

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 548**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2007 E 07811339 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2051987**

54 Título: **Uso de CD83 en terapias de combinación**

30 Prioridad:

18.08.2006 US 838812 P

04.05.2007 US 927377 P

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

13.01.2015

73 Titular/es:

ARGOS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

4233 TECHNOLOGY DRIVE

DURHAM, NC 27704, US

72 Inventor/es:

NICOLETTE, CHARLES;

BRAND, STEPHEN;

ZHONG, ZHEN;

WANG, HAO;

ARP, JACQUELINE;

RAMCHARRAN, SIOBHAN y

BAROJA, MIRIN LOREA

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 526 548 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de CD83 en terapias de combinación

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos mejorados para tratar a un sujeto para suprimir o prevenir respuestas inmunológicas no deseadas. Los métodos comprenden el uso de CD83 y hacer tolerante a un sujeto a una composición terapéutica. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para prevenir el rechazo de tejido trasplantado.

10 Antecedentes de la invención

El sistema inmunológico de los mamíferos es capaz de desarrollar una respuesta protectora a un número muy grande de antígenos extraños. Desafortunadamente, esta capacidad de respuesta puede causar dificultades cuando sea dirigida a compuestos que (se destinan) para uso terapéutico –que incluye, por ejemplo, tejido trasplantado, vectores de terapia génica y compuestos (particularmente proteínas) usados para la terapia de ciertos trastornos y enfermedades. Por ejemplo, los pacientes afectados con hemofilia B pueden desarrollar una respuesta inmunológica al factor IX terapéutico así como a un vector de transferencia génica usado para expresar Factor I(X) en estos pacientes (ver, por ejemplo, Dobryzynskiy otros, (2006) Proc. Nat'l. Acad. Sci. E.U.A. 103:4592-4597). De manera similar, los pacientes tratados con anticuerpos terapéuticos (por ejemplo Rituxan[®] y Bexxar[®]) pueden desarrollar una respuesta inmune contra los anticuerpos terapéuticos que los haga inefectivos y presenten un riesgo adicional para el paciente.

Desafortunadamente, los tratamientos actuales para prevenir o eliminar una respuesta inmunológica indeseable típicamente involucran el uso de compuestos que causan una supresión global del sistema inmunológico (ver, por ejemplo, capítulo 14 de Janeway y otros, eds. (2001) Immunobiology (5ª edición, Garland Publishing, Nueva York, NY)). Estos tratamientos ponen al paciente en riesgo de infecciones futuras (ver, por ejemplo, Gottschalk y otros, (2005) Annu. Rev. Med. 56:29-44) y generalmente tienen efectos secundarios indeseables y serios. Algunos estudios que combinaron tratamientos diferentes mostraron que algunas combinaciones realmente exacerban la toxicidad (ver, por ejemplo, Andoh y otros, (1996) Transplantation 62: 311-316). Los tratamientos actualmente disponibles también pueden requerir de tratamiento durante un periodo de tiempo prolongado -en algunos casos (por ejemplo, trasplante de tejido), durante el resto de la vida del paciente.

Existen también muchos otros casos en los que es deseable una supresión enfocada y de tiempo limitado del sistema inmunológico, por ejemplo en el tratamiento de reacciones alérgicas y reacciones de hipersensibilidad (ver, por ejemplo, capítulo 12 de Janeway y otros, eds. (2001) Immunobiology quinta edición, Garland Publishing, Nueva York, NY)), tales como dermatitis por contacto, asma crónica, alergias a fármacos y anafilaxis sistémica. Generalmente, el tratamiento clínico para suprimir estas respuestas también tiene un amplio efecto (ver Janeway y otros, id.). Otro ejemplo se observa con las respuestas mediadas por células B. Las células B son los mediadores principales del rechazo de trasplante mediado por anticuerpos y sirven también como células presentadoras de antígenos. Sin embargo, la terapia actual para prevenir los efectos adversos de una respuesta mediada por células B no deseada se limita a la depleción usando anticuerpos monoclonales (mAb) contra CD20, y no existe una terapia efectiva para prevenir la activación y/o la diferenciación de células B. Otros tratamientos usados actualmente para respuestas inmunológicas indeseables usan inhibidores específicos para bloquear la síntesis o los efectos de mediadores inflamatorios producidos por células cebadas. Algunos tratamientos diseñados para inducir desensibilización involucran la inyección de antígeno(s) específico(s); (se cree que) estos tratamientos desvían la respuesta inmunológica al alérgeno de una respuesta tipo T_H2 a T_H1 por lo que se produce IgG en lugar de IgE. Estos tratamientos han tenido éxito en muchos casos, pero no en todos.

Muchas formas de inmunidad son mediadas por células T, que incluyen linfólisis de células, hipersensibilidad de tipo retardada (DTH), rechazo de trasplantes y rechazo de aloinjertos (ver, por ejemplo, Paul (1993) Fundamental Immunology (Raven Press, Nueva York, Nueva York) tercera edición). El comportamiento de las células T es afectado por las células dendríticas ("DC"), las cuales son las células presentadoras de antígenos profesionales del sistema inmunológico y pueden estimular dramáticamente una respuesta de células T (algunas veces referidas además en la presente como "células dendríticas inmunoestimuladoras"; (ver, por ejemplo, Banchereau y Schmitt, eds. (1995) Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, vol. 2 (Plenum Press, Nueva York); Schuler y otros, (2003) Curr. Opin. Immunol.15:138-147; solicitud de patente de Estados Unidos núm. 10/287,813).

Bajo algunas circunstancias, las células dendríticas también juegan un papel importante en la tolerancia inmunológica. En este contexto, algunas veces son conocidas como "células dendríticas tolerogénicas" (ver, por ejemplo, Steinman y otros (2003) Ann. Rev. Immunol. 21:685-711; Kubach y otros (2005) Int. J. Hematol. 81: 197 —203). Desafortunadamente, las células dendríticas son raras en la sangre periférica, por lo que ciertas aplicaciones pueden necesitar un método ex vivo para producir cantidades terapéuticas de células dendríticas tolerogénicas. Los métodos para elaborar DC

5 inmuoestimuladoras han sido descritos (ver, por ejemplo, la patente de E.U.A No. 6,274,378), pero estas DC no son tolerogénicas. Otros tipos de células también han demostrado tener un papel en tolerancia, incluyendo las "células T reguladoras" (ver, por ejemplo, Boehmer (2005) Nat. Immunol. 6:338-344). Estudios en roedores han demostrado una población única CD4⁺ CD25⁺ de células T reguladoras profesionales (o "supresoras") que de manera activa y dominante evitan tanto la activación como la función efectora de las células T autorreactivas (Sakaguchi y otros, (1995) J. Immunol. 155:1151-1164; Takahashi y otros, (1998) Int.Immunol. 10: 1969-1980; Itoh y otros, (1999) J. Immunol.162:5317-5326). La eliminación o inactivación de estas células T reguladoras ha mostrado dar como resultado enfermedad autoinmunitaria severa y mejorar las respuestas inmunológicas a aloantígenos y tumores (ver además, Shimizuy otros, (1999) J. Immuno]. 163: 5211-5218). Un trabajo reciente identificó a las células T reguladoras en humanos (solicitud de patente de Estados Unidos núm. 10/661,804). La preparación de células T humanas con propiedades reguladoras pero que no son células T CD4⁺ CD25⁺ ha sido reportada además (ver la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 10/618,134).

15 CD83 es una molécula de la superfamilia de proteínas ("Ig") de inmunoglobulina (ver, por ejemplo, Zhou y otros, (1999) J. Immunol. 149:735-742; ver además la patente de Estados Unidos. núm. 7,169,898; para revisión, ver Fujimoto y Tedder((2006) J. Med. Dent. Sci. 53: 86-91). Aunque la función precisa de CD83 sigue por determinarse, una forma soluble de CD83 se ha reportado que se une a células dendríticas y maduras (ver Lechmann y otros, (2001) (J. Exp.Med. 194:1813-1821). Los autores reportaron además que esta proteína redujo la expresión de CD80 y CD83 por células dendríticas maduras *in vitro* y que inhibió la capacidad de las células dendríticas para estimular las células T *in vitro* (ver además, Lechmann y otros, (2002) Trends in Immunology 23: 273-275). Otros han reportado la presencia de una forma soluble de CD83 *in vivo* (ver, por ejemplo, Hock y otros, (2002) Int. Immunol. 13:959-967). Estudios con DC infectadas con HSV-1 demuestran que la infección viral conduce a la degradación de CD83 y a la inhibición del transporte de ARNm de CD83; este posible mecanismo de escape por HSV-1 sustenta aún más la importancia de CD83 para la biología de DC (ver, por ejemplo, Kruse y otros (2000) J. Virol. 74:7127-7136). Kruse y otros (2000) (J. Exp. Med. 191:1581-1589) reportaron que GC7(N(1)-guanil-1,7-diaminoheptano)interfirió con la translocación nucleocitoplásmica del ARNm de CD83, que evita la expresión en superficie de CD83 y que inhibe significativamente la activación de linfocitos T por estas DC.

20 CD83 es una glicoproteína de cadena simple de aproximadamente 45 kDa, y la forma inmadura de CD83 incluye un péptido de señal que es removido después de la inserción de la proteína en la membrana. La CD83 maduro incluye tres dominios estructurales: un dominio extracelular; un dominio de transmembrana y un dominio citoplásmico (ver, por ejemplo WO 2004/046182, que identifica correctamente el dominio extracelular). El dominio extracelular de CD83 comprende un dominio único tipo Ig (tipo V) el cual es codificado por al menos dos exones (ver, por ejemplo, Zhou y otros (1999) J. Immunol. 149:735-742; GenBank ID #Z11697) y se expresa de manera muy fuerte sobre la superficie celular de las células dendríticas maduras nativas ("mDC").

35 La patente de Estados Unidos núm. 5,316,920 y el documento WO 93/21318 correspondiente describen una proteína CD83 (referida como "HB15") y las "secuencias de ADNc que codifican para la proteína HB15 o porciones de la misma, que incluyen cualquiera de sus dominios específicos, fragmentos de unión a ligando o fragmentos inmunoespecíficos" (columna 2, líneas 23-25). La patente describe además el uso de "anticuerpos reactivos con HB15 y los métodos para usar anticuerpos anti-HB15, u otros antagonistas de la función de HB15, para tratar un trastorno, una enfermedad o un síndrome inmunológico" (ver resumen). La patente especula además (columna 3, líneas 6-12) que "[l]a proteína HB15, los fragmentos inmunoespecíficos o de unión a ligando o dominios específicos de la misma, u otros antagonistas de HB15 que interfieren con la función de HB15, pueden usarse terapéuticamente para modificar o inhibir el desarrollo o la progresión de una respuesta inmunológica o interacción celular, o suministrar fármacos, toxinas, o agentes de formación de imágenes a células que expresan HB 15.

45 La patente de Estados Unidos núm. 5,710,262 (una continuación en parte de la solicitud que fue concedida como patente de Estados Unidos núm. 5,316,920) y el WO 95/29236 correspondiente están dirigidas a proteínas CD83 y analizan la comparación entre proteínas humanas y de ratón (columna 2, líneas 46-48). Estas patentes y la solicitud están dirigidas además a "métodos para producir HB15 humana o un homólogo de mamífero de HB15"(columna 3, líneas 5-6), la producción de anticuerpos (columna 4, líneas 35-37), y el uso de un anticuerpo HB15 para "suministrar fármacos, toxinas o agentes de formación de imágenes a células que expresen HB15" (columna 4, líneas 15 38-39).

50 El documento WO 97/29781 se dirige a "un método para estimular una respuesta inmunológico humoral, que comprende administrar un reactivo de CD83 y un antígeno, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la CD83 estimula la producción de anticuerpos específicos a antígenos" (página 1). La solicitud establece que "[e]n una modalidad preferida, los reactivos de CD83 son moléculas de ADN que codifican y péptidos de CD83 que comprenden, el dominio extracelular de CD83" (página 2). La solicitud analiza además el uso de anticuerpos CD83 para inhibir respuestas específicas de antígeno indeseables en un mamífero y establece que "tales métodos...son útiles en el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunes así como también el rechazo al trasplante de tejido u órgano, y al tratamiento o la prevención de la alergia o el asma" (pág. 3).

El documento WO 2004/046182 y la patente de Estados Unidos núm. 7,169,898 correspondiente (ambas de las que se incorporan en la presente en su totalidad a manera de referencia) identifican correctamente al dominio extracelular de CD83 y sugieren “el uso de una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83...para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección médica causada por la disfunción o función no deseada de una respuesta inmunológica celular que involucra a las células dendríticas, las células T, y/o las células B” (WO 2004/046182, página 7). La solicitud de PCT establece (páginas 15 12) que una forma de CD83 indujo un patrón de expresión de marcadores superficiales alterado en las células dendríticas inmaduras y maduras. Además, las “formas solubles de los miembros de la familia de proteínas CD83 de la presente invención son capaces de alterar la interacción de células dendríticas con las células T y/o las células B y/o inhibir la formación de agrupaciones de células T dendríticas.” (página 14; ver además Sénéchal y otros(2004) Blood 103:4207-4215). La solicitud describe además que los ratones tratados con hCD83ext no desarrollaron la parálisis típica asociada con encefalitis automonológica experimental (“EAE”) (página 12; ver además Zinser y otros(2004) J. Exp. Med. 200: 345-351

En vista de lo anterior, los solicitantes reconocieron una necesidad de tratamientos seguros y efectivos que puedan suprimir una respuesta inmunológica a una composición particular sin producir supresión global de la respuesta inmunológica y sin causar otro daño al paciente.

Resumen de la invención

En un aspecto la invención proporciona un CD83 soluble para usar para prevenir, curar, o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad o desorden causado por la disfunción o la función no deseada de una respuesta inmunológica en combinación con un primer compuesto inmunosupresor, en donde dicho primer compuesto inmunosupresor se selecciona de ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, y un mAb anti-CD45RB, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona de un grupo que consiste de una alergia, asma; rechazo de tejido trasplantado; una respuesta inmunológica para una sustancia administrada de manera crónica; una enfermedad autoinmunitaria; y SIDA

En un aspecto adicional la invención proporciona una combinación de CD83 soluble y un primer compuesto inmunosupresor para usar para prevenir, curar, o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad o desorden causado por la disfunción o la función no deseada de una respuesta inmunológica en combinación con un primer compuesto inmunosupresor, en donde dicho primer compuesto inmunosupresor se selecciona de ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, y un mAb anti-CD45RB, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona de un grupo que consiste de una alergia, asma; rechazo de tejido trasplantado; una respuesta inmunológica para una sustancia administrada de manera crónica; una enfermedad autoinmunitaria; y SIDA

En un aspecto adicional la invención proporciona el uso de una combinación de CD83 soluble y un primer compuesto inmunosupresor para tratar un tejido a ser trasplantado luego de eliminarlo de un donante y antes del trasplante, en donde dicho primer compuesto inmunosupresor se selecciona de ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, y un mAb anti-CD45RB.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 (ver Ejemplo 2) muestra la absorción de [³H]-timidina en un ensayo de proliferación de células T como una función de la concentración de hemocianina de lapa en forma de cerradura (KLH) que se administró a los ratones de los que se derivaron las células. Brevemente, los animales se trataron con sCD83 y luego se inyectaron con KLH; después de 28 días, las células esplénicas se removieron y se reestimularon con diferentes dosis de KLH. La incorporación de ³H-timidina se muestra como una función de la concentración de KLH (µg/ml) para células obtenidas de animales que se trataron con sCD83 (diamantes) así como también para animales de control que no se trataron (cuadrados) o se trataron con BSA (triángulos).

La figura 2 muestra la absorción de [³H]-timidina de un ensayo de proliferación de células T como una función de la concentración de hemocianina de lapa en forma de cerradura (KLH) que se administró a los ratones de los que se derivaron las células (ver Ejemplo 3). Brevemente, los animales se trataron con sCD83 y luego se inyectaron con KLH; después de 10 días, las células del bazo se removieron y se reestimularon con diferentes dosis de KLH. La incorporación de ³H-timidina se muestra como una función de la concentración de KLH (µg/ml) para células obtenidas de animales que se trataron con sCD83 (diamantes) así como también para animales de control que se inocularon en falso (triángulos).

La figura 3 muestra la absorción de [³H]-timidina en un ensayo de proliferación de células T como una función de la concentración de hemocianina de lapa en forma de cerradura que se administró a los ratones de los que se derivaron las células (ver Ejemplo 3). Brevemente, los animales se trataron con sCD83 y luego se inyectaron con KLH; después de 22 días, las células del bazo se removieron y se reestimularon con diferentes dosis de KLH. La incorporación de ³H-timidina se muestra como una función de la concentración de KLH (µg/ml) para células obtenidas de animales que se trataron con sCD83 (diamantes) así como también para animales de control que se inocularon en falso (triángulos).

La figura 4 muestra el resultado de un experimento descrito en el Ejemplo 5 y demuestra que la CD83 soluble ("sCD83") suprime la proliferación *ex vivo* de células B.

5 La figura 5 muestra los resultados de un experimento descrito en el Ejemplo 5 y demuestra que sCD83 suprime la producción de anticuerpos *ex vivo* por las células B del receptor del trasplante. Los asteriscos indican que $p < 0.01$.

10 La figura 6 muestra los resultados de un experimento descrito en el ejemplo 7 y demuestra que sCD83 puede prevenir la inducción de una respuesta de alo-anticuerpos por células Ba antígenos extraños.

La figura 7 muestra los resultados de un experimento descrito en el Ejemplo 8 y demuestra que la coadministración de sCD83 con sirolimus ("Rapa") y anticuerpo monoclonal anti- CD45RB proporcionó supervivencia a largo plazo de tejido cardíaco trasplantado.

15 La figura 8 muestra los resultados de un experimento descrito en el Ejemplo 8 y demuestra que la coadministración de sCD83 con sirolimus ("Rapa") y anticuerpo monoclonal anti-CD45RB inhibió la maduración de DC en receptores de trasplantes. Los asteriscos indican que $p < 0.05$.

20 La figura 9 muestra los resultados de un experimento descrito en el Ejemplo 8 y, al igual que la figura 9, demuestra que la coadministración de sCD83 con sirolimus

("Rapa") y anticuerpo monoclonal anti-CD45RB inhibió la maduración de DC en receptores de trasplantes. Los asteriscos indican que $p < 0.01$.

25 La figura 10 muestra los resultados de un experimento descrito en el Ejemplo 8 y demuestra que la coadministración de sCD83 con sirolimus ("Rapa") y anticuerpo monoclonal anti-CD45RB generó células T reguladoras en receptores de trasplante. Los asteriscos indican que $p < 0.01$.

30 La figura 11 muestra los resultados de un experimento descrito en el Ejemplo 9 y demuestra que sCD83 suprimió *in vitro* la producción de TNF- α y la expresión en superficie de marcadores de activación mDC por mDC de monos cinomolgos.

La figura 12 muestra los resultados de un experimento descrito en el Ejemplo 9 y demuestra que sCD83 suprimió moderadamente *in vitro* la producción de TNF- α y la expresión en superficie de marcadores de activación de monocitos.

35 La figura 13 muestra los resultados de un experimento descrito en el Ejemplo 9 e indica que sCD83 promovió la generación de células T reguladoras. El eje vertical muestra el porcentaje de células $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$

La figura 14 muestra los resultados de un experimento descrito en el Ejemplo 9 e indica que los números incrementados de células T reguladoras se generaron por las células dendríticas tratadas con CD83 soluble.

40 Descripción detallada de la invención

La invención describe métodos para el uso de CD83 para tratar un sujeto. Los métodos descritos en la presente incluyen el uso de CD83 en combinación con al menos algún otro compuesto inmunosupresor. Se describen métodos que usan CD83 en combinación con al menos algún otro compuesto inmunosupresor; además se describen composiciones que comprenden CD83 y al menos algún otro compuesto inmunosupresor. Los métodos de la invención incluyen métodos que usan CD83 con al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco o más compuestos inmunosupresores.

50 En algunas modalidades, los métodos descritos en la invención comprenden además el uso de otros compuestos. Por ejemplo, en algunas modalidades, al menos una composición terapéutica se coadministra a un sujeto con CD83 para hacer tolerante al sujeto a la(s) composición(es) terapéutica(s). En algunas modalidades, los métodos descritos en la invención comprenden hacer tolerante a un sujeto mediante la coadministración al sujeto de CD83 y al menos algún otro compuesto inmunosupresor junto con al menos una composición terapéutica. Los métodos pueden usarse, por ejemplo, para inducir tolerancia a la al menos una composición terapéutica o para prevenir o reducir la severidad de enfermedades autoinmunitarias. La composición terapéutica puede ser tejido trasplantado. Así, en algunas modalidades, los métodos descritos en la invención se usan para prevenir el rechazo de tejido trasplantado.

60 La invención proporciona además métodos para hacer tolerante a un sujeto que comprende la producción de células dendríticas tolerogénicas por medio de la maduración en presencia de CD83 y al menos algún otro compuesto inmunosupresor ya sea *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, *ex vivo*). Las células dendríticas tolerogénicas se usan para producir células T reguladoras. Las células dendríticas tolerogénicas y las células T reguladoras de la invención pueden producirse *in*

5 *vivo* o *ex vivo*; las células producidas *ex vivo* pueden administrarse después a un sujeto. Las células dendríticas tolerogénicas y las células T reguladoras pueden ser autólogas o pueden derivarse de células madre. Las composiciones y métodos pueden usarse para la tolerabilidad (hacer tolerante a) antígenos así como también para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección médica (por ejemplo, un trastorno) causado por la disfunción o la función no deseada de una respuesta inmunológica, en donde se administra a un sujeto una cantidad eficaz de CD83 y al menos algún otro compuesto inmunosupresor.

10 La invención describe la tolerancia completa de un sujeto a una composición terapéutica. En algunas modalidades, los objetos de la invención incluyen la tolerabilidad completa de un sujeto a una composición terapéutica. En algunas modalidades, los objetos de la invención incluyen la prevención, cura, reducción y/o alivio de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno causado por la disfunción o función alterada de una respuesta inmunológica. Un sujeto se considera que es tolerante y/o que ha sido inmunosuprimido (es decir, se considera que se indujo o adquirió la tolerancia inmunológica) si se logra al menos uno de estos objetivos. Así, "hacer tolerante" a un sujeto o inducir "inmunosupresión" según se usa en la presente significa que al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno causado por la disfunción o función no deseada de una respuesta inmunológica que involucra células dendríticas, células B o células T se previene, se cura, se reduce o se alivia en comparación con un control sin tratar u otro control apropiado (por ejemplo, en comparación con el síntoma antes del tratamiento o con la severidad esperada del síntoma sin tratamiento, si el tratamiento se destina para prevenir el desarrollo de o reducir la severidad de una respuesta inmunológica). Los expertos en la materia están familiarizados con la selección y aplicación de métodos de medición y evaluación de los síntomas así como también con la selección de controles apropiados.

15 Así, se considera que un sujeto es tolerante y/o se considera que la inmunosupresión ha ocurrido cuando al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno causado por la disfunción o función no deseada de una respuesta se reduce o alivia en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 100% en comparación con un control adecuado. En modalidades en las que el tratamiento está diseñado para reducir el riesgo de que un sujeto desarrolle un trastorno autoinmunitario, el riesgo se reduce o se alivia en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 100% en comparación con un control adecuado; esta evaluación se puede llevar a cabo estadísticamente en una población de sujetos. En modalidades en las que el tratamiento se destina para hacer tolerante a un sujeto a una composición terapéutica, una función no deseada de una respuesta inmunológica se reduce en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 100% en comparación con un control adecuado; esta evaluación puede realizarse estadísticamente en una población de sujetos. Cuando el tratamiento se destina para hacer tolerante un sujeto a una composición terapéutica, una función no deseada de una respuesta inmunológica se reduce por al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 100% en comparación con un control adecuado. En otras modalidades, los objetivos de la invención incluyen la producción de células dendríticas tolerogénicas, en estas modalidades, "síntoma" se refiere a un parámetro de comportamiento de las células ya sea *in vivo* o *in vitro*.

20 Los métodos descritos en la invención son útiles para propósitos terapéuticos y por lo tanto se destinan para prevenir, curar, o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno causado por la disfunción o la función no deseada de una respuesta inmunológica. Un síntoma de una enfermedad o trastorno que se considera es reducido o aliviado si el síntoma es reducido, incrementado o mejorado, según sea adecuado, en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90% o más en comparación con un control adecuado, tal como en comparación con el síntoma antes del tratamiento o en comparación con la severidad esperada del síntoma, en donde el tratamiento se destina para ser preventivo. Alguien capacitado en la técnica está familiarizado con las técnicas y criterios para evaluar cambios en los síntomas. Los síntomas de enfermedades o trastornos causados por la disfunción o función no deseada de una respuesta inmunológica son conocidos para aquellos con experiencia en la técnica e incluyen los siguientes: histología anormal de un tejido de trasplantado; función anormal de un tejido trasplantado; longitud breve de tiempo de supervivencia después de un evento tal como, por ejemplo, el diagnóstico o trasplante; un nivel o número anormalmente o indeseablemente alto o bajo de proteína(s) indicadora(s) y otro(s) compuesto(s) en la sangre, tales como anticuerpos no deseados o células no deseadas (por ejemplo, células dendríticas específicas de antígenos o células T); un nivel o número anormalmente o indeseablemente alto o bajo de células T reguladoras, de manera que se inicia una respuesta inmunológica no deseada.

25 Cuando sea adecuado, la tolerabilidad o tolerancia *in vivo* y/o inmunosupresión pueden medirse usando ensayos *in vitro*, tales como, por ejemplo, en una reacción de linfocitos mixta usando células aisladas de un sujeto. En forma similar, la tolerabilidad o tolerancia y/o inmunosupresión logradas en células *ex vivo* también se pueden medir en ensayos *ex vivo* usando varios tipos de células tales como, por ejemplo, células dendríticas, células T o células B. Si la tolerabilidad o tolerancia y/o inmunosupresión se mide usando un método *ex vivo*, se considera que ha ocurrido la tolerabilidad o tolerancia si la respuesta de las células a un estímulo inmunológico se reducen al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90% o más en comparación con un control adecuado. Los ensayos adecuados miden directa o indirectamente una respuesta inmunológica y se conocen en la técnica; incluyen, pero no están limitados a: ensayos de reacción linfocítica mixta, ensayos de citotoxicidad; ensayos de títulos de anticuerpos; ensayos para la producción de IL-10; ensayos para la producción de TGF- β ; evaluación de marcadores de superficie celular; y ensayos para la expresión de Foxp3.

El término "CD83 soluble" o "sCD83" según se usa en la presente se refiere a una molécula proteica que comprende al menos una porción del dominio extracelular de un miembro de la familia de proteínas CD83. En algunas modalidades, una proteína CD83 soluble no tiene una secuencia de aminoácidos que sea capaz de anclar la molécula a la membrana de una célula en la que se expresa. Por ejemplo, una proteína CD83 soluble puede incluir residuos adicionales de la proteína CD83 nativa de longitud completa que estén fuera del dominio extracelular. La proteína CD83, su secuencia de ácido nucleico y su estructura se conocen en la técnica. La secuencia de ácido nucleico de CD83 humana (como la mostrada en GenBank No. de registro Z11697) se describe en SEQ ID NO:1. Esta secuencia incluye una secuencia de codificación de la posición 11 a 628 (incluyendo el codón de terminación) y un péptido señal de la posición 11 a 67. La secuencia que codifica para el péptido CD83 maduro se extiende de la posición 68 a 625. Los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción están presentes al inicio y al final de la secuencia (en las posiciones 1 a 6 y 1755 a 1760). La secuencia de aminoácidos de la CD83 humana (como la mostrada en GenBank No. de registro Q01151 y codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO:1) se muestra en la SEQ ID NO:2.

Se ha descrito que el dominio extracelular de CD83 incluye los aminoácidos 20 a 144 de la proteína nativa de longitud completa. La secuencia de aminoácidos de CD83 de longitud completa se muestra en la SEQ ID NO:2 y los aminoácidos 20 a 44 de la CD83 de longitud completa se muestran en la SEQ ID NO:4. La porción de la secuencia de ácido nucleico de CD83 que codifica el dominio extracelular se muestra en la SEQ ID NO:3. Ver también, por ejemplo, Zhou y otros, (1992) J. Immunol. 149:735-742; GenBank No. de registro Z11697; y SwissProt No. reg. Q01151; WO 2004/046182, incorporado en la presente a manera de referencia en su totalidad.

Una proteína CD83 está "unida a membrana", es decir, comprende al menos una porción del dominio extracelular de un miembro de la familia de proteínas CD83 y también comprende una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es capaz de anclarla a una membrana, tal como la membrana de una célula. Según se usa en la presente, el término "CD83" abarca CD83 soluble y CD83 unida a membrana.

En algunas modalidades, una proteína CD83 tendrá al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o más de identidad de secuencia con la porción correspondiente de la secuencia de la proteína CD83 humana mostrada en la SEQ ID NO:2) y/o SwissProt No. reg. Q01151. Así, el término "CD83" abarca la proteína CD83 murina (también llamada "HB15"; ver, por ejemplo, Berchtold y otros, (1999) FEBS Lett. 461:211-216). Una proteína CD83 comprende un fragmento de al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 75, 100, o más aminoácidos consecutivos de la proteína CD83 nativa, de longitud completa, o comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más identidad de secuencia con ese fragmento. Generalmente, "identidad de secuencia" según se usa en la presente se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias determinada usando el bien conocido programa de alineación BLAST con parámetros determinados según sea adecuado para el tipo de secuencias (es decir, nucleótidos o aminoácidos). Los programas alternativos son BLASTN y BLASTP; los detalles de estos programas se conocen en la técnica y pueden encontrarse en el sitio de red del NCBI (Centro Nacional para Información de Biotecnología).

En algunas modalidades, "CD83 soluble" o "sCD83" según se usa en la presente se refiere a un epítipo que comprende al menos una porción del dominio extracelular de un miembro de la familia de proteínas CD83 en donde el epítipo estimula una respuesta inmunológica contra sí mismo, por ejemplo, cuando es administrado a un sujeto. En estas modalidades, la respuesta inmunológica contra el epítipo que es sCD83 puede imitar las actividades y efectos descritos en la presente para sCD83. Es decir, la respuesta inmunológica contra el epítipo que es sCD83 puede tener la actividad de una sCD83 que comprenda el dominio extracelular de CD83 nativa, o la respuesta inmunológica contra el epítipo que sea sCD83 puede tener un efecto en un sujeto al cual se le administre que sea similar al efecto producido por la administración de sCD83 que comprende el dominio extracelular de CD83 nativa. En estas modalidades, la actividad o efecto de CD83 en un ensayo o en un sujeto pueden ser el resultado de una respuesta inmunológica contra el epítipo o puede resultar de la actividad de la propia CD83, o ambas.

La CD83 para usarse en la invención puede ser un dímero o multímero de la proteína CD83. La dimerización o multimerización pueden producirse a través de la formación de uno o más enlaces de disulfuro entre los residuos de cisteína presentes dentro de la forma monomérica de la proteína CD83 (los cuales están presentes, por ejemplo en las posiciones 12, 27, 35, 100, 107, 129 y 163 de la proteína nativa), o por medio de una molécula enlazadora bifuncional (por ejemplo, una diamina, un compuesto de ácido dicarboxílico o similares), que conecta las mismas o diferentes porciones funcionales (por ejemplo, grupos carboxi, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos tioles, etc.) dentro de la forma monomérica de la proteína CD83. Esta última incluye también el uso de enlazadores polipeptídicos (por ejemplo, de pequeños residuos de aminoácidos polares tales como -(Gly)_xSer)_y- (en donde x es, por ejemplo, 3 ó 4 y y es, por ejemplo, 1 a 5)) para producir estructuras dimericas que puedan ser producidas directamente por técnicas recombinantes. En algunas modalidades, CD83 para usarse en la invención es un homodímero u homomultímero (por ejemplo, sCD83 que comprende los residuos de aminoácido 20 a 144 de la proteína CD83 nativa (es decir, SEQ ID NO:2) conectado por medio de un enlace disulfuro entre

el quinto residuo de cisteína de la CD83 soluble (es decir, el residuo de cisteína que corresponde al aminoácido 129 en la proteína nativa).

5 En algunas modalidades, CD83 puede ser un monómero; en esas modalidades, uno o más de los residuos de cisteína nativos de CD83 pueden ser reemplazados por otro residuo de aminoácido, por ejemplo, un residuo de aminoácido pequeño y/o polar. En algunas modalidades, de preferencia los residuos de aminoácidos pequeños y/o polares se seleccionan de serina, alanina, glicina, valina, treonina, etc. Cuando CD83 es un monómero, en algunas modalidades, al menos un residuo de cisteína de la proteína CD83 ha sido reemplazado, tal como, por ejemplo, el residuo de cisteína que corresponde a la posición 129 de la proteína nativa de longitud completa puede ser reemplazado con alanina.

10 En algunas modalidades, el término "CD83 soluble" o "sCD83" abarca también proteínas de fusión de al menos una porción del dominio extracelular de CD83 y fragmentos funcionales y derivados (ver, por ejemplo, WO 2004/046182). Las proteínas de fusión adecuadas incluyen al menos una porción del dominio extracelular de CD83 y al menos algún otro péptido o proteína, siempre y cuando la proteína de fusión conserve la actividad CD83 definida en la presente. Así, en algunas modalidades, la proteína de fusión comprenderá por lo menos una porción del dominio extracelular de CD83.

15 Estas proteínas o péptidos se conocen en la técnica. En algunas modalidades, las proteínas que comprenden residuos adicionales de CD83 fuera del dominio extracelular son abarcadas por el término "CD83 soluble". Así, los derivados adecuados incluyen, pero no están limitados a, proteínas que tienen secuencias adicionales unidas al C o N terminal, por ejemplo, aquellas que portan parte de un dominio de transmembrana en su C terminal o que portan en el N terminal un péptido corto (por ejemplo, Gly- Ser-Pro-Gly, que puede resultar del corte de un sitio de trombina por la trombina, por ejemplo, como un producto de una proteína de fusión manipulada por ingeniería genética; o un péptido corto que resulte de un fragmento de GST después del corte de una proteína de fusión). En algunas modalidades, sCD83 consiste en o incluye los aminoácidos 20 a 145 de la proteína nativa, de longitud completa (SEQ ID NO:2), que incluye el dominio extracelular y un aminoácido adicional en el C terminal. En otras modalidades, sCD83 consiste en los aminoácidos 20-143 de la SEQ ID NO:2.

20 La actividad de CD83 para usarse en la presente invención puede evaluarse por métodos conocidos en la técnica. Se dice que una proteína CD83 tiene "actividad CD83" si exhibe al menos una actividad de la proteína CD83 nativa, de longitud completa medida por cualquier ensayo adecuado. Se dice que una proteína CD83 tiene "actividad CD83" si en este ensayo tiene al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de la actividad de la proteína CD83 nativa, de longitud completa medida en el mismo ensayo. De preferencia, la proteína CD83 para usarse en la presente invención es capaz de unirse a células dendríticas inmunoestimuladoras maduras y reducir la capacidad de estas células dendríticas para estimular la proliferación de células T. En algunas modalidades, CD83 reprimirá o reducirá TNF- α en DC maduras o monocitos, por ejemplo, en los ensayos descritos en el ejemplo 9. Esta actividad puede evaluarse directa o indirectamente y puede medirse in vivo o *in vitro*; se conocen en la técnica los ensayos adecuados e incluyen, por ejemplo, un ensayo mixto de reacción de linfocitos, o "MLR" (ver, por ejemplo, Kruse y otros, (2000) J. Virol. 74:7127-7136; Lechmann y otros, (2001) J. Exp. Med. 194:1813-1821). Así, la proteína CD83 para usarse en la invención puede reducir la capacidad de las células dendríticas inmunoestimuladoras maduras para estimular la proliferación de células T en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90%, o más en comparación con un control adecuado tal como, por ejemplo, una interacción entre células dendríticas inmunoestimuladoras maduras y células T en ausencia de sCD83. En algunas modalidades, CD83 es un epítipo y tiene la actividad de estimular una respuesta inmunológica. Esta actividad puede evaluarse identificando los anticuerpos anti-CD83 producidos en respuesta a la CD83 en un ensayo in vitro o después de su administración a un sujeto.

25 En algunas modalidades, la proteína CD83 para usarse en la invención puede reducir la expresión de TNF- α , CD80 y/o CD83 por células dendríticas inmunoestimuladoras maduras in vitro en presencia de CD83 soluble durante al menos una etapa del proceso de maduración en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% o más en comparación con un control adecuado (ver, por ejemplo, Lechmann y otros, (2001) J. Exp. Med. 194: 1813-1821; WO 2004/046182; ejemplo 9). De esta manera, se puede decir que la CD83 ha cambiado la expresión de marcadores de superficie celular, es decir, ha alterado el inmunofenotipo de las células tratadas. Se entiende por aquellos con experiencia en la técnica que las técnicas usadas comúnmente para el análisis de la expresión de marcadores de superficie celular (por ejemplo, análisis FACS) algunas veces pueden producir datos que representen poblaciones mixtas de células, y se debe tener cuidado de identificar qué poblaciones pueden estar representadas en un conjunto de datos en particular.

30 Otros miembros de la familia de proteínas CD83 pueden obtenerse al hibridar un ácido nucleico que comprenda, por ejemplo, toda o parte de la región de codificación de CD83 humana que codifique la porción extracelular a varias fuentes de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN genómico, ADNc o ARN) de otros animales, tales como mamíferos, o de otros tejidos del mismo organismo. CD83 y otras proteínas usadas en los métodos y composiciones de la invención pueden producirse y purificarse mediante cualquier método adecuado. Los métodos para producir, purificar y manipular varias proteínas y derivados de las mismas así como ácidos nucleicos que codifican para éstas también se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.); ver también la patente de Estados Unidos núm. 7,169,898; la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 10/382,397; y la

solicitud de patente de Estados Unidos núm. 10/535,522.

5 En algunas modalidades, CD83 se administra a un sujeto al proporcionar al sujeto un ácido nucleico que codifica para una proteína CD83. Por ejemplo, CD83 podría administrarse a un sujeto como un fragmento de ADN que comprenda los nucleótidos 58 a 432 de la SEQ ID NO:1 de la patente de Estados Unidos núm. 7,169,898, o como el ARNm correspondiente (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,015,204). En forma similar, en algunas modalidades, CD83 se proporciona a células *in vitro* o *in vivo* al transformar una célula hospedera (es decir, una célula) con un ácido nucleico que codifique para una proteína CD83; la célula hospedera transformada puede expresar entonces la proteína CD83, proporcionando de esta manera la proteína CD83 a otras células así como a sí misma (es decir, la célula hospedera transformada). En esas modalidades, las células hospederas adecuadas incluyen las células dendríticas. En modalidades en las que CD83 se proporciona como un ácido nucleico que codifica para la proteína CD83, el término "CD83" también puede referirse al ácido nucleico que codifica para la proteína CD83. Cualquier ácido nucleico adecuado puede ser usado, incluyendo ADN, ARN o un ácido nucleico sintético, siempre y cuando codifique para una proteína CD83. Un ácido nucleico puede proporcionarse en un vector adecuado para la expresión de la proteína o fragmento de proteína codificado. Lo vectores adecuados y los métodos para producirlos se conocen en la técnica.

20 Según se usa en la presente, "composición terapéutica" se refiere a una composición exógena que se usa para propósitos terapéuticos y para la que no se desea una respuesta inmunológica. De esta manera, el término "composición terapéutica" abarca preparaciones puras (es decir, preparaciones que consisten en una sola sustancia o compuesto, esencialmente puro) así como mezclas de sustancias o compuestos. Según se usa en la presente, el término "propósitos terapéuticos" incluye un esfuerzo para prevenir, curar o reducir o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno. De esta manera, "propósitos terapéuticos" incluyen los usos tanto terapéuticos como profilácticos de las composiciones y/o métodos de la invención; en consecuencia, las composiciones terapéuticas incluyen aquellas usadas para prevenir el desarrollo de una enfermedad o trastorno causado por la disfunción o función no deseada de una respuesta inmunológica que incluye células T.

30 Las composiciones terapéuticas adecuadas para usarse en la invención incluyen, pero no están limitadas a: anticuerpos, proteínas, "moléculas pequeñas", vectores de terapia génica y cualquier proteína expresada por un vector de terapia génica, antígenos, alérgenos, células (incluyendo células madre), y trasplantes de tejido. Se entiende que estas categorías no necesariamente son mutuamente exclusivas; así, por ejemplo, muchas proteínas son antígenos y muchos antígenos son proteínas. En modalidades en las que la composición terapéutica es coadministrada con CD83 pero el sujeto no es tratado también con al menos alguna otra composición terapéutica o al menos algún otro compuesto inmunosupresor, la composición terapéutica no es un tejido trasplantado. En algunas modalidades en las que la composición terapéutica es coadministrada con CD83 pero el sujeto no es tratado también con por lo menos alguna otra composición terapéutica o al menos algún otro compuesto inmunosupresor, la composición terapéutica no es un antígeno asociado con un tejido trasplantado.

40 Una composición terapéutica adecuada que es un antígeno es cualquier composición contra la que se levanta una respuesta inmunológica (es decir, cualquier composición contra la que un sujeto tiene o puede tener una respuesta inmunológica). Los antígenos adecuados incluyen proteínas y fragmentos de proteína, tales como, por ejemplo, un antígeno asociado con una enfermedad autoinmunitaria al cual se desee tolerancia, tal como un antígeno que esté implicado en o asociado con el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria o contra el cual se encuentren anticuerpos en un sujeto que tenga esa enfermedad autoinmunitaria.

45 Así, los antígenos ejemplares incluyen proteína básica de mielina (la cual está implicada en el desarrollo de esclerosis múltiple), proteína desmogleína-3 (la cual se cree que está implicada en el desarrollo de Pénfigo vulgar), receptor de la hormona estimuladora de tiroides (TSH) (que está implicado en el desarrollo de enfermedad de Grave), peroxidasa de tiroides (la cual está implicada en el desarrollo de tiroiditis de Hashimoto), receptor de acetilcolina (el cual está implicado en el desarrollo de miastenia grave) e insulina (la cual está implicada en el desarrollo de diabetes mellitus tipo I). Una composición terapéutica adecuada que es un anticuerpo puede ser cualquier tipo de anticuerpo derivado del mismo, incluyendo un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena individual, o una porción o fragmento de un anticuerpo.

55 Los métodos descritos en la presente pueden inducir tolerancia aún cuando el antígeno contra el que se dirige o puede dirigirse una respuesta inmunológica no se conoce, siempre y cuando la composición terapéutica usada en los métodos dirija a las células tolerogénicas a las intermediaciones de la respuesta inmunológica no deseada. De esta manera, las composiciones terapéuticas adecuadas incluyen antígenos que están asociados con un tejido particular al cual se desea tolerabilidad, no obstante la identidad del antígeno en o cerca de ese tejido al cual se dirige o puede dirigirse una respuesta inmunológica no deseada. De esta manera, en algunas modalidades, los métodos y composiciones de la invención pueden ser útiles particularmente en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos en los cuales haya ocurrido o pudiera ocurrir "una dispersión determinante"(ver, por ejemplo, Dai y otros, (2005) Cell. Mol. Immunol. 2:169-175; Prat y

Antel (2005) Curr. Opin. Neurol. 18: 225-230).

Un antígeno está “asociado con” un tejido particular si es expresado por células de las cuales está comprendido ese tejido, o si se encuentra sobre o cerca de células de las cuales está comprendido ese tejido (por ejemplo, en la matriz extracelular de ese tejido). El uso de un antígeno “asociado con” un tejido particular puede implicar el uso del antígeno en forma pura, separado del propio tejido, o puede implicar el uso del antígeno *in situ* (es decir, en el tejido). El término “tejido” según se usa en la presente abarca órganos individuales (por ejemplo, hígado, riñón, corazón, pulmón, etc.) así como tejidos “líquidos” (por ejemplo, sangre, componentes hemáticos tales como plasma, células tales como células T, etc.) y porciones y subpartes de cualquiera o ambos.

Cuando sea adecuado, las composiciones terapéuticas pueden seleccionarse para carecer de actividad biológica que no sea su capacidad para hacer tolerante a un sujeto cuando se use en los métodos descritos en la invención. Así, por ejemplo, una composición terapéutica puede consistir en sólo una porción o fragmento de la proteína insulina nativa que carezca de la actividad fisiológica normal de insulina nativa. Una composición terapéutica adecuada que es un anticuerpo puede ser cualquier tipo de anticuerpo o derivado del mismo, incluyendo un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena individual, o una porción o fragmento de un anticuerpo. Alguien con experiencia en la técnica será capaz de identificar y proporcionar composiciones terapéuticas adecuadas para usarse en los métodos de la invención.

Las composiciones terapéuticas adecuadas pueden incluir antígenos u otros agentes que sirvan para estimular la tolerabilidad ya sea que estén asociados o no con un tejido particular al cual se desee la tolerabilidad, siempre y cuando el objetivo de la invención se logre (por ejemplo, tolerabilidad a un tejido trasplantado). Una composición terapéutica adecuada comprende ARN total o un subconjunto de ARN aislado de un tejido de interés; esta se puede administrar directamente al sujeto (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,015,204) o puede usarse para transducir células dendríticas, las cuales pueden usarse después, por ejemplo, para tratar un sujeto o para la producción *in vitro* de células T reguladoras. Una composición terapéutica que sea una proteína o polipéptido puede administrarse como una proteína o polipéptido o puede administrarse al proporcionar un ácido nucleico que la codifique a una célula o a un sujeto. Una composición terapéutica puede comprender ARN (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,015,204). En algunas modalidades, más de una composición terapéutica se administra a un sujeto.

El término “compuesto inmunosupresor” se refiere a un compuesto que es capaz de reducir el tamaño de una población de clones de linfocitos T y/o B o que es capaz de suprimir su reactividad, expansión o diferenciación. Los compuestos inmunosupresores para usarse en los métodos de la invención incluyen, pero no están limitados a: inhibidores de calcineurina, incluyendo ciclosporina (también conocida como “CsA”, comercializada como Neoral® o Sandimmune®) y tacrolimus (también conocido como “FK506”, comercializado como Prograf®); inhibidores del metabolismo de las purinas tales como micofenolato mofetilo (también conocido como “MMF”, comercializado como Cellcept®) y azatioprina (comercializada como Azasan® o Imuran®); inhibidores de la proliferación tales como everolimus (comercializado como Certican®) y sirolimus (también conocido como “rapamicina” o “Rapa”, comercializado como Rapamune®); anticuerpos monoclonales (“mAb”), tales como anti-CD45 y anti-CD45RB (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,160,987); anticuerpos monoclonales dirigidos contra células T, tales como OKT3; anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de IL-2, incluyendo anticuerpos anti-T_H1 humanizados, tales como basilixamab y daclizumab; sustancias que bloqueen las vías co-estimuladoras de células T, tales como la proteína de fusión CTLA-4-Ig1; sustancias que sean capaces de inducir quimerismo (es decir, la co-existencia de células inmunológicas de donador y receptor, en las cuales el tejido de injerto se reconoce como propio) y tratamientos pre-trasplante no mieloablativos tales como ciclofosfamida (comercializada como Cytosan®). Para una descripción de inmunosupresores y sus objetivos, ver, por ejemplo, Stepkowski (2000) Expert Rev. Mol. Med. 21 de Junio, 2000; 1-23).

Sirolimus (también conocido como “rapamicina” o “Rapa”, comercializado como Rapamune®) está indicado actualmente para la profilaxis de rechazo de órganos en pacientes de trasplante renal con edades de 13 años y más. El fabricante recomienda que Rapamune® debe ser usado inicialmente con ciclosporina y corticosteroides. Estudios en modelos experimentales (es decir, ratones, cerdos y/o primates) mostraron que sirolimus prolongó la supervivencia de aloinjertos, por ejemplo, de riñón, corazón, piel, islotes, intestino delgado, tejido pancreático-duodenal y médula ósea. Sirolimus invirtió el rechazo agudo de aloinjertos de corazón y riñón en ratas y prolongó la supervivencia del injerto en ratas pre-sensibilizadas. En algunos estudios, el efecto inmunosupresor de sirolimus duró hasta 6 meses después de discontinuar la terapia. El efecto de tolerabilidad de sirolimus es alérgico específico. En modelos de roedores de enfermedad autoinmunitaria, sirolimus suprimió eventos mediados por el sistema inmunológico asociados con el lupus eritematoso sistémico, la artritis inducida por colágeno, la diabetes autoinmune (tipo I), la automiocarditis, la encefalomielitis alérgica experimental, la enfermedad de injerto contra hospedero y la uveorretinitis autoinmune.

El micofenolato mofetilo (también conocido como “MMF”, comercializado como Cellcept®) está indicado actualmente para la profilaxis del rechazo de órganos en pacientes que reciben trasplantes cardíacos (de corazón) o hepáticos (de hígado) alogénicos. El fabricante recomienda que Cellcept® se use concomitantemente con ciclosporina y corticosteroides. El

micofenolato mofetilo ha demostrado en modelos de animales experimentales que prolonga la supervivencia de los trasplantes alogénicos incluyendo riñón, corazón, hígado, intestino, extremidades, intestino delgado, islotes pancreáticos, y médula ósea. El micofenolato mofetilo también demostró revertir el rechazo agudo continuo del modelo renal canino y modelo de aloinjerto cardiaco de rata e inhibió la arteriopatía proliferativa en modelos experimentales de aloinjertos aórticos y cardiacos en ratas así como xenoinjertos en primates. El micofenolato mofetilo también ha demostrado inhibir el desarrollo de tumores y prolongar la supervivencia en modelos de trasplante de tumores murinos. El micofenolato mofetilo puede usarse solo o en combinación con otros agentes inmunosupresores.

El tacrolimus (también conocido como "FK506", comercializado como Prograf®) se indica actualmente para la profilaxis de rechazo de órganos en pacientes que reciben trasplantes alogénicos de hígado, riñón o cardiacos. El tacrolimus también se debe usar concomitantemente con corticosteroides adrenales. En receptores de trasplante de corazón, se recomienda que Prograf® se use en conjunto con la azatioprina o MMF. El tacrolimus ha demostrado prolongar la supervivencia del hospedero y el injerto trasplantado en modelos animales de trasplante de hígado, riñón, corazón, médula ósea, intestino delgado y páncreas, pulmón y tráquea, piel, córnea y extremidades. En animales, el tacrolimus ha demostrado que suprime parte de la inmunidad humoral y, en mayor grado, las reacciones mediadas por células tales como rechazo al aloinjerto, hipersensibilidad de tipo retardada y artritis inducida por colágeno, encefalomiелitis alérgica experimental y enfermedad de hospedero contra injerto. Aunque la invención no está limitada por el mecanismo de acción de cualquiera de los compuestos o sus combinaciones, y aunque se desconoce el mecanismo de acción exacto del tacrolimus, se cree que el tacrolimus inhibe la actividad fosfatasa de calcineurina e inhibe la activación de linfocitos T.

La ciclosporina (también conocida como "CsA", comercializada, por ejemplo, como Neoral® o Sandimmune®) es indicada actualmente para la profilaxis de rechazo de órganos para trasplantes alogénicos de riñón, hígado y corazón. La ciclosporina ha sido usada en combinación con azatioprina y corticosteroides, y puede usarse en combinación con metotrexato en pacientes de artritis reumatoide. La ciclosporina está indicada para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide activa severa en donde la enfermedad no ha respondido adecuadamente al metotrexato. La ciclosporina también está indicada para el tratamiento de pacientes adultos no inmunocomprometidos, con psoriasis de placa recalcitrante severa. La ciclosporina es un potente agente inmunosupresor que tiene supervivencia prolongada de trasplantes alogénicos que involucran piel, riñón, hígado, corazón, páncreas, médula ósea, intestino delgado y pulmón en modelos animales. Se ha demostrado que la ciclosporina suprime parte de la inmunidad humoral y, en mayor grado, las reacciones inmunológicas mediadas por células tales como rechazo de aloinjertos, hipersensibilidad retardada, encefalomiелitis alérgica experimental, artritis de adyuvante de Freund y enfermedad de injerto contra hospedero en muchas especies animales para una variedad de órganos. Aunque la invención no está limitada por el mecanismo de acción de ninguno de los compuestos y sus combinaciones, la ciclosporina ha demostrado inhibir linfocitos inmunocompetentes en la fase G0 y G1 del ciclo celular e inhibir de preferencia linfocitos T.

Por "cantidad eficaz" de una sustancia se intenta decir que la cantidad es al menos suficiente para lograr por lo menos un objetivo de la invención cuando se administra a un sujeto de acuerdo con los métodos de la invención. Así, por ejemplo, una "cantidad eficaz" de una composición terapéutica es al menos suficiente para hacer tolerante el sujeto a la composición terapéutica cuando se coadministre a un sujeto con CD83 y por lo menos algún otro compuesto inmunosupresor. En forma similar, una "cantidad eficaz" de CD83 es al menos suficiente para hacer tolerante al sujeto a una composición terapéutica cuando se coadministre como una composición terapéutica y al menos algún otro compuesto. Una "cantidad eficaz" de un compuesto inmunosupresor es al menos suficiente para producir un efecto medible sobre al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno causado por la disfunción o la función no deseada de una respuesta inmunológica cuando se coadministre con CD83 y, opcionalmente, una composición terapéutica. En algunas modalidades, una cantidad eficaz de un compuesto inmunosupresor es al menos suficiente para inducir tolerancia y/o inmunosupresión como la definida en cualquier otra parte en la presente. La cantidad eficaz de un compuesto inmunosupresor puede determinarse con respecto a los síntomas exhibidos por un sujeto individual o puede determinarse a partir de estudios clínicos o extrapolarse a partir de estudios apropiados en sistemas de modelo. Así, por ejemplo, una cantidad eficaz de un compuesto inmunosupresor incluye una cantidad que se esperaría produjera un efecto medible en al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno con base en un intervalo de dosis determinada en un estudio clínico utilizando un método de la invención.

Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosis. Las administraciones, aplicaciones y dosis adecuadas variarán dependiendo de un número de factores, incluyendo pero no limitados a: la actividad específica de las composiciones; la formulación de las composiciones; el peso corporal, la edad, la salud, la enfermedad y la condición del sujeto a tratar; y la vía de administración de las composiciones en el sujeto. En algunos casos, la cantidad mínima de CD83 requerida para ser una cantidad eficaz puede reducirse debido a la presencia en el paciente de CD83 preexistente, particularmente CD83 soluble (ver, por ejemplo, Hock y otros (2006) (Tissue Antigens 67:57-60)); alguien con experiencia en la técnica fácilmente será capaz de ajustar la dosis y administración, etc., para lograr los mejores resultados. Por ejemplo, CD83 puede administrarse a un paciente dentro de un intervalo que tenga: un extremo inferior de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 70, 100, 200, 500 ó 700 mg/kg, ó 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50 ó 100 g/kg; y un extremo superior de 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 70, 100, 200, 500, o 700 mg/kg ó 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 100, ó 200 g/kg.

En algunas modalidades, los métodos de la invención pueden inducir tolerancia incluso cuando se desconoce el antígeno contra el cual se dirige o puede dirigirse una respuesta inmunológica. De esta manera, las composiciones terapéuticas adecuadas incluyen antígenos que están asociados con un tejido particular al cual se desea tolerabilidad, no obstante la identidad del antígeno en o cerca de ese tejido al cual se dirige o puede dirigirse una respuesta inmunológica no deseada. De esta manera, en algunas modalidades, los métodos y composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o trastornos en los que haya ocurrido o pudiera ocurrir una "dispersión determinante" (ver, por ejemplo, Dai y otros (2005) Cell. Mol. Immunol. 2: 169-175; Prat y Antel (2005) Curr. Opin. Neurol. 18:225-230). Un antígeno está "asociado con" un tejido particular si es expresado por células que el tejido comprende, o si se encuentra sobre o cerca de células que el tejido comprende (por ejemplo, en la matriz extracelular de ese tejido).

Los métodos de la invención proporcionan el beneficio de un efecto sinérgico producido por la coadministración de CD83 con al menos algún otro compuesto inmunosupresor, de tal manera que la eficacia del tratamiento combinado sea mucho más alta de la que se esperaría de combinar los dos tratamientos individuales. Además, si CD83 es coadministrada a un sujeto con dos o más de otros compuestos inmunosupresores, pueden proporcionarse beneficios todavía mayores. De esta manera, la invención proporciona tratamientos en combinación (o "coadministrados") que dan mayor eficacia que la proporcionada por los tratamientos individuales solos. En algunas modalidades, el tratamiento en combinación o coadministrado proporciona mayor beneficio que la suma de los beneficios proporcionados por cada tratamiento individual. En algunas modalidades, el tratamiento en combinación o coadministrado proporciona un beneficio que mayor que la suma de los beneficios proporcionados por cada tratamiento individual en al menos 10%, 20%, 25%, 30%, 50%, 75%, 100%, 200%, o más, o en 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces o más.

Esta eficacia mejorada del tratamiento en combinación (o "coadministrado") proporciona los métodos de tratamiento de la invención, en los cuales pueden usarse dosis más bajas de un compuesto individual para tratar un sujeto que las que se requerirían si ese compuesto se usara solo. De esta manera, la invención hace posible el tratamiento eficaz usando menos de cada compuesto individual que lo que se usa actualmente. En otras palabras, la invención proporciona métodos para usar cantidades reducidas de compuestos para tratar un sujeto y métodos para reducir la cantidad de un compuesto usado para tratar un sujeto. Así, la invención proporciona además un tratamiento con probabilidad más baja de efectos secundarios y/o una severidad reducida de efectos secundarios debido a las dosis más bajas usadas. Estos efectos secundarios incluyen aquellos observados generalmente con inhibidores de calcineurina (por ejemplo, nefrotoxicidad). Los inhibidores de calcineurina individuales también tienden a cambios en la piel, mientras que los efectos secundarios que tienden a ser observados con tratamiento con tacrolimus incluyen una incidencia de diabetes incrementada, pero menos hiperlipidemia, hipertensión e hiperplasia de encías de las que tienden a ser observadas con tratamiento con ciclosporina. Los efectos secundarios observados comúnmente con tratamiento con micofenolato mofetilo incluyen un riesgo incrementado de leucopenia, diarrea, anemia, hipertensión, esofagitis, gastritis y hemorragias gastrointestinales.

Por "dosis más bajas" se intenta decir que un compuesto individual se administra a un sujeto a niveles de dosis por debajo de aquellos que de otra manera pudieran requerirse usar para tratar a un sujeto. En algunas modalidades, por "dosis más bajas" se intenta decir que un compuesto individual es coadministrado a un sujeto a niveles de dosis por debajo de aquellos recomendados por el fabricante, es decir, niveles de dosis recomendados en el inserto de empaque para el compuesto. Como referencia, los niveles de dosis actualmente recomendados en los insertos de empaque para varios compuestos de interés son los siguientes. Cuando un nivel de dosis recomendado varía por etapa de intervalo de terapia o tratamiento (por ejemplo, los niveles de dosis de pacientes recién trasplantados contra los niveles de dosis de mantenimiento), los métodos de la invención incluyen métodos de tratamiento en los que el sujeto se trata con dosis más bajas de un compuesto durante sólo una etapa de intervalo de terapia o tratamiento o durante al menos una etapa de intervalo de terapia o tratamiento. Las etapas de intervalos de terapia y/o tratamiento se entienden por aquellos con experiencia en la técnica e incluyen, por ejemplo: mantenimiento a largo plazo o manejo de un trastorno o enfermedad autoinmunitariacrónico; preparación previa al trasplante; recuperación post- trasplante y mantenimiento post-trasplante. Alternativamente, un intervalo de tratamiento puede ser un período de tiempo durante el cual el tratamiento se lleve a cabo y/o evalúe, tal como un día, una semana, un mes, o dos, tres, cuatro, cinco o seis meses, o un año, o un intervalo durante o después del cual un sujeto muestra haber logrado cierta(s) meta(s) de tratamiento.

Para tacrolimus (también conocido como "FK506, comercializado como Prograf®), el fabricante recomienda una dosificación no antes de 6 horas después del trasplante a una dosis inicial de 0.01 mg/kg/día (para trasplantes de corazón) o 0.03-0.05 mg/kg/día (para trasplantes de hígado o riñón) como una infusión intravenosa continua. La infusión continua debe continuarse sólo hasta que el paciente pueda tolerar la administración oral.

Para sirolimus (conocido también como "rapamicina", comercializado como Rapamune®), la dosificación recomendada varía en dependencia del riesgo inmunológico para el paciente y la etapa de tratamiento post-trasplante. Para pacientes en riesgo inmunológico bajo a moderado, se recomienda que la solución oral y las tabletas de Rapamune® se usen en una combinación con ciclosporina y corticosteroides; la ciclosporina debe ser retirada a los 2-4 meses después del trasplante.

Para receptores de trasplante nuevos, una dosis de carga de Rapamune® que corresponde a 3 veces la dosis de mantenimiento debe ser administrada. Por ejemplo, para pacientes de trasplante renal, una dosis de mantenimiento de 2 mg se recomienda junto con una dosis de carga de 6 mg. Los pacientes considerados para el retiro de ciclosporina deben estar recibiendo terapia en combinación de Rapamune® y ciclosporina. Dos a cuatro meses después del trasplante, la ciclosporina debe ser progresivamente descontinuada durante 4 a 8 semanas y la dosis de Rapamune® debe ajustarse para obtener niveles de paso en sangre entera dentro del intervalo de 16 a 24 ng/mL durante el primer año después del trasplante; posteriormente el objetivo debe ser 10-20 ng/mL.

Para pacientes en alto riesgo inmunológico, se recomienda que la solución oral y las tabletas de Rapamune® se usen en una combinación con ciclosporina y corticosteroides durante el primer año. Para los pacientes que reciben terapia de Rapamune® con ciclosporina, la terapia de Rapamune® debe iniciarse con una dosis de carga de hasta 15 mg en el primer día después del trasplante. Al inicio del segundo día después del trasplante, debe darse una dosis de mantenimiento inicial de 5 mg/día. La dosis inicial de ciclosporina debe ser de hasta 7 mg/kg/día en dosis divididas y la dosis debe ser ajustada subsecuentemente para lograr una concentración de paso en sangre entera objetivo (es decir, concentración mínima en la sangre). También se debe administrar prednisona, a un mínimo de 5 mg/día.

Para uso en receptores de aloinjerto renal, la dosis inicial de Rapamune® debe administrarse tan pronto como sea posible después del trasplante. Un ajuste de dosis de Rapamune® frecuente con base en concentraciones en estado estable de Rapamune® puede llevar a sobredosis o sub-dosis, por lo que deben hacerse ajustes de dosis y monitorearse cuidadosamente. Una vez que la dosis de mantenimiento es ajustada, los pacientes deben mantenerse en la nueva dosis de mantenimiento durante al menos 7 a 14 días.

Para el micofenolato mofetilo (también conocido como "MMF", comercializado como Cellcept®), la recomendación del fabricante para pacientes de trasplante renal es de una dosis de 1 gramo administrado oralmente o intravenosamente (durante no menos de 2 horas) dos veces al día para una dosis total diaria de 2 gramos. Para pacientes pediátricos entre 3 meses y 18 años de edad, la dosis diaria recomendada de suspensión oral de Cellcept® es 600 mg/m² dos veces al día (hasta un máximo de 2 gramos/10 ml de suspensión oral). El área de la superficie corporal puede determinarse, por ejemplo, usando tablas de área de superficie corporal estándares como una función del peso (ver, por ejemplo, Sharkey y otros (2001) British J. Cancer 85: 23-28). Para pacientes de trasplante de corazón, los adultos deben ser tratados con una dosis de 1 gramo administrado intravenosamente dos veces al día ("b.i.d.") durante no menos de 2 horas o 1.5 gramos administrados oralmente dos veces al día para una dosis diaria de 3 gramos. Para pacientes de trasplantes hepáticos, los adultos deben ser tratados con una dosis de 1 gramo administrado intravenosamente b.i.d. durante no menos de 2 horas o una dosis de 1.5 gramos administrado oralmente b.i.d. para una dosis diaria total de 3 gramos.

Para ciclosporina (también "CsA", comercializada como Neoral® o Sandimmune®), la recomendación del fabricante es que una dosis oral inicial de Neoral® puede darse 4-12 horas antes del trasplante o post-operatoriamente. En pacientes de trasplante nuevos, la dosis inicial media (±SD) es 9 (±3) mg/kg/día para pacientes de trasplante renal, 8 (±4) mg/kg/día para pacientes de trasplante de hígado y 7(±3) mg/kg/día para pacientes de trasplante de corazón. Dosis diarias totales se dividen en dos dosis iguales, y la dosis se ajusta subsecuentemente para lograr una concentración en sangre de ciclosporina predefinida; un programa de dosificación representativo con base en el peso de una persona inicia en 2 mg/kg/día durante los primeros 14 días; posteriormente, la dosis se reduce gradualmente a 1 mg/kg/día por una semana, se reduce más a 0.6 mg/kg/día por dos semanas, a 0.3 mg/kg/día por un mes y 0.15 mg/kg/día en dos meses y después como terapia de mantenimiento. Inicialmente, la terapia adjunta con corticosteroides adrenales es recomendada.

Para el tratamiento de la artritis reumatoide, la dosis inicial de ciclosporina es 2.5 mg/kg/día tomada dos veces al día como una dosis oral dividida. Otros tratamientos de salicilatos, agentes antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides orales pueden ser continuados. Para controlar los eventos adversos en cualquier momento, las dosis deben reducirse en 25-50%. Para el tratamiento de la psoriasis, la dosis inicial de ciclosporina es 2.5 mg/kg/día tomada dos veces al día como una dosis oral dividida. Para bloquear los eventos adversos, los pacientes deben mantenerse en esta dosis durante al menos 4 semanas. Si una mejora clínica significativa no se observa después de 4 semanas, la dosis puede ser incrementada a intervalos de dos semanas por 0.5 mg/kg/día a un máximo de 4 mg/kg/día. Para controlar los eventos adversos en cualquier momento, las dosis deben reducirse en 25-50%

Los términos "compuesto", "composición" y "sustancia" se usan en la presente y abarcan cada uno cualquier sustancia destinada para usarse en un método de la invención (es decir, incluyendo CD83, una composición terapéutica o un compuesto inmunosupresor). Una sustancia es "coadministrada" con otra sustancia y la "coadministración" ocurre cuando las sustancias se administran simultáneamente al sujeto, o cuando una sustancia se administra al sujeto dentro de 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 horas, o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ó 200 días antes o después de que otra sustancia se administre al sujeto. Cuando las sustancias se administran simultáneamente, pueden combinarse antes de la administración, o administrarse por separado al mismo tiempo.

Los métodos de la invención pueden incluir una dosis o administración o varias dosis o administraciones de cada compuesto o composición. En modalidades en las que se lleven a cabo varias administraciones, al menos una administración de un compuesto o composición ocurrirá dentro de la “ventana de efectividad” de otro compuesto o composición que se administre. En algunas modalidades, la administración de una segunda sustancia se considera que ha ocurrido dentro de la “ventana de efectividad” de una primera sustancia si la eficacia del tratamiento combinado (es decir, de la administración de una segunda sustancia se considera que ha ocurrido dentro de la “ventana de efectividad” de una primera sustancia si la eficacia de tratamiento combinado (es decir, de la administración de ambas sustancias) es o se espera que sea mayor que o diferente de las eficacias combinadas de los tratamientos individuales si se hubieran administrado por separado, es decir, en un experimento de control adecuado. Por ejemplo, un sujeto puede hacerse tolerante a una composición terapéutica mediante un método que comprende la administración de CD83 y la administración de la composición terapéutica dentro de la ventana de efectividad de CD83; este resultado no se esperaría si el sujeto fuera tratado separadamente con CD83 y con la composición terapéutica, de tal manera que la administración de la composición terapéutica ocurriera fuera de la ventana de efectividad de CD83.

En algunas modalidades, al menos un compuesto o composición se administra de tal manera que haya al menos cierta superposición de la “ventana de efectividad” de esa sustancia con la “ventana de efectividad” de al menos alguna otra sustancia. Se considera que esta superposición ha ocurrido si la eficacia del tratamiento combinado es o se espera que sea mayor que o diferente de los tratamientos individuales si se hubieran administrado por separado, es decir, en un experimento de control adecuado. En algunas modalidades, durante un curso de tratamiento particular, pueden ocurrir administraciones adicionales antes, durante o después de la ventana de efectividad de una o más sustancias, mientras que en otras modalidades, no hay administraciones adicionales fuera de la ventana de efectividad de una o más sustancias. En algunas modalidades, todas las administraciones de cada sustancia ocurren dentro de la ventana de efectividad de cada una de las demás sustancias administradas al sujeto. En modalidades en las que más de dos sustancias se administran a un sujeto, una sustancia puede ser administrada dentro de la ventana de efectividad de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de otras sustancias.

Los métodos de la invención también pueden incluir la administración de más de una composición terapéutica. Así, los métodos pueden incluir la administración de varias composiciones terapéuticas. Las composiciones terapéuticas pueden ser similares o disimilares. Por ejemplo, las composiciones terapéuticas que se administraron en un método de la invención a un sujeto podrían incluir antígenos relacionados. Así, por ejemplo, en algunas modalidades, las composiciones terapéuticas administradas a un sujeto podrían comprender ARN preparado de un tejido particular (“ARN de tejido total”).

Debido a que el sujeto puede hacerse tolerante a compuestos exógenos por CD83, para propósitos terapéuticos, es importante que el sujeto no sea expuesto al menos durante el tratamiento, o al menos durante la ventana de efectividad de CD83, a compuestos a los cuales no se desee tolerabilidad. Así, por ejemplo, el sujeto no debe ser expuesto a antígenos específicos de tumor y microorganismos que causen enfermedades incluyendo virus, bacterias, mohos, etc. Generalmente, según se usa en la presente, por “sujeto” se intenta decir cualquier animal que requiera tratamiento. De esta manera, por ejemplo, un “sujeto” puede ser un paciente humano o un paciente mamífero no humano o puede ser otro paciente que sea un animal.

Cuando se desee la prevención de una enfermedad o afección médica, un sujeto puede ser tratado a intervalos regulares (por ejemplo, aproximadamente: cada dos años, cada año, cada seis meses, cada dos a cuatro meses, o cada mes). Sin embargo, en todas las modalidades de la invención, los métodos y composiciones de la invención se administran a un sujeto que se ha identificado que tiene una enfermedad o trastorno particular causado por la disfunción o función no deseada de una respuesta inmunológica o un sujeto que ha sido identificado como que es probable que desarrolle una enfermedad o trastorno particular. Por ejemplo, un sujeto puede ser identificado como propenso a desarrollar dicha enfermedad o trastorno particular como resultado del examen del historial familiar del sujeto, de una prueba médica tal como una prueba genética o de una prueba para determinar los niveles enzimáticos o de metabolitos del sujeto, o de ser diagnosticado con otra enfermedad o trastorno. De esta manera, por ejemplo, los métodos de la invención pueden usarse para tratar una enfermedad autoinmunitaria, para prevenir el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria, o para reducir el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria. Generalmente, un curso de tratamiento concluye cuando el sujeto ya no está siendo tratado para aliviar o prevenir una enfermedad o afección médica particular causada por la disfunción o función no deseada de una respuesta inmunológica.

Así, la invención proporciona un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección médica causada por la disfunción o función no deseada de una respuesta inmunológica, en donde una cantidad eficaz de CD83 es coadministrada a un sujeto junto con al menos algún otro compuesto inmunosupresor de tal manera que se logre la inmunosupresión. Opcionalmente, una composición terapéutica también puede ser administrada. Si se administra una composición terapéutica, se administra al sujeto durante la ventana de efectividad de CD83 de tal forma que el sujeto se haga tolerante a la composición terapéutica. Cualquier forma de administración puede seleccionarse para el suministro de CD83 y la composición terapéutica siempre y cuando este objetivo se logre. Así, por ejemplo, CD83 y la composición terapéutica

pueden administrarse juntas y por medio de la misma forma de administración o pueden administrarse por separado y/o por medio de diferentes formas de administración. De esta manera, por ejemplo, CD83 puede administrarse al sujeto como una proteína o puede administrarse al sujeto como un ácido nucleico que codifique para CD83 (por ejemplo, como un ARNm o en un vector de expresión).

5

Los métodos de la invención pueden emplearse para tratar sujetos que estén o puedan ser afectados por una enfermedad o trastorno causado por la disfunción o función no deseada de una respuesta inmunológica, tal como, por ejemplo: una alergia; asma; rechazo de un trasplante de tejido; una respuesta inmunológica a una sustancia administrada crónicamente; una enfermedad autoinmunitaria tal como miastenia grave, esclerosis múltiple, vasculitis, enfermedad inflamatoria intestinal crónica tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa; espondilitis alquilosante, lupus eritematoso sistémico, enfermedades de la piel tales como psoriasis, artritis reumatoide y diabetes mellitus dependiente de insulina; y SIDA. Los métodos de la invención pueden usarse para tratar sujetos afectados por una enfermedad o trastorno que implique células B o funciones de células B, tales como, por ejemplo: hiperplasias de células B tales como leucemia (incluyendo mieloma múltiple y leucemia linfoblástica aguda), hiperactividad de células B asociada con SIDA; síndrome de choque tóxico; enfermedad del suero y enfermedad periodontal (ver, por ejemplo, Mahanonda y otros, (2002) J. Periodontal Res. 37: 177-183). La enfermedad del suero es un grupo de síntomas causados por una respuesta inmunológica no deseada a ciertos medicamentos o antisueros. Es decir, la enfermedad del suero puede resultar cuando se da antisuero de otro animal o humano a un sujeto en un esfuerzo por inducir inmunización pasiva. En algunas modalidades, los métodos de la invención proporcionan el tratamiento de una enfermedad o trastorno que incluye células B o funciones de células B, en donde el tratamiento no da como resultado la depleción de células B, es decir, una reducción en el número y/o subtipo de células B en el sujeto.

10

15

20

Las composiciones y métodos de la invención pueden usarse solas (es decir, pueden usarse para tratar un sujeto que no está recibiendo otros tratamientos) o pueden administrarse a un sujeto que esté recibiendo o haya recibido otros tratamientos. Por ejemplo, un sujeto afectado con una enfermedad o trastorno particular podría ser tratado sólo con los métodos y composiciones de la invención, o podría ser tratado con los métodos y composiciones de la invención así como otro tratamiento o terapia comúnmente administrado a sujetos que sean o puedan verse afectados por la enfermedad o trastorno particular, tales como, por ejemplo, quimioterapia o tratamiento farmacéutico convencional. Así, por ejemplo, los métodos de la invención pueden comprender además el uso o coadministración de otros compuestos incluyendo compuestos no inmunosupresores. De esta manera, los métodos de la invención pueden comprender además el uso o coadministración de otros compuestos, incluyendo, por ejemplo, corcicosteroides, agentes antiinflamatorios tales como, por ejemplo, azatioprina y fármacos antimetabolitos tales como, por ejemplo, metotrexato.

25

30

Así, en algunas modalidades, los métodos de la invención se usan para prevenir, curar o aliviar al menos un síntoma de rechazo de un trasplante de tejido en un receptor de tejido. En estas modalidades, el receptor de trasplante ("receptor" o sujeto) puede ser tratado con CD83 y al menos algún otro compuesto inmunosupresor o al menos una composición terapéutica. La composición terapéutica puede ser un antígeno asociado con el tejido trasplantado, tal como, por ejemplo, un antígeno preparado a partir de o extraído de tejido trasplantado, por ejemplo, mediante lisis u homogeneización de una muestra del tejido trasplantado. Generalmente, el tratamiento de receptores de trasplante de acuerdo con los métodos de la invención puede incluir el tratamiento antes de, junto con (es decir, al mismo tiempo), y/o después del trasplante del tejido. La composición terapéutica es el propio tejido trasplantado y de esta manera no se hace una administración adicional de la composición terapéutica al receptor que no sea la introducción del tejido trasplantado. En estas modalidades, al menos algún otro compuesto inmunosupresor o por lo menos una composición terapéutica también es administrada. Los métodos de la invención previenen, curan o alivian todos los síntomas de rechazo adversos de un trasplante de tejido, de tal forma que el tratamiento continuo del sujeto de trasplante para prevenir el rechazo se hace innecesario; en estas modalidades, se dice que la tolerancia al injerto ha sido inducida en el sujeto.

35

40

45

En algunas modalidades, el donador del tejido que será trasplantado ("donador de trasplante") puede ser tratado (por ejemplo, con CD83 y al menos algún otro inmunosupresor y, opcionalmente, al menos una composición terapéutica de acuerdo con los métodos de la invención) antes de remover el tejido para trasplante en el receptor deseado. Las sustancias se administran al donador de trasplante como se describe en la presente, pero el objetivo del tratamiento es inducir tolerancia y/o inmunosupresión en el receptor del trasplante. Aquí también, la composición terapéutica puede ser un antígeno asociado con el tejido trasplantado (por ejemplo, un órgano). Tanto el donador de trasplante como el receptor de trasplante pueden tratarse de acuerdo con los métodos de la invención.

50

55

El tejido que será trasplantado puede ser removido del donador y luego expuesto a una solución que contenga CD83; es decir, por ejemplo, el tejido puede ser almacenado en y/o perfundido con una solución que contenga CD83 antes del trasplante. El tejido que será trasplantado puede ser removido del donador y luego expuesto a una solución que contenga CD83 y al menos algún otro compuesto inmunosupresor; es decir, por ejemplo, el tejido puede ser almacenado en y/o perfundido con una solución que contenga CD83 y por lo menos algún otro compuesto inmunosupresor. Las composiciones terapéuticas también pueden administrarse al donador. Como resultado, cuando este tejido es luego introducido en el

60

receptor de trasplante, la CD83 y otro(s) compuesto(s) inmunosupresor(es) en el tejido y sobre la superficie del tejido serán coadministrados al sujeto junto con un antígeno asociado con el tejido. "Tejido" según se usa en la presente abarca órganos individuales y/o tejidos especializados (por ejemplo, hígado, riñón, corazón, pulmón, piel, islotes pancreáticos, etc.) así como tejidos "líquidos" (por ejemplo, sangre, componentes hemáticos tales como plasma, células tales como células dendríticas, etc.) ; el término "tejido" abarca también porciones y subpartes de órganos individuales y tejidos líquidos.

Los expertos en la técnica están familiarizados con los métodos de evaluación y tratamiento de receptores y donadores de trasplantes para lograr el mejor resultado posible tanto para el receptor como para el donador. De esta manera, los expertos en la técnica serán capaces fácilmente de evaluar y ajustar la dosis y administración de CD83, al menos algún otro compuesto inmunosupresor y opcionalmente una composición terapéutica según sea adecuado para un sujeto particular. Como se apreciará fácilmente de la descripción anterior, los métodos de la invención abarcan un número de etapas; estas etapas pueden llevarse a cabo en cualquier orden siempre y cuando se logre por lo menos un objeto de la invención. Debido a que los métodos pueden implicar varias administraciones de varios compuestos, puede ocurrir también cierta superposición de etapas.

Los métodos y composiciones de la invención proporcionan tolerancia a vectores de terapia génica tales como, por ejemplo, virus adeno-asociado ("AAV") y vectores derivados de un AAV, y/o a un producto génico codificado por el vector de terapia génica. Así, por ejemplo, cuando se administra terapia génica de un producto que carece de un producto génico particular (por ejemplo, cuando un sujeto tiene un defecto génico que resulta en la ausencia de una proteína particular), el sujeto podría ser tratado usando los métodos para prevenir una respuesta inmunológica no deseada al producto génico cuando es introducido en el sujeto. De preferencia, los vectores de terapia génica usados en las composiciones y métodos de la invención no tendrán patologías asociadas. En algunas modalidades, los métodos y composiciones del método proporcionan tolerancia a sustancias que son administradas a un sujeto repetidamente (es decir, "crónicamente") y contra el que no se desea una respuesta inmunológica, tal como, por ejemplo, interferón beta, el cual se administra comúnmente a sujetos afectados con esclerosis múltiple.

Los métodos y composiciones de la invención proporcionan células dendríticas ("DC") las cuales son "tolerogénicas": es decir, son capaces de inducir tolerancia inmune (es decir, "hacer tolerante a un sujeto") como se describió anteriormente. La actividad tolerogénica de una célula dendrítica puede evaluarse directa o indirectamente y puede medirse *in vivo* o *in vitro*; los ensayos adecuados se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, la capacidad de producir células T reguladoras después de la incubación con una población de células T CD4⁺ *in vitro* y/o un cambio detectable en la expresión de un marcador de superficie celular tal como CD14 o CD80 (ver, por ejemplo, Steinman y otros (2003) Ann. Rev. Immunol. 21: 685-711; Kubach y otros (2005) Int. J. Hematol. 81: 197-203).

La tolerancia inducida por una célula dendrítica tolerogénica puede inducirse *in vivo* o *ex vivo* y puede ser específica de un antígeno presentado por las DC. El término DC "inmunoestimuladoras" se usa en la presente para distinguir DC "normales" o nativas de las DCs tolerogénicas de la invención. Los métodos de la invención para producir DC tolerogénicas puede llevarse a cabo *in vivo* o *ex vivo*, y comprenden la etapa de exponer las células a CD83y al menos algún otro compuesto inmunosupresor. Las células pueden ser expuestas a la CD83 y otro(s) compuesto(s) inmunosupresor(es) durante el proceso de maduración o después de que el proceso de maduración esté completo, ya sea *in vivo* o *ex vivo* (*in vitro*). En modalidades en las que el proceso de maduración se lleva a cabo *in vitro*, por "expuestas" se intenta decir que las células pueden ser incubadas en presencia de CD83 y los demás compuestos inmunosupresores o pueden ser cultivadas (es decir, las células pueden crecer y dividirse) en presencia de CD83 y los demás compuestos inmunosupresores. Las células pueden ser expuestas a CD83 y a los demás compuestos inmunosupresores de cualquier manera adecuada; por ejemplo, CD83 y los demás compuestos inmunosupresores pueden añadirse al medio de crecimiento o, cuando sea posible, una o más de CD83 y los demás compuestos inmunosupresores pueden ser expresados por las células en el cultivo después de la transfección con un ARNm que los codifique.

Se describen métodos para producir DC tolerogénicas que comprenden exponer DC inmaduras a CD83 y al menos algún otro compuesto inmunosupresor durante el proceso de producción (por ejemplo, durante la etapa de maduración final). Generalmente, en estos métodos, células dendríticas inmaduras pueden ser expuestas a CD83 dentro de un intervalo que tenga: un extremo inferior de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 50 ó 100 microgramos por ml de medio; y un extremo superior de 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 50, 100 ó 200 microgramos por ml de medio. Muy preferentemente, las DC son maduras en presencia de 1-10 µg/ml de CD83. Las dosis de los demás compuestos inmunosupresores pueden seleccionarse fácilmente por alguien con experiencia en la técnica. Por "DC inmadura" según se usa en la presente se intenta decir que las células son capaces de volverse células dendríticas maduras si se cultivan adecuadamente (si es *in vitro*) o si se les deja madurar (si es *in vivo*). Así, los métodos de la invención comprenden exponer células a CD83 durante al menos una etapa del proceso de maduración y exponer las células a los demás compuestos inmunosupresores durante al menos una etapa del proceso de maduración; estas etapas pueden ser la(s) misma(s) etapa(s) o puede(n) ser etapa(s) diferente(s) y/o no superpuesta(s). Las células se exponen a CD83 y/o los demás compuestos inmunosupresores: a través de al menos una etapa del proceso de maduración; durante más de una

etapa del proceso de maduración; o durante el proceso de maduración completo.

Las células dendríticas tolerogénicas pueden ser cargadas con antígeno para su presentación al "pulsar" las células con antígeno o al transducir las células con ARN (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6,387,701; la patente de Estados Unidos núm. 6,670,186; la solicitud de E.U.A. No. 10/362,715). Los métodos de la invención también pueden combinarse con otros métodos conocidos en la técnica para proporcionar ventajas adicionales (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,831,068; la solicitud de E.U.A. No. 11/246,387). Se apreciará que las etapas de los métodos de la invención pueden llevarse a cabo en cualquier orden que produzca el resultado deseado. Así, por ejemplo, las células pueden ser cargadas con antígeno antes de o después de su exposición a CD83 y/o a los demás compuestos inmunosupresores. De esa manera, los métodos de la invención incluyen la producción de células dendríticas tolerogénicas mediante un método que comprende la co administración de CD83, al menos algún otro compuesto inmunosupresor y opcionalmente una composición terapéutica (por ejemplo, un antígeno de interés) a las células durante el proceso de maduración.

Las células dendríticas inmunoestimuladoras maduras generalmente exhiben un conjunto característico de marcadores de superficie celular. Así, generalmente, una DC inmunoestimuladora madura no exhibirá o exhibirá muy poca expresión de CD14. Asimismo, generalmente, una DC inmunoestimuladora madura (ya sea una DC nativa producida *in vivo* o una DC producida *in vitro*) exhibirá características tales como, por ejemplo, expresar los marcadores de superficie celular CD80, CD83 y CD86 y secretar IL-12. En contraste, las DC tolerogénicas producidas mediante los métodos de la invención tienen un nivel de expresión reducido de al menos uno de estos marcadores de superficie celular característicos. El nivel de expresión de un marcador de superficie celular particular en una DC tolerogénica producida mediante un método de la invención se reduce en 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ó 100%, o es indetectable, en comparación con el nivel de expresión del mismo marcador de superficie celular en una célula de control adecuada (por ejemplo, una DC inmunoestimuladora nativa, o una DC inmunoestimuladora madura obtenida por medio de maduración *in vitro*). Una DC tolerogénica de la invención exhibe expresión indetectable de CD83 y expresión de CD80 muy reducida. Una DC tolerogénica exhibe expresión de CD83 que está reducida en al menos 95% y expresión de CD80 que está reducida en al menos 50% para cada marcador en comparación con una célula control adecuada. Una DC tolerogénica de la invención exhibirá expresión más alta de CD14 que una DC inmunoestimuladora madura. Las células dendríticas tolerogénicas pueden producirse y/o ensayarse para su función usando técnicas conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, WO 2004/046182), o como se describe en la sección experimental o como sigue.

Por ejemplo, pueden cultivarse células usando medio estándar con 1% de plasma humano (por ejemplo, RPMI 1640 (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) complementado con glutamina (200 µg/ml, BioWhittaker, Verviers, Bélgica), penicilina/estreptomicina (20 µg/ml), 10 mM de Hepes, pH 7.5 (Sigma-Aldrich) y 1% de plasma humano de un solo donador (previamente inactivado con calor al incubar a 56°C durante 30 minutos)). Las PBMC humanas pueden ser aisladas de las capas leucocitarias mediante sedimentación en Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania), sembradas sobre cajas de cultivo de 100 mm revestidas con IgG (10 µg/ml de γ -globulina de la fracción de Cohn; Sigma-Aldrich), e incubadas a 37°C en 5% de CO₂. Después de incubaciones de 1 hora y 7 horas, las fracciones de células no adherentes se remueven y las células adherentes se cultivan adicionalmente en medio con plasma humano al 1% suplementado con citocinas GM-CSF (800 U/ml) e IL-4 (500U/ml). En el día 3 del periodo de incubación, se añade medio fresco (que incluye GM-CSF a 400 U/ml e IL-4 a 500 U/ml). El día 4 ó 5, se recogen las células no adherentes, se cuentan y se transfieren a cajas nuevas a una densidad de 0.3-0.5x10⁵ células/ml. Para la etapa de maduración final, 1% de medio de plasma humano es suplementado con TNF- α (1.25 ng/ml), GM-CSF (40 U/ml), IL-4(200 U/ml), prostaglandina E₂ (0.5 pg/ml; (ver, por ejemplo, Lechmann y otros, (2001) J. Exp. Med. 194: 1813-1821), y CD83 soluble (4 µg/ml). Alternativamente, para la etapa de maduración final, el cóctel de maduración comprende IL-1 β , TNF- α , PGE₂, y CD83 soluble (4 µg/ml). El día 8, las células pueden ser analizadas mediante FACS. Las células maduras mediante este método revelan una clara reducción en la expresión de CD80 en la superficie celular (por ejemplo, de 96% a 66%) y CD83 (por ejemplo, de 96% a 30%) y un incremento en células CD14 positivas cuando se compara con DC maduras normalmente (ver, por ejemplo, WO 2004/046182). La expresión de otros marcadores de superficie celular (por ejemplo, MHC Clase I y II) podría no verse afectada significativamente. En otras modalidades, las células pueden ser maduras de acuerdo con el protocolo como se describió anteriormente pero puede añadirse CD83 soluble al cóctel de maduración después de uno, dos, tres, o más días.

Las células dendríticas expuestas a CD83 y a los demás compuestos inmunosupresores pueden compararse con las células dendríticas que no fueron expuestas a CD83 y a los demás compuestos inmunosupresores de varias maneras para evaluar sus propiedades tolerogénicas o inmunoestimuladoras. Los ensayos adecuados se conocen en la técnica (por ejemplo, el ensayo MLR); algunos se describen también en la sección experimental. Una característica típica de los ensayos de MLR es la formación de agrupaciones de DC inmunoestimuladoras y células T proliferativas. La adición de CD83 soluble el día 1 del ensayo inhibe potentemente la formación de agrupaciones de células típica (ver, por ejemplo, Lechmann y otros, (2001) J. Exp. Med. 194: 1813-1821). Más aún, CD83 soluble inhibe la capacidad de las células dendríticas maduras para estimular la proliferación de células T en una manera dependiente de la concentración (ver, por ejemplo, Lechmann y otros (2001), *ibid.*)

Las células dendríticas tolerogénicas se usan para producir células T reguladoras (ver, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos núm.10/661,804). Brevemente, las células T reguladoras pueden producirse a partir de una población que comprende células TCD4⁺ y/o células T CD8⁺. Estas poblaciones de células T pueden aislarse de un sujeto o pueden cultivarse. Además pueden usarse subpoblaciones de células T, tal como, por ejemplo, poblaciones clasificadas por marcador de superficie celular a fin de comprender poblaciones enriquecidas de células particulares (por ejemplo, células T CD4⁺ CD25⁺ o células T CD4⁺ CD25⁻). Después las células T son cultivadas o incubadas con las células dendríticas tolerogénicas, es decir, las células dendríticas que han sido expuestas a sCD83 y a al menos algún otro compuesto inmunosupresor, por ejemplo, durante el proceso de maduración. Si las células T reguladoras están siendo producidas *in vitro*, las células dendríticas tolerogénicas pueden ser alogénicas a o singénicas con las células T. Las DC tolerogénicas se cargan con antígeno (por ejemplo, pulsadas con antígeno o transfectadas con ARN que codifica para antígeno). Las DC tolerogénicas pueden presentar el antígeno a las células T.

Durante la producción de células T tolerogénicas, las células T pueden ser expuestas a y/o cultivadas con las DC tolerogénicas una vez o más de una vez. Por ejemplo, las células T pueden ser cultivadas con DC durante días o semanas; las DC en el cultivo mixto pueden ser restablecidas si es necesario. El cultivo continuará hasta que se obtenga una cantidad terapéutica de células T reguladoras. Otras técnicas de cultivo y/o aditivos pueden usarse para mejorar los resultados obtenidos, por ejemplo, el medio de cultivo puede contener además citoquinas tales como IL-2.

Generalmente, las células T reguladoras secretan IL-10 y/o TGF- β (ver, por ejemplo, Walsh y otros, (2004) J. Clin. Invest. 114:1398-1403); los ensayos para confirmar la secreción de estas citocinas se conocen en la técnica. En algunas modalidades, las células T reguladoras inhibirán una reacción linfocítica mixta en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90%, 95%, o 100 %. Los ensayos de reacción linfocítica mixta se conocen bien en la técnica. Las células T reguladoras de la invención pueden ser específicas de antígenos. Las células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ expresan generalmente marcadores de superficie celular característicos incluyendo CD4, CD25 y Foxp3; los ensayos para marcadores de superficie celular se conocen bien en la técnica.

El término "vector" se refiere a un plásmido, virus o a otro vehículo conocido en la técnica que puede ser manipulado mediante inserción o incorporación de un polinucleótido. Estos vectores pueden usarse para la manipulación genética (es decir, "vectores de clonación") o se pueden usar para transcribir y/o traducir el polinucleótido insertado ("vectores de expresión"). Un vector generalmente contiene al menos un origen de replicación para su propagación en una célula y un promotor. Los elementos de control presentes dentro de un vector de expresión, que incluyen los elementos de control de la expresión que se muestran en la presente, se incluyen para facilitar la transcripción y la traducción adecuadas (por ejemplo, señales de empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción en marco del ARNm, codones de terminación, etc.). El término "elemento de control" según se usa en la presente incluye, como mínimo, uno o más componentes cuya presencia puede influenciar la expresión; el término "elemento de control de expresión" según se usa en la presente se refiere a una o más secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico a la cual se enlazan operablemente. Un elemento de control de la expresión como se usa en la presente se refiere a una o más secuencias de ácidos nucleicos que regula la expresión de una secuencia de ácido nucleico a la que está enlazada operablemente. Un elemento de control de la expresión enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico controla la transcripción y, según sea adecuado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. De esta manera un elemento de control de la expresión puede incluir, según sea adecuado, promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción y/o un codón de inicio (por ejemplo, ATG) enfrente de un gen que codifique para proteínas. Los vectores también pueden incluir componentes adicionales tales como, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de proteínas de fusión. "Enlazado operablemente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista.

Por "promotor" se entiende al menos una secuencia mínima que es suficiente para dirigir la transcripción. Los promotores para usar en o con la invención pueden ser constitutivos o inducibles, según sea adecuado (ver, por ejemplo, Bitter y otros (1987) Methods in Enzymology 153:516-544). Los promotores inducibles son activados por señales o agentes externos. Otros elementos promotores pueden incluir aquellos que sean suficientes para proporcionar control de la expresión génica dependiente del promotor para tipos de celulares, tejidos o condiciones fisiológicas específicas. Estos elementos pueden ubicarse en las regiones 5', 3' o intrónicas del gen. Los promotores útiles también incluyen "promotores condicionales", los cuales son activos sólo bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, un promotor condicional puede estar inactivo o reprimido cuando está presente un agente particular (por ejemplo, un compuesto químico), pero puede estar activo o no reprimido cuando el agente ya no esté presente.

Según se usa en la presente, "transfectar" o "transfección" se refiere a la introducción de uno o más ácidos nucleicos o polinucleótidos exógenos en una célula eucariótica. La transfección incluye la introducción de tal manera que una proteína codificada por el ácido nucleico o polinucleótido pueda ser expresada. Los métodos de transfección se conocen en la técnica e incluyen una variedad de técnicas tales como electroporación métodos que usan complejos de suministro de

ácidos nucleicos a base de proteínas, a base de lípidos, y a base de iones catiónicos, vectores virales, suministro por "pistola génica" y varias otras técnicas.

5 Un polinucleótido introducido en una célula (por ejemplo, una DC) no modifica genéticamente la célula y no se mantiene establemente. El término "modificado genéticamente" o "transformado" significa que conviene y/o que expresa un gen extraño o secuencia de ácido nucleico que a su vez modifica el genotipo de la célula o su progenie; el fenotipo de la célula también es alterado. "Modificado genéticamente" o "transformado" se refiere también a cualquier adición, supresión o 10 disrupción de los nucleótidos endógenos de la célula. El mantenimiento estable de un polinucleótido introducido requiere típicamente que el polinucleótido contenga un origen de replicación compatible con la célula hospedera o se integre en un replicón de la célula tal como un replicón extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial.

15 El término "transfectada transitoriamente" se refiere a una célula que ha sido transfectada pero la cual no está genéticamente modificada y por lo tanto la progenie de la célula no hereda el material genético transformado (por ejemplo, ácido nucleico o polinucleótido). El material genético puede ser ARN o puede transcribirse a ARN, y una proteína codificada por el material genético puede ser expresada. Dicha expresión se denomina en la presente como "expresión transitoria". Normalmente, la expresión transitoria se logra al no incorporar el material genético transfectado en el cromosoma.

20 Las células dendríticas son transfectadas transitoriamente usando electroporación de ARN. Los métodos de electroporación de ARN se conocen bien en la técnica. Generalmente, el ARNm no se vuelve una parte permanente del genoma de la célula, ya sea cromosómica o extracromosómica. Cualquier otro método que pudiera usarse para expresar transitoriamente una proteína deseada también se contempla dentro del alcance de la invención. Los métodos no incluyen la alteración permanente del genoma (es decir, no da como resultado un cambio genético heredable a la célula) y de esta manera evitan las desventajas asociadas con el uso de virus, tales como, por ejemplo, retrovirus y adenovirus.

25 Si se desea, la transformación de una célula con ADN puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, cuando la célula es un eucarionte, los métodos de transformación de ADN incluyen, por ejemplo, co-precipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encapsulado en liposomas, y vectores virales. Las células eucarióticas también pueden cotransformarse con secuencias de ADN que codifiquen para un ácido nucleico de interés y/o 30 una segunda molécula de ADN extraña que codifique para un fenotipo seleccionable, tales como los descritos en la presente. Otro método es usar un vector viral eucariótico, tal como el virus de simio 40 (SV40) o virus de papiloma bovino para infectar o transformar transitoriamente células eucarióticas y expresar la proteína. Después de la transformación, CD83 puede ser aislada y purificada de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, el lisado preparado a partir de un 35 hospedero de expresión (por ejemplo bacterias) puede ser purificado usando HPLC, cromatografía de exclusión de tamaño, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. Las proteínas sustancialmente puras también pueden obtenerse mediante síntesis química usando un sintetizador de péptidos (por ejemplo, Applied Biosystems, Inc., Modelo 430A (ABI, Foster City, Calif., EUA) o similar). CD83 también se puede producir como se describe en la sección experimental más abajo en la presente.

40 La producción de medicamentos o composiciones farmacéuticas que comprenden CD83 y al menos otro compuesto inmunosupresor o al menos una composición terapéutica usada de acuerdo con la invención y el uso de dichos medicamentos o composiciones farmacéuticas ocurre de la manera habitual por medio de métodos de la tecnología farmacéutica común y por lo tanto proporcionados fácilmente por alguien con experiencia en la técnica. Alguien con 45 experiencia en la técnica apreciará que diferentes formas de administración serán adecuadas para diferentes compuestos y/o indicaciones, y serán capaces de seleccionar el método de administración más adecuado. Por ejemplo, la psoriasis puede tratarse tópicamente con una formulación adecuada para su administración a la piel, mientras que el lupus eritematoso sistémico puede ser tratado mediante la administración al sujeto de una formulación adecuada para inyección intraperitoneal. Los profesionales que tienen experiencia en la técnica están familiarizados con los criterios y métodos para 50 el ajuste de dosis y administraciones de compuestos, tales como, por ejemplo, la evaluación de los resultados a partir de pruebas clínicas y de laboratorio convencionales, incluyendo ensayos bioquímicos e inmunológicos. Cuando sea adecuado, los componentes de un medicamento pueden administrarse por separado.

55 Generalmente, los compuestos de acuerdo con la presente invención se procesan junto con adyuvantes y/o vehículos adecuados y farmacéuticamente aceptables para proporcionar formas medicinales adecuadas para las diferentes indicaciones y tipos de rutas de administración. Una composición farmacéutica adecuada puede incluir también estabilizadores y conservantes. Para ejemplos de vehículos, estabilizadores y adyuvantes, ver, por ejemplo, Gennaro (1995) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mac Pub. Co., Easton, PA, E.U.A.). En consecuencia, los medicamentos pueden producirse de tal manera que la velocidad de liberación deseada respectiva se obtenga, tal como, por ejemplo, un 60 rápido efecto de liberación o un efecto de liberación prolongada.

Los métodos de tratamiento proporcionados por la invención incluyen el uso de CD83 y al menos algún otro compuesto inmunosupresor y, opcionalmente, una composición terapéutica (por ejemplo, un antígeno) para inducir tolerancia y/o inmunosupresión en un sujeto *in vivo*. Los medios para administrar estas sustancias a un sujeto incluyen, pero no están limitados a, rutas convencionales y fisiológicamente aceptables, tales como, por ejemplo, rutas de administración oral, pulmonar, parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular, intraarticular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), inhalación (por medio de una formulación en polvo fino o una aspersión fina (aerosol)), rutas de administración transdérmica, intradérmica, nasal, vaginal, rectal o sublingual. Estas sustancias (es decir, la CD83, el al menos algún otro compuesto inmunosupresor y opcionalmente la composición terapéutica) se pueden administrar con vehículo, y pueden administrarse en la misma formulación y a través de la misma ruta de administración o pueden administrarse en formulaciones diferentes y/o a través de rutas de administración diferentes. Preferentemente, cada una de las sustancias se administra en su dosis óptima para de esta manera obtener un efecto terapéutico óptimo de la coadministración. Por ejemplo, la administración de anticuerpos puede ser mediante inyección intravenosa, mientras que la administración de CD83 puede ser mediante inyección peritoneal y la administración de un compuesto inmunosupresor puede ser mediante dosificación oral con una píldora.

Los vehículos comprenden cualquier solución o dispersante fisiológico adecuado o similar. Las soluciones fisiológicas comprenden cualquier medio de solución o dispersión aceptable, tal como solución salina o solución salina de pH regulado. El vehículo también puede comprender agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes de retraso de absorción e isotónicos, y similares. Excepto en la medida en que cualquier medio, vehículo o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, su uso es contemplado. El vehículo puede comprender además uno o más compuestos adicionales, incluyendo pero no limitados a citocinas tales como, por ejemplo, interleucina-10 (IL-10) y TGF- β .

Cuando la composición farmacéutica comprende un ácido nucleico para su administración a cierta especie de animal, el ácido nucleico para usar en la invención puede derivarse de otras especies. Por ejemplo, cuando una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que codifica CD83 se va a administrar a humanos, el ácido nucleico puede comprender la secuencia de la forma humana de la proteína CD83. Los ácidos nucleicos para usarse en la invención pueden ser administrados junto con agentes que incrementen la permeabilidad de la membrana celular y/o la absorción celular de los ácidos nucleicos. Los ejemplos de estos agentes son poliaminas como las descritas por ejemplo por Antony y otros (1999) *Biochemistry* 38: 10775- 10784; poliaminas ramificadas como las descritas por ejemplo por Escriou y otros, (1998) *Biochem. Biophys. Acta* 1368: 276-288; poliaminolípidos como los descritos por ejemplo por Guy-Caffey y otros, (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 31391-31396; DOTMA como se describe por Feigner y otros, (1987) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. E.U.A.* 84: 7413-7417 y porfirinas catiónicas como las descritas por ejemplo por Benimetskaya y otros, (1998) *Nucl.1. Acids. Res.* 26(23): 5310-5317.

Las composiciones, medicamentos y métodos de tratamiento proporcionados por la invención también incluyen DC tolerogénicas y células T reguladoras producidas de acuerdo con los métodos de la invención y el uso de las mismas para inducir tolerancia en un sujeto *in vivo*. Los medios para administrar las DC tolerogénicas y/o células T reguladoras de la invención a un sujeto incluyen, pero no están limitados a, rutas convencionales y fisiológicamente aceptables, tales como, por ejemplo, inyección intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea. Las células (es decir, las DC tolerogénicas y/o células T reguladoras producidas por los métodos de la invención) pueden ser administradas con un vehículo. Estos vehículos comprenden cualquier solución o dispersante fisiológico adecuado o similar, tales como, por ejemplo, solución salina o solución salina de pH regulado. El vehículo también puede comprender agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes de retraso de absorción e isotónicos y similares. Excepto en la medida en que cualquier medio, vehículo o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo (es decir, las DC tolerogénicas y/o células T reguladoras), se contempla su uso en las composiciones.

Como es familiar para aquellos con experiencia en la técnica, la dosis de las células que será administrada *in vivo* se determina con referencia a varios parámetros, incluyendo la especie del hospedero, la edad, peso y estado de enfermedad. La dosis también depende de la ubicación que será seleccionada dentro del hospedero, por ejemplo, el sitio de trasplante de tejido de un donador. Por ejemplo, la orientación directa al sitio de tejido insertado puede requerir de diferentes dosis que la administración al torrente sanguíneo de un hospedero mamífero. La dosis se selecciona preferentemente de manera que la administración cause un resultado eficaz en el sujeto. Las dosis pueden variar de aproximadamente al menos 1×10^4 células a aproximadamente al menos 1×10^9 células por administración. La dosis varía de aproximadamente 5×10^5 células a aproximadamente 5×10^7 células. Para lograr un efecto terapéutico máximo, pueden requerirse varias dosis.

Cuando sea adecuado, la administración previa de las células también se puede usar. Así, por ejemplo, cuando se vayan a usar células para la prolongación de la supervivencia de tejido trasplantado, la administración de las células al receptor de trasplante puede llevarse a cabo antes del trasplante, tal como, por ejemplo, una semana antes del trasplante. La administración también se puede llevar a cabo en el momento del trasplante y más adelante (por ejemplo, de una a dos semanas después del trasplante, o tanto como sea necesario en base a la evaluación clínica) para asegurar la aceptación o falta de rechazo del tejido trasplantado. Cuando sea adecuado, los tratamientos también pueden comprender más de un

tratamiento individual descrito en la presente; de esta manera, por ejemplo, un curso de tratamiento para un paciente puede incluir la administración de sCD83 y al menos otro compuesto inmunosupresor y también puede incluir la administración de DC tolerogénicas.

5 A continuación se describen más particularmente varios aspectos de la invención por medio de ejemplos. Sin embargo, la invención no está limitada simplemente a las modalidades ilustradas por estos ejemplos sino que más bien proporciona beneficios como los descritos más completamente en la presente en la solicitud como un todo.

Sección experimental

10 Métodos generales:

Para las técnicas generales, ver Current Protocols in Immunology, eds., Coico y otros, (Wiley, Hoboken, NJ).

15 **Transferencia Western/Tinción con Azul Coomassie:** Un procedimiento típico para evaluar sCD83 fue el siguiente. Para cada muestra de sCD83, se preparó 1 microgramo de sCD83 con regulador de pH de corrida y 2 microlitros de β -mercaptoetanol. La muestra se calentó durante 10 minutos a 96 grados y después se corrió en un gel de poliacrilamida al 4-12% de Invitrogen. El gel se tiñó directamente con azul Coomassie, o, si se deseaba, fue transferido a una membrana. La membrana se sondeó con anticuerpo primario monoclonal CD83 4BS 1/1,000 y después con anticuerpo secundario anti-rata en cabra 1/20,000; la señal se reveló con reactivos de quimioluminiscencia de Amersham.

20 **Reacción Linfocítica Mixta ("MLR") en primates:** Se aislaron las PBMC de muestras de sangre de dos monos cinomolgos diferentes usando separación por gradiente de Ficoll. Las células estimuladoras se hicieron no proliferativas con Mitomicina C o tratamiento con radiación. Las células estimuladoras y las células que respondían fueron sembradas a 3×10^5 células/pocillo y se trataron con cantidades de titulación de sCD83. Después de 96 horas se añadió ^3H -timidina (1 μCi /pocillo) a los cultivos. Las células se cosecharon 18 a 20 horas más tarde y se analizaron para determinar la cantidad de proliferación de células T.

25 **Tinción para TNF- α , CD86 y CCR5:** La tinción para TNF- α (intracelular) y CD86 y CCR5 (superficie) se llevó a cabo como sigue. Se obtuvieron muestras de sangre total de monos cinomolgos y se incubaron con sCD83 durante 12 horas. Las muestras fueron estimuladas con 100 ng/mL de LPS y 100 U/mL de IFN- γ durante 6 horas. La tinción intracelular para TNF- α se llevó a cabo usando un estuche Fix/Perm disponible comercialmente. Alternativamente, la tinción superficial para CD83 y CCR5 se llevó a cabo usando técnicas estándares. Después de la tinción, los glóbulos rojos fueron lisados y los resultados se analizaron con un citómetro de flujo BD (Becton Dickinson).

30 **Protocolo de proliferación de células B:** Se hicieron suspensiones de células individuales de células esplénicas de ratón, y los glóbulos rojos se lisaron usando regulador de pH de lisis ACK (ver, Current Protocols in Immunology, eds. Coico y otros, (Wiley, Hoboken, NJ)). Las células B fueron purificadas usando esferas de MACS CD19, y las células B puras a 10^5 células/pocillo fueron pre-incubadas durante 3 horas con cantidades de titulación de sCD83. Después las células B fueron estimuladas con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. Después de 48 horas, se añadió al cultivo 1 μCi de ^3H -timidina/pocillo. Las células fueron cosechadas 18 a 20 horas más tarde para determinar la cantidad de proliferación de células B.

35 **Protocolos de Producción de Anticuerpos para Trabajo *In vitro*:** La producción de IgM e IgG fue como sigue. Una población pura de 2×10^6 células B/pocillo (de ratones C57B1/6) fue cultivada con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (para inducir la producción de anticuerpos) en presencia de una concentración de titulación de sCD83 (15 a 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los sobrenadantes fueron cosechados después de 72 horas de cultivo, y la producción de IgM e IgG en los sobrenadantes se midió por ELISA.

40 **Cambio de isotipo:** Poblaciones puras de 2×10^6 células B/pocillo (de ratones C57B1/6) fueron cultivadas con uno de los siguientes tratamientos: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (para inducir IgG2b); 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS, 800 U/mL de IL-4 y 150 U/mL de IL-5 (para inducir IgG1); o 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS y 1,000 U/mL de IFN- γ (para inducir IgG2a). Para cada tratamiento, algunas células también fueron cultivadas con 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sCD83 y algunas fueron designadas como controles de No Tratamiento. Las células fueron cosechadas después de 72 horas, y se les dio un breve lavado con ácido para remover la inmunoglobulina unida al receptor de Fc. Después las células fueron teñidas con uno de los siguientes, para detectar IgG2b, IgG1 e IgG2a en la superficie respectivamente: anti-IgM-FITC y anti-IgG2b-RPE; anti-IgM-FITC y anti-IgG1-RPE o anti-IgM-FITC y anti-IgG2a-RPE.

45 **Protocolos de Producción de Anticuerpos para Trabajo *ex vivo*:** Proliferación de células B: a ratones C57B1/6 se les dio un aloinjerto cardiaco heterotópico de un ratón C3H. Después los ratones se dejaron sin tratar o fueron tratados con una dosis diaria de 100 μg de sCD83 mediante inyección intraperitoneal. Después los ratones fueron sacrificados el día 8, que es el tiempo de supervivencia medio de ratones no tratados. Después las células B fueron cosechadas de los bazos de ratón y poblaciones puras de 10^5 células B /pocillo fueron cultivadas con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS para estimular las células (sin sCD83 añadida). Después de 48 horas de cultivo, se añadió ^3H -timidina, y después de 12-20 horas adicionales

de cultivo, las células fueron cosechadas y se midió la incorporación de ^3H -timidina.

Producción de IgM e IgG: a ratones C57B1/6 se les dio un aloinjerto cardíaco heterotópico de un ratón C3H. Después los ratones se dejaron sin tratar o fueron tratados con una dosis diaria de 100 μg de sCD83 por inyección intraperitoneal. Después los ratones fueron sacrificados el día 8, que fue aproximadamente el tiempo de supervivencia promedio de ratones no tratados. Las células B fueron cosechadas de los bazo de ratones receptores y cultivadas a 2×10^6 células B/pocillo con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (para inducir la producción de anticuerpos, sin sCD83 añadida). Después de 72 horas de cultivo, los sobrenadantes fueron cosechados y la producción de IgM e IgG se midió por ELISA.

Trasplante: Los procedimientos y criterios para la selección de cepas de ratones se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, Wang y otros, (2003) J. Immunol. 171:3823-3836.

Ejemplo 1: Producción de CD83 soluble recombinante

Cepa bacteriana y plásmido: El plásmido de pGEX2ThCD83ext que contiene el ADNc que codifica para el dominio extracelular de CD83 (sCD83) fusionado con GST se usó como el vector de expresión para la producción de GST-hCD83ext recombinante, que estaba bajo la regulación de un promotor *lac* inducible por IPTG (ver, por ejemplo, Lechmann y otros (2002) Protein Expression and Purification 24:445-452). Debido al diseño de un sitio de corte de trombina en la unión entre GST y hCD83ext, el producto sCD83 final tiene cuatro aminoácidos adicionales (Gli-Ser-Pro-Gli) en el amino terminal.

Cultivo de GST-sCD83: La cepa de E. Coli para la producción proporcionada amablemente por el Dr. Alexander Steinkasserer, se almacenó congelada a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, se revivió al estriarla sobre una placa de agar LB (5 g/L de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura Bacto, 10 g/L de triptona Bacto y 15 g/L de agar Bacto) que contenía 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina (Amp.). La placa se incubó a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 15 horas. Pocas colonias individuales aisladas se usaron para inocular 600 mL de medio LB que contenía 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Amp. El cultivo se incubó después a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en una zaranda giratoria a 200 rpm durante aproximadamente 16 horas. El cultivo de siembra (de hasta 600 mL) se usó para inocular un biorreactor (MBR Bioreactor AG, Wetzikon, Suiza) que contenía 1 a 15 litros de volumen de medio de cultivo de trabajo (5 g/L de NaCl, 20 g/L de extracto de levadura Bacto, 20 g/L de triptona Bacto y 5 g/L de glucosa). Cuando las células crecieron hasta una densidad celular designada de $2.0 \pm 0.2\text{ OD}_{600}$, el cultivo se suplementó con 0.5 mM de isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) para la inducción de la producción de GST-hCD83ext. También se añadió al cultivo antiespuma 289 (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.) a 50 $\mu\text{L}/\text{L}$ para evitar la excesiva formación de espuma durante el cultivo. Para la aireación, el biorreactor se purgó con aire esterilizado con filtro a 1.5 vvm. El pH del cultivo se mantuvo a 7.00 ± 0.15 al añadir NH_4OH 3 N o H_3PO_4 3 N usando una combinación de un electrodo de pH (Ingold Messtechnik AG, Zurich, Suiza), un controlador de pH (Modelo pH-40, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, E.U.A.) y dos bombas peristálticas (Watson Marlon, Falmouth, Reino Unido). Después de la inducción, el biorreactor fue operado a $28\text{ }^\circ\text{C}$ y 600~650 rpm durante 6 horas.

Procesamiento corriente abajo de sCD83: Después del cultivo, las células fueron cosechadas mediante centrifugación a $6,000 \times g$ y $2\text{ }^\circ\text{C}$, pesadas y almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para su uso posterior. Típicamente, pudo obtenerse la pasta celular a aproximadamente 20 g de peso de células en húmedo (wcv) a partir de un litro de cultivo que tenía una densidad celular de 8-10 OD_{600} lo que implica que 1 g de wcv fue aproximadamente equivalente a 400-500 unidades OD_{600} . Para preparar el lisado para la purificación de hCD83ext, una suspensión de células a 0.05 g- wcv/mL se preparó al suspender una cantidad adecuada de pasta de célula congelada en solución salina regulada con fosfato (PBS, pH 7.3). Un lote de 100 mL de suspensión celular a aproximadamente 20-25 OD_{600} se sometió a ultrasonidos intermitentemente (0.5 segundos encendido/0.5 segundos apagado) durante 4 minutos usando un procesador ultrasónico con una punta regular (Misonix, Farmingdale, NY, E.U.A.). El lisado de células procesado se centrifugó después a $15,000 \times g$ y $2\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos para remover los restos celulares. El sobrenadante que contenía proteínas solubles totales se filtró con un filtro de 0.45- μm antes del tratamiento cromatográfico subsecuente para la purificación de proteínas.

Para capturar la proteína de fusión GST-CD83 por cromatografía de afinidad a GST, 100 mL del lisado preparado anteriormente se cargaron en una columna GSTrap de 20 mL (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec, Canadá) a una velocidad de flujo de 4 mL/min. Mientras se unía a la columna, la fusión GST-hCD83ext fue cortada *in situ* con 10 U/mL de trombina (es decir, "corte en columna"). Para hacer esto, el regulador de pH de unión PBS en la columna GSTrap unida con la fusión GST-hCD83ext fue reemplazado por el mismo volumen de regulador de pH de unión que contenía 10 U/mL de trombina a través de la inyección manual en la columna. El corte se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 2.5 horas y el líquido a granel en la columna GSTrap, que contenía principalmente hCD83ext contaminado con trombina, fue expulsado usando 1 volumen de columna de regulador de pH de unión. La porción GST junto con el resto de GST-hCD83 no digerido se eluyeron después usando el regulador de pH de elución. Para mantener un buen rendimiento para el corte en columna, la columna GSTrap se limpió con NaOH 1M y HCl guanidina 6M para remover varios contaminantes de proteína atrapados dentro de la columna.

Se llevó a cabo una etapa de pulido para remover la trombina y otras proteínas contaminantes de CD83. Un sistema

FPLC (AKTApurifier UPC 10, GE Healthcare) equipado con una columna de intercambio aniónico fuerte (30-mL de HiTrap Q HP en XK16/20, GE Healthcare) se usó para el procesamiento, aunque un sistema HPLC también se puede usar para llevar a cabo esta etapa de purificación. Los reguladores de pH de carga y elución usados fueron regulador de pH Tris (20 mM, pH 7.5) con 50 mM de NaCl y regulador de pH Tris con NaCl 1M, respectivamente. Primero, la columna de intercambio aniónico del sistema FPLC fue equilibrada con el regulador de pH de carga. Luego, la solución de proteínas que eluyó de la columna GStrap como se describió anteriormente se cargó en la columna. Las fracciones que contenían hCD83ext fueron eluidas, agrupadas y concentradas con ultrafiltración usando una celda agitada de alta presurización (Amicon, Modelo 8050 con disco YM10, Millipore Canadá, Cambridge, Ontario, Canadá) o unidad de ultrafiltración similar, y después se almacenaron a -20 °C. Esta acumulación de producto se llevó a cabo diariamente hasta que la cantidad acumulada se hizo lo suficientemente grande para procesar para la remoción adicional de la endotoxina.

Para la remoción adicional de la endotoxina aproximadamente 1 g de la sCD83 acumulada se trató con cromatografía de intercambio aniónico usando el mismo escenario experimental y protocolo para la etapa de pulido. Todos los reguladores de pH para esta etapa de procesamiento se prepararon usando agua para inyección (WFI). Las fracciones que contenían hCD83ext se agruparon y concentraron con ultrafiltración usando una celda agitada ultrapresurizada. Finalmente, las fracciones del producto CD83 pueden someterse adicionalmente a filtración usando el filtro Mustang E (Pall Life Sciences, Mississauga, Ontario, Canadá) o unidad de filtración similar para la remoción de endotoxinas y después se esteriliza por filtración. La endotoxina de cada fracción de producto fue ensayada.

Protocolos Analíticos: la muestra de cultivo fue diluida adecuadamente con solución salina para medir la densidad celular en OD₆₀₀ con un espectrofotómetro (DU[®]520, Beckman Coulter, Fullerton, CA, E. U.A.). Para la preparación del extracto de células para el análisis, células en la cantidad de 40 unidades OD₆₀₀ (definidas como 'OD₆₀₀xmL') fueron centrifugadas a 6,000xg a 2°C durante 10 minutos. El sedimento de células fue resuspendido en 3 mL de PBS, se rompió con prensa de French (Thermo Electron Corporation, USA), y después se centrifugó a 15,000xg a 2°C durante 15 minutos para remover los restos celulares. La disrupción celular también se puede inducir usando otros métodos físicos (por ejemplo, sonicación) o químicos. El sobrenadante que contiene proteínas solubles se usó para el ensayo de GST y el gel de SDS. El sedimento que contenía proteínas insolubles y restos celulares se lavó con regulador de pH de fosfato, se resuspendió en regulador de pH TE/SDS (10 mM de Tris HCl, pH 8.0, 1 mM de EDTA, 1% de SDS), y se calentó a 100 °C durante 5 minutos para permitir la disolución. El contenido proteico del sedimento se analizó como la fracción insoluble.

La función de GST se ensayó a temperatura ambiente usando sustratos 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y glutatión. La GST (y su fusión) cataliza una reacción entre los dos sustratos para formar un producto conjugado que puede detectarse a 340 nm. Una unidad (U_{GST}) Se define como la cantidad de enzima que causa un incremento en absorbancia a 1 OD₃₄₀/min. La actividad volumétrica (en U_{GST}/mL) es el producto de la actividad específica (en unidad U_{GST}/OD₆₀₀) y la densidad celular (en OD₆₀₀). La endotoxina fue ensayada usando un estuche de ensayo comercial (LAL QCL-1000, Cambrex Bio Science Inc., Walkersville, MD, E.U.A.); la concentración de endotoxina volumétrica (en EU/mL) es el producto de la concentración específica de endotoxina (en EU/mg) y la concentración de proteínas (en mg/mL). La electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se realizó en una celda de electroforesis Mini-PROTEAN[®] II (Bio-Rad, Hercules, CA) usando un gel separador de poliacrilamida al 12.5% concentrado por un gel concentrador de poliacrilamida al 4%. Las muestras de proteínas del extracto de células (fracciones tanto solubles como insolubles a 0.12 unidades OD₆₀₀) y los productos purificados en cantidades adecuadas fueron cargadas. Se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje constante de 200 V durante aproximadamente 45 min. El gel se tiñó con azul Coomassie o nitrato de plata, se secó y se exploró para confirmar la remoción de endotoxinas de la muestra procesada. La proteína purificada se congeló y se almacenó en PBS (solución salina de pH regulado con fosfato) (pH 7.5) ya sea a -20°C o - 80°C.

Ejemplo 2: CD83 soluble no induce inmunosupresión global en un modelo de ratón de enfermedad autoinmunitaria.

La Encefalomiелitis Autoinmunitaria Experimental ("EAE") sirve como un modelo animal de esclerosis múltiple, una enfermedad que comparte algunas características patológicas con Lupus Eritematoso Sistémico ("SLE"), incluyendo infiltraciones de linfocitos CD4⁺ autoagresivas y densas a los tejidos afectados. Se ha reportado que CD83 puede reducir la parálisis que resulta de la inducción de EAE (ver, por ejemplo Zinser y otros (2004) J. Exp. Med. 200: 345-351). Se deseó determinar si la inmunosupresión inducida por CD83 en el contexto de este modelo de enfermedad en ratón fue específica o si fue una inmunosupresión global.

Para inducir EAE, los ratones fueron inmunizados con un péptido derivado de glicoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG), un constituyente de la funda de mielina que rodea las neuronas del sistema nervioso central, y con toxina de tosferina (ver, por ejemplo, Zinder y otros, (2004) J. Exp. Med. 200: 345-351). Empezando diez días más tarde, los ratones fueron inoculados con CD83 soluble (100 µg) cada día durante diez días. Veintiocho días después de la última inyección de CD83 soluble, los ratones fueron inyectados subcutáneamente con hemocianina de lapa en forma de cerradura ("KLH", 10 µg/ratón). Diez días más tarde, células del bazo fueron removidas de los ratones y reestimuladas con diferentes dosis de KLH. La proliferación de linfocitos en respuesta a esta estimulación se midió por la incorporación de [³H]-timidina. Los

resultados (mostrados en la figura 1) demostraron que los linfocitos de estos ratones proliferaron en respuesta a KLH, indicando que los animales eran inmunocompetentes y que CD83 soluble y no indujo inmunosupresión global y de larga duración.

5 **Ejemplo 3: Caracterización del punto final de la ventana de efectividad de CD83**

10 Los ratones se evaluaron para determinar el periodo de tiempo después de la administración de CD83 en el cual un sujeto puede hacerse tolerante a otro antígeno administrado. CD83 soluble (100 µg) se administró a ratones CBA mediante inyección 10 veces cada segundo día. Después de 11 días, los animales tratados fueron inmunizados con hemocianina de lapa en forma de cerradura (KLH, 10 µg). Diez días más tarde, las células esplénicas fueron removidas y se llevaron a cabo los ensayos de re-estimulación como se describió en la publicación de patente internacional WO 2004/046182, los contenidos de la cual se incorporan a manera de referencia. Los resultados (mostrados en la figura 2) demuestran que a este intervalo de inmunización, el sujeto no se hace tolerante al antígeno.

15 Otro experimento similar se llevó a cabo con sus células esplénicas las cuales fueron removidas de los animales tratados después de 22 días y evaluadas por ensayo de re-estimulación. Estos resultados fueron similares a aquellos descritos anteriormente y se muestran en la Figura 3.

20 **Ejemplo 4: Producción de DC tolerogénicas a partir de células precursoras de médula ósea murina**

20 Ratones C57/BL6 y ratones BALB/C (macho o hembra; Charles River, Wiga, Sulzfeld, Alemania) se usaron a las edades de entre 1 y 4 meses. La generación de células dendríticas derivadas de médula ósea se realizó como se describe en Lutz y otros (1999) J. Immunol. Meth.223: 77. El RPMI 1640 (Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) se suplementó con 100 U/ml de penicilina (Sigma), 100 µg/ml de estreptomina (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 50 µg/ml de ME (Sigma) y 10% de FCS filtrado e inactivado con calor (PAA, Colbe, Alemania). Se usó GM-CSF a 200 U/ml (PreproTech/Tebu, Rocky Hill, N.J.) en los días 0, 3, 6 y 8 del periodo de incubación.

25 Se llevó a cabo un ensayo MLR alogénico como sigue: células T CD4⁺ y CD8⁺ se aislaron de nódulos linfáticos inguinales y mesenquimales de ratones BALB/C y se co-cultivaron (2x10⁵ células/pocillo) durante 3 días con BM-DCs (a diferentes relaciones) que habían sido procesadas a través del día 9 del protocolo de preparación para BM-DC. El cultivo se hizo en cajas de cultivo de 96 pocillos, y el medio fue 20 microlitros de RPMI 1640 suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 pg/ml de estreptomina, 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de ME, y 10% de FCS filtrado e inactivado con calor. Las células fueron pulsadas con [³H]-timidina (1 µCi/pocillo; Amersham Pharmacia Biotech) durante 16 horas. Los sobrenadantes de cultivo se cosecharon en filtros de fibra de vidrio usando un colector Inotech 1H-110 (Inotech, Dottikon, Suiza), y los filtros se contaron en un contador de microplacas Wallac 1450 (Wallac, Turku, Finlandia).

30 Los resultados del ensayo de MLR alogénico mostraron que la formación de agrupaciones entre células dendríticas inmunoestimuladoras de ratón y células T de ratón fue inhibida por CD83 soluble (aquí, hCD83ext). Además, CD83 soluble inhibió de una manera dependiente de concentración la capacidad de las células dendríticas inmunoestimuladoras murinas para estimular células T, por lo que las células T no proliferaron en respuesta a exposición a las DC.

40 **Ejemplo 5: sCD83 suprime la proliferación y función de células B ex vivo**

45 Se midió el efecto de sCD83 en células B en una serie de experimentos, como sigue.

50 Efecto de sCD3 en la proliferación de células B de receptor de trasplante ex vivo: Corazones de ratones C3H fueron trasplantados en la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6. Ocho días después del trasplante (cuando el trasplante sería típicamente rechazado en ratones no tratados), los ratones fueron sacrificados. Las células B fueron purificadas del ratón receptor, cultivadas y estimuladas con LPS. La incorporación de ³H-timidina se midió como conteos por minuto (cpm). Los resultados se muestran en la figura 4 y demuestran que CD83 suprime la proliferación de células B ex vivo.

55 Efecto de sCD83 en producción de anticuerpos ex vivo por células B: Corazones de ratones C3H fueron trasplantados en la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6. Ocho días después del trasplante (cuando el trasplante sería típicamente rechazado en ratones no tratados), los ratones fueron sacrificados. Las células B se purificaron de los ratones receptores, se cultivaron y estimularon con LPS. Después de 72 horas de cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se midió la producción de IgM e IgG usando ELISA. Los resultados se muestran en la figura 5 y demuestran que sCD83 suprime la producción de anticuerpos ex vivo.

60 **Ejemplo 6: sCD83 coadministrada con ciclosporina, tacrolimus o MMF incrementa la supervivencia de injerto cardiaco en receptores de trasplante de aloinjerto**

Se retiraron corazones de ratones donadores como se indica y se trasplantaron en la cavidad peritoneal de ratones receptores (es decir, trasplante de corazón intra-abdominal heterotópico). Los ratones receptores fueron tratados como se indicó, con algunos tratamientos empezando antes del trasplante. El tiempo de supervivencia medio del tejido trasplantado se determinó para cada tratamiento.

Se usaron ratones donadores C57BL/6 y ratones receptores BALB/c. Los tratamientos y la supervivencia del tejido trasplantado para cada grupo de tratamiento son como se muestra en la Tabla 1. En este conjunto de experimentos, el tratamiento con sCD83 empezó con una inyección intraperitoneal diaria de 100 µg de sCD83 a partir del "día -1" (es decir, el día antes del trasplante) al día 7 y luego se continuó con inyecciones cada tercer día hasta el día 28. En esta solicitud, "día 1" se refiere generalmente al día antes del trasplante, el cual se refirió como "día 0". El tratamiento con ciclosporina fue mediante inyección subcutánea diariamente ya sea con una dosis subterapéutica (5 mg/kg/día) o una dosis alta (15 mg/kg/día). El tratamiento con tacrolimus fue mediante administración oral diaria de una dosis subterapéutica de 8 mg/kg/día, y el tratamiento con MMF fue mediante administración oral diaria de una dosis baja de 80 mg/kg/día. Los resultados demuestran que sCD83 coadministrado con ciclosporina, tacrolimus o MMF incrementó la supervivencia de injerto cardiaco en receptores de trasplante de aloinjerto.

Tabla 1: sCD83 coadministrada con ciclosporina, tacrolimus o MMF incrementa la supervivencia de injerto cardiaco de corazones C57BL/6 en receptores BALB/c

C57BL/6 a BALB/c	Supervivencia individual (días)	MST (días)
No tratado	8, 8, 9, 9	8.5 ± 0.6
sCD83	15, 15, 16, 17	15.8 ± 1.0
CsA (5 mg/kg, histórico)	9, 10, 10, 10, 10, 11, 11	10.1 ± 0.3
sCD83 + CsA (5 mg/kg)	18, 21, 23, 25	21.8 ± 3.0
CsA (15 mg/kg, histórico)	14, 15, 15, 16, 16, 17	15.5 ± 1.1
sCD83 + CsA (15 mg/kg)	28, 35, 40, 41, 42	37.2 ± 5.8
Tacrolimus	13, 14, 14, 15, 16, 18, 19, 21	16.3 ± 1.0
sCD83 + Tacrolimus	20, 27, 28, 30, 32, 35	28.7 ± 5.1
sCD83 + MMF	20, 22, 23, 26, 27, 28	24.3 ± 3.1

En experimentos adicionales, los receptores de trasplante fueron tratados con un curso más corto de administraciones y una ruta de administración diferente. Los ratones fueron tratados generalmente como se describió anteriormente, se removieron los corazones de ratones donadores C57BL/6 y setrasplantaron en la cavidad peritoneal de ratones receptores BALB/c. CD83 soluble a una dosis de 100 µg por ratón al día y ciclosporina a una dosis de 15 mg por kg al día fueron administrados intravenosamente a ratones receptores a partir del día -1 hasta el día 7. El tiempo de supervivencia promedio del tejido trasplantado fue de más de 100 días.

Ejemplo 7: sCD83 inhibe inducción de alo-anticuerpos en receptores de trasplante

El trasplante de tejidos entre individuos no histocompatibles estimula el rechazo del trasplante. El proceso de rechazo puede incluir los brazos tanto celular como humoral de la respuesta inmunológica. El rechazo agudo de un órgano trasplantado puede ser mediado por una respuesta a anticuerpo dirigida contra alo-antígenos específicos del donador (es decir, a antígenos de histocompatibilidad extraños). Alternativamente, las respuestas a alo-anticuerpos pueden ser inducidas como una consecuencia debido a la destrucción de tejido donador facilitada por una respuesta mediada por células. En cualquier caso, la presencia de una respuesta a alo-anticuerpos en el receptor puede detectarse al medir el título de anticuerpos en el suero del receptor que puede unirse a las células derivadas del donante, típicamente al teñir los esplenocitos derivados del donante. Debido a que sCD83 incrementó el tiempo de supervivencia de injertos en experimentos de trasplante, deseamos determinar si sCD83 afectó la inducción de anticuerpos en receptores de trasplante.

En estos experimentos, los sueros se recolectaron de receptores de trasplante (de individuos de tratados con el control-, tratados con sCD83 y vírgenes al tratamiento). Se retiraron esplenocitos del(de los) donador(es) de trasplante y se incubaron con los sueros de receptor de trasplante. La unión de anticuerpos de los alo-antisueros a la superficie de los esplenocitos del donador de trasplante se monitoreó selectivamente usando anticuerpos específicos para los fragmentos Fc de IgM e IgG de ratón. Una ventaja de este procedimiento es que no mide el anticuerpo de murino expresado pasivamente en las células donadoras (por ejemplo, las células B dentro de la población de esplenocitos del donador) toda vez que el fragmento Fc sólo es accesible si la Ig se deriva de una fuente extracelular (es decir, el suero del receptor); los fragmentos Fc de Ig derivada de donador sobre la superficie de células B del donador, etc. serán incrustados en receptores Fc o retenidos intracelularmente y de esta manera no estarán disponibles para tinción. Las células teñidas pueden ser analizadas usando FACS.

En el procedimiento de trasplante, se retiraron corazones de ratones C3H y se trasplantaron en ratones C57BL/6, los cuales fueron tratados con sCD83 o se dejaron sin tratar. Los sueros fueron recogidos de los receptores de trasplante C57BL/6 ocho días después del trasplante (el tiempo aproximado cuando los ratones no tratados típicamente rechazarían el trasplante (es decir, muestran rechazo de tejido completo)). Estos sueros de receptor se usaron después para teñir los esplenocitos de los donadores de C3H, y la unión de alo-anticuerpos fue detectada con anticuerpos conjugados a FITC específicos ya sea del fragmento Fc de anti-IgG o anti-IgM. Los resultados demostraron que los receptores de trasplante tratados con sCD83 tuvieron baja actividad de alo-anticuerpos (es decir, unión específica de IgM o IgG de donador baja) que fue equivalente a niveles en suero de ratones vírgenes (es decir, ratones que no habían recibido un trasplante) (ver figura 6). Los ratones C57BL/6 que recibieron trasplantes de corazón C3H y también fueron tratados con sCD83 tuvieron baja actividad de alo-anticuerpos, equivalente a suero derivado de ratones C57BL/6 vírgenes no trasplantados. En contraste, los receptores de trasplante que no fueron tratados y por lo tanto rechazaron el tejido trasplantado tuvieron alo-anticuerpos detectables que estuvieron presentes a niveles significativamente más altos que en el control. Los sueros de receptores de trasplante no tratados también fueron capaces de teñir esplenocitos derivados de donador C3H sobre niveles de control. Estos experimentos demuestran que sCD83 suprime la producción de anticuerpos específicos de donador por células B contra antígenos extraños (por ejemplo, tejido trasplantado) y puede prevenir el rechazo de órganos.

Ejemplo 8: sCD83 coadministrada con sirolimus y anticuerpo monoclonal CD45RB logra supervivencia de injerto cardíaco a largo plazo en receptores de trasplante de aloinjerto

Se removieron corazones de ratones donadores como se indicó y se trasplantaron en la cavidad peritoneal de ratones receptores (es decir, trasplante heterotópico). Los ratones receptores fueron tratados como se indicó, con algunos tratamientos empezando antes del trasplante. Se monitoreó la supervivencia del aloinjerto y se calificó como sigue: "A", fuertemente creciente; "B" leve declinación en la intensidad de pulsación; "C", notable declinación en la intensidad de pulsación; "D", cese completo de los impulsos cardíacos. El tiempo de supervivencia medio del tejido trasplantado fue determinado para cada tratamiento.

En el primer conjunto de experimentos, se usaron ratones donadores C3H y ratones receptores BALB/c. Los tratamientos de supervivencia de tejido trasplantado para cada grupo de tratamiento son como se muestra en la Tabla 2. En este conjunto de experimentos, el tratamiento con sCD83 empezó el día -1 (es decir, el día antes del trasplante) y duró hasta el día 28; cada día, 100 µg de sCD83 fueron administrados a cada ratón mediante inyección intraperitoneal. El tratamiento con

sirolimus empezó el día 0 (es decir, el día del trasplante) y continuó hasta el día 14; cada día, 2 mg/kg de sirolimus fueron administrados oralmente a cada ratón. El tratamiento con anti- CD45RB empezó el día 0 y continuó hasta el día 14; cada día, 100 µgde anti-CD45RB (BioExpress, Inc., West Lebanon, New Hampshire) fueron administrados a cada ratón intravenosamente.

Tabla 2

sCD83 coadministrada con sirolimus y anticuerpo monoclonal CD45RB logra la supervivencia de injerto cardiaco a largo plazo de corazones C3H en receptores BALB/c

C3H a BALB/c	Supervivencia de Transplante Individual (días)	MST (días)
No tratado	8, 8, 8, 9	8.3 ± 0.5
Sirolimus	12, 23, 25, 25	21.3 ± 6.2
Anti-CD45RB mAb	12, 15, 21	16.0 ± 4.6
sCD83	9, 9, 10, 12	10.0 ± 1.4
Anti-CD45RB mAb+ sirolimus	31, 33, 36	33.3 ± 2.5
sCD83 + sirolimus	52, 53, 62	55.7 ± 5.5
sCD83 + anti-CD45RB mAb	35, 37, 38	36.7 ± 1.5
sCD83 + sirolimus + anti-CD45RB mAb	> 100 (x 4)	> 100

En un conjunto de experimentos adicionales, los corazones de los ratones C3H se trasplantaron en la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6 (los resultados se muestran en la Tabla 3 y la Figura 7). Sin tratamiento, los injertos de corazón fueron rechazados en 8.5 ± 0.6 días mediante rechazo celular y humoral agudo, caracterizado por vasculitis, hemorragia, trombosis e infiltración de células CD4⁺ y CD8⁺. Altos niveles de IgG e IgM también fueron detectados en el tejido trasplantado así como en la sangre de los receptores. El tratamiento con CD83 solo (es decir, inyección intraperitoneal de 100 µg de sCD83 por ratón cada día a partir de los días 1 a 7 y luego cada tercer día (*g.o.d.*) a partir de los días 8-16) redujo los síntomas de rechazo agudo e incrementó la supervivencia de injerto de corazón a 10.7 ± 1.5 días; el mismo tratamiento con 400 µgde sCD83 duplicó la supervivencia del injerto de corazón a 15 ± 1.0 días. Otros tratamientos incluyeron dosis subterapéuticas ya sea de anticuerpo monoclonal ("mAb") anti-CD45RB (es decir, 100 µg/ratón cada día a partir de los días 0 a 14 mediante inyección intravenosa) o sirolimus (es decir, 2 mg/kg cada día a partir de los días 0 a 14 mediante administración oral ("*p.o.*").). Las dosis subterapéuticas en estos experimentos se basaron en las dosis humanas equivalentes.

Inesperadamente, sCD83 a la dosis más baja de 100 µg por inyección mostró un efecto sinérgico con estas dosis subterapéuticas ya sea de mAb anti-CD45RB o sirolimus; los tratamientos combinados con sCD83 mejoraron aún más la alta supervivencia de injerto a 32 ± 3.6 días y 39.3 ± 4.7 días, respectivamente. El tratamiento combinado de mAb anti-CD45RB y sirolimus incrementó la supervivencia a 50.3 ± 3.1 días. Notablemente, sCD83 en combinación tanto con mAb anti- CD45RB como con sirolimus previno de manera eficaz el rechazo agudo e indujo tolerancia a injerto con supervivencia indefinida durante más de 100 días.15 ($p < 0.01$ contra tratamiento combinado con mAb anti-CD45RB y sirolimus. Los

corazones trasplantados de ratones tratados con la combinación de sCD83, mAb anti-CD45RB y sirolimus (es decir, "tratamiento triple") fueron examinados el día post-operatorio 100 ("POD 100") y mostraron histología normal sin vasculopatía. Este experimento demostró que el tratamiento que comprende coadministración de sCD83 con sirolimus y mAb anti-CD45RB indujo aceptación a largo plazo de tejido cardíaco trasplantado.

Tabla 3 sCD83 en combinación con sirolimus y mAb anti-CD45RB logra la supervivencia de injerto de corazón a largo plazo de corazones C3H en receptores C57BL/6

C3H a BALB/c	Supervivencia de Transplante Individual (días)	MST (días)
No tratado	8, 8, 8, 9	8.3 ± 0.5
Sirolimus	12, 23, 25, 25	21.3 ± 6.2
Anti-CD45RB mAb	12, 15, 21	16.0 ± 4.6
sCD83	9, 9, 10, 12	10.0 ± 1.4
Anti-CD45RB mAb+ sirolimus	31, 33, 36	33.3 ± 2.5
sCD83 + sirolimus	52, 53, 62	55.7 ± 5.5
sCD83 + anti-CD45RB mAb	35, 37, 38	36.7 ± 1.5
sCD83 + sirolimus + anti-CD45RB mAb	> 100 (x 4)	> 100

Aunque la invención no es limitada por ningún mecanismo de operación particular, generalmente, el trasplante de tejido C3H en ratones BALB/c se considera que es un sistema modelo para el rechazo mediado por anticuerpos, aunque el trasplante de tejido C3H en ratones C57BL/6 se considera que es un sistema modelo para el rechazo mediado por células T. La terapia con sCD83 sola y coadministrada con otras sustancias mejoró la supervivencia de injerto en ambos sistemas, demostrando que sCD83 puede suprimir respuestas inmunológicas no deseadas que son mediadas por células B así como aquellas que son mediadas por células T. En otras palabras, sCD83 puede suprimir el rechazo de injerto humoral en un modelo de trasplante cardíaco de ratón C3H a BALB/c y también puede suprimir el rechazo de injerto celular agudo en un modelo de trasplante cardíaco de ratón C3H a C57BL/6.

Los ratones receptores que recibieron el tratamiento triple de sCD83, mAb anti-CD45RB y sirolimus también fueron examinados para determinar el efecto del tratamiento en la generación de DC tolerogénicas (es decir, células CD11c⁺ MHCII^{low} CD40^{low} CD86^{low} IL-12⁻) y células T reguladoras (células CD4⁺ CE25⁺ Foxp3⁺). Una cantidad incrementada tanto de DC tolerogénicas como de células T reguladoras se encontró en estos ratones cuando fueron examinados el día post-operatorio (ver resultados de citometría de flujo mostrados en la figura 8, figura 9 y figura 10). El marcador CXCR6 es característico de DC inmaduras, mientras que los marcadores CXCR4 y CCR7 son característicos de DC maduras. Los asteriscos en las figuras 9 y 10 indican resultados que difieren a p<0.01. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la terapia basada en sCD83 indujo la generación de DC tolerogénicas y células T reguladoras.

Ejemplo 9: sCD83 suprime la producción de TNF-α *in vitro* y la expresión en la superficie de marcadores de activación de mDC

Deseábamos examinar las propiedades funcionales *in vitro* de sCD83 humana en DC de sangre periférica, monocitos y

células T. Las DC maduras ("mDC") de monos cinomolgos fueron identificados usando FACS con tinción con cuatro colores como células que fueron HLA-DR positivas, de linaje negativo (es decir, CD3, CD20, CD14 y CD16 negativas), y CD11c positivas. El TNF- α intracelular, la IL-6 y los marcadores de superficie CD83, CD80, CD86 y CCR5 (los que están incrementados en DC maduras y activadas) también fueron monitoreados.

Para evaluar el efecto de sCD83 en mDC, las PBMC aisladas (1×10^6 células de monos cinomolgos fueron incubadas durante la noche con sCD83. Las células fueron estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) e IFN- γ (100 U/ml) durante 6 horas. Los niveles de TNF- α intracelular y de los marcadores de superficie se detectaron en mDC usando FACS. Los resultados representativos de uno de tres experimentos se muestran en la figura 11; los resultados fueron expresados como % de células positivas y unidades de fluorescencia media (MFU). Los resultados muestran que sCD83 suprimió la producción *in vitro* de TNF- α por mDC y también suprimió la expresión en la superficie de los marcadores de activación de mDC CD83, CD86, CCR5 y CD80.

Para evaluar el efecto de sCD83 en monocitos, las PBMC aisladas (1×10^6 células) de monos cinomolgos fueron incubadas durante la noche con sCD83 (1×10^6 células). Los niveles de TNF- α intracelular y los marcadores de superficie fueron detectados en monocitos usando FACS. Los resultados representativos de uno de tres experimentos se muestran en la figura 12. Los resultados fueron expresados como % de células positivas y unidades de fluorescencia media (MFU). Los resultados muestran que sCD83 suprimió moderadamente la producción *in vitro* de TNF- α por monocitos y suprimió también la expresión en la superficie de los marcadores de activación de monocitos.

Para evaluar el efecto de sCD83 en células T CD4⁺, estas células fueron purificadas de monos cinomolgos y luego estimuladas en presencia o ausencia de sCD83 o mAb anti-CD28 durante 6 días. Las células fueron teñidas después para identificar células T reguladoras (es decir, células CD4⁺, CE25+, Foxp3⁺) y analizadas por FACS. Los resultados (mostrados en la figura 13) sugieren que sCD83 promueve la generación de células T reguladoras.

Las células T reguladoras también fueron preparadas usando células dendríticas preparadas a partir de monos cinomolgos, como sigue. Células dendríticas mieloides de monos cinomolgos fueron generadas a partir de células de monocito CD14⁺ en presencia de GM-CSF e IL-4 durante 7 días; se añadió CD83 soluble a 50 $\mu\text{g/ml}$ a algunos cultivos los días 3 a 7, y un cóctel de maduración de IL-11 β , IL-6, TNF- α y PGE-2 se añadió los días 5 a 7. Las células T ($1 \times 10^6/\text{ml}$) fueron aisladas mediante selección negativa y estimuladas a diferentes relaciones con las células dendríticas maduras alogénicas que habían sido tratadas o no tratadas con sCD83 (50 mg/ml). Después las células fueron teñidas para identificar las células T reguladoras (es decir, células CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺) y analizadas por FACS. Los resultados (mostrados en la figura 14) muestran que números incrementados de células T reguladoras fueron generados por células dendríticas tratadas con CD83 soluble, particularmente a las relaciones DC:T más altas probadas.

Ejemplo 10: Supresión por sCD83 de la proliferación y función de células B *in vitro*.

Evaluación del efecto de sCD83 en la proliferación de células B *in vitro*: Células B de C57BL/6 se estimulan con LPS en presencia o ausencia de sCD83. Después de 48 horas de cultivo, se mide la incorporación de ³H-timidina como conteos por minuto (cpm). Los resultados se evalúan para determinar si sCD83 suprime la proliferación de células B *in vitro*.

Evaluación del efecto de sCD83 en la producción de IgM e IgG por células B: Células B de C57BL/6 son estimuladas con LPS en presencia o ausencia de sCD83. Después de 72 horas de cultivo, los sobrenadantes se cosechan y se determinó la producción de IgM o IgG usando ELISA. Los resultados se evalúan para determinar si sCD83 suprime la producción de anticuerpos por las células B *in vitro*.

Ejemplo 11: Producción de células dendríticas tolerogénicas y evaluación de la función de células dendríticas

Células dendríticas tolerogénicas pueden producirse como sigue. Las células pueden ser cultivadas usando medio estándar con 1% de plasma humano (por ejemplo, RPMI 1640 (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) suplementado con glutamina (200 $\mu\text{g/ml}$, BioWhittaker, Verviers, Bélgica), penicilina/estreptomina (20 $\mu\text{g/ml}$), 10 mM de Hepes, pH 7.5 (Sigma-Aldrich) y 1% de plasma humano de un donador individual (previamente inactivado con calor al incubar a 56°C durante 30 minutos). Las PBMC humanas pueden ser aisladas de las capas leucocitarias mediante sedimentación en Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania), sembradas sobre cajas de cultivo de 100 mm revestidas con IgG (10 $\mu\text{g/ml}$ de γ -globulina de la fracción de Cohn; Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C en 5% de CO₂. Después de incubaciones de 1 hora y 7 horas, las fracciones de células no adherentes se remueven y las células adherentes se cultivan adicionalmente en 1% de medio de plasma humano suplementado con las citocinas GM-CSF (800 U/ml) e IL-4 (500 U/ml). El día 3 del periodo de incubación, se añade medio fresco (incluyendo GM-CSF a 400 U/ml e IL-4 a 500 U/ml). El día 4 ó 5, las células no adherentes son recogidas, contadas y transferidas a cajas nuevas a una densidad de 0.3-0.5 $\times 10^5$ células/ml. Para la etapa de maduración final, se suplementa 1% de plasma humano con TNF- α (1.25 ng/ml), GM-CSF (40 U/ml), IL-4 (200 U/ml), prostaglandina E₂ (0.5 pg/ml; ver, por ejemplo, Lechmann y otros (2001) J. Exp. Med. 194: 1813-1821), y CD83 soluble (4

µg/ml). Alternativamente, para la etapa de maduración final, el cóctel de maduración comprende IL-1β, TNF-α, PGE₂, y CD83 soluble (4 µg/ml). El día 8, las células pueden ser analizadas mediante FACS. Las células maduras mediante este método revelan una clara reducción en la expresión de CD80 en la superficie celular (por ejemplo, de 96% a 66%) y CD83 (por ejemplo, de 96% a 30%) y un incremento en células CD14 positivas cuando se compara con DC maduras normalmente (ver, por ejemplo, WO 2004/046182). La expresión de otros marcadores de superficie celular (por ejemplo, MHC Clase I y II) no puede ser afectada significativamente. En otras modalidades, las células pueden ser maduras de acuerdo con el protocolo como se describió anteriormente pero CD83 soluble y los demás compuestos inmunosupresores pueden ser añadidos al cóctel de maduración después de uno, dos, tres o más días (por separado o juntos, como se describió anteriormente).

Las células dendríticas pueden ser evaluadas usando un ensayo de reacción de linfocitos mixtos ("MLR") alogénicos, como sigue. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ son aisladas de las capas leucocitarias. Brevemente, las fracciones de células no adherentes cosechadas se incuban con eritrocitos de oveja tratados con neuramidasa, se recogen mediante centrifugación en gradiente de Ficoll, y se cultivan en RPMI suplementado con 5% de suero humano de un solo donador AB. Después las células son estimuladas con diferentes relaciones de DC inmuoestimuladoras alogénicas maduras. Las células son incubadas con diferentes concentraciones de CD83 soluble ("hCD83ext" como se describe en WO 2004/046182) o con BSA (BioRad) como un control, o no son tratadas. Las células T(2x10⁵ células/pocillo) y las DC son cocultivadas durante 4 días en RPMI suplementado con 5% de suero humano a partir de un solo donador AB en cajas de cultivo de células de 96 pocillos. Las células son pulsadas con [³H]-timidina (1 µCi/pocillo; Amersham Pharmacia Biotech) durante 16 horas. Los sobrenadantes de cultivo se cosechan sobre filtros de fibra de vidrio usando un colector IH-110 (Inotech. Dottikon, Suiza), y los filtros se cuentan en un contador de microplacas Wallac 1450 (Wallac, Turku, Finlandia).

Ejemplo 12: Determinación del punto final de la ventana de efectividad de CD83 en respuesta a varios estímulos

Los ratones son evaluados esencialmente como se describió en el ejemplo 3 para su respuesta inmunológica después de intervalos variables entre la administración de CD83 y KLH (es decir, 10 días, 8 días, 6 días, 4 días, 2 días, 1 día). Un intervalo se define para el cual la reestimulación usando KLH no provoca una respuesta inmunológica; este intervalo marca el final de la ventana de sensibilidad en este experimento.

Los sujetos son evaluados esencialmente como se describió anteriormente, pero se examinan otros estímulos inmunológicos. Estos protocolos sustituyen injertos de piel de terceras partes para el antígeno KLH. Otros protocolos sustituyen la infección Leishmania durante y después del tratamiento con CD83 (el día antes del tratamiento con CD83, el día después del tratamiento con CD83 y tres días después del tratamiento con CD83). Otros protocolos sustituyen la infección con LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica) durante y después del tratamiento con CD83.

Ejemplo 13: Evaluación de la reactivación de células T de memoria en respuesta a CD83

Los ratones son infectados con LCMV y 28 días más tarde son inyectados con CD83. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) son evaluadas para la presencia de células T de memoria específicas de LCMV que producen IFNγ e IL-2, pero que no matan células objetivo.

Ejemplo 14: Evaluación del efecto de CD83 en células T reguladoras.

Las células T específicas de antígeno se producen *in vitro* y se exponen a células dendríticas en presencia o ausencia de CD83 soluble. Después el efecto de CD83 se evalúa al ensayar células T para la proliferación (CFSE), la apoptosis (anexina V), la producción de citocinas (INF-γ e IL-10) y la presencia de Foxp3; ensayos adecuados se conocen en la técnica. Las células T son aisladas de mamíferos por lo que pueden ser cultivadas y/o ensayadas *in vitro*. Las PBMC son separadas de los glóbulos rojos y los neutrófilos usando la centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque de acuerdo con procedimientos establecidos. Las células se lavan con AIM-V modificado (el cual consiste en AIM-V (GIBCO) con 2 mM de glutamina, 10 µg/ml de sulfato de gentamicina y 50 µg/ml de estreptomycin) suplementado con 1% de suero bovino fetal (FBS). Las células T son enriquecidas mediante selección negativa o positiva con anticuerpos monoclonales adecuados acoplados a columnas o esferas magnéticas de acuerdo con técnicas estándares. Se analiza una alícuota de células para el fenotipo de superficie celular incluyendo la expresión de CD4, CD8, CD3 y CD14.

En algunos casos, las células se lavan y se resuspenden a una concentración de aproximadamente 5 x 10⁵ células por ml de AIM-V modificado como anteriormente y que contiene 5% de FBS y 100 U/ml de IL-2 recombinante (rIL-2) (AIM-V suplementado). Las células T pueden ser expuestas después a células dendríticas inmuoestimuladoras o tolerogénicas en presencia o ausencia de sCD83.

Para estimular la proliferación, el anticuerpo monoclonal OKT3 (Ortho diagnostics) puede ser añadido hasta una concentración de 10 µg/ml. Las células son colocadas en placas de 24 pocillos (0.5 ml de suspensión celular por pocillo) y

se cultivan a una temperatura de alrededor de 37 °C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. La proliferación de células T en respuesta a una composición reactiva tal como el anticuerpo OKT3 puede ser monitoreada cuantitativamente al medir, por ejemplo, la absorción de ³H-timidina (ver, por ejemplo, Caruso y otros, (1997) Cytometry 27: 71).

5 El análisis de los tipos y cantidades de citocinas secretadas por las células T durante y después de de la exposición a células dendríticas puede ser una medida de la actividad funcional. Las citocinas pueden medirse por los ensayos ELISA o ELISPOT para determinar la velocidad y cantidad total de producción de citocinas. Ver, por ejemplo, Fujihashi y otros, (1993) J. Immunol. Meth. 160: 181; Tanquay y Killion (1994) Lymphokine Cytokine Res. 13: 259; Parkhurst y otros, (1996) Immunol. 157: 2539.

10 **Ejemplo 15: Evaluación de la transferencia adoptiva de inmunidad usando células T reguladoras producidas con CD83**

15 Los ratones son inmunizados con 10 µgde KLH. CD83 (100 µg) se administra el día antes, el día después y tres días después de la inmunización con KLH. Diez días después de la inmunización con KLH, se preparan esplenocitos de estos animales y se transfieren a animales vírgenes que son luego inmunizados con KLH y ensayados para una respuesta inmunológica al antígeno.

20 **Ejemplo 16: Transferencia adoptiva de tolerancia usando DC tolerogénicas**

25 DC tolerogénicas preparadas con una etapa de maduración que comprende CD83 soluble son preparadas como se describió en el ejemplo 4. Las DC inmaduras son cargadas con un antígeno de interés, o un ácido nucleico que codifique para un antígeno de interés. Estas DC se transfieren a un sujeto y se evalúa a respuesta inmunológica del sujeto al antígeno.

30 **Ejemplo 17: Coadministración de CD83 soluble y un órgano trasplantado**

35 Se llevan a cabo trasplantes de riñón en macacos cinomolgos juveniles no consanguíneos; cada macaco recibe un riñón que fue retirado de otro macaco. Durante el procedimiento de trasplante, los macacos receptores son inyectados intravenosamente o intraperitonealmente con CD83 soluble a una dosis de entre 3 y 6 mg/kg/día. La administración es una vez al día o cuatro veces al día durante 28 días. Los macacos de control reciben el órgano trasplantado pero no la CD83 soluble. Después del procedimiento de trasplante, los macacos son monitoreados para la viabilidad y el suministro de sangre del órgano trasplantado.

Reivindicaciones

- 5 1. CD83 soluble para su uso para prevenir, curar o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno causado por la disfunción o función no deseada de una respuesta inmunológica en combinación con un primer compuesto inmunosupresor, en donde dicho primer compuesto inmunosupresor se selecciona de ciclosporina, tacrolimus, sirolimus y anti-CD45RB mAb, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en una alergia; asma; rechazo de tejido trasplantado; una respuesta inmunológica a una sustancia administrada crónicamente; una enfermedad autoinmune; y el SIDA.
- 10 2. La sCD83 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde sCD83 y el primer compuesto inmunosupresor son para la administración en la misma formulación y a través de la misma ruta de administración o son para la administración en diferentes formulaciones y / o a través de diferentes rutas de administración.
- 15 3. La sCD83 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho primer compuesto inmunosupresor es ciclosporina.
- 20 4. La sCD83 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es para usar en combinación con un segundo compuesto inmunosupresor, en donde dicho primer compuesto inmunosupresor es sirolimus y dicho segundo compuesto inmunosupresor es mAb anti-CD45RB.
- 25 5. La sCD83 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es para usar en combinación con un segundo compuesto inmunosupresor, en donde el primer compuesto inmunosupresor es tacrolimus y el segundo compuesto inmunosupresor es micofenolato mofetilo.
- 30 6. La sCD83 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde CD83 y dicho primer compuesto inmunosupresor son para la administración dentro de tres días entre sí.
- 35 7. La sCD83 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad autoinmunitaria.
- 40 8. La sCD83 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha CD83 se administra al introducir ácido nucleico que codifica CD83 en el sujeto.
- 45 9. La sCD83 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde dicha enfermedad o trastorno es el rechazo de tejido trasplantado, y en donde la CD83 soluble es para la administración a un paciente de trasplante con dicho tejido trasplantado y/o para la administración al paciente de trasplante después del trasplante del tejido.
- 50 10. La sCD83 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, que es para la administración con una composición terapéutica.
- 55 11. La sCD83 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha composición terapéutica es un antígeno asociado con el tejido trasplantado.
- 60 12. La sCD83 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha enfermedad o trastorno es el rechazo de tejido trasplantado y en donde dicha CD83 es para la administración a un tejido a trasplantar después de retirarlo de un donador.
13. Una combinación de CD83 soluble y un primer compuesto inmunosupresor para usar para prevenir, curar, o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno causado por la disfunción o la función no deseada de una respuesta inmunológica en donde dicho primer compuesto inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en una alergia, asma, rechazo de tejido trasplantado, una respuesta inmunológica a una sustancia administrada crónicamente; una enfermedad autoinmunitaria; y SIDA.
14. La sCD83 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha cada una de dicha CD83 soluble, dicho primer compuesto inmunosupresor, dicho segundo compuesto inmunosupresor y dicha composición terapéutica es para la administración simultánea, o es para la administración por separado.
15. Uso de una combinación de CD83 soluble y un primer compuesto inmunosupresor para tratar un tejido a trasplantar después de la remoción de un donador y antes del trasplante, en donde dicho primer compuesto inmunosupresor

se selecciona del grupo que consiste en ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, y mAb anti-CD45RB.

- 5
16. La sCD83 soluble para su uso de acuerdo con la reivindicación 1^o la combinación de CD83 soluble y un primer compuesto inmunosupresor para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en miastenia grave, enfermedad intestinal inflamatoria crónica, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, artritis reumatoide, y diabetes mellitus dependiente de insulina.
- 10
17. La CD83 soluble para su uso de acuerdo con la reivindicación 16 o la combinación de CD83 soluble y un primer compuesto inmunosupresor para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha enfermedad intestinal inflamatoria crónica es la enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa.

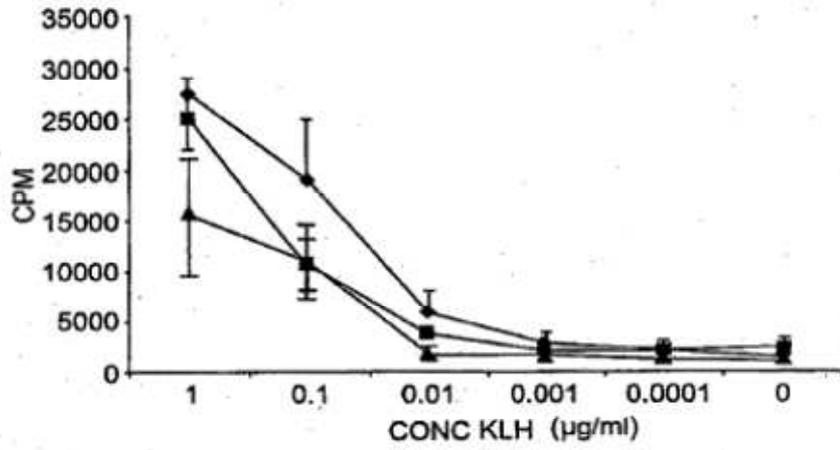


FIG. 1

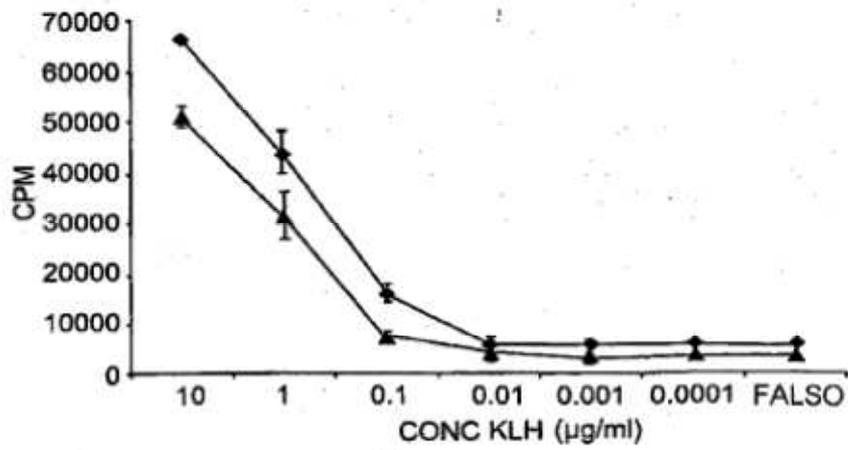


FIG. 2

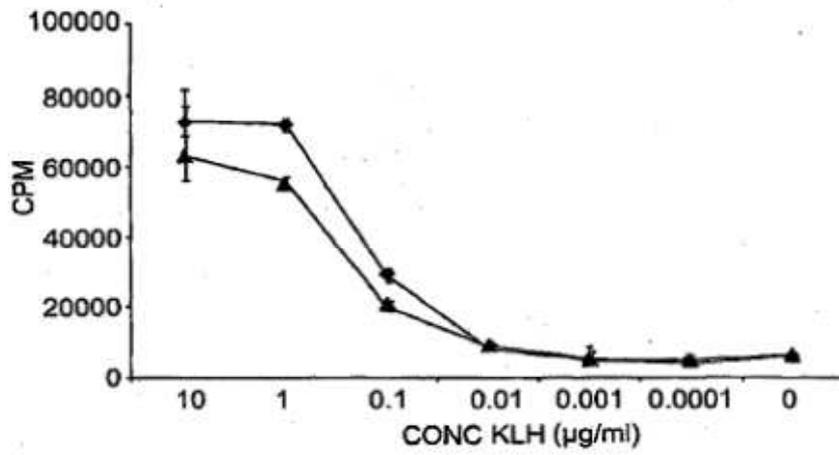


FIG. 3

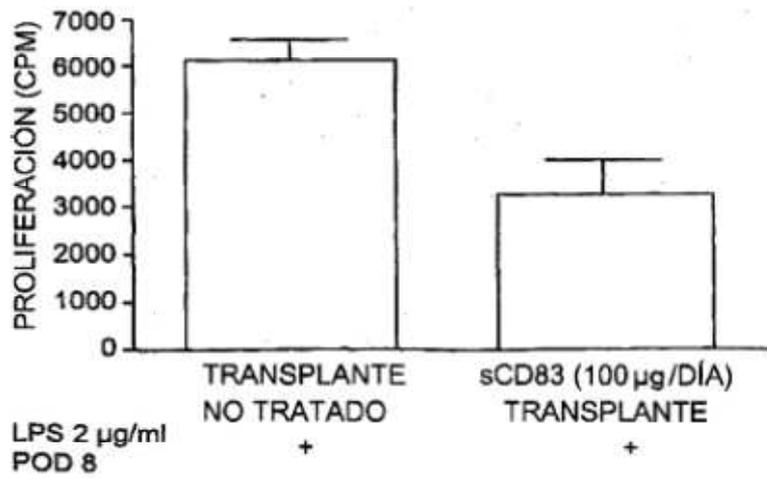


FIG. 4

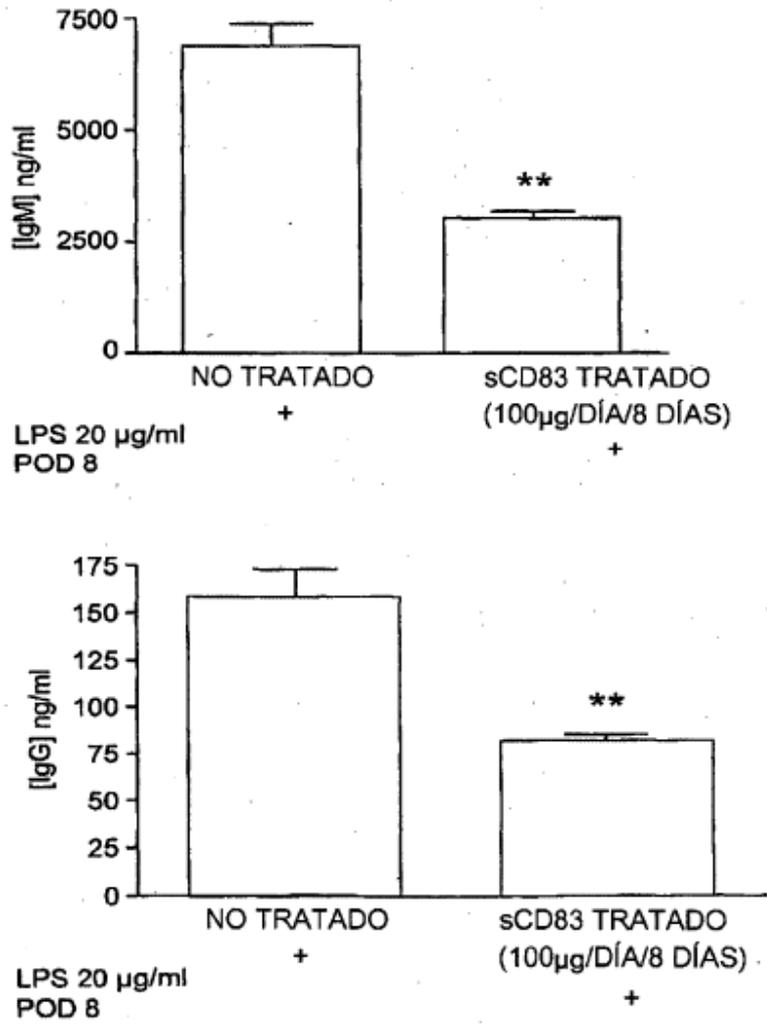
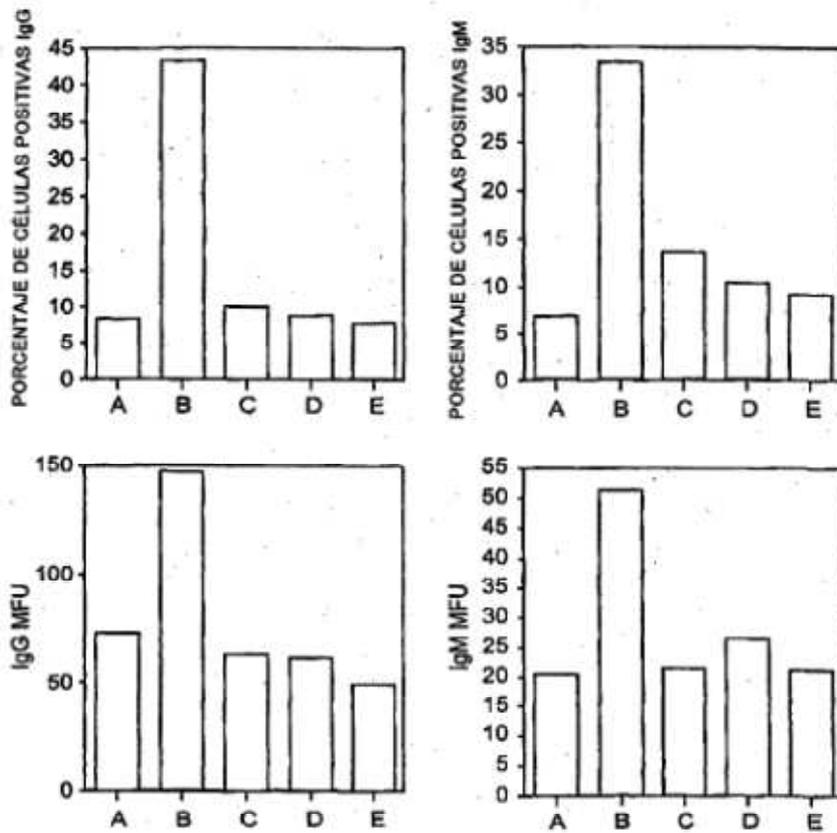


FIG. 5



A: SUERO NAIVE
 B: SUERO NO TRATADO
 C: sCD83 TRATADO (1638)
 D: sCD83 TRATADO (1639)
 E: sCD83 TRATADO (1640)

FIG. 6

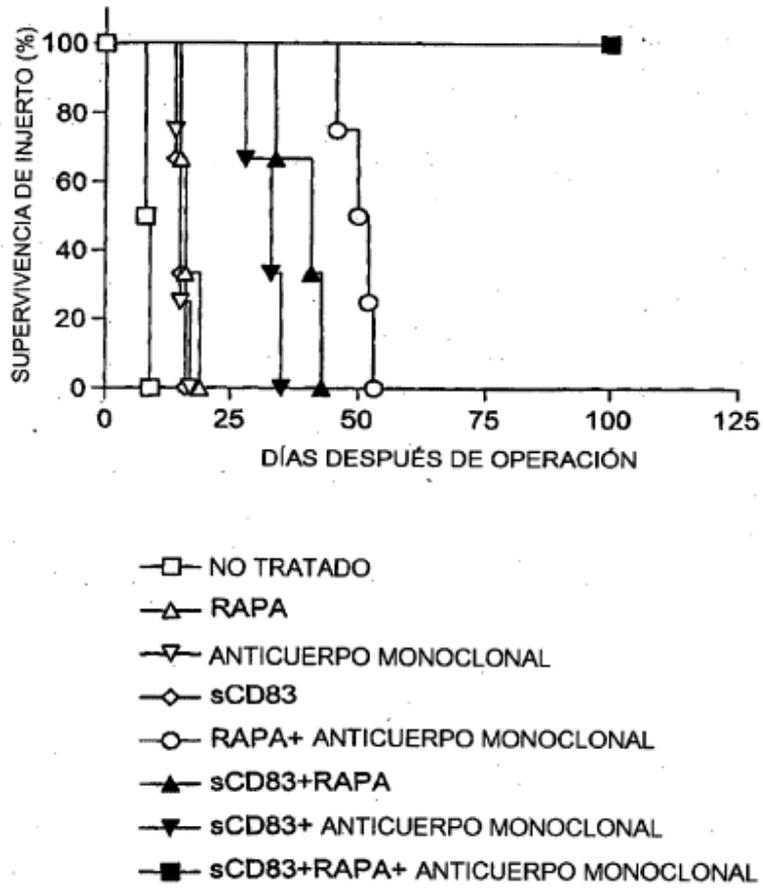


FIG. 7

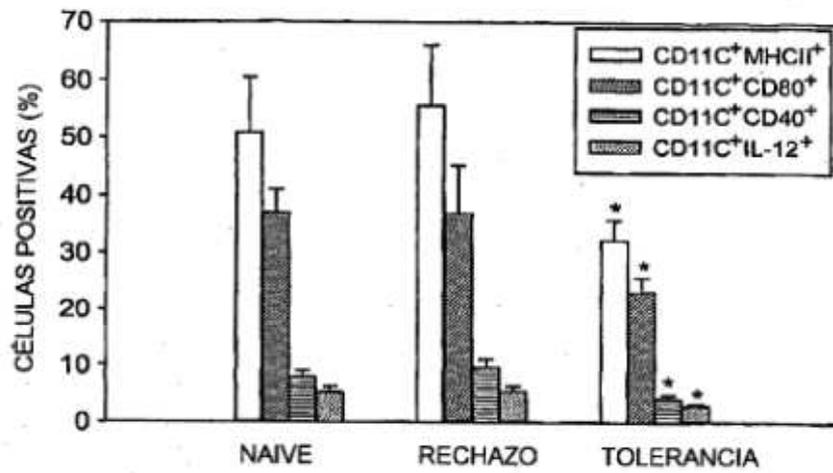


FIG. 8

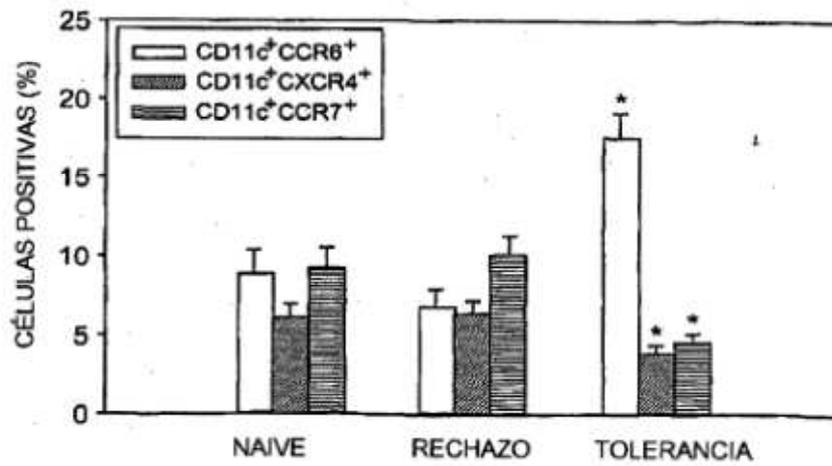


FIG. 9

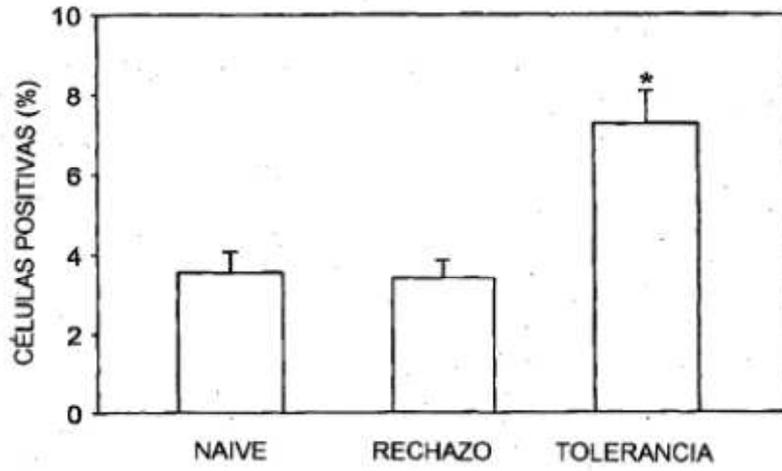


FIG. 10

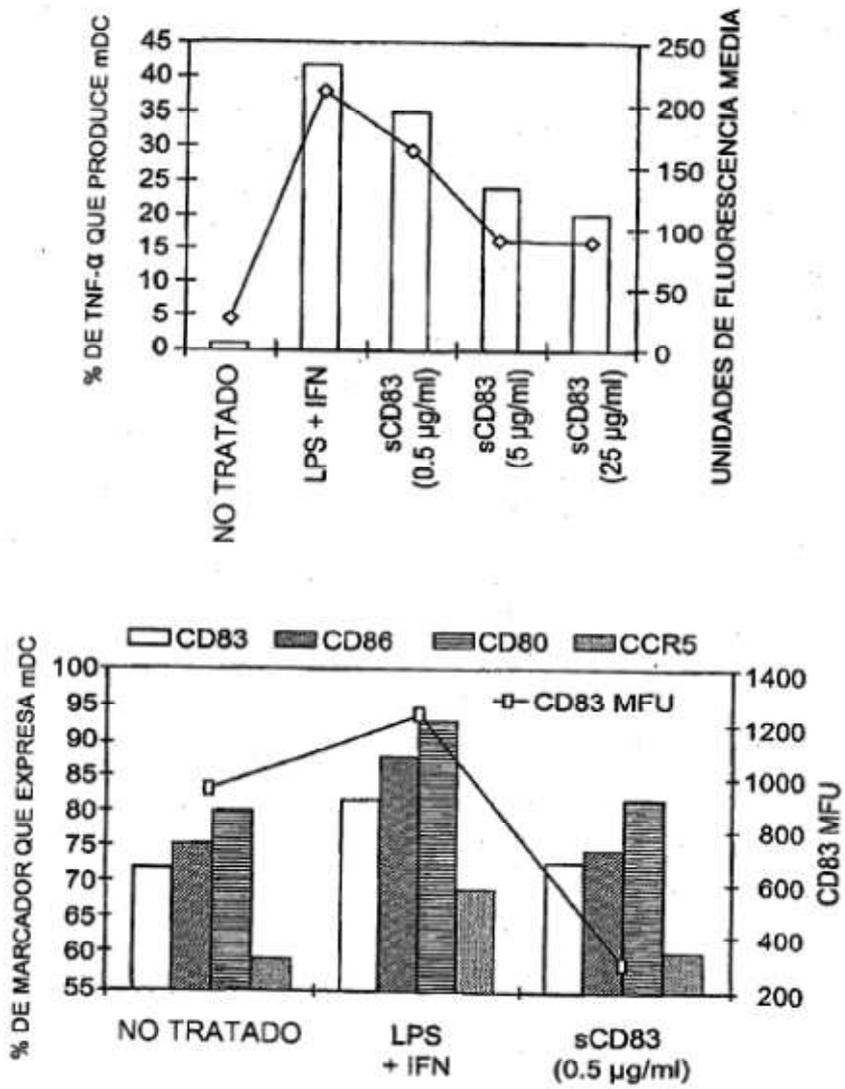


FIG. 11

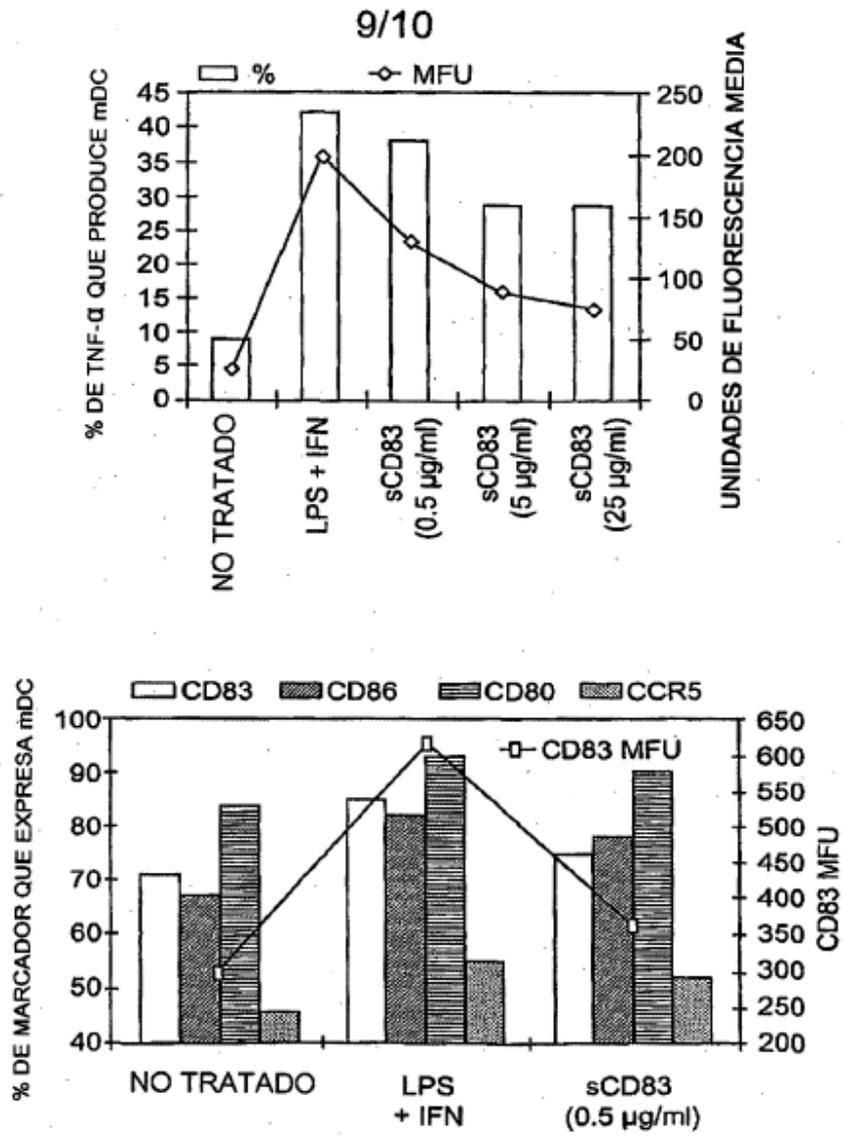


FIG. 12

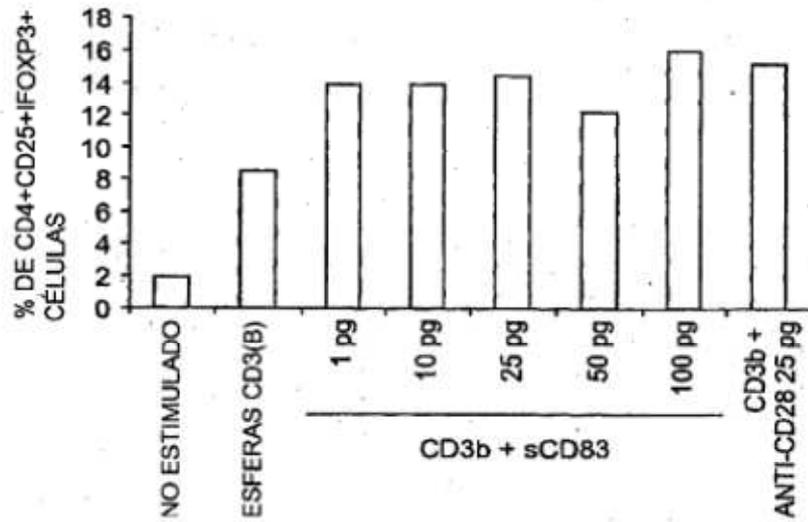


FIG. 13

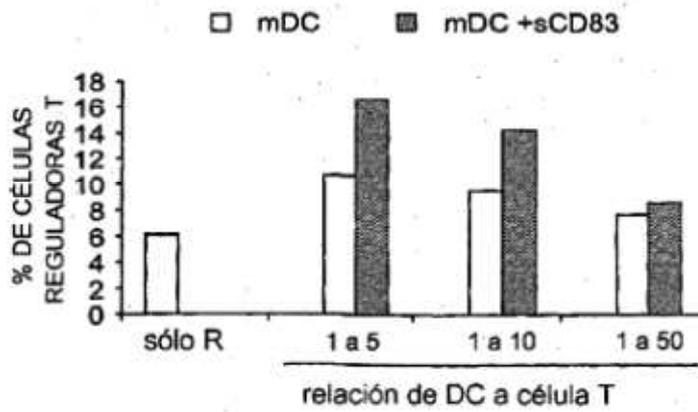


FIG. 14