proteasa para promover, por ejemplo, la supervivencia del trasplante o reducir un efecto colateral del trasplante. Además, la administración de la composición puede ser antes del trasplante, durante el trasplante, después del trasplante o una combinación de ellos. Además, la composición también puede incluir una o varias terapias adicionales tales como terapias de inmunosupresión. Un trasplante de la presente invención puede incluir trasplante de un órgano tales como pulmón, riñón, corazón, hígado, piel, páncreas o intestino, o no orgánico tales como médula ósea, islote pancreático, córnea y/o tejido blando.

Los inhibidores de serina proteasa se han hallado en una variedad de organismos. Ahora se han identificado al menos nueve proteínas separadas bien caracterizadas, que comparten la capacidad de inhibir la actividad de diversas proteasas. Varios de los inhibidores se han agrupado juntos como el inhibidor de α1-antitripsina-proteinasa. Las serina proteasas incluyen, pero sin limitación, elastasa de leucocito, trombina, catepsina G, quimiotripsina, activadores de plasminógeno y plasmina.

Las realizaciones de la presente invención incluyen métodos para promover el trasplante, la supervivencia del injerto, la reducción del rechazo al injerto y/o la reducción o prevención de efectos colaterales asociados con el rechazo al injerto. De acuerdo con estas realizaciones, los efectos colaterales pueden incluir condiciones asociados con enfermedad de injerto versus huésped (GVHD) o rechazo al injerto. En un ejemplo, los métodos revelados en la presente se pueden usar para tratar a un sujeto que se somete a trasplante de médula ósea. En otra realización, los síntomas o signos pueden incluir, pero sin limitación, uno o varios de los siguientes: malestar, fiebre, tos seca, mialgias y dolores de pecho, compromiso ventilatorio, sudoración, náuseas, vómitos, fiebre, dolor abdominal, diarrea con sangre, ulceraciones de mucosa, función renal reducida (creatinina aumentada, producción de orina reducida), menor función pulmonar (mayor acortamiento de la respiración, fiebre, tos, esputo, hipoxemia), función cardíaca reducida (acortamiento de la respiración, dolor de pecho, fatiga, edema pulmonar o periférico, valvulopatía), función de islote reducida (glucosa incrementada, diabetes mellitus), enfermedad de injerto versus huésped (ulceración gastrointestinal (GI), insuficiencia pulmonar, ulceración de la piel).

Las realizaciones de la presente invención incluyen métodos para tratar a un sujeto que necesita de una terapia de inmunotolerancia. De acuerdo con estas realizaciones, un sujeto se puede tratar con una composición para inducir inmunotolerancia. Esto se logra mientras se reduce el riesgo de una respuesta inmune disfuncional o un efecto colateral de una respuesta inmune disfuncional en un sujeto tal como se encuentra típicamente durante la inmunosupresión estándar. Por ejemplo, una respuesta inmune disfuncional puede ser un efecto de rechazo al injerto, neumonía, sepsis, infección fúngica, cáncer. De acuerdo con este método, al sujeto se puede administrar una composición que incluye un compuesto que es capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa u otra actividad asociada con α1-antitripsina o un análogo de α1-antitripsina. En determinadas realizaciones, una composición capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa puede incluir α-1-antitripsina, uno de sus análogos o una combinación de ellos. De acuerdo con estas realizaciones, un ejemplo de la terapia de inmunotolerancia puede incluir la inhibición de la producción de citoquinas.

Cualquiera de las realizaciones detalladas en la presente también puede incluir uno o varios de una cantidad terapéuticamente efectiva de fármacos antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores o agentes inmunosupresores o una combinación de ellos.

Los ejemplos no limitativos de agentes / fármacos antirrechazo pueden incluir, por ejemplo, ciclosporina, azatioprina, corticosteroides, FK506 (tacrolimus), RS61443, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, 15-desoxispergualina y/o leflunomida o cualquier combinación de ellos.

Además, otras composiciones combinadas o métodos de la presente invención incluyen determinadas terapias a base de anticuerpos. Los ejemplos no limitativos incluyen anticuerpos policlonales antilinfocíticos, anticuerpos monoclonales dirigidos al complejo de receptor de antígeno de células T (OKT3, TIOB9), anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos de la superficie celular adicionales, incluyendo receptor alfa de interleuquina-2. Las terapias a base de anticuerpos se pueden usar como terapia de inducción y/o fármacos antirrechazo en combinación con las composiciones y métodos de la presente invención.

Las realizaciones de la presente invención incluyen métodos de tratamiento de un sujeto que necesita de una terapia de inmunotolerancia. De acuerdo con estas realizaciones, un sujeto se puede tratar con una composición capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa. En una realización, la composición puede incluir una α-1-antitripsina, su análogo o un inhibidor de serina proteasa, por ejemplo, para reducir o inhibir la producción de citoquinas. De acuerdo con estas realizaciones, se contemplan terapias combinadas, tales como combinación de una composición de α-1-antitripsina con un agente antiinflamatorio.

Una realización particular de la presente invención incluye métodos para reducir los niveles y actividades de citoquinas tales como TNFα (factor de necrosis tumoral alfa). Por ejemplo, la composición puede incluir alfa1-antitripsina o su análogo o una combinación de ellos solos o combinados con otras terapias.

En una realización, la reducción, prevención o inhibición del rechazo de trasplante o sus efectos colaterales asociados con una o varias de las condiciones antes mencionadas pueden ser de aproximadamente el 10-20%, 30-40%, 50-60% o más de reducción o inhibición debido a la administración de las composiciones reveladas.

En una realización de la presente invención, una composición puede incluir compuestos que enganchan moléculas para el receptor SEC para tratar a un sujeto que se somete a trasplante y/o que necesita de terapia de inmunotolerancia. En cada uno de los métodos mencionados, una α1-antitripsina (por ejemplo, derivada de mamífero) o inhibidor de sustancia con actividad de serina proteasa contemplados para usar dentro de los métodos de la presente invención pueden incluir una serie de péptidos que incluyen péptidos de aminoácidos carboxiterminales correspondientes a AAT. Estos pentapéptidos pueden estar representados por una fórmula

general (I): I-A-B-C-D-E-F-G-H-II (nota: en el listado de secuencias F=X), en donde I es Cys o está ausente; A es Ala, Gly; Val o está ausente; B es Ala, Gly, Val, Ser o está ausente; C es Ser, Thr o está ausente; D es Ser, Thr, Ans, Glu, Arg, Ile, Leu o está ausente; E es Ser, Thr, Asp o está ausente; F es Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o está ausente; G es Tyr o está ausente; H es Thr, Gly, Met, Met(O), Cys, Thr o Gly; y II es Cys, un grupo amida, un grupo amida sustituida, un grupo éster o está ausente, en donde los péptidos incluyen 4 o más aminoácidos consecutivos y sus sales fisiológicamente aceptables. Entre estas series de péptidos, varios son igualmente aceptables que incluyen FVFLM (SEQ ID NO. 1), FVFAM (SEQ. ID NO. 2), FVALM (SEQ. ID NO. 3), FVFLA (SEQ. ID NO. 4), FLVFI (SEQ. ID NO. 5), FLMII (SEQ. ID NO. 6), FLFVL (SEQ. ID NO. 7), FLFVV (SEQ. ID NO. 8), FLFLI (SEQ. ID NO. 9), FLFFI (SEQ. ID NO. 10), FLMFI (SEQ. ID NO. 11), FMLLI (SEQ. ID NO. 12), FIIMI (SEQ. ID NO. 13), FLFCI (SEQ. ID NO. 14), FLFAV (SEQ. ID) NO. 15), FVYLI (SEQ. ID NO. 16), FAFLM (SEQ. ID NO. 17), AVFLM (SEQ. ID NO. 18) y cualquier combinación de ellos.

En varias realizaciones de la presente, los péptidos de AAT contemplados para usar en las composiciones y métodos de la presente invención también pretenden incluir cualquiera y todos aquellos péptidos de AAT específicos de la SEQ ID NO. 1 representada supra. Se puede usar cualquier combinación de aminoácidos consecutivos que simulan la actividad de AAT o actividad de tipo AAT, tales como aminoácidos 2-12, aminoácidos 3-14, 4-16, etc.

En cada uno de los métodos antes mencionados, se contemplan α1-antitripsina o sus análogos para usar en una composición en la presente. Estos análogos pueden incluir péptidos. Los péptidos pueden incluir, pero sin limitación, péptidos de aminoácidos que contienen MPSSVSWGIL (SEQ. ID NO. 19); LAGLCCLVPV (SEQ. ID NO. 20) SLAEDPQGDA (SEQ. ID NO. 21); AQKTDTSHHD (SEQ. ID NO. 22) QDHPTFNKIT (SEQ. ID NO. 23); PNLAEFAFSL (SEQ. ID NO. 24); YRQLAHQSNS (SEQ. ID NO. 25); TNIFFSPVSI (SEQ. ID NO. 26); ATAFAMLSLG (SEQ. ID NO. 27); TKADTHDEIL (SEQ. ID NO. 28); EGLNFNLTEI (SEQ. ID NO. 29); PEAQIHEGFQ (SEQ. ID) NO. 30); ELLRTLNQPD (SEQ. ID NO. 31); SQLQLTTGNG (SEQ. ID NO. 32); LFLSEGLKLV (SEQ. ID NO. 33); DKFLEDVKKL (SEQ. ID NO. 34); YHSEAFTVNF (SEQ. ID NO. 35); GDHEEAKKQI (SEQ. ID NO. 36); NDYVEKGTQG (SEQ. ID NO. 37); KIVDLVKELD (SEQ. ID NO. 38); RDTVFALVNY (SEQ. ID NO. 39); IFFKGKWERP (SEQ. ID NO. 40); FEVKDTEDED (SEQ. ID NO. 41); FHVDQVTTVK (SEQ. ID NO. 42); VPMMKRLGMF (SEQ. ID NO. 43); NIQHCKKLSS (SEQ. ID NO. 44); WVLLMKYLGN (SEQ. ID NO. 45); ATAIFFLPDE (SEQ. ID NO. 46); GKLQHLENEL (SEQ. ID NO. 47); THDIITKFLE (SEQ. ED NO. 48); NEDRRSASLH (SEQ. ID NO. 49); LPKLSITGTY (SEQ. ID NO. 50); DLKSVLGQLG (SEQ. ID NO. 51); ITKVFSNGAD (SEQ. ID NO. 52); LSGVTEEAPL (SEQ. ID NO. 53); KLSKAVHKAV (SEQ. ID NO. 54); LTIDEKGTEA (SEQ. ID NO. 55); AGAMFLEAIP (SEQ. ID NO. 56); MSIPPEVKFN (SEQ. ID NO. 57); KPFVFLMIEQ (SEQ. ID NO. 58); NTKSPLFMGK (SEQ. ID NO. 59); VVNPTQK (SEQ. ID NO. 60) o cualquier combinación de ellos.

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el péptido se puede proteger o derivar por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, acilación N-terminal, amidación C-terminal, ciclación, etc. En una realización específica, el término N del péptido es acetilado.

Composiciones farmacéuticas

Las realizaciones en la presente proporcionan la administración de composiciones que comprenden el compuesto de la invención a sujetos en una forma biológicamente compatible apropiada para administración farmacéutica in vivo. Por “forma biológicamente compatible apropiada para administración in vivo” se entiende una forma del agente activo (es decir, producto químico farmacéutico, proteína, gen, anticuerpo, etc., de las realizaciones) para ser administrada, en la que cualquier efecto tóxico se ven compensado por los efectos terapéuticos del agente activo. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones terapéuticas se define como una cantidad efectiva, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto puede variar de acuerdo con factores tales como el estado patológico, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo de producir una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes posológicos se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

En una realización, el compuesto (es decir, producto químico farmacéutico, proteína, péptido etc. de las realizaciones) se puede administrar de una manera conveniente como administración subcutánea, intravenosa, oral, inhalación, aplicación transdérmica, aplicación intravaginal, aplicación tópica, administración intranasal o rectal. Según la vía de administración, el compuesto activo se puede recubrir de un material para proteger el compuesto de la degradación por enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. En una realización preferida, el compuesto se puede administrar por vía oral. En otra realización preferida, el compuesto se puede administrar por vía intravenosa. En una realización particular, el compuesto se puede administrar por vía intranasal, como inhalación.

Un compuesto se puede administrar a un sujeto en un portador o diluyente apropiado, coadministrado con inhibidores de enzimas o en un portador apropiado como liposomas. La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” como se usa en la presente pretende incluir diluyentes tales como solución fisiológica y soluciones tamponadas acuosas. Puede ser necesario recubrir el compuesto o coadministrar el compuesto con un material para evitar su inactivación. El agente activo también se puede administrar por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de ellos y en aceites. En

condiciones de almacenamiento y uso ordinarias, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para uso inyectable se pueden administrar por medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar soluciones acuosas estériles (llegado el caso, hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la composición puede ser estéril y puede ser fluida en la medida en que exista una simple inyectabilidad. Puede ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se puede preservar contra la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y sus mezclas apropiadas. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por uso de un recubrimiento como lecitina, por mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por uso de tensioactivos. La prevención de microorganismos se puede lograr por calentamiento, exposición del agente al detergente, irradiación o adición de diversos agentes antibacterianos o antifúngicos.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (por ejemplo un compuesto que reduce la actividad de serina proteasa) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados con anterioridad, de ser requerid, seguido de esterilización por filtración.

Las composiciones acuosas pueden incluir una cantidad efectiva de un compuesto terapéutico, péptido, región central epitópica, estimulante, inhibidor y similares, disuelto o disperso en un portador farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. Los compuestos y materiales biológicos revelados en la presente se pueden purificar por medios conocidos en la técnica.

Las soluciones de los compuestos activos como sales de base libre o farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua apropiadamente mezclada con un tensioactivo, como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de ellos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir con el uso en las composiciones de agentes que demoran la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosis y en tal cantidad que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas posológicas, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas con anterioridad. Se contempla que también se pueden emplear cápsulas de liberación lenta, micropartículas de liberación prolongada y similares. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente apropiadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.

Los agentes terapéuticos activos se pueden formular dentro de una mezcla para comprender aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 1 a 10 gramos por dosis. Las dosis únicas o múltiples también se pueden administrar en un cronograma apropiado para una condición predeterminada.

En otra realización, se pueden usar soluciones nasales o sprays, aerosoles o inhalantes para suministrar el compuesto de interés. Las formulaciones adicionales que son apropiadas para otros modos de administración incluyen supositorios y pesarios. También se puede usar un pesario o supositorio rectal. En general, para supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo del 0,5% al 10%, con preferencia, del 1%-2%.

Las formulaciones orales incluyen tales excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. En determinadas realizaciones definidas, las composiciones farmacéuticas orales comprenderán un diluyente inerte o portador comestible asimilable o se pueden incluir en cápsula de gelatina dura o blanda o se pueden prensar en comprimidos o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica oral, los compuestos activos se pueden incorporar con excipientes y usar en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, tabletas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Estas composiciones y preparaciones deberán contener al menos el 0,1% de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y las preparaciones pueden variarse, de hecho, y pueden ser de modo conveniente de entre aproximadamente el 2 a aproximadamente el 75% del peso de la unidad o, con preferencia, de entre el 25-60%. La cantidad de compuestos activos en tales composiciones de utilidad terapéutica es tal que se obtendrá una dosis apropiada.

Una composición farmacéutica se puede preparar con portadores que protegen los ingredientes activos de una rápida eliminación del organismo, tales como formulaciones de liberación prolongada o recubrimientos. Se conocen

estos portadores incluyen formulaciones de liberación controlada, tales como, pero sin limitación, sistemas de suministro microencapsulado y biodegradable, polímeros biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, poliortoésteres, ácido poliláctico y otros.

Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad y con una frecuencia que es efectiva para inhibir o aliviar los efectos colaterales de un trasplante y/o reducir o evitar el rechazo. La dosis y la duración del tratamiento precisas se pueden determinar empíricamente usando protocolos de ensayo conocidos o ensayo de composiciones en sistemas de modelo conocidos en la técnica y extrapolándolos. Las dosis también pueden variar con la gravedad de la condición. Una composición farmacéutica se formula y administra en general para ejercer un efecto de utilidad terapéutica mientras se minimizan los efectos colaterales indeseables. En general, una dosis oral varía de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1000 mg, que se puede administrar, por ejemplo, 1 a 3 veces por día.

Será evidente que, para cualquier sujeto particular, se pueden ajustar los regímenes posológicos específicos en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual. Las dosis preferidas para administración pueden estar en cualquier intervalo entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 100 mg por ml de fluido biológico de paciente tratado. En una realización particular, el intervalo puede estar entre 1 y 100 mg/kg que se puede administrar diariamente, cada dos días, dos veces por semana, semanalmente, mensualmente, etc. En otra forma de realización particular, el intervalo puede estar entre 10 y 75 mg/kg introducidos semanalmente a un sujeto. La cantidad terapéuticamente efectiva de α1-antitripsina, péptidos o fármacos que tienen similares actividades que la α1-antitripsina o péptidos también se puede medir en concentraciones molares y pueden variar entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 2 mM.

Los comprimidos, tabletas, píldoras, cápsulas, y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes, tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tales como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, y similares; un lubricante, tales como estearato de magnesio; y un agente endulzante tales como sacarosa, lactosa o sacarina se pueden añadir o un agente saborizante.

Se pueden usar liposomas como un sistema de suministro terapéutico y se pueden preparar de acuerdo con técnicas de laboratorio conocidas. Además, los lípidos secos o los liposomas liofilizados preparados tal como se describió previamente se pueden reconstituir en una solución de agente activo (por ejemplo, ácido nucleico, péptido, proteína o agente químico) y la solución diluida hasta una concentración apropiada con un disolvente apropiado conocido por los expertos en la técnica. La cantidad de agente activo encapsulado se puede determinar de acuerdo con métodos estándar.

En una realización preferida, se puede emplear un ácido nucleico (por ejemplo, α1-antitripsina o sus análogos) y el lípido dioleoilfosfatidilcolina. Por ejemplo, los oligonucleótidos resistentes a nucleasa se pueden mezclar con lípidos en presencia de t-butanol en exceso para generar oligonucleótidos liposomales para administración.

Las composiciones farmacéuticas que contienen la α1-antitripsina, su análogo o inhibidor de la actividad de serina proteasa o su derivado funcional se pueden administrar a individuos, en particular seres humanos, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intranasal, oral, tópica, transdérmica, parenteral, gastrointestinal, transbronquial y transalveolar. La administración tópica se lleva a cabo por medio de una crema, gel, enjuague, etc. aplicados tópicamente que contienen cantidades terapéuticamente efectivas de inhibidores de serina proteasas. La administración transdérmica se lleva a cabo por aplicación de una crema, enjuague, gel, etc. capaz de permitir que los inhibidores de serina proteasas penetren en la piel y entren en el torrente sanguíneo. Además, se pueden usar bombas osmóticas para administración. La dosis necesaria puede variar con la condición particular en tratamiento, método de administración y tasa de clearance de la molécula del organismo.

En cada una de las composiciones y métodos antes mencionados, se puede usar un compuesto que tiene actividad inhibidora de serina proteasa y/o que tiene actividad de α1-antitripsina o su análogo en una dosis terapéutica individual, forma aguda o forma crónica de tratar episodios o episodios prolongados, respectivamente, promoviendo la supervivencia del injerto, tratando el rechazo al injerto y/o efectos secundarios asociados inducidos por rechazo del injerto.

En determinadas realizaciones de los métodos de la presente invención, el sujeto puede ser un mamífero tal como un ser humano o un animal veterinario y/o domesticado.

Métodos terapéuticos

En una realización de la presente invención, los métodos proporcionan el tratamiento de un sujeto que necesita o que se somete a un trasplante. Por ejemplo, los tratamientos para reducir el rechazo al injerto, promover la supervivencia del injerto y promover la función prolongada del injerto por administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un compuesto de la invención. La composición puede incluir un compuesto capaz de inhibir al menos una serina proteasa, por ejemplo, α1-antitripsina o su análogo.

Preservación del injerto durante el trasplante antes del injerto

De acuerdo con la presente invención, las complicaciones del trasplante se pueden reducir o inhibir para obtener importantes beneficios terapéuticos. En consecuencia, la administración de una composición terapéutica contemplada por realizaciones de la invención, es decir, α1-antitripsina, su derivado o su análogo, puede ser beneficiosa para el tratamiento de complicaciones del trasplante o condiciones.

Otro efecto beneficioso de uso de las composiciones que comprenden un compuesto de la presente invención incluye la reducción de efectos negativos sobre un órgano o no órgano durante el explante, aislamiento, transporte y/o antes del implante. Por ejemplo, la composición puede reducir la apoptosis, reducir la producción de citoquinas, reducir la producción de NO o una combinación de ellos en un órgano para trasplante. En una realización particular, una composición puede incluir un compuesto que incluye alfa1-antitripsina, uno de sus análogos, un inhibidor de serina proteasa, actividad de tipo de inhibidor de serina proteasa, su análogo o una combinación de ellos. El órgano o no órgano de trasplante puede incluir, pero sin limitación, pulmón, riñón, corazón, hígado, tejido blando, piel, páncreas, intestino, tejido blando, cornea, médula ósea, célula madre, islote pancreático y una combinación de ellos.

En otra realización, las composiciones que comprenden un compuesto de la invención son de utilidad en el tratamiento terapéutico de los efectos colaterales asociados con el rechazo al injerto. En otra realización más, los efectos colaterales asociados con el rechazo al injerto se pueden evitar por medio de la administración prolongada del agente de la invención como un profiláctico, antes del inicio de uno o varios los síntomas o uno o varios signos o antes del inicio de uno o varios síntomas severos o uno o varios signos de una enfermedad asociada con el rechazo al injerto. Así, un paciente con riesgo de un particular rechazo al injerto o enfermedad asociada al rechazo al injerto o indicación clínica puede ser tratado con inhibidores de serina proteasa, por ejemplo, (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-pmlinamida; como una medida preventiva.

Se contempla en la presente que las composiciones que comprenden un compuesto de la presente invención se pueden usar para tratar pacientes con uno o varios injertos que requieren de la terapia crónica para mantener la integridad del injerto y estos pacientes se beneficiarán, por ello, del uso indefinido o crónico de la terapia regresiva del rechazo de los métodos de la presente invención. Se puede usar incluso otra realización para tratar flairs de rechazo agudo, de modo de minimizar los efectos de rechazo clínico agudo, falla orgánica y/o destrucción eventual del injerto.

Los niveles en sangre deseados se pueden mantener por infusión continua para proporcionar aproximadamente 0,01-5,0 mg/kg/hr o por infusiones intermitentes que contienen aproximadamente 0,4-20 mg/kg de ingrediente activo. Los tampones, conservantes, antioxidantes, y similares se pueden incorporar de ser requerido. Se pretende en la presente que los intervalos mencionados también incluyan todas las cantidades específicas en porcentaje en el intervalo mencionado. Por ejemplo, el intervalo de aproximadamente 0,4 a 20 mg/kg también comprende 0,5 al 19,9%, 0,6 al 19,8%, etc., sin mencionar realmente cada intervalo específico.

Inhibidores de serina proteasa

Se ha de entender que la presente invención tal como se define por las reivindicaciones no está limitada a los ejemplos descritos en la presente y otras serina proteasas conocidas en la técnica se pueden usar dentro de las limitaciones de la invención. Por ejemplo, un experto en la técnica puede adoptar con facilidad inhibidores tal como se describe en el documento WO 98/24806, que revela oxadiazol sustituido, tiadiazol y triazol como inhibidores de serina proteasa. La patente U. S. N.º 5.874.585 revela compuestos heterocíclicos sustituidos útiles como inhibidores de serina proteasas por ejemplo, (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometil-bencil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida, (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(2-feniletil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; y (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(2-metoxibencil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida.

La α1-antitripsina es una glucoproteína de MW 51.000 con 417 aminoácidos y 3 cadenas laterales de oligosacáridos. La α1-antitripsina humana es una cadena simple de polipéptido sin enlaces disulfuro internos y sólo un residuo de cisteína simple normalmente ligado de forma intermolecular en disulfuro con cisteína o glutatión. El sitio reactivo de α1-antitripsina contiene un residuo de metionina, que es lábil a la oxidación después de la oxidación a humo de tabaco u otros contaminantes oxidantes. Esta oxidación reduce la actividad inhibidora de elastasa de α1-antitripsina; en consecuencia, la sustitución de otro aminoácido en esa posición, es decir, alanina, valina, glicina, fenilalanina, arginina o lisina, produce una forma de α1antitripsina que es más estable. La α1-antitripsina puede estar representada por la siguiente fórmula: SEQ ID 61:

MPSSVSWGIL LAGLCCLVPV SLAEDPQGDA AQKTDTSHHD

QDHPTFNKITPNLAEFAFSL YRQLAHQSNS TNIFFSPVSI ATAFAMLSLG

TKADTHDEIL 100

EGLNFNLTEI PEAQIHEGFQ ELLRTLNQPD SQLQLTTGNG

LFLSEGLKLVDKFLEDVKKL YHSEAFTVNF GDHEEAKKQI NDYVEKGTQG

KIVDLVKELD 200

RDTVFALVNY IFFKGKWERP FEVKDTEDED FHVDQVTTVK VPMMKRLGMF

NIQHCKKLSS WVLLMKYLGN ATAIFFLPDE GKLQHLENEL THDIITKFLE 300

NEDRRSASLH LPKLSITGTY DLKSVLGQLG ITKVFSNGAD LSGVTEEAPL

KLSKAVHKAV LTIDEKGTEA AGAMFLEAIP MSIPPEVKFN KPFVFLMIEQ 400

NTKSPLFMGK VVNPTQK 417

Una importante secuencia de aminoácido cerca del extremo carboxiterminal de la α1-antitripsina se muestra en negrita y subrayada y es pertinente a esta invención (los detalles de la secuencia se pueden hallar, por ejemplo, en la patente U. S. N.º 5.470.970).

Los sitios extrahepáticos de la producción de AAT incluyen neutrófilos, monocitos y macrófagos y la expresión de AAT es inducible en respuesta a LPS, TNFα, IL-1 e IL-6 en diversos tipos celulares. La deficiencia en AAT está asociada con condiciones disfuncionales inmunes tales como artritis reumatoidea y lupus eritematoso sistémico.

Otras moléculas de inhibidor de serina proteasa, que se pueden usar en cualquiera de las composiciones reveladas pueden incluir compuestos descritos a continuación: el documento WO 98/20034 que revela inhibidores de serina proteasa de pulgas; el documento WO98/23565 que revela compuestos de aminoguanidina y alcoxiguanidina útiles para inhibir las serina proteasas; el documento WO98/5034 que revela compuestos de bis-aminometilcarbonilo útiles para tratar trastornos de cisteína y serina proteasa; el documento WO98/50420 que revela derivados cíclicos y otros aminoácidos útiles para enfermedades relacionadas con trombina; el documento WO 97/21690 que revela derivados que contienen D-aminoácidos; el documento WO 97/10231 que revela inhibidores de serina y cisteína proteasas que contienen cetometileno; el documento WO 97/03679 que revela inhibidores de serina y cisteína proteasas con contenido de fósforo; el documento WO 98/21186 que revela benzotiazo e inhibidores de serina proteasas heterocíclicos relacionados; el documento WO 98/22619 que revela una combinación de inhibidores que se ligan al sitio P de serina proteasas con sitio quelante de cationes divalentes; el documento WO 98/22098 que revela una composición que inhibe la conversión de la subfamilia CPP32 proenzimática que incluye caspasa 3 (CPP32/Yama/Apopaína); el documento WO 97/48706 que revela pirrolo-pirazina-dionas; y el documento WO 97/33996 que revela bicunina placentaria humana (recombinante) como inhibidor de serina proteasa.

Otros compuestos que tienen actividad inhibidora de serina proteasa son igualmente apropiados y efectivos para usar en los métodos de la presente invención, incluyendo, pero sin limitación: derivados de tetrazol tal como se revela en el documento WO 97/24339; derivados de ácido guanidinobenzoico tal como se revela en el documento WO 97/37969 y en una cantidad de patentes U. S. Nros. 4.283.418, 4.843.094, 4.310.533, 4.283.418, 4.224.342, 4.021.472, 5.376.655, 5.247.084 y 5.077.428; derivados de fenilsulfonilamida representados por la fórmula general en el documento WO 97/45402; nuevos derivados de sulfuro, sulfóxido y sulfona representados por la fórmula general en el documento WO 97/49679; nuevos derivados de amidino representados por la fórmula general en el documento WO 99/41231; otros derivados de amidinofenol se revelan en las patentes U. S. Nros. 5.432.178, 5.622.984, 5.614.555, 5.514.713, 5.110.602, 5.004.612 y 4.889.723 ente muchas otras.

Rechazo al injerto y supervivencia del injerto - efectos colaterales y condiciones 1)

Uno de los efectos beneficiosos de uso de las composiciones que comprenden un compuesto de la presente invención incluye, por ejemplo, y no a modo de limitación, infiltración reducida de injerto con células o factores séricos (incluyendo, pero sin limitación, complemento, anticuerpo antiinjerto que generan inflamación y rechazo al injerto), citoquinas reducidas, óxido nítrico reducido, apoptosis reducida y respuesta inmune específica reducida contra el injerto o cualquier combinación de ellos.

Control del rechazo del injerto

Al prevenir o reducir los efectos colaterales o condiciones asociadas con la supervivencia del injerto o el rechazo al injerto usando este novedoso enfoque, se obtienen varias ventajas en comparación con enfoques alternativos, por ejemplo, y no a modo de limitación:

1. Reducida infiltración del injerto con células o factores séricos (por ejemplo, y no a modo de limitación, complemento, anticuerpo antiinjerto que genera inflamación y rechazo al injerto); producción reducida de citoquinas u óxido nítrico (NO) que puede inducir inflamación o apoptosis; inhibe apoptosis; inhibe la activación inmune, inhibe CMV o cualquier combinación de ellos.

2. Inhibidores sintéticos de serina proteasas (similares a AAT o análogos) pueden desarrollarse y se han desarrollado por medios conocidos en la técnica. Tal agente farmacéutico se puede formular como, por ejemplo, una crema para tratar el rechazo al injerto y/o promover la supervivencia de injerto.

3. Agentes asequibles en comercios ya aprobados para un uso diferente en humanos actuarán como un tratamiento para el rechazo al injerto y/o promoverán la supervivencia del injerto. Estos agentes se usan actualmente para indicaciones distintas al rechazo al injerto y/o para promover la supervivencia del injerto e incluyen AAT inyectables, preparaciones plasmáticas, aprotinina y otros (American J. de Resp Critical Care Med 1998, VII 158:49-59). En una realización, los inhibidores de serina proteasa se pueden suministrar por inhalación. Un agente inhalado (AAT natural o un producto sintético similar a AAT y/u otro inhibidor de serina proteasa) puede ser especialmente útil debido a las elevadas concentraciones locales, facilidad de suministro de fármaco y falta de efectos colaterales (dado que la administración no es sistémica). Este modo de suministro de fármaco enfocado puede aumentar la actividad inhibidora de serina proteasa dentro de tejidos pulmonares y linfáticos asociados, que son dos de los sitios principales donde se desarrollan las enfermedades y/o condiciones clínicas asociadas con el rechazo al injerto y/o promoción de la supervivencia del injerto.

4. Al promover la supervivencia del injerto y/o tratar el rechazo al injerto, la causa directa del efecto colateral se disrumpe en individuos afectados. Esta invención contempla específicamente la inhibición de las serina proteasas de células huésped o induce el receptor SEC o una combinación de ellos como un método de tratamiento del rechazo al injerto y/o promoción de la supervivencia del injerto en un mamífero que lo necesita junto con la administración de uno o varios agentes antirrechazo y/o antimicrobianos.

5. Hay una vasta experiencia clínica usando AAT inyectables para tratar pacientes con deficiencia de AAT genética. No se han detectado efectos negativos a largo plazo hasta la fecha (American J. of Resp Critical Care Med 1998, VII 158: 49-59; Wencker et al. Chest 2001 119:737-744). Más aún, se ha administrado un inhibidor de molécula pequeña de serina proteasa de huésped a pacientes con enfermedad de Kawasaki (Ulinistatin, Ono Pharmaceuticals).

Proteínas aisladas para usar en las composiciones y métodos de la invención

También se revelan proteínas y sus porciones, así como fragmentos de polipéptidos apropiados para usar como inmunógenos para producir anticuerpos dirigidos contra un polipéptido de la invención. El polipéptido nativo se puede aislar de células o fuentes tisulares por un esquema de purificación apropiado usando técnicas estándar de purificación de proteínas. En otra realización, se producen polipéptidos de la invención por técnicas de ADN recombinantes. Alternativamente a la expresión recombinante, se puede sintetizar un polipéptido de la invención químicamente usando técnicas estándar de síntesis de péptidos.

También se conocen variantes recombinantes no modificadas y mutantes de alfa1-antitripsina producidas por métodos de ingeniería genética (ver la patente U. S. N.º 4.711.848). La secuencia de nucleótidos de alfa1-antitripsina humana y otras variantes de alfa1-antitripsina humana se reveló en la solicitud publicada internacional N.º WO 86/00.337. Esta secuencia de nucleótidos se puede usar como material de partida para generar todas estas variantes de aminoácidos de AAT y fragmentos de aminoácidos representados en la presente, usando técnicas de ADN recombinantes y métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Una proteína aislada y/o purificada o parcialmente purificada o su porción biológicamente activa se puede usar en cualquier realización de la invención. Una proteína que es sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína heterológa. Cuando la proteína o superficie porción biológicamente activa se produce de forma recombinante, también puede ser sustancialmente libre de medio de cultivo. Cuando la proteína se produce por síntesis química, es sustancialmente libre con preferencia de precursores químicos u otros productos químicos. Conforme a ello, tales preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10% y 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del polipéptido de interés.

Las porciones biológicamente activas de un polipéptido de la invención incluyen polipéptidos que incluyen secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas o derivadas de la secuencia de aminoácido de la proteína (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID Nos: 1 a 60, que exhiben al menos una

actividad de la correspondiente proteína de longitud total). Una porción biológicamente activa de una proteína de la invención puede ser un polipéptido, que tiene, por ejemplo, 5, 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de largo. Más aún, otras porciones biológicamente activas, en donde se suprimen otras regiones de la proteína, se pueden preparar por técnicas recombinantes y se evalúan respecto de una o varias de las actividades funcionales de la forma nativa de un polipéptido de la invención.

Los polipéptidos preferidos tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nos: 1 a 60. Otras proteínas útiles son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos aproximadamente el 45%, con preferencia el 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o 99%) a cualquier de SEQ ID NOs: 1 a 60 y retienen la actividad funcional de la proteína de la correspondiente proteína natural que aún difiere en la secuencia de aminoácidos debido a la variación alélica natural o mutagénesis.

Los compuestos de la presente invención se pueden usar como agentes terapéuticos en el tratamiento de una condición fisiológica (en especial, patológica) causada en todo o en parte por la actividad excesiva de serina proteasa. Además, una condición fisiológica (en especial, patológica) se puede inhibir en todo o en parte. Los péptidos contemplados en la presente se pueden administrar como péptidos libres o sus sales farmacéuticamente aceptables. Los péptidos se deberán administrar a individuos como una composición farmacéutica que, en la mayoría de los casos, incluirá el péptido y/o sus sales farmacéuticas con un portador farmacéuticamente aceptable.

Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Ver http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

La presente invención también pertenece a variantes de los polipéptidos de la invención tal como se definen por las reivindicaciones. Tales variantes tienen una secuencia de aminoácidos alterados que pueden funcionar como agonistas (miméticos) o como antagonistas. Las variantes se pueden generar por mutagénesis, por ejemplo, mutación puntual discreta o truncamiento. Un agonista puede retener sustancialmente la misma o un subgrupo de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína. Un antagonista de una proteína puede inhibir una o varias de las actividades de la forma natural de la proteína, por ejemplo, por ligación competitiva con un miembro corriente abajo o corriente arriba de una cascada de señalización celular que incluye la proteína de interés. Así, los efectos biológicos específicos se pueden producir por tratamiento con una variante de función limitada. El tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subgrupo de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína puede tener menores efectos colaterales en un sujeto respecto al tratamiento con la forma natural de la proteína.

Las variantes de una proteína de la invención que funcionan como agonistas (miméticos) o como antagonistas pueden ser identificados por control de bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes por truncamiento, de la proteína de la invención por la actividad agonista o antagonista.

Polipéptidos de fusión

En otras realizaciones, los compuestos que tienen actividad inhibidora de serina proteasa como α1-antitripsina y/o su análogo, pueden ser parte de un polipéptido de fusión. En un ejemplo, un polipéptido de fusión puede incluir α1-antitripsina (por ejemplo, α1-antitripsina de mamífero) o uno de sus análogos y una diferente secuencia de aminoácido que puede ser heteróloga a la α1-antitripsina o sustancia análoga.

En otras realizaciones más, el polipéptido de fusión contemplado para usar en los métodos de la presente invención pueden incluir adicionalmente una secuencia de aminoácido que es de utilidad para identificar, rastrear o purificar el polipéptido de fusión, por ejemplo, una secuencia de rótulo FLAG o HIS. El polipéptido de fusión puede incluir un sitio de escisión proteolítica que puede remover la secuencia de aminoácido heteróloga del compuesto capaz de inhibir la serina proteasa, como α1-antitripsina de mamífero o su análogo. En una realización, los polipéptidos de fusión de la invención se producen por técnicas de ADN recombinantes. Alternativamente a la expresión recombinante, se puede sintetizar un polipéptido de fusión de la invención químicamente usando técnicas estándar de síntesis de péptidos. La presente invención también proporciona composiciones que comprenden un polipéptido de fusión de la invención y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En particular, en una realización, la proteína de fusión comprende una secuencia heteróloga que es una secuencia derivada de un miembro de la familia de las proteínas de inmunoglobulina, por ejemplo, comprende una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina humana como región constante de IgG1 humana. La proteína de fusión puede incluir, por ejemplo, una porción de α1-antitripsina, su análogo o polipéptido inhibidor de la actividad de serina proteasa fusionad con el término amino o el término carboxilo de una región constante de inmunoglobulina, tal como se revela, por ejemplo, en la patente U. S. N.º 5.714.147 y la patente U. S. N.º 5.116.964. De acuerdo con estas realizaciones, la región FcR de la inmunoglobulina puede ser de tipo salvaje o mutada. En determinadas realizaciones, es deseable utilizar una proteína de fusión de inmunoglobulina que no interactúa con un receptor Fc y no inicia las reacciones de ADCC. En tales instancias, la secuencia heteróloga de inmunoglobulina de la proteína de fusión se puede mutar para inhibir tales reacciones. Ver, por ejemplo, la patente U. S. N.º 5.985.279 y el documento WO 98/06248.

En otra realización más, la α1-antitripsina, su análogo o la proteína de fusión del polipéptido inhibidor de la actividad de serina proteasa comprende una proteína de fusión GST en donde se fusiona con el término C de secuencias GST. Los vectores de expresión de fusión y los medios de purificación y detección se conocen en la técnica.

Los vectores de expresión se pueden diseñar rutinariamente para la expresión de un polipéptido de fusión de la invención en células procariotas (por ejemplo, E. coli) o células eucariotas (por ejemplo, células de insectos (usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero) por medios conocidos en la técnica.

La expresión de las proteínas en procariotas se puede llevar a cabo por medios conocidos en la técnica. Tales vectores de fusión sirven típicamente para tres propósitos: 1) incrementar la expresión de la proteína recombinante; 2) incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en purificación por afinidad.

En otra realización más, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero tal como se describe en la técnica. En otra realización, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo celular particular (por ejemplo, elementos reguladores específicos de tejidos se usan para expresar el ácido nucleico) tales como promotores específicos de páncreas (Edlund et al. (1985) Science 230:912-916) y promotores específicos de las glándulas mamarias (por ejemplo, promotor de suero de leche; patente U. S. N.º 4.873.316 y publicación de solicitud europea N.º 264.166). Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota (por ejemplo, E. coli) o eucariota (por ejemplo, células de insectos, de levadura o de mamífero). El ADN vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas por medio de técnicas convencionales de transformación o transfección.

Terapias de combinación

En cada uno de los métodos de la presente invención antes mencionados tal como se define por las reivindicaciones, el uso de un compuesto capaz de inhibir la serina proteasa o la α1-antitripsina o su análogo solo o combinado con agentes inmunosupresores estándar permite los trasplantes de injertos en receptores inmunosuprimidos o inmunocomprometidos. Esta terapia de combinación expandirá la población elegible del paciente capaz de recibir esta forma de tratamiento.

En cada uno de los aspectos y realizaciones de la invención antes mencionados, las terapias de combinación distintas de las ya enumeradas con anterioridad también se contemplan específicamente en la presente. En particular, las composiciones que comprenden un compuesto de la presente invención se pueden administrar con uno o varios antibióticos macrólidos o no macrólidos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes antivirales y agentes antiparasitarios. Los ejemplos de antibióticos macrólidos que se pueden usar en combinación con la composición de la presente invención incluyen, pero sin limitación, compuestos antibióticos macrólidos sintéticos, semisintéticos o naturales: metimicina, neometimicina, YC-17, litorina, TMP-SSX, eritromicina A a F y oleandomicina. Los ejemplos de eritromicina y compuestos de tipo eritromicina preferidos incluyen: eritromicina, claritromicina, azitromicina y troleandomicina.

Los ejemplos de agentes antibacterianos incluyen, pero sin limitación, penicilinas, quinolonsas, aminoglicósidos, vancomicina, monobactamas, cefalosporinas, carbacefems, cefamicinas, carbapenems y monobactamas y sus diversas sales, ácidos, bases y otros derivados.

Los agentes antifúngicos incluyen, pero sin limitación, caspofungina, clorhidrato de terbinafina, nistatina y sulfuro de selenio.

Los agentes antivirales incluyen, pero sin limitación, ganciclovir, aciclovir, valacilocir, clorhidrato de amantadina, rimantadina y edoxudina.

Los ejemplos de antibióticos macrólidos que se pueden usar en combinación con la composición de la presente invención incluyen, pero sin limitación, compuestos antibióticos macrólidos sintéticos, semisintéticos o naturales: metimicina, neometimicina, YC-17, litorina, TMP-SSX, eritromicina A a F y oleandomicina. Los ejemplos de eritromicina y compuestos de tipo eritromicina preferidos incluyen: eritromicina, claritromicina, azitromicina y troleandomicina.

Los agentes antiparasitarios incluyen, pero sin limitación, piretrinas/butóxido de piperonilo, permetrina, yodoquinol, metronidazol, cotrimoxazol (sulfametoxazol/trimetoprim) e isetionato de pentamidina.

En otro aspecto, en el método de la presente invención tal como se define por las reivindicaciones, se puede complementar, por ejemplo, la composición que comprende un compuesto de la invención por administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o varios fármacos o agentes antiinflamatorios o inmunomoduladores. Por “fármacos antiinflamatorios”, se entienden, por ejemplo, agentes que tratan respuestas inflamatorias, es decir, una reacción tisular a la lesión, por ejemplo, agentes que tratan los sistemas inmune, vascular o linfático.

Los fármacos o agentes antiinflamatorios o inmunomoduladores apropiados para usar en esta invención incluyen, pero sin limitación, derivados de interferón (por ejemplo, betaserona); derivados de prostano (por ejemplo, compuestos revelados en el documento PCT/DE93/0013, iloprost, cortisol, dexametasona; inmunsupresores (por ejemplo, ciclosporina A, FK-506 (micofenilato mofetilo); inhibidores de lipoxigenasa (por ejemplo, zileutona, MK-886, WY-50295); antagonistas de leucotrieno (por ejemplo, compuestos revelados en el documento DE 40091171, solicitud de patente alemana P 42 42 390.2); y análogos; derivados peptídicos (por ejemplo, ACTH y análogos); receptores solubles de TNF; anticuerpos de TNF; receptores solubles de interleuquinas, otras citoquinas, proteínas de células T; anticuerpos contra receptores de interleuquinas, otras citoquinas y proteínas de células T.

Kits

También se revelan kits para usar con los métodos descritos con anterioridad. Se pueden emplear pequeñas moléculas, proteínas o péptidos para usar en cualquiera de los métodos revelados. Además, otros agentes tales como agentes antibacterianos, agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios pueden estar provistos en el kit. Los kits podrán incluir así, en un medio contenedor apropiado, una proteína o un péptido o agente análogo y opcionalmente uno o varios agentes adicionales.

Los kits también pueden incluir una composición alicuotada apropiadamente de la proteína codificada o antígeno de polipéptido, ya sea rotulada o no rotulada, como se puede usar para preparar una curva estándar para un ensayo de detección.

El medio contenedor de los kits incluirá en general un vial, tubo de ensayo, frasco, botella, jeringa u otro medio contenedor, en el que se puede colocar el anticuerpo o el antígeno y, con preferencia, alicuotar de forma apropiada. Cuando se proporciona un segundo o tercer ligando de unión o componente adicional, el kit también contendrá en general un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que este ligando o componente se puede colocar. Los kits de la presente invención también pueden incluir típicamente un medio para contener el anticuerpo, antígeno y cualquier otro contenedor reactivo en confinamiento cerrado para venta comercial. Estos contenedores pueden incluir inyección o contenedores plásticos moldeados por soplado en los que se retienen los viales deseados.

Ejemplos

Ejemplo 1

La alfa1-antitripsina prolonga la supervivencia de islotes injertados en ratones

Fig. 1A-1D. Islotes de ratones DBA/2 (H-2d) se trasplantaron debajo de la cápsula renal de ratones hiperglucémicos C57BL/6 inducidos con estreptozotocina (H-2b). (A) Niveles de glucosa de los días 6-18. El control consiste en ratones que no estaban tratados (n = 3) o tratados del día -1 cada 3 días con albúmina humana (ALB, 6 mg, n = 3). La supervivencia del injerto de islotes se observa en ratones tratados desde el día -1 cada 3 días con AAT humana (2 mg, n =10). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 entre niveles de glucosa el mismo día. (B) Protocolos de tratamiento. Se describen tratamiento de AAT de control y completo en el panel A. El tratamiento temprano de AAT consiste en el tratamiento en los días -1, 1 y 3 (2 mg, n = 3). El tratamiento tardío de AAT consiste en el tratamiento desde el día 2 y cada 2 días (2 mg, n = 3). El rechazo indica el día en que los niveles de glucosa exceden 300 mg/dl. (C) Efecto de anticuerpos anti-humano-AAT de ratón. La línea de puntos indica niveles de glucosa postrasplante de un ratón bajo protocolo de tratamiento de AAT completo (ver A, B) que se inmunizó por administraciones múltiples de AAT humana antes del trasplante (1 representante, n = 3). La línea sólida indica niveles de glucosa de un ratón no inmunizado tratado bajo el protocolo de tratamiento de AAT completo (1 representante, n = 10). La flecha indica la detección de anticuerpos anti-humano-AAT inducidos por tratamiento en el ratón representativo no inmunizado. (D) Comparación de los niveles de glucosa postrasplante en el día 15 en ratones que estaban bajo protocolo de tratamiento completo con ALB (n = 3) o AAT (no inmunizados n =10, inmunizados n = 3). Del grupo tratado con AAT, se detectaron anticuerpos el día 15 en 3/3 ratones inmunizados y en 6/10 ratones no inmunizados. ** P = 0,005 entre ratones que produjeron anticuerpos (n = 6) y ratones que no produjeron produce anticuerpos (n = 4).

El tratamiento con albúmina humana (6 mg) dio como resultado el rechazo al injerto comparable con aquel de ratones receptores no tratados. Por el contrario, los ratones receptores que recibieron AAT (2 mg) exhibieron una función de injerto prolongada. Como se representa en la Fig. 1b, ninguno de los protocolos de tratamiento parciales, es decir, días -1, 1 y 3 ('tratamiento temprano') o días 2 y más ('tratamiento tardío') prolongaron la supervivencia del aloinjerto.

Los ratones tratados con AAT desarrollaron anticuerpos anti-humanos-AAT (Fig. 1C y D). Los ratones individuales exhibieron anticuerpos anti-humanos-AAT en diversos puntos temporales (datos no mostrados). Para afirmar que los anticuerpos reducen el efecto de protección de AAT, se preexpuso un grupo de ratones ("inmunizados") a AAT humana dos meses antes de dejarlos hiperglucémicos y trasplantados con islotes alogénicos. Estos receptores de injertos se trataron con el protocolo de AAT completo, a pesar de exhibir altos títulos de anticuerpos específicos antes del injerto y mostrar un rápido rechazo al injerto (Fig. 1C). El día 15 se seleccionó para representar una asociación entre formación de anticuerpos y pérdida de actividad de protección de AAT; en este punto de tiempo, los ratones tratados con AAT se dividieron en productores positivos y negativos de anticuerpos anti-humanos-AAT.

Como se muestra en la Fig. 1D, el día 15 todos los ratones con anticuerpos positivos eran hiperglucémicos y todos loms ratones con anticuerpos negativos eran normoglucémicos.

Ejemplo 2

Fig. 2A-2D ilustra un método de ejemplo del efecto de AAT sobre infiltrados celulares peritoneales producidos por tioglicolato. A los ratones se administraron por vía intraperitoneal 0,1 ml de solución fisiológica, ALB, AAT o AAT oxidado seguido de 1 ml de solución fisiológica o tioglicolato (ThG, 3% p/v, n = 3 por grupo). El lavado peritoneal se llevó a cabo en grupos separados después de 24 y 48 horas. (A) Población celular total de células lavadas de ratones inyectados con tioglicolato tratados con solución fisiológica (barras abiertas) o tratados con ATT (barras cerradas) (5 mg). ** P < 0,05. (B) Porcentaje de población celular de ratones tratados con solución fisiológica a las 48 horas. ** P < 0,05. (C) Oxidación de AAT. AAT se sometió a radicales oxidativos (ver los métodos). La pérdida de la actividad de serina proteasa de AAT oxidada se evaluó en un ensayo de elastasa. La actividad de elastasa en ausencia de AAT nativa se fijó en el 100% y se calculó el porcentaje de actividad en presencia de AAT nativa y oxidada (n = 3). *** P < 0,002. En la Fig. 2D, se identifican los macrófagos y neutrófilos producidos. Los infiltrados peritoneales de lavados de 48 horas de ALB (6 mg) y tratados con AAT (6 mg), los ratones inyectados con tioglicolato se tiñeron para análisis FACS por anticuerpos específicos. Los macrófagos y neutrófilos se identificaron sobre la base de F4/80 y GR1 versus perfiles de citometría de flujo de dispersión lateral. Arriba, gráficos representativos de análisis FACS (n = 3). Los resultados de FACS cuantificados (n = 3) se representan en la parte de abajo.

AAT inhibe la infiltración celular

Para lograr la posibilidad de que AAT afecte la infiltración celular efectora, se examinaron dos modelos de emigración celular: infiltración peritoneal provocada por tioglicolato (ThG) e infiltración celular debido a inyección intraperitoneal de fibroblastos incompatibles con MHC.

Tal como se muestra en la Fig. 2A, había un incremento progresivo en el recuento de células total a las 24 y 48 horas en ratones inyectados con ThG, mientras que no se observaba un aumento significativo en ratones inyectados con AAT y ThG. A las 48 horas, el recuento celular total en el lavado peritoneal de ratones tratados con AAT era del 50% de aquel de control (Fig. 2B). El recuento de células total en ratones que recibieron control de albúmina era similar al de los ratones tratados con solución salina. Había un efecto dependiente de la dosis en la que se halló que un sexto de la dosis reducía el recuento celular en menor medida de una manera significativa. AAT oxidada, que había perdido su actividad anti-elastasa in vitro (Fig. 2C), no afectó el infiltrado celular a 1 mg (Fig. 2B).

La reducción del recuento celular total se atribuye primariamente a una reducción de la cantidad de neutrófilos (Fig. 2D), identificada por su perfil de dispersión lateral de GR-1 alto/intermedio (SSC). No se observó una mayor diferencia con la infiltración de macrófagos, identificada por su perfil F4/80int, GR-1int, SSC12 int, que es distinto del perfil F4/80 muy alto, GR-1 bajo, SSC alto de macrófagos residentes12 (datos no mostrados).

Ejemplo 3

Fig. 3A-3C ilustra un método de ejemplo del efecto de AAT en infiltrados celulares peritoneales incompatibles con MHC, producidos por fibroblastos NIH-3T3. Los ratones (C57BL/6; H-2b) fueron inyectados i.p. con 0,1 ml de solución salina o AAT (1 mg) seguido por 1 ml de células NIH-3T3 (1107 células en solución salina; H-2d). El lavado peritoneal se realizó diariamente los días 1-5 y las subpoblaciones celulares se identificaron por análisis FACS (n = 3 por tratamiento). (A) Cantidades de células. La cantidad de células en cada subpoblación se calculó a partir de los porcentajes obtenidos por análisis FACS y la cantidad total de células en el infiltrado. * P < 0,05, ** P < 0,01 entre las cantidades de células el mismo día. (B) Análisis representativo FACS. (C) Efecto de AAT sobre la intensidad y la función del infiltrado producida por aloinjerto de islote. Izquierda, tinción de hematoxilina y eosina (H&E) de aloinjertos de islotes del día 7. Una sección de injerto de islote tratado con AAT (marco blanco) se compara con una sección similar de ratón receptor diabético tratado con ALB (protocolo de tratamiento completo, ver la Fig. 1A). La flecha apunta a un borde entre islote e infiltrado circundante. Derecha, inmunohistoquímica (IHC) con anticuerpos antiinsulínicos de injertos de islotes del día 15. Un asección de injerto de islote autólogo (marco blanco) se compara con secciones similares de aloinjertos de ratones receptores tratados con AAT y ALB. R, parénquima renal, G, injerto, C, cápsula renal.

Como se ilustra en la Fig. 3A, la introducción de células alogénicas evocaron un infiltrado celular que consistía en neutrófilos que aparecen tempranamente y macrófagos activados y células CD3+ y NK de tardía aparición (Fig. 3B). Los ratones tratados con AAT exhibieron una reducción de neutrófilos, células CD3+ y NK, el color oscuro es tinción insulínica.

Para evaluar el nivel de infiltración celular en islotes injertados, se removieron los injertos de ratones receptores tratados con AAT y ALB el día 7, se fijaron en paraformaldehído y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Como se representa en la Fig. 3C (izquierda), es demostrable un infiltrado celular sin tener en cuenta el tratamiento con AAT e incluye neutrófilos y linfocitos. Sin embargo, los infiltrados evocados por injertos de ratones receptores tratados con ALB eran más masivos y causan la disrupción de bordes de islotes, en comparación con islotes intactos de ratones

receptores de AAT. Para evaluar la función de islote, se removieron los injertos de ratones receptores tratados con AAT y ALB el día 15 y la inmunohistoquímica se llevó a cabo con anticuerpos antiinsulínicos, el color oscuro es tinción de insulina. Como se representa en la Fig. 3C (derecha), la producción de insulina se preserva el día 15 en islotes de receptores tratdos con AAT.

Ejemplo 4

Fig. 4A-4H ilustra un método de ejemplo del efecto de AAT en respuestas a islotes. (A-D) Islotes de ratones C57BL/6 se cultivaron en 100 islotes/cavidad, por duplicado. AAT se incubó en las concentraciones indicadas durante 1 hora antes de la adición de IFNγ (5 ng/ml) más IL-1β (10 ng/ml). 72 horas más tarde, los sobrenadantes se recolectaron y se evaluó la viabilidad de islotes. Las respuestas celulares de islotes en ausencia de AAT se fijaron en el 100%. Los datos se combinaron a partir de 3 experimentos individuales, por duplicado. ** P < 0,01, *** P < 0,001 entre islotes tratados con AAT y no tratados. Media ± SEM de a. niveles de nitrito, b. viabilidad celular y c. niveles de MIP-1α.. La línea de puntos representa islotes incubados a 1/30 de la concentración de IFNγ/IL-1β. d. niveles de TNFα. (E) Ensayo de inducción insulínica. Los islotes se incubaron por triplicado (20 islotes/cavidad) en presencia de AAT (0,5 mg/ml) o ALB (0,5 mg/ml) 1 hora antes de la adición de IFNγ (5 ng/ml) más IL-1β (10 ng/ml). 24 horas más tarde, los islotes se transfirieron a una solución de glucosa de 3 mM o 20 mM durante 30 minutos y se midieron los niveles de insulina. El eje vertical representa la relación entre niveles de insulina en ambas concentraciones de glucosa. * P < 0,05 entre islotes tratados con AAT y ALB. (F) Toxicidad de estreptozotocina. Los ratones C57BL/6 se inyectados i.p. con AAT (5 mg) o solución fisiológica, un día antes, el mismo día y un día después de la inyección de estreptozotocina (225 mg/kg) o solución fisiológica (n = 3 por grupo). 48 horas más tarde, se retiraron los páncreas y se identificaron células con contenido de insulina por inmunohistoquímica. Cada imagen representa un islote representativo de un páncreas. Gráfico, media ± SEM de cambio en porcentaje de células que contienen insulina como se determinó manualmente de imágenes de 2 islotes por páncreas (n = 6 por grupo de tratamiento). * P < 0,05. (G) Contenido celular de islotes. Islotes aislados frescos (100 islotes por triplicado) y restos pancreáticos residuales de no islotes se disociaron en suspensiones celulares simples y se tiñeron para análisis FACS con anti-CD45-APC o anticuerpo de control de isotipo. Área sombreada, islotes. Área abierta, desechos. (H) Expresión de MHC clase II. Se cultivaron islotes de ratones C57BL/6 (100 islotes/cavidad por duplicado) en presencia de AAT (0,5 mg/ml) 1 hora antes de la adición de IFNγ (5 ng/ml) más IL-1β (10 ng/ml). 24 horas más tarde, los islotes se disociaron en suspensiones celulares simples y doblemente teñidas para análisis FACS con anticuerpos anti-CD45-APC y anti-MHCII-PE o anticuerpos de control de isotipo. Izquierda, Media ± SEM de cambio en porcentaje del islotes no estimulados de control (CT). * P < 0,05 entre islotes tratados con AAT y no tratados. Derecha, análisis representativo FACS; área sombreada, islotes tratados con AAT. Área abierta, islotes estimulados. Los eventos se regulan para CD45+.

AAT modifica la respuesta de los islotes a los mediadores proinflamatorios

Se examinaron diversas respuestas de islotes a IL-1β/IFNγ in vitro. Los islotes expuestos a IL-IL-1β/IFNγ durante 72 horas produce óxido nítrico (NO) de una manera dependiente de la concentración y exhiben pérdida de viabilidad dependiente de NO. Como se muestra en las Figs. 4A y B, en presencia de AAT, se produjo menos NO y se obtuvo mayor viabilidad de islotes. La producción de MIP-1α se redujo en presencia de AAT, en particular cuando se estimula por bajas concentraciones de IL-1β/IFNγ (Fig. 4C). Notablemente, el nivel de TNFα en sobrenadantes se redujo marcadamente por AAT (Fig. 4D). La inducción de insulina se inhibió por IL-1β/IFNγ, pero era intacta en presencia de IL-1β/IFNγ más AAT (Fig. 4E). Para ensayar el efecto de AAT en islotes in vivo, se evaluó la toxicidad de STZ. Se administró AAT (2 mg) un día antes, el mismo día y un día después de la inyección de STZ. La inmunohistoquímica de los páncreas con anticuerpos antiinsulínicos 48 horas después de la inyección de STZ revela más células productoras de insulina en islotes de ratones tratados con AAT más que ALB (26,3% ± 2,6 y 12,8% ± 2,3 células productoras de insulina por islote, respectivamente, Fig. 4f). El contenido de células blancas de islotes recién aislados se evaluó por análisis FACS. Los islotes contienen células CD45+ (Fig. 4G) que también son positivas para los marcadores monocíticos / granulocíticos GR1 y F4/80 (datos no mostrados). Esta población celular respondía a AAT con MHC de clase II de menor superficie (Fig. 4H).

Ejemplo 5

Fig. 5A-5D ilustra el efecto de AAT sobre TNF-α. (A) Los islotes de ratones C57BL/6 se cultivaron (100 islotes/cavidad por triplicado) en presencia de AAT (0,5 mg/ml) o inhibidor de TACE (10 mM) 1 hora antes de la estimulación por IFNγ (5 ng/ml) más IL-1β (10 ng/ml). Izquierda, media ± SEM de cambio en TNFα en sobrenadantes después de 72 horas de incubación. Derecha, media ± SEM de cambio en veces en TNFα de membrana en células de islotes después de 5 horas de incubación, de acuerdo con el análisis FACS. *** P < 0,001 niveles de control (CT) comparados en ausencia de AAT. (B) Análisis representativos FACS de TNFα de membrana en células de islotes estimulados en ausencia (área abierta) o presencia (área sombreada) de AAT. Los eventos se regulan para CD45+. (C) Hiperglicemia inducida por estreptozotocina. Los ratones C57BL/6 se inyectaron i.p. con solución fisiológica (n = 3), AAT (5 mg, n = 3) o TNFα (1 mg/kg, n = 3) o fueron administrados p.o. con inhibidor de TACE (TACEi, 60 mg/kg, n = 6) un día antes de la inyección de STZ (225 mg/kg, i.p.). Posteriormente, AAT y TNFα se inyectaron a diario; inhibidor de TACE se administró dos veces por día. A las 48 horas, se comparan niveles de glucosa medios ± SEM con los de las camadas normales (n = 3). * P < 0,05, ** P < 0,01 en comparación con ratones tratados con solución fisiológica, inyectados con STZ.

AAT inhibe la liberación de TNFα de membrana

Escisión proteolítica de TNFα de membrana libera TNFα soluble de células activadas por acción de la enzimas convertidora de TNFα (TACE). Los inventores examinaron los niveles de TNFα de membrana en islotes estimulados en presencia de AAT. El efecto de AAT se comparó con el de un inhibidor de TACE. Tanto Bot como inhibidor de TACE redujo los niveles de TNFα en sobrenadantes de islotes expuestos a IL-1β/IFNγ (Fig. 5A, izquierda). En estas condiciones, TNFα de membrana acumulado sobre la superficie celular de células de islotes CD45+ (Fig. 5A, derecha).

Para evaluar la posibilidad de que la protección de islotes se produzca por medio de inhibición de la liberación de TNFα de membrana in vivo, se introdujeron inhibidor de TACE, receptor de p75 TNF (TNF BP) o AAT a ratones antes de la inyección de STZ. A pesar de que todos los ratones desarrollaron hiperglucemia después del día 4, la progresión de la toxicidad de células β se veía significativamente afectada por tratamientos. Como se muestra en la Fig. 5C, el efecto de STZ a las 48 horas se redujo en la presencia de AAT (una reducción del 23,2% ± 2,3 en niveles de glucosa en ayunas en comparación con ratones inyectados con STZ/solución fisiológica). El efecto del inhibidor de TACE y receptor de p75 TNF no rea profundo. De modo similar, el inhibidor de TACE prolongaba la supervivencia del injerto de islotes en una menor extensión que AAT (datos preliminares no mostrados).

Los esplenocitos que se cosecharon 48 horas después de la inyección de ThG produjeron TNFα en cultivo (Fig. 5D). AAT administrado antes de tioglicolato redujo la liberación de TNFα de esplenocitos cultivados. Una tendencia similar se halló con IFNγ (datos no mostrados), lo que significa que la respuesta a ThG tenía efectos que se extienden más allá del compartimiento peritoneal y que el pretratamiento con AAT reducía estos efectos.

Ejemplo 6

Fig. 6A-6D ilustra el efecto de AAT sobre trasplante de aloinjerto de islotes. 6A ilustra el estudio en el transcurso del tiempo después del trasplante de células de islotes. Este ejemplo indica que los ratones tratados mantienen normoglucemia durante un período de 60 días (n = 4), después de retirar la terapia de AAT. Después de retirar la terapia, la normoglucemia duró otros 20 días. 6A ilustra el seguimiento de glucosa. La tinción de insulina positiva en el injerto de islote tratado en el día 85 también se demostró (datos no mostrados). 6B ilustra un infiltrado inmune hallado fuera del área del injerto. 6C ilustra un incremento en la presencia de CD4+ y una reducción comparativa de monocitos y neutrófilos. También se mostró que la vascularización masiva era evidente dentro del injerto (datos no mostrados). Se observó que los injertos de islotes aceptados de larga duración se pueden se pueden liberar de una alorrespuesta inmune, incluso se evaluó después de retiro de la terapia si la terapia había evocado una inmunotolerancia específica de la cepa de islotes del donante. Para ello, los injertos se explantaron por nefrectomía y los receptores originales ahora hiperglucémicos fueron retrasplantados con la misma cepa de islotes de antes (n = 2) o una tercera cepa que no habían considerado antes (n = 2). De acuerdo con una inmunotolerancia específica de cepa establecida, los ratones aceptaron injertos de donantes originales, pero tenían injertos de tercera cepa rechazados agudamente (6D); el mismo donante (izquierda) y un reinjerto de tercer donante (derecha).

Ejemplo 7

Fig. 7A-7E ilustra la producción de AAT por células de islotes y la reflexión de la supervivencia del injerto de islotes. 7A ilustra una expresión en el transcurso del tiempo de mARN de AAT de ratón después de la producción de citoquinas (IL-1β e IFNγ) (izquierda) y a las 8 horas (derecha). Para demostrar la relevancia de alfa1-antitripsina endógena en condiciones fisiológicas, se enfocó el tema de lesión de los islotes durante la pancreatitis. En el modelo de ratón de pancreatitis aguda, los islotes aislados de páncreas que están inflamados expresan alfa1-antitripsina inducible. 7B ilustra un ejemplo de lesión de islote durante la pancreatitis; la histología de islotes normales (arriba izquierda), la histología de los islotes de un páncreas inflamado (arriba derecho) y expresión de AAT de ratón en islotes obtenidos de los páncreas en un modelo de pancreatitis aguda (abajo). Niveles de alfa1-antitripsina durante la pancreatitis (modelo de caeruleína para pancreatitis aguda). Arriba, histología de un islote en un páncreas normal (izquierda) y un islote en un páncreas inflamado (derecha), representativos de n = 3. Abajo, expresión de alfa1-antitripsina de ratón en islotes obtenidos de páncreas en un modelo de pancreatitis aguda. El tratamiento de ratones con alfa1-antitripsina exógena dio como resultado la regulación hacia debajo de la expresión de alfa1-antitripsina endógena, así como reducción de los niveles séricos de TNFα (no mostrados).

Para demostrar la relevancia de alfa1-antitripsina endógena en trasplante de islote, se seccionaron aloinjertos de islotes de ratones trasplantados no tratados en los días 1 a 7 después del trasplante (n = 3). Se examinaron respecto de la expresión de alfa1-antitripsina y revelaron un patrón que puede coincidir con la fase de inflamación (días 1-3) seguido de pérdida de masa de islote (días 4-7). 7C ilustra un ejemplo de muestras de aloinjertos de islotes tomadas después del injerto y también se evaluaron los cambios en porcentaje en niveles de mARN de AAT. Se extrajo el ARN total y el mARN para alfa1-antitripsina se evaluó por RT-PCR.

La protección de islotes de la lesión de citoquina se examinó usando alfa1-antitripsina endógena introduciendo oncostatina M, un miembro de la familia de IL-6 que induce la expresión de alfa1-antitripsina en islotes sin causar la muerte de los islotes. Después de 4 días, esos islotes humanos se incubaron con oncostatina M, a los fines de la acumulación de suficiente alfa1-antitripsina, a los islotes se añadió la combinación tóxica de células β de IL-1β/IFNγ.

Los islotes pretratados que tenían exceso de alfa1-antitripsina se protegieron de la lesión, soportando el concepto de que la alfa1-antitripsina derivada del islote puede participar en la protección del islote durante la inflamación. 7D ilustra un ejemplo de protección de islotes de la lesión de citoquinas con AAT endógena al introducir oncostatina M (un miembro de la familia de interleuquina 6 (IL-6) que induce la expresión de AAT en islotes, oncostatina M y niveles de AAT (arriba izquierda); se evaluaron los niveles de óxido nítrico y viabilidad (arriba derecha). Abajo, islotes humanos expuestos a oncostatina M durante 4 días producen suficiente alfa1-antitripsina para reducir los efectos de IL-1β/IFNγ añadida durante 48 horas más.

Ejemplo 8

En un estudio de ejemplo, se examinó la alfa1-antitripsina en islotes humanos. Fig. 8A-8D ilustra el efecto de AAT sobre islotes humanos. Se examinó la producción de óxido nítrico (8A), la producción de TNF-α (8B), de IL-6 (8C) e IL-8 (8D). 100 islotes humanos por cavidad se sembraron por triplicado y se añadió alfa1-antitripsina (AAT) 2 horas antes de los estímulos. Los sobrenadantes se ensayaron 72 horas más tarde. 3A, óxido nítrico; 3B, TNFα; 3C, IL-6; 3D, IL-8. Los resultados son media ± SEM y son representativos de aislamientos de islotes separados de tres donantes humanos.

MÉTODOS

De acuerdo con la presente invención, se puede emplear biología molecular convencional, microbiología, y técnicas de ADN recombinantes dentro del alcance de la técnica. Estas técnicas se explican por completo en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Animal Cell Culture, R. I. Freshney, ed., 1986).

Ratones hembras C57BL/6 y DBA/2 se adquirieron de Jackson Laboratories.

Inducción de hiperglucemia por estreptozotocina, aislamiento de islotes y trasplante de islotes. En un método de ejemplo, se trataron ratones C57BL/6 de 5-6 semanas de edad por vía intraperitoneal (i. p.) con 225 mg/kg de estreptozotocina (STZ) (Sigma). Se usaron ratones con hiperglucemia establecida al menos 5 días después de la administración de STZ. Los islotes se aislaron de ratones DBA/2 el día del trasplante o 24 horas antes de los ensayos in vitro, por digestión enzimática de páncreas, por medios conocidos en la técnica, con modificaciones menores. Brevemente, los ratones se anestesiaron con cetamina i.p. (50 mg/kg, Vedco Inc.) y xilazina (10 mg/kg, Vedco Inc.). Cada páncreas se infló con 3,5 ml de colagenasa fría (1 mg/ml, tipo XI, Sigma), se seccionaron y se sumergieron durante 40 minutos a 37 °C en baño de agua. Los páncreas se sometieron generosamente a vórtex y se filtraron a través de un tamiz de metal de 500 micrones. El pellet se lavó dos veces en HBSS frío con contenido de 0,5% de BSA (Sigma) y se reconstituyó en RPMI-1640 (Cellgro, Mediatech) suplementado con 10% de FCS (Cellgro), 50 UI/ml de penicilina (Cellgro) y 50 mg/ml de estreptomicina (Cellgro). Los islotes se recolectaron en un filtro celular de nylon de 100 micrones (BD Falcon), se liberaron en una placa de Petri por enjuague con HBSS (Cellgro, Mediatech) y 0,5% de BSA (Sigma) y se colocaron a mano bajo un estereomicroscopio. Para el trasplante, se lavaron bien 450 islotes de FCS residual en HBSS y 0,5% de BSA y se montaron en una punta de 0,2 ml para trasplante inmediato. Para los ensayos in vitro, se dejaron incubar los islotes durante 24 horas a 37 °C. El trasplante de islotes se llevó a cabo en el espacio subcapsular renal izquierdo. Los ratones receptores se anestesiaron, tal como se describió con anterioridad. Se realizó una incisión en la pared abdominal sobre el riñón izquierdo. Los islotes se liberaron en el espacio subcapsular a través de una punción y la abertura se selló por medios conocidos en la técnica. El seguimiento de glucosa en sangre se llevó a cabo 3 veces por semana a partir de gotas de sangre del extremo de la cola usando glucosticks (Roche) (Nanji, S.A. & Shapiro, A.M. Islet transplant in patients with diabetes mellitus: choice of immunosuppression. BioDrugs 18, 315-28 (2004).)

Desarrollo de anticuerpos anti-humanos-AAT en ratones. En otro método de ejemplo, a fin de evocar la producción específica de anticuerpos contra AAT humano, a los ratones se inyectaron i. p. 10 mg de AAT humana por ratón de 20 gramos cuatro veces a intervalos de 1 semana. Se usaron ratones en experimentos 2 meses después de la última administración. La producción de anticuerpos se evaluó antes de llevar a cabo los experimentos de trasplante.

En un ejemplo, el ensayo de los niveles de anticuerpos anti-humanos-AAT se llevó a cabo tal como se describió en la técnica. Brevemente, los sueros de ratón se mantuvieron a -70 °C hasta ensayar los niveles de AAT anti-humano. Las placas se recubrieron con AAT humana o albúmina (2 mg/ml) en PBS a 4 °C durante la noche, luego se lavó y se bloqueó durante 1 hora a 25 °C tal como se describió. El suero de control negativo se usó además del suero de ensayo. El anticuerpo anti-AAT ligado usando solución estándar de sustrato TMB se midió (Sigma).

Células. La línea celular NIH-3T3 (por ejemplo, ATCC) se cultivó. El día de la inoculación peritoneal, se recolectaron frescas 1 x 107 por tripsinización y se lavaron con PBS frío. El pellet se resuspendió en 1 ml de PBS frío para la inyección inmediata.

Experimentos de infiltración. La infiltración peritoneal se produjo por inyección i. p. de 1 ml de tioglicolato autoclavado (3% p/v, Sigma) o células alogénicas (NIH-3T3), junto con 0,1 ml de solución fisiológica, albúmina humana, AAT humana o AAT oxidada. El lavado peritoneal se llevó a cabo a las 24 y 48 horas (tioglicolato) o en los días 1-5 (células alogénicas). Para el lavado, los ratones se anestesiaron por inhalación de isoflurano y se

inyectaron inmediatamente con 5,5 ml de PBS frío que contenía 5% de FCS y 5 U/ml de heparina en la cavidad peritoneal. Después de masajear el abdomen, se recuperó el fluido peritoneal. Se lisaron los glóbulos rojos (tampón de lisado RBC, BD PharMingen) y se realizaron recuentos celulares con un hemocitómetro. Luego se aislaron las células. Las células (aproximadamente 1 x 106/vial de polipropileno) se incubaron con anticuerpos de bloque de receptor de FcγRIII/II (Tabla I) durante 10 min. Las células se dividieron luego en dos grupos y se incubaron con mAbs para leucocitos y células CD3/NK o neutrófilos / monocitos / macrófagos (Tabla I) durante 30 min. Las células se lavaron y se fijaron. La cantidad de células que expresan un marcador particular se calculó multiplicando los porcentajes obtenidos de citometría de flujo por concentración de células en el fluido de lavado.

Tabla I. mAbs antirratón de rata usado por citometría de flujo

Finalidad	mAb	(1) Especificidad	(2) Fuente
Bloqueo	2.4G2	FcγRIII/II	BD PharMingen
Leucocitos	30-F11 (APC)	CD45 (leucocitos)	BD PharMingen
Macrófagos y neutrófilos	F4/80 (PE) RB6-8C5 (FITC)	F4/80 (macrófagos / monitos) GR1 (neutrófilos / monocitos)	eBiosciences BD PharMingen
CD3	DX5 (PE)	Células Pan-NK	Miltenyi Biotec
Células NK	17A2 (FITC)	CD3	BD PharMingen
TNFα	MP6-XT22 (PE)	TNFα de ratón	eBiosciences
MHC de clase II	M5/114.15.2 (PE)	I-Ab/d, I-Ed	BD PharMingen
Control de isotipo	IgG1 de rata (PE)		eBiosciences

Un ensayo insulínico e inmunohistoquímica se llevaron a cabo por medios conocidos en la técnica (Nanji, S.A. & Shapiro, A. M. Islet transplant in patients with diabetes mellitus: choice of immunosuppression. BioDrugs 18, 315-28 (2004)).

Oxidación de AAT por sistema de mieloperoxidasa (MPO). En un ejemplo, se incubó AAT (4 mg/ml) a 37 °C durante 45 minutos con MPO (1 U/ml, Sigma), H2O2 (80 mM, Sigma) y NaCl (2,5 mM) en PBS, pH 7,4, por medios conocidos en la técnica. La reacción se terminó por cocción durante 1 hora, seguido por centrifugación por filtrado de los productos del sistema. En este ejemplo, era necesaria la cocción para la inactivación de MPO, pero esto no inactivaba AAT (datos no mostrados). La pérdida de actividad de AAT oxidada se confirmó por ensayo de actividad de elastasa.

Ensayo de actividad de elastasa. En otro método de ejemplo, se evaluó la inhibición de una serina proteasa elastasa 30 minutos después de la coincubación de AAT o AAT oxidada con elastasa porcina (Sigma) por triplicado, por medio de métodos conocidos. La capacidad de la elastasa de liberar 4-nitroanilina (A410) de SucAla3-PNA se determinó por medición cinética de la absorbancia de luz a 410 nm. La actividad en ausencia de inhibidores se fijó como el 100% en el intervalo lineal del ensayo.

Ensayos de citoquinas. Se usó un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) como se conoce en la técnica para la medición de TNFα de ratón y MIP-1α. Brevemente, se rotularon con rutenio anticuerpos purificados por afinidad de antirratón de cabra específicos de citoquinas (por ejemplo, BioVeris) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron anticuerpos antirratón policlonales biotinilados (por ejemplo, R&D Systems). La cantidad de quimioluminiscencia de TNFα y MIP-1α se determinó usando un Origen Analyzer (BioVeris).

TNFα de membrana. Se detectó TNFα de membrana en células de islotes por modificación de un método para la evaluación de TNFα de membrana en PBMC humana. Brevemente, se incubó la suspensión de islotes de células simples con anti-mTNFα-PE mAb (Tabla I). Las céluals se lavaron con tampón con tampón FACS y se resuspendieron en 0,5 ml de 2% de formaldehído de grado EM.

Ensayo de óxido nítrico. Los niveles de nitrito en sobrenadantes se determinaron usando reactivo de Griess (Promega), tal como se describió previamente (Chan, E. D. & Riches, D. W. Am J Physiol Cell Physiol 280, C441-50 (2001).

Ensayo de apoptosis. El efecto de protección de AAT en islotes puede abordar uno de los mayores obstáculos en el trasplante de islotes hoy en día, a saber, la falta de adecuación de la masa de islotes y la viabilidad de islotes

posaislamiento. Los islotes humanos recién aislados activan las vías de señalización de estrés y exhiben una alta tasa de apoptosis debido al proceso de aislamiento, necesitando el uso de más de un donante de islote por paciente diabético (Nanji, (2004); Abdelli, S. et al. Intracellular stress signaling pathways activated during human islet preparation and following acute cytokine exposure. Diabetes 53, 2815-23 (2004)).

En este ejemplo, la apoptosis que sigue al aislamiento de los islotes se reduce cuando los islotes se cultivan con AAT (datos no mostrados) y demuestran que los islotes que se cultivan con AAT durante 24 horas antes del trasplante son capaces de normalizar los niveles séricos de glucosa de ratones diabéticos cuando se trasplantan autólogamente en una masa subfuncional de otro modo (datos no mostrados).

Dosis de AAT. Plasma humano normal contiene 0,8-2,4 mg/ml de AAT, con una vida media de 5-6 días1. En estudios de transferencia génica en ratones C57BL/6, se lograron niveles en plasma de 0,8-1,0 mg/ml y proporcionaron protección de diabetes de tipo I en ratones NOD (Song, S. et al Gene Therapy 11, 81-6 (2004)). AAT se administró intraperitonealmente a 0,3-1,0 mg por ratón protegido de la respuesta letal inducida por TNFα y 0,8 mg de AAT protegida de lesión hepática inducida por D-galactosamina/LPS. Libert, C., et al., J Immunol 157, 5126-9 (1996).

Si bien los niveles de AAT aumentan 3 a 4 veces durante la respuesta de fase aguda 1, 2 mg por ratón da como resultado niveles en plasma que no exceden los niveles fisiológicos.

Análisis estadísticos. Las comparaciones entre grupos se analizaron por prueba t de dos lados o ANOVA por experimentos con más de dos subgrupos. Los resultados se presentan como media ± SEM.

Prolongación de la supervivencia del injerto de islotes por AAT.

En el presente estudio, la administración de AAT de grado clínico a ratones trasplantados con islotes alogénicos prolongó la supervivencia del injerto. Además, AAT redujo la migración de neutrófilos y la posterior infiltración de linfocitos y células NK en modelos de peritonitis. AAT también redujo la secreción de TNFα y MIP-1α de islotes e inhibió la expresión de MHC de clase II de superficie en células CD45+ de islotes in vitro. AAT era protectora en un modelo de toxicidad de células β inducida por estreptozotocina (STZ). Así, parece que la monoterapia de AAT se dirige a varios aspectos de un sistema inmune inflamatorio activado, culminando en la prolongación de la supervivencia del aloinjerto de islotes.

Efecto de AAT sobre la infiltración celular.

AAT redujo la migración de neutrófilos en el peritoneo de ratones inyectados con células de fibroblastos incompatibles con tioglicolato o MHC. Otros estudios demuestran que AAT inhibe la infiltración de neutrófilos en riñones durante la lesión por isquemia / reperfusión y en pulmones después de la administración intratraqueal de sílice. En el presente estudio, AAT redujo la producción de islotes de MIP-1α y TNFα, dando como resultado islotes deficientes en capacidades quimiotácticas y, en consecuencia, menos inmunogénicas. El efecto perjudicial de neutrófilos reclutado en islotes fue demostrado claramente.

La implicancia de macrófagos en la destrucción de islotes es crítica; su presencia precede la insulitis en ratones NOD y en rata BB prediabética y su agotamiento es de protección durante el trasplante de islotes en ratas. Los islotes son potentes reclutadores de macrófagos; de los 51 productos génicos identificados en islotes humanos recién aislados por disposición de cADN, se halló que la expresión de MCP-1 era elevada. En ratones, el bloqueo de MCP-1 prolonga la supervivencia del aloinjerto de islotes cuando se combina con un breve curso subterapéutico de rapamicina. El rechazo al aloinjerto de isolotes se asocia con un incremento fijo de la expresión intrainjerto de MCP-2, MCP-5, CCL5, CXCL10 y CXCL9 y los receptores de quimioquina CCR2, CCR5, CCR1 y CXCR337. Conforme a ello, los ratones CCR2-/- y ratones CXCR3-/- exhiben una prolongación de la supervivencia del aloinjerto de islotes. En la configuración del trasplante, las citoquinas que se producen localmente, como TNFα y IL-1β, causan un daño a las células proximales independientes de reconocimiento de antígenos y la activación del complemento es crítica para la supervivencia del injerto independiente de la inmunidad aloespecífica. La relevancia de macrófagos durante eventos tempranos en el rechazo al injerto de islotes se refuerza por medio de la identificación de células CD45, F4/80 y Grl positivas que expresan MHC de clase II en islotes recién aislados. En presencia de AAT, los niveles de MHC de clase II se redujeron por debajo de los de islotes estimulados por IL-1β/IFNγ y no estimulados, sustentando la idea de que el proceso del aislamiento de islotes es suficiente para provocar la activación de las vías inflamatorias en las células de islotes. A la luz de la implicancia de los neutrófilos y macrófagos en el rechazo al injerto, la interferencia con sus funciones por AAT proporciona un ambiente no inflamatorio inusual para la supervivencia y la recuperación de islotes injertados.

Como se muestra en el presente estudio y en otra parte, la inyección intraperitoneal de células NIH-3T3 alogénicas evoca la infiltración de macrófagos y neutrófilos los días 1-2 y de células CD3+ y NK los días 4-5. La intensidad de la última infiltración se redujo por administración de AAT antes de la inyección de línea celular alogénica, pero no por administración de AAT el día 3 (datos no mostrados). En la configuración del trasplante, los factores tempranos no específicos contribuyen en la respuesta inmune específica posterior. En consecuencia, es posible que la reducción de la infiltración de células CD3+ y NK en el presente estudio sea secundaria a la falla funcional de la respuesta

innata temprana. Sin embargo, sin tener en cuenta el tratamiento de AAT, la examinación histológica de injertos de islotes demostraron que el infiltrado evocado por islotes alogénicos consiste en neutrófilos y linfocitos. Sin embargo, el infiltrado del día 7 se redujo en receptores tratados con AAT, y, de acuerdo con la immunohistoquímica insulína del día 15, infiltrado causó menor destrucción de islotes.

ART inhibe la liberación de TNFα.

Sobrenadantes de islotes estimulados con IL-1β/IFNγ contenían sorprendentemente menos TNFα cuando se incubaron con AAT (inducción del 100,0% ± 22,0 media ± SEM a 0 mg/ml AAT; 10,2% ± 11,2 a 0,5 mg/ml y 0,8% ± 0,1 a 1,0 mg/ml). En PBMC humana estimulada, AAT mostró disminuir la liberación de TNFα sin afectar los niveles de mARN de TNFα. En ratones, conforme a ello, se reducen los niveles séricos de TNFα en ratones tratados con AAT inyectados con LPS. De modo importante, el tratamiento de ratones con AAT bloquea la letalidad mediada por TNFα inducida por LPS, pero no inducida por TNFα en ratones. En el presente estudio, los esplenocitos de ratón cultivados aislados de ratones inyectados con tioglicolato segregaron menos TNFα, 48 horas después de la inyección de AAT.

En presencia de AAT, el TNFα de membrana se acumuló en células de islotes CD45+ estimulados con IL-1β/IFNγ. TNFα se libera de la superficie celular de macrófagos por acción de la enzimas convertidora de TNFα (TACE), una metaloproteinasa que escinde el TNFα de membrana en la forma soluble de TNFα. Los inhibidores de TACE reduce la liberación de TNFα y aumenta los niveles de TNFα de membrana, tal como se demuestra por análisis FACS. A pesar de que la regulación de la actividad de TACE no es clara, hay evidencia que sugiere que están implicadas las proteasas extracelulares: TACE no requiere su dominio citoplásmico para su activación, su actividad no depende de la cantidad de TACE sobre la superficie celular, coexpresión de TACE y TNFα transmembrana no es suficiente para el procesamiento de TNFα y la enzima se expresa constitutivamente en diversas células. Se sugiere que las serpinas, tales como serpina PN-I52, poseen efectos reguladores extracelulares sobre diversas proteínas de superficie.

TACE probablemente sea relevante para el rechazo al injerto dado que el inhibidor de TACE redujo los parámetros de lesión en un modelo de rata de lesión pulmonar postrasplante. Además de una reducción de los niveles de TNFα, el estudio muestra menor expresión de MCP-1 e ICAM-1 y una reducción de la infiltración de neutrófilos. Se obtuvieron similares hallazgos con AAT y un inhibidor de metaloproteinasa de amplio espectro en un modelo de influjo de neutrófilos inducido por sílice en los pulmones. Sin embargo, inhibidor de TACE sólo reprodujo parcialmente el efecto de protección de AAT sobre la supervivencia del injerto de islotes (datos preliminares). De modo similar, la protección de AAT de hiperglucemia inducida por STZ sólo se reproducía parcialmente por inhibición de TACE y por receptor de p75-TNF recombinant. A pesar del hecho de que TNFα localmente segregado es perjudicial para la función de injerto de islotes, para nuestra conocimiento, no hay informe que describa la protección de injertos de islotes por neutralización de actividad de TNFα. Esta distinción entre la inhibición de AAT y TACE soporta la posibilidad de que AAT afecta múltiples aspectos del sistema inmune, incluyendo no sólo la liberación de TNFα sino también eventos que están corriente debajo de las actividades de TNFα.

En una realización, se contempla que una composición de la presente invención puede incluir AAT, uno de sus análogos, una serina proteasa, inhibidor de TACE (TACEi) o cualquier combinación de ellos. Estas composiciones se pueden administrar a un sujeto que tiene o que necesita un trasplante y/o que necesita terapia de inmunotolerancia.

Los islotes trasplantados se estimulan por medio del proceso de aislamiento.

El proceso del aislamiento de islotes inicia en los islotes una cascada inflamatoria de citoquinas y quimioquinas. Así, los islotes aislados contienen un potencial proinflamatorio intrínseco que puede afectar las respuestas inmunes locales del huésped. Se cree que el mecanismo de la toxicidad del islote inducida por citoquina implica la expresión de óxido nítrico sintasa inducible y posterior producción de óxido nítrico (NO) por células no β. En el presente estudio, AAT redujo la producción de NO en islotes tratados con IL-1β/IFNγ. Conforme a ello, se incrementó la viabilidad de islotes en un ambiente de bajo NO, como se logra por incubación con una baja concentración de estimulantes (datos no mostrados) o por introducción de AAT. La inducción de insulina, que es típicamente incompleta en presencia de citoquinas, estaba intacta en presencia de AAT y citoquinas. In vivo, AAT protegía los islotes en ratones inyectados con STZ, como se concluyó por menores niveles de glucosa en suero. La porción de células β viables se evaluó visualmente por inmunohistoquímica de insulina y era proporcional a la reducción en niveles de glucosa en suero. La protección de AAT estaba limitada a los días iniciales que siguen a la administración de STZ, lo que sugiere que AAT interfiere con la producción de NO y la activación inmune y no la alquilación de ADN intracelular. Las células CD45+ no estimuladas de islotes recién aislados expresaban MHC de clase II, que estaba implicada en las respuestas inmunes contra islotes. Los niveles de MHC de clase II eran elevados en presencia de IL-1β/IFNγ y decrecían en presencia de AAT. De manera interesante, la expresión de MHCII no se veía afectada por la presencian de inhibidor de TACE (enzima convertidora de TNF) (datos no mostrados), lo que confirma que las actividades de AAT se extienden más allá de aquellas de la inhibición de TACE.

De acuerdo con el presente estudio, las actividades de AAT se dirigían contra múltiples componentes del sistema inmune innato, culminando en un efecto protector sobre la destrucción del injerto de islotes. Los islotes exhibían en

particular un alto grado de protección de procesos inflamatorios en presencia de AAT. El pretratamiento con AAT antes del trasplante de islotes puede reducir tanto la pérdida de islotes como la respuesta inmunológica contra el injerto.

Los términos y expresiones que fueron empleados se usan como términos de la descripción y no de limitación y no hay intención de que, en el uso de tales términos y expresiones, de excluir todo equivalente de las características mostradas y descritas o sus partes, pero se reconoce que diversas modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención reivindicado. Así, se ha de entender que, a pesar de que la presente invención se reveló específicamente en la presente, los expertos en la técnica pueden recurrir a características opcionales, modificación y variación de los conceptos revelados en la presente y que estas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta invención como se define por medio de las reivindicaciones anexas. Además, cuando las características o los aspectos de la invención se describen en términos de los grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush y que otros miembros de los grupos descritos se incluyen, pero no se enumeran.

Descripción:

Descripción 1: Un método de reducción del riesgo de un rechazo de trasplante o un efecto colateral de un rechazo de trasplante en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una composición que comprende un compuesto que es capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa.

Descripción 2: El método de la realización 1, en donde la composición se administra al sujeto antes del trasplante, durante el trasplante, después del trasplante o una combinación de ellos.

Descripción 3: El método de la realización 1, en donde la composición también comprende uno o varios agentes anti-rechazo de trasplante, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores, agentes inmunomoduladores, agentes antimicrobianos o una combinación de ellos.

Descripción 4: El método de la realización 1, en donde el compuesto comprende alfa1-antitripsina, uno de sus análogos o una combinación de ellos.

Descripción 5: El método de la realización 1, en donde el trasplante se selecciona de un trasplante de órgano o no orgánico.

Descripción 6: El método de la realización 5, en donde un trasplante de órgano se selecciona del grupo que consiste en pulmón, riñón, corazón, hígado, tejido blando, piel, páncreas, intestino y una combinación de ellos.

Descripción 7: El método de la realización 5, en donde el trasplante no orgánico se selecciona del grupo que consiste en córnea, médula ósea, célula madre, islote pancreático y una combinación de ellos.

Descripción 8: Un método para el tratamiento de un sujeto que necesita de terapia de inmunotolerancia, que comprende la administración al sujeto de una composición que comprende un compuesto que es capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa, activar el receptor de SEC (complejo enzimático de serpina), induce otra actividad de tipo alfa1-antitripsina o una combinación de ellos.

Descripción 9: El método de la realización 8, en donde el compuesto comprende alfa1-antitripsina, uno de sus análogos o una combinación de ellos.

Descripción 10: El método de la realización 8, en donde la composición reduce de modo significativo la necesidad de una terapia inmunosupresora.

Descripción 11: El método de la realización 8, en donde la composición también comprende uno o varios agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores, agentes inmunomoduladores, agentes antimicrobianos o una combinación de ellos.

Descripción 12: El método de la realización 8, en donde la terapia de inmunotolerancia se selecciona del grupo que consiste en reductores de la producción de apoptosis, reductores de la producción de citoquinas, reductores de la producción de óxido nítrico y una combinación de ellos.

Descripción 13: El método de la realización 12, en donde la inhibición de la producción de citoquinas se selecciona del grupo que consiste en inhibición de TNFα (factor de necrosis tumoral alfa), IL-1 (interleuquina-1), IL-12 (interleuquina-12), IL-18 (interleuquina-18), IFNγ (interferón gamma) y una combinación de ellos.

Descripción 14: Un método de reducción del riesgo de un rechazo al injerto o un efecto colateral de un rechazo al injerto en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una composición que comprende un compuesto que es capaz de reducir de modo significativo la actividad de serina proteasa.

Descripción 15: El método de la realización 14, en donde el compuesto comprende alfa1-antitripsina, uno de sus análogos o una combinación de ellos.

Descripción 16: El método de la realización 14, en donde el rechazo al injerto comprende enfermedad de injerto versus huésped (GVHD).

Descripción 17: El método de la realización 14, en donde la sustancia que exhibe actividad inhibidora de serina proteasa se dirige a las siguientes proteasas seleccionadas del grupo que consiste en proteinasa-3, catepsina G, quimiotripsina, elastasa, elafina, eglina C, triptasa clara, tripsina y una combinación de ellos.

Descripción 18: El método de la realización 14, que también comprende uno o varios agentes antirrechazo, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores, agentes inmunomoduladores, agentes antimicrobianos, agentes antivirales o una combinación de ellos.

Descripción 19: Un método para preservar un órgano o no órgano explantado, que comprende la administración al órgano o no órgano de una composición que comprende un compuesto que es capaz de la actividad de tipo alfa1-antitripsina, inhibiendo la actividad de serina proteasa o una combinación de ellos.

Descripción 20: El método de la realización 19, en donde la preservación del explante comprende preservar el explante en cualquier momento antes de implantar el órgano o no órgano en un receptor.

Descripción 21: El método de la realización 19, en donde la preservación de un explante se selecciona del grupo que consiste en la reducción de la apoptosis en el explante, la reducción de la producción de citoquinas en el explante, la reducción de la producción de óxido nítrico en el explante y una combinación de ellos.

Listado se Secuencias

<110> Regents of the University of Colorado Shapiro, Leland

<120> Inhibidores de la actividad de serina proteasa y su uso en métodos y composiciones para el tratamiento de rechazo de injertos y promoción de supervivencia del injertos

<130> 66888-336462

<140> tosavía sin asignar
<141> 2006-06-07

<150> 60/687850
<151> 2005-06-07

<160> 61

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<400> 1

Xaa Val Xaa Leu Met
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1) .. (1)
<223> X = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3) .. (3)
<223> X = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Ala, Gly, Val o ausente

<400> 2

Xaa Val Xaa Xaa Met
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Ala, Gly, Val o ausente

<400> 3

Xaa Val Xaa Leu Met
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Ala, Gly, Val o ausente

<400> 4

Xaa Val Xaa Leu Xaa
1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Cys o ausente

<400> 5

Xaa Leu Val Xaa Xaa
1 5

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Cys, un grupo amido, un grupo amido sustituido, un grupo éster o ausente

<400> 6

Xaa Leu Met Xaa
1

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<400> 7

Xaa Leu Xaa Val Leu
1 5

<210> 8
<211> 5

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<400> 8

Xaa Leu Xaa Val Val
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Cys o ausente

<400> 9

Xaa Leu Xaa Leu Xaa
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Cys o ausente

<400> 10

Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Cys o ausente

<400> 11

Xaa Leu Met Xaa Xaa
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Cys o ausente

<400> 12

Xaa Met Leu Leu Xaa
1 5

<210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Cys, un grupo amido, un grupo amido sustituido, un grupo éster o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Cys o ausente

<400> 13

Xaa Xaa Met Xaa
1

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4) .. (4)
<223> Xaa = Ser, Thr o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5) .. (5)
<223> Xaa = Ser o ausente

<400> 14

Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1).. (1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thr, ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Ala, Gly, Val o ausente

<400> 15

Xaa Leu Xaa Xaa Val
1 5

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1).. (1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Ser o ausente

<400> 16

Xaa Val Tyr Leu Xaa
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Ala, Gly, Val o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<400> 17

Xaa Xaa Xaa Leu Met
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Ala, Gly, Val o ausente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o ausente

<400> 18

Xaa Val Xaa Leu Met
1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Leu Ala Gly Leu Cys Cys Leu Val Pro Val
1 5 10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala
1 5 10

<210> 22
<211> 10
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu
1 5 10

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe
1 5 10

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Asp His Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu Val Asn Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Asp Glu Asp
1 5 10

<210> 42

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val Lys
1 5 10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe
1 5 10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Asn Glu Asp Arg Arg Ser Ala Ser Leu His
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

Ile Thr Lys Val Phe Ser Asn Gly Ala Asp
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu
1 5 10

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Lys Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val
1 5 10

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu Ala
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn
1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys
1 5 10

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Val Asn Pro Thr Gln Lys
1 5

<210> 61
<211> 417
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

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

Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln
            20                  25                  30

Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys
        35                  40                  45

Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu
    50                  55                  60

Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile
65                  70                  75                  80
```

```
Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr His
                85                  90                  95

Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu
            100                 105                 110

Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln
        115                 120                 125

Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser
    130                 135                 140

Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu
145                 150                 155                 160

Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp His Glu Glu Ala
                165                 170                 175

Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys Ile
            180                 185                 190

Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu Val
        195                 200                 205

Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val Lys
    210                 215                 220

Asp Thr Glu Asp Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val Lys
225                 230                 235                 240

Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys
                245                 250                 255

Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr
            260                 265                 270

Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn
        275                 280                 285

Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp Arg
    290                 295                 300

Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr
305                 310                 315                 320

Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe Ser
                325                 330                 335

Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu
            340                 345                 350
```

```
Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr
        355                 360                 365

Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro
    370                 375                 380

Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln
385                 390                 395                 400

Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln
                405                 410                 415

Lys
```

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende alfa1-antitripsina, un péptido de aminoácido carboxiterminal correspondiente a alfa1-antitripsina o un análogo de alfa1-antitripsina para usar en un método para la reducción de un rechazo de trasplante no orgánico o para la reducción del riesgo de un rechazo de trasplante no orgánico o enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), en donde el trasplante no orgánico se selecciona del grupo que consiste en córnea, médula ósea, islote pancreático y una combinación de ellos.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición también comprende uno o varios agentes anti-rechazo de trasplante, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores, agentes inmunomoduladores, agentes antimicrobianos o una combinación de ellos.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto comprende un péptido carboxiterminal derivado de alfa1-antitripsina.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el trasplante no orgánico comprende trasplante celular de islotes pancreáticos.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el fragmento de alfa1-antitripsina comprende uno o varios péptidos de aminoácidos carboxiterminales correspondientes al carboxiterminal de alfa1-antitripsina seleccionado del grupo que consiste en AGAMFLEAIP (SEQ. ID NO. 56); MSIPPEVKFN (SEQ. ID NO. 57); KPFVFLMIEQ (SEQ. ID NO. 58); y NTKSPLFMGK (SEQ. ID NO. 59).

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el compuesto comprende FVFLM (SEQ ID NO. 1) o análogo de FVFLM (SEQ ID NO. 1) o una combinación de ellos.

7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde AAT o péptido de aminoácido carboxiterminal correspondiente a alfa1-antitripsina es una parte de un polipéptido de fusión.

8. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde AAT o péptido de aminoácido carboxiterminal correspondiente a alfa1-antitripsina se fusiona con una región constante de inmunoglobulina.

Fig. 1A

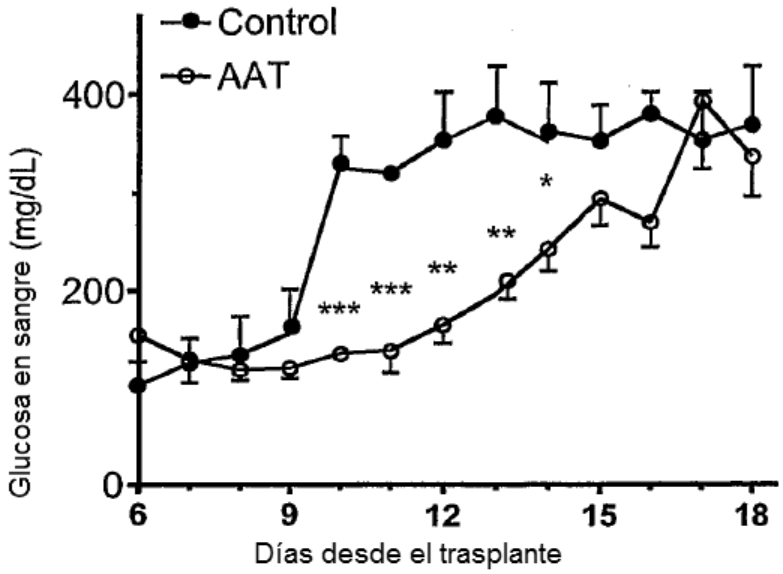

Control
AAT
400
200
0
Glucosa en sangre (mg/dL)
6
9
12
15
18
Días desde el trasplante
***
***
**
**
*

Fig. 1B

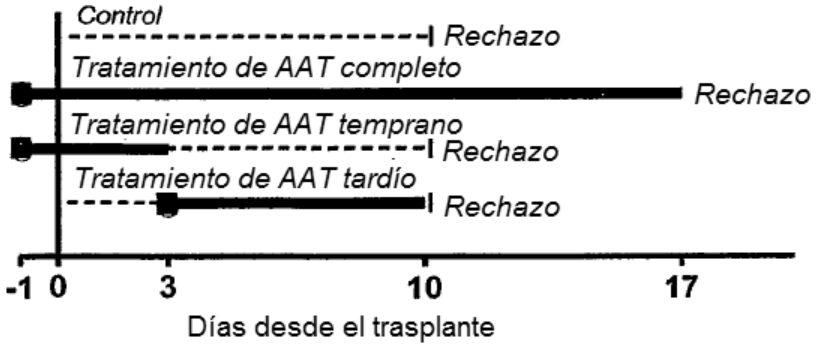

Control
Rechazo
Tratamiento de AAT completo
Rechazo
Tratamiento de AAT temprano
Rechazo
Tratamiento de AAT tardío
Rechazo
-1 0
3
10
17
Días desde el trasplante

Fig. 1C

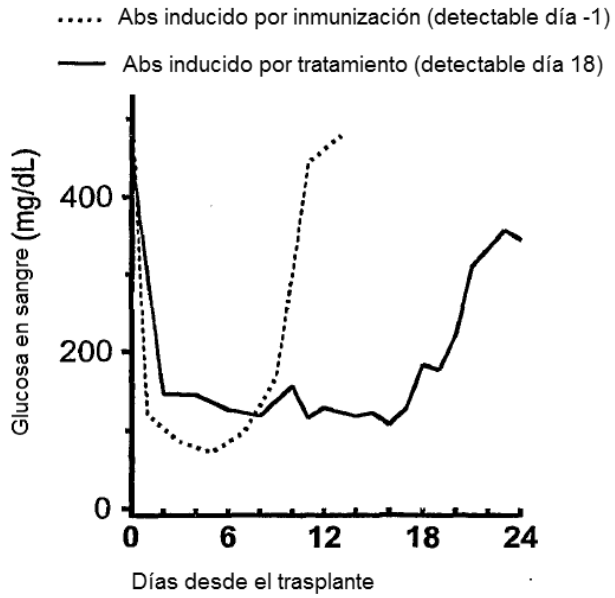

Abs inducido por inmunización (detectable día -1)
Abs inducido por tratamiento (detectable día 18)
Glucosa en sangre (mg/dL)
400
200
0
0
6
12
18
24
Días desde el trasplante

Fig . 1D

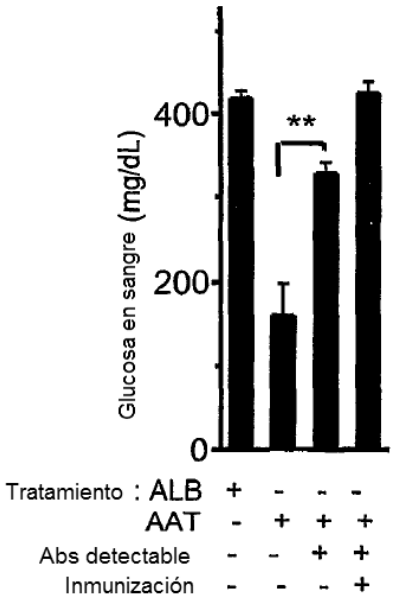

Glucosa en sangre (mg/dL)
400
200
0
**
Tratamiento : ALB + - - -
AAT - + + +
Abs detectable - - + +
Inmunización - - - +

Fig. 2A

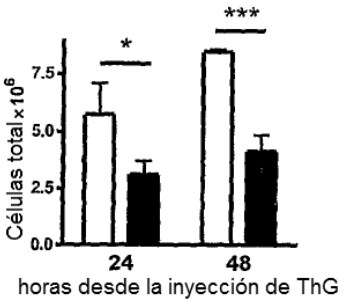


Fig. 2B

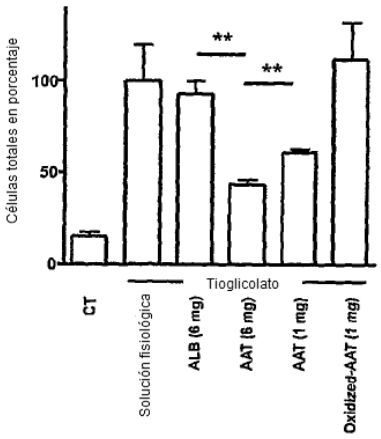


Fig. 2C

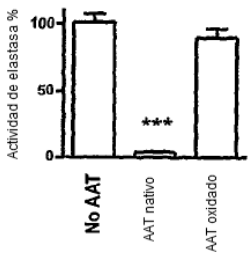
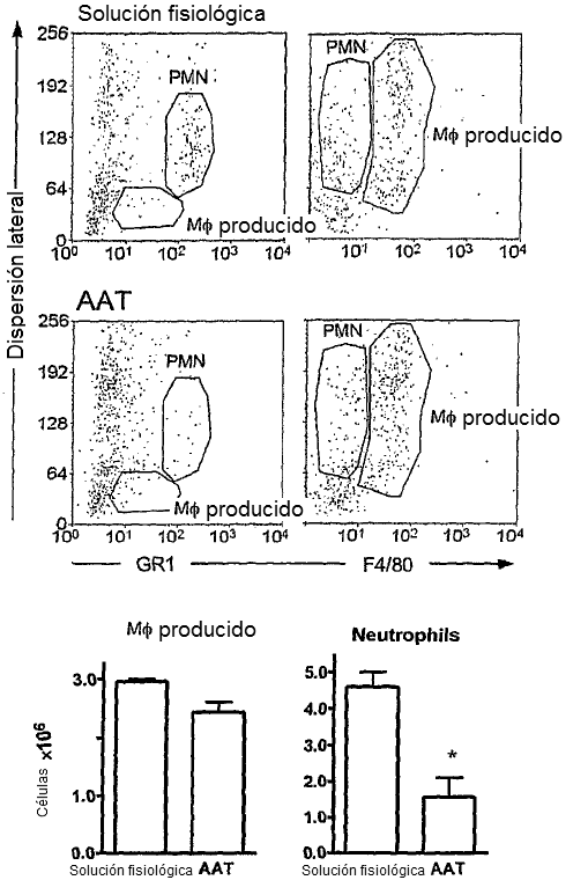


Fig. 2D



Inmunización - - - +

Fig. 3A

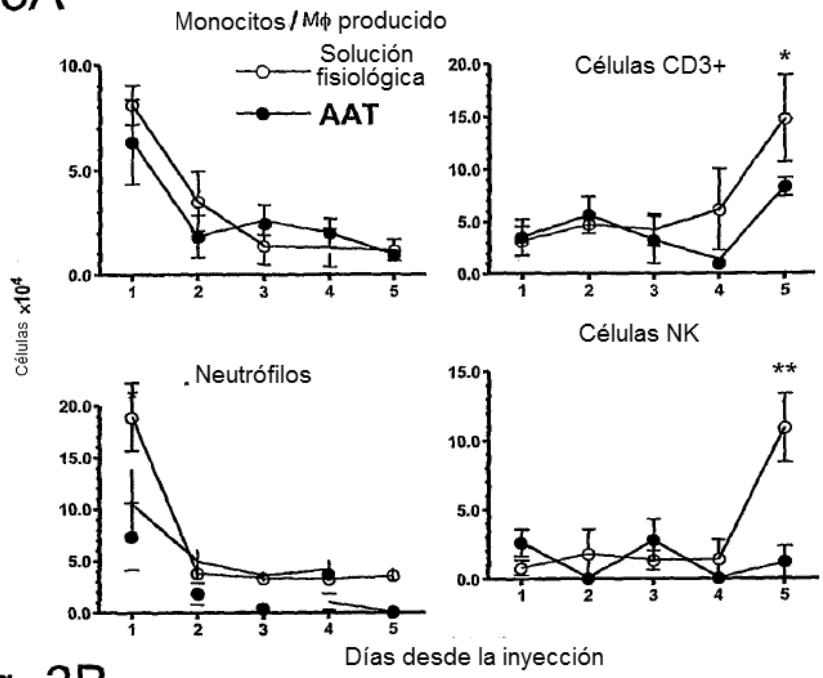


Fig. 3B

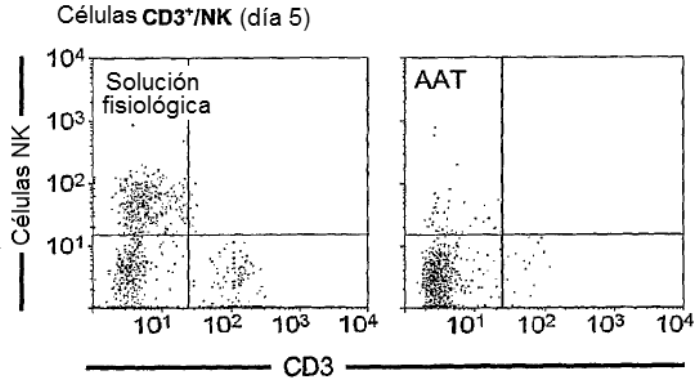


Fig. 3C

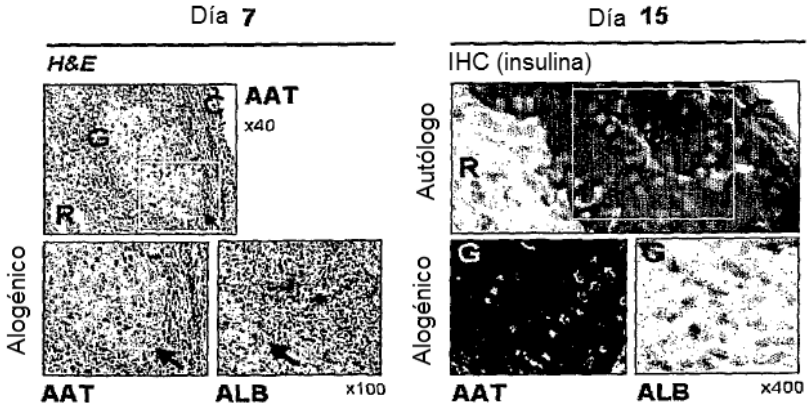


Fig. 4A

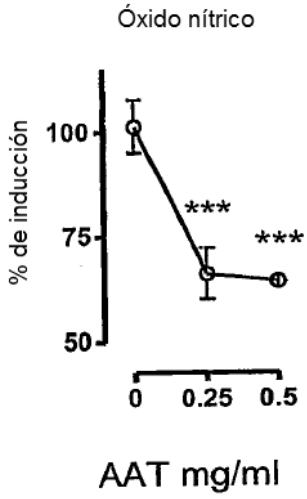


Fig. 4B

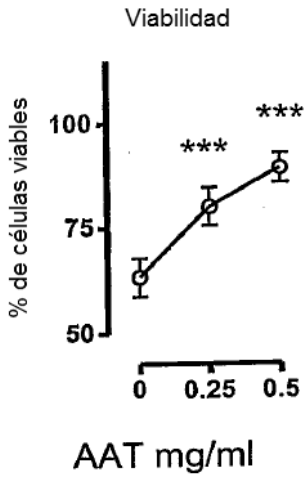


Fig. 4C

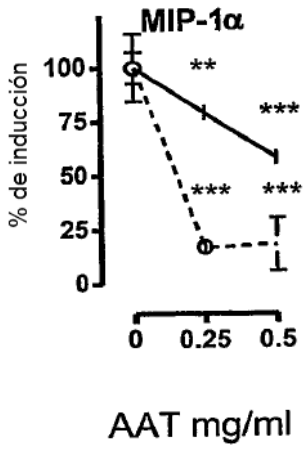


Fig. 4D

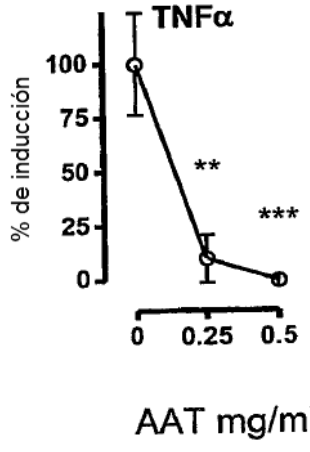


Fig. 4E

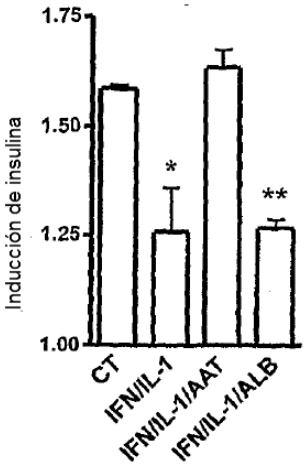


Fig. 4F

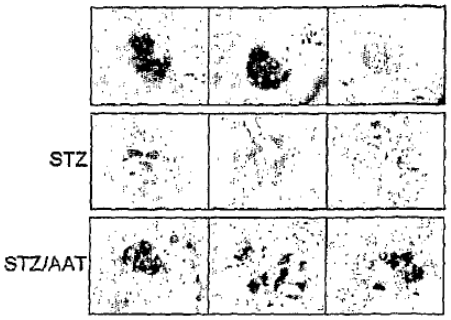


Fig. 4G

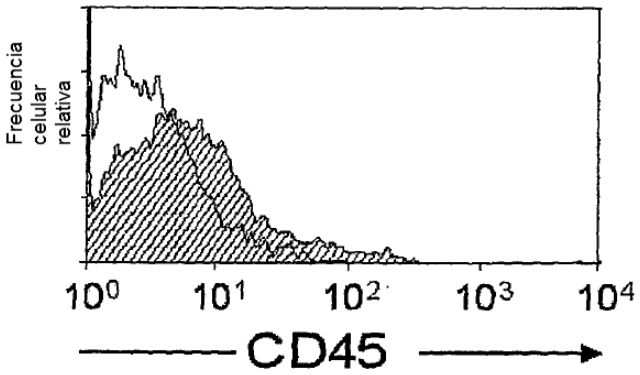


Fig. 4H

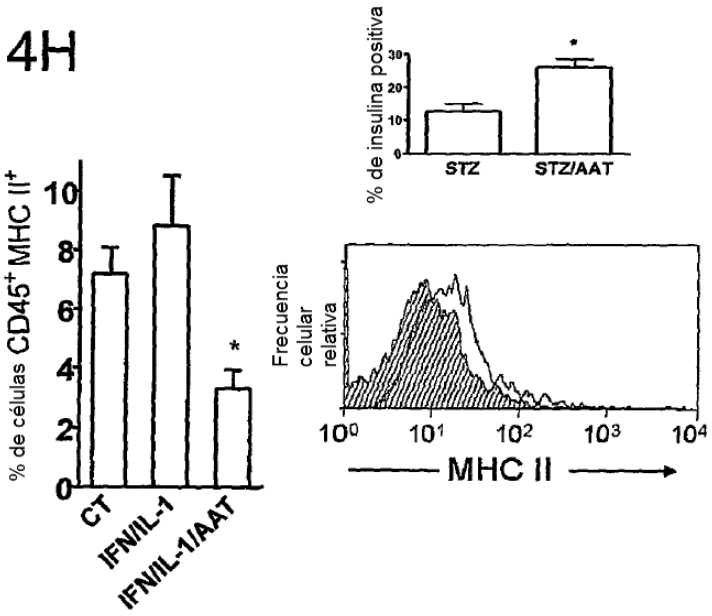


Fig. 5A

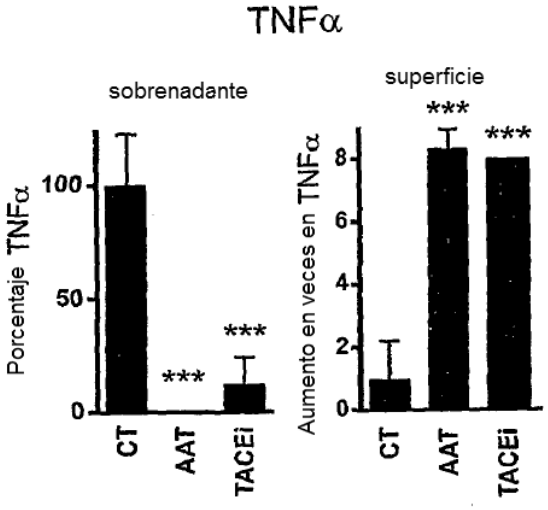

TNFα
sobrenadante
superficie
Porcentaje TNFα
Aumento en veces en TNFα
100
50
0
8
6
4
2
0
***
***
***
CT
AAT
TACEi
CT
AAT
TACEi

Fig. 5B

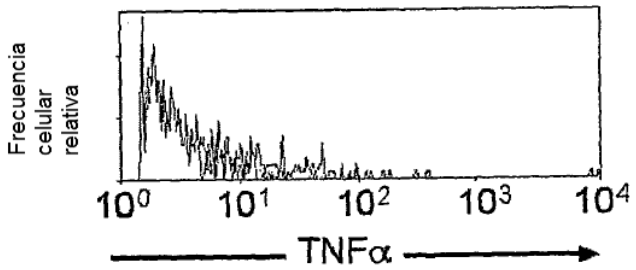

Frecuencia celular relativa
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
TNFα

Fig. 5C

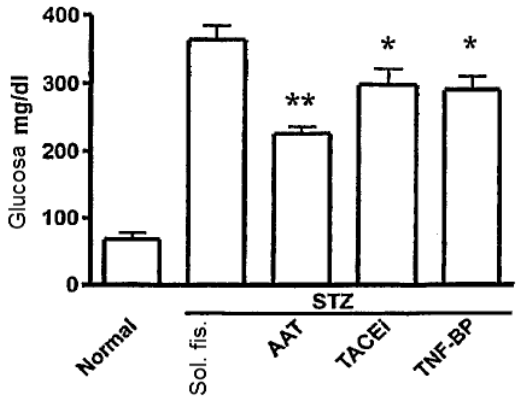

Glucosa mg/dl
400
300
200
100
0
**
*
*
STZ
Normal
Sol. fis.
AAT
TACEI
TNF-BP

Fig. 5D

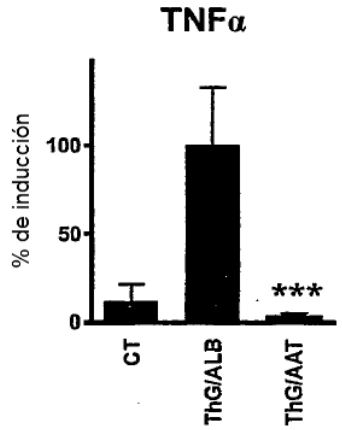

TNFα
% de inducción
100
50
0
***
CT
ThG/ALB
ThG/AAT

Fig. 6A

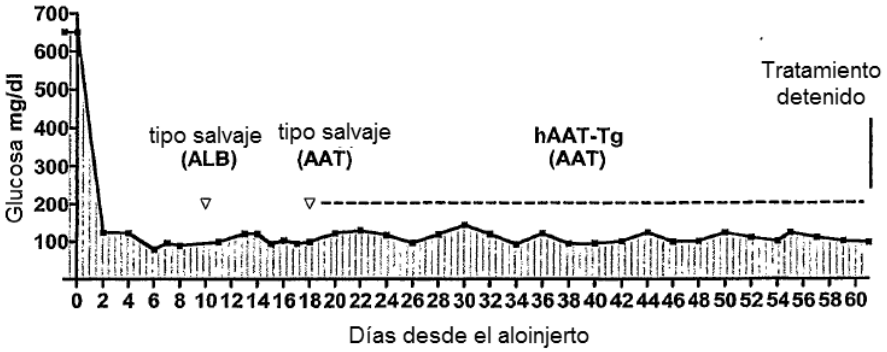
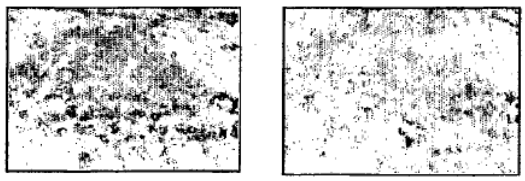

Glucosa mg/dl
700
600
500
400
300
200
100
tipo salvaje (ALB)
tipo salvaje (AAT)
hAAT-Tg (AAT)
Tratamiento detenido
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60
Días desde el aloinjerto

Fig. 6B

Fig. 6C



CD4
(linfocitos)

CD11b
(monocitos / PMN)

Fig. 6D

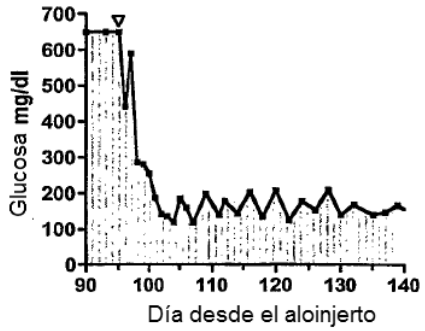
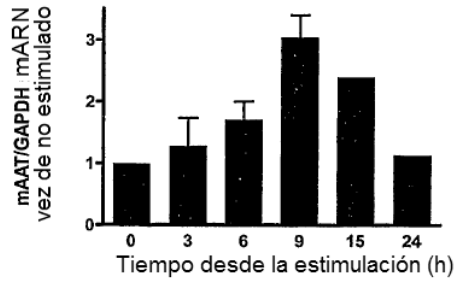


Fig. 7A

Expresión de mAAT inducida por **IL-1β/IFNγ** en islotes



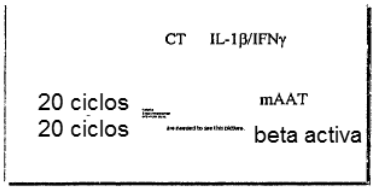
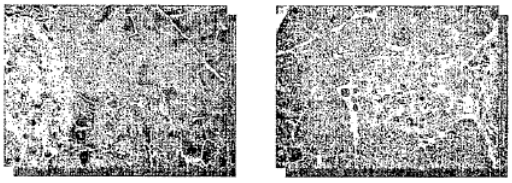


Fig. 7B



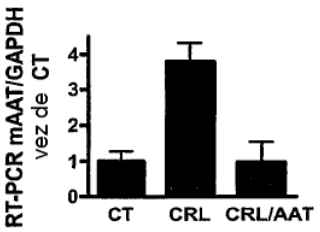


Fig. 7C

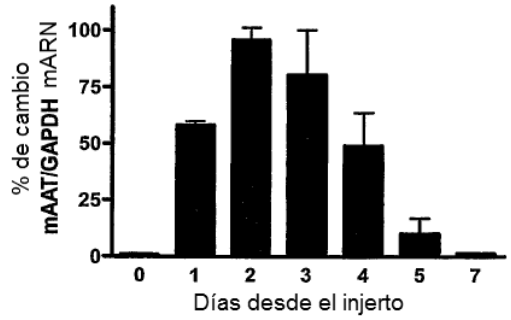


Fig. 7D

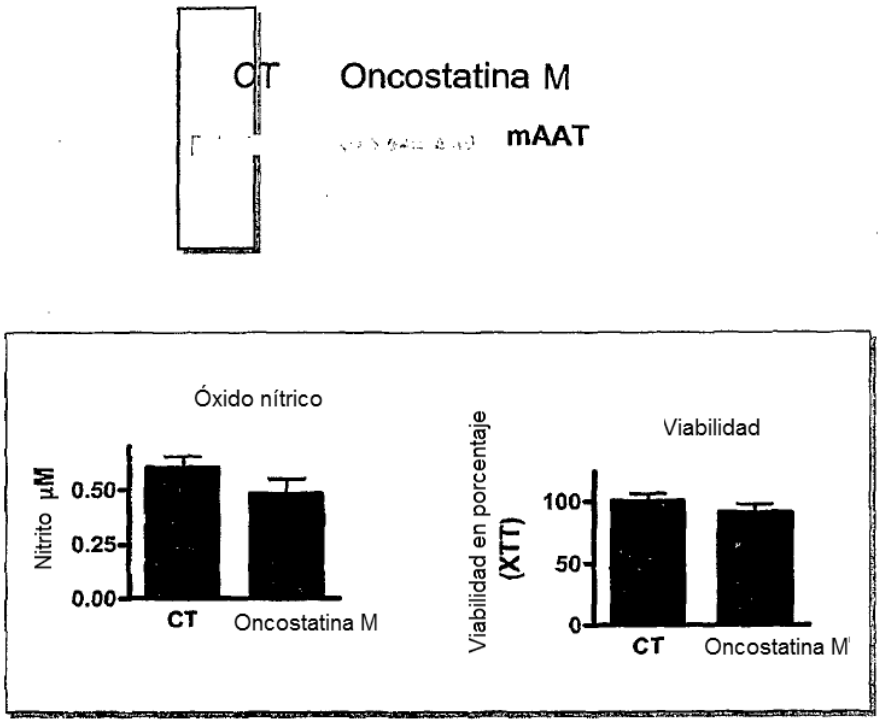

CT
Oncostatina M
mAAT
Óxido nítrico
Nitrito µM
0.50
0.25
0.00
CT
Oncostatina M
Viabilidad
Viabilidad en porcentaje (XTT)
100
50
0
CT
Oncostatina M

Fig. 7E

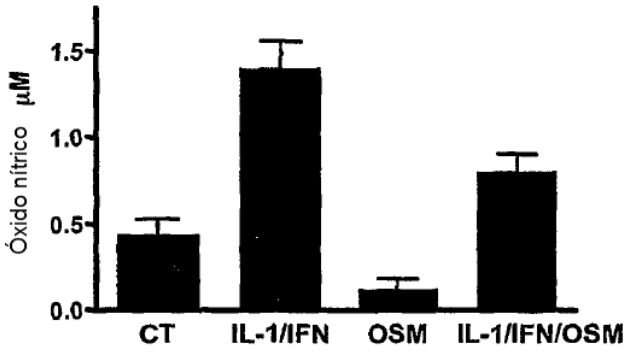

Óxido nítrico µM
1.5
1.0
0.5
0.0
CT
IL-1/IFN
OSM
IL-1/IFN/OSM

Fig. 8A

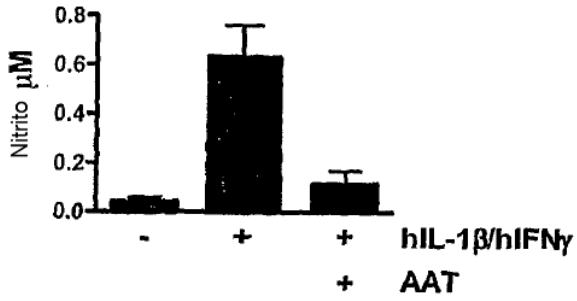

Nitrito µM
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-
+
+
hIL-1β/hIFNγ
+
AAT

Fig. 8B

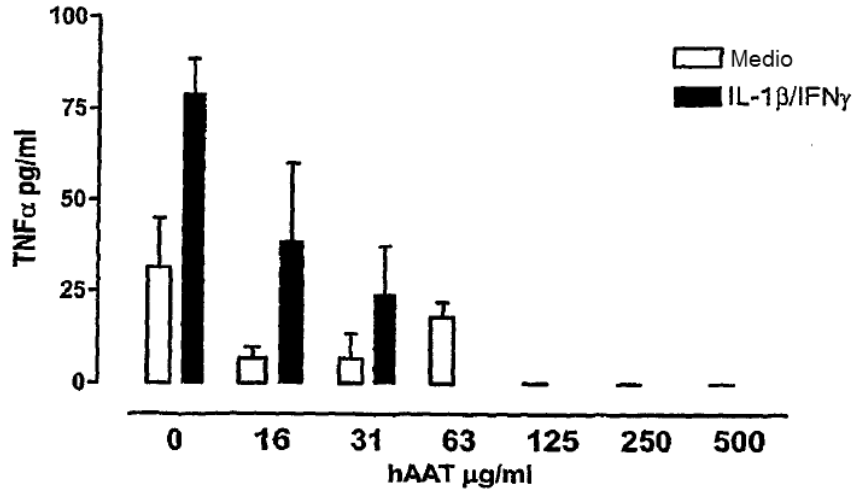

TNFα pg/ml
100
75
50
25
0
Medio
IL-1β/IFNγ
0
16
31
63
125
250
500
hAAT µg/ml

Fig. 8C

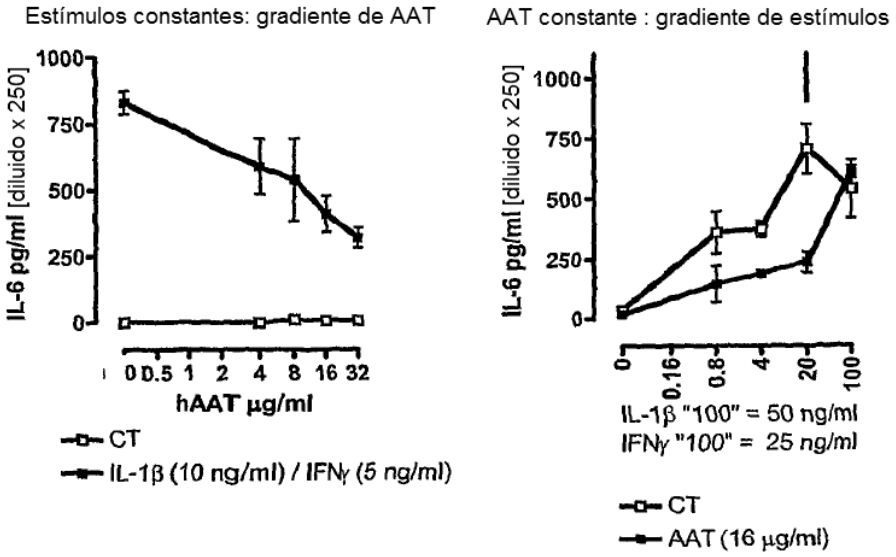
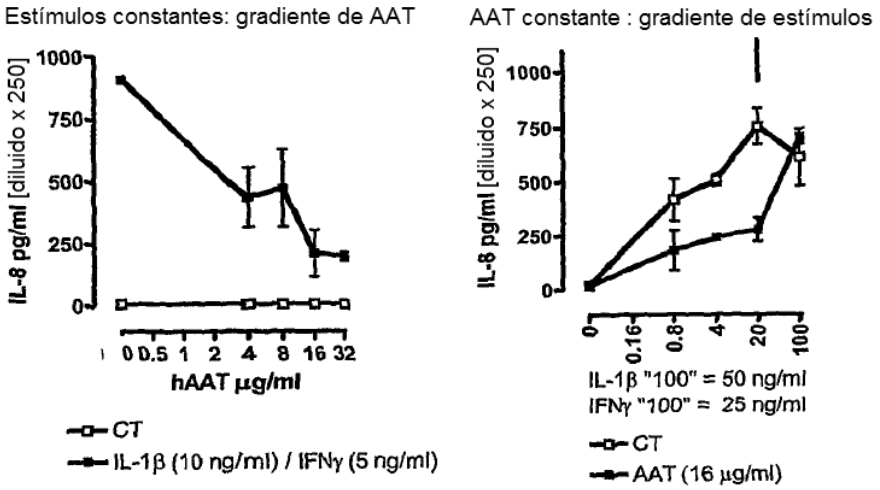

Estímulos constantes: gradiente de AAT
AAT constante : gradiente de estímulos
IL-6 pg/ml [diluido x 250]
1000
750
500
250
0
0 0.5 1 2 4 8 16 32
hAAT µg/ml
CT
IL-1β (10 ng/ml) / IFNγ (5 ng/ml)
0 0.16 0.8 4 20 100
IL-1β "100" = 50 ng/ml
IFNγ "100" = 25 ng/ml
CT
AAT (16 µg/ml)

Fig. 8D


Estímulos constantes: gradiente de AAT
AAT constante : gradiente de estímulos
IL-8 pg/ml [diluido x 250]
1000
750
500
250
0
0 0.5 1 2 4 8 16 32
hAAT µg/ml
CT
IL-1β (10 ng/ml) / IFNγ (5 ng/ml)
0 0.16 0.8 4 20 100
IL-1β "100" = 50 ng/ml
IFNγ "100" = 25 ng/ml
CT
AAT (16 µg/ml)