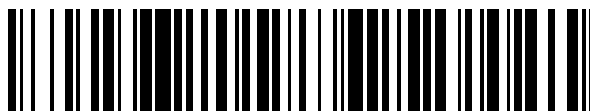


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 414**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2004 E 04717386 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 1605974**

54 Título: **Método para el tratamiento de una enfermedad autoinmune mediante la inducción de la presentación de antígeno mediante células presentadoras de antígeno que inducen tolerancia**

30 Prioridad:

04.03.2003 US 451816 P

15.12.2003 US 529500 P

28.02.2004 US 548385 P

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

23.01.2015

73 Titular/es:

ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

352 KNOTTER DRIVE

CHESHIRE, CT 06410, US

72 Inventor/es:

BOWDISH, KATHERINE S.;

KRETZ-ROMMEL, ANKE y

DAKAPPAGARI, NAVEEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 527 414 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

Método para el tratamiento de una enfermedad autoinmune mediante la inducción de la presentación de antígeno mediante células presentadoras de antígeno que inducen tolerancia

5 Campo técnico

Desarrollo y restauración de la tolerancia inmune natural a autoantígenos para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes.

10 Antecedentes de la técnica relacionada

15 La diabetes mellitus insulino-dependiente ("DM1") es una enfermedad mediada por células T es un problema de salud importante, que afecta a más de 1,5 millones de estadounidenses. Esta enfermedad autoinmune resulta de la destrucción mediada por células T de células β productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas. A pesar del tratamiento con insulina, las muertes resultantes de la DM T1 han aumentado en los últimos 20 años, mientras que la mortalidad por cáncer, enfermedades cardiovasculares y los accidentes cerebrovasculares han disminuido (Hurlbert et al, 2001). Además, las complicaciones del tratamiento con insulina exógena incluyendo nefropatía, neuropatía y retinopatía son muy debilitantes.

20 La DM T1 se considera una enfermedad mediada por Th1 y la intervención temprana que desplaza la respuesta inmune hacia un tipo Th2, por ejemplo, mediante la administración sistémica de IL-4, puede prevenir la aparición de la enfermedad (Cameron et al, 1997). El equilibrio de las células T efectoras, Th1 y Th2, puede ser importante en el mantenimiento de la tolerancia inmune, y el cambio en el equilibrio puede resultar en la autoinmunidad. Sin embargo, la protección contra la enfermedad autoinmune no es una propiedad intrínseca de las células Th2 ya que también se ha demostrado que las líneas de células Th2 a partir de ratones NOD transfieren la enfermedad (Pakkala et al, 1997).

30 El sistema inmune ha evolucionado de manera compleja para mantener la auto-tolerancia. El timo ofrece una importante selección inicial de las células T. Esta selección da como resultado la exportación, a la periferia, de células T que son tolerantes a auto-antígenos presentes en el timo. Sin embargo, muchas proteínas específicas de tejido no se expresan a niveles suficientes para inducir tolerancia. Por ejemplo, las células T reactivas de los islotes de Langerhans se han encontrado en sujetos sanos, aunque presumiblemente de baja afinidad (Lohman et al. 1996). Existen varios mecanismos de tolerancia periférica complementan los mecanismos centrales de tolerancia en el timo para mantener las células T autoreactivas bajo control. Uno de los principales mediadores de la tolerancia periférica es la célula presentadora de antígeno ("APC"). APC, como las células dendríticas ("DC") y los macrófagos capturan los antígenos propios de otras células y los presentan a células T autoreactivas para inducir tolerancia de células T por delección, anergia y / o generación de células T reguladoras (Heath y Carbone, 2001). La hipótesis actual es que las APC inmaduras, tales como APC en el sistema inmunológico de estado estacionario, inducen la tolerancia en lugar de activar las células T, presumiblemente debido a la falta de moléculas coestimuladoras. Hawiger et al. se han dirigido al antígeno hacia la ruta de la clase principal de histocompatibilidad II ("MHC, II") de DC usando anticuerpos frente a DEC-205, un receptor de endositos restringido a DC (Hawiger et al., 2001). La presentación de antígeno por estas DC provocó una corta proliferación de células T CD4+, seguido por la delección y los receptores permanecieron tolerantes al antígeno, como se muestra por la falta de respuesta a la posterior inmunización de péptido. En contraste, cuando la localización de antígeno fue acompañada por un fuerte estímulo de maduración de las DC tales como anti-CD40, se indujo la inmunidad.

45 Las células dendríticas también pueden inducir tolerancia periférica mediante la generación de células T reguladoras que influyen en las funciones de las células T efectoras a través de citoquinas supresoras o un mecanismo dependiente del contacto (Roncarolo et al, 2001; Jonuleit et al, 2000; Dhodapkar y Steinman, 2001). Se han desarrollado una serie de diferentes protocolos para la inducción de células T reguladoras, en general, por medio de estimulación "subóptima" de células T. La estimulación subóptima de células T se puede lograr mediante la presentación de antígenos en ausencia de co-estimulación, o inflamación, o por bloqueo parcial del receptor de células T o sus co-receptores CD4 y CD8. El fenotipo y el mecanismo de acción de las células T reguladoras es heterogénea. Muchas células supresoras son CD4+ CD25+, sin embargo, está quedando cada vez más claro que en muchas situaciones las células CD4+ CD25- son igualmente eficaces. Otros marcadores identificados en la población de células T reguladoras incluyen CD62L, GITR y CD103 (Lafaille y Lafaille, 2002), y las células T reguladoras CD8 + también se han descrito (Dhodapkar y Steinman, 2002). Algunas células T reguladoras han demostrado producir la interleuquina citoquina inmunosupresora ("IL")-10 (Wakkach et al, 2001; Barrat et al. 2002), mientras que las células T reguladoras inducidas por la tolerancia oral se han caracterizado por la producción de Factor- β de crecimiento transformante ("TGF- β "), además de las citoquinas de tipo Th2 IL-4 e IL-10 (Weiner, 2001). Las células supresoras dependientes de contacto se han generado mediante la activación de las células T periféricas humanas CD4+ CD45RA+ en presencia de TGF- β (Yamigawa et al, 2001). Mientras que la inducción de células T reguladoras requiere la estimulación a través del receptor de células T, su efecto supresor parece no ser específico de antígeno (Thornton y Shevach, 2000).

Las células inmunoregulatoras T han demostrado desempeñar un papel en la modulación de las células T autorreactivas patógenas en los ratones NOD. Hay evidencia de que los ratones prediabéticos albergan células inmunoregulatoras T y que la disminución de su número, o su capacidad funcional, es un evento importante que contribuye a la progresión de la enfermedad (Sempe et al, 1994). Los experimentos de cotransferencia han demostrado que los esplenocitos T CD4+ de ratones prediabéticos impiden totalmente la transmisión de enfermedades por las células diabetogénicas en receptores inmunoincompetentes (Boitard et al, 1989; Hutchings & Cooke, 1990). Además, la inducción de células T reguladoras por las CD inmaduras se correlaciona con la prevención de la enfermedad en el modelo de ratón NOD (Huges et al, 2002).

En los seres humanos, las células T autorreactivas que responden a la insulina, descarboxilasa del ácido glutámico ("GAD"), proteína de choque térmico ("HSP") 60, o molécula similar a la proteína tirosina-fosfatasa ("IA-2"), y otros antígenos de células β indefinidos han sido descritos (Roep et al, 1990; Atkinson et al, 1992; Honeyman et al, 1993; Reijonen et al, 2002).

GAD es una enzima biosintética del neurotransmisor inhibidor del ácido gamma aminobutírico (Baekkeskov et al, 1990). Se han clonado dos isoformas distintas con 65% de homología, GAD65 y GAD67. Aunque GAD65 es la isoforma predominante en los seres humanos, mientras que GAD67 es la forma principal en los ratones NOD, los anticuerpos contra ambas isoformas se detectan en los seres humanos (Kaufman et al, 1992). En los ratones NOD, los anticuerpos anti-GAD se detectaron antes, o en el momento de, insulinitis, y antes de que se desarrollen anticuerpos frente a otros antígenos de las células β . Este tiempo implica que GAD es el antígeno primario que inicia la autoinmunidad de las células β en este modelo (Tisch et al, 1993). La evidencia adicional para un papel importante en la diabetes de GAD proviene de las observaciones de muchos laboratorios que las células T específicas de GAD aisladas de bazo o el páncreas de ratones diabéticos pueden transferir la enfermedad a los animales no expuestos (Rohane et al, 1995; Wen et al, 1998; Zekzer et al, 1998). Aunque sigue habiendo controversia con respecto a la función central de GAD en la patogénesis de DM T1, la evidencia de los experimentos con animales sugiere al menos un papel importante de esta proteína.

La inmunización con GAD65 purificada a una edad temprana, ya sea por vía intratímica o intravenosa puede inducir tolerancia de células T contra células β pancreáticas en ratones NOD, evitando de ese modo la insulinitis y la diabetes (Tian et al, 1996; Ma et al, 1997). La inducción de tolerancia contra GAD también podría prevenir el desarrollo de reacciones inmunitarias contra otros antígenos, tales como HSP65. Otros estudios dirigidos contra péptidos de GAD fueron capaces de inducir la tolerancia (Tisch et al, 2001; Tisch et al, 1999; Zechel et al, 1998). La protección contra la aparición de la diabetes también se puede lograr por tratamiento de insulina o HSP65 a través de la vía intravenosa, subcutánea, oral o nasal (Elias et al, 1991; Elias y Cohen, 1994; Elias et al. 1997; Atkinson et al. 1990). Mientras que las terapias específicas de antígeno son muy eficaces en la prevención de aparición de la enfermedad cuando se administra temprano, sólo unos pocos intentos tuvieron éxito en el control de la enfermedad en curso (Elias y Cohen, 1994; Tian et al, 1996).

Las inmunizaciones de péptidos general no pueden controlar si las células presentadoras de antígenos presentan los péptidos en una etapa que induce inmunidad o por las células presentadoras de antígeno que pueden cambiar la respuesta inmune hacia la tolerancia, y por lo tanto puede resultar en la estimulación inmune o la supresión inmune.

Comprometer el sistema inmune puede prevenir el desarrollo de la diabetes. Una amplia gama de agentes generales que suprimen la función de células T tales como FK506, anti-CD4, anti-CD8, anti-CTLA-4 y otros han demostrado prevenir o retrasar la aparición de diabetes en ratones NOD (revisado en: Atkinson y Leiter, 1999). Sin embargo, ninguno de estos reactivos es específico para células T diabetogénicas, y la mayoría de éstos se puede prevenir la aparición de la enfermedad, pero es ineficaz una vez establecida la enfermedad. Agentes inmunosupresores generales, tales como ciclosporina probado en ensayos clínicos ha sido efectiva a corto plazo (Feutren et al, 1988; Skyler y Rabinovitch, 1992). Sin embargo, la interrupción de la inmunosupresión llevó a provocar recaídas, y los efectos secundarios tales como toxicidad renal excluye el tratamiento a largo plazo (Parving et al, 1999).

Se han iniciado ensayos clínicos para evaluar la eficacia de la terapia específica de antígeno en la diabetes. El péptido p277 HSP60 (DiaPep277) se analizó en los diabéticos de aparición temprana (Raz et al, 2001). Múltiples inmunizaciones con el péptido desaceleró la progresión de la enfermedad y estudios a gran escala se han iniciado para validar y ampliar los resultados. Los ensayos clínicos que utilizan la cadena beta de la insulina humana en combinación con adyuvante incompleto de Freund, un ligando de péptido alterado de insulina B9-23 y GAD, están en marcha. Sin embargo, los ensayos que tratan a los diabéticos recién diagnosticados con insulina oral fracasaron (Pozzili et al. 2000; Chaillous et al. 2000) y la administración parenteral de insulina no tuvo éxito en la prevención de la enfermedad en prediabéticos de alto riesgo (Ensayo de Prevención de Diabetes de Tipo 1 (DPT) Grupo de Estudio, 2002). El fracaso puede deberse a varios factores, incluyendo la elección de antígeno, dosis de antígeno (Kurts et al., 1999), el momento y la vía de administración. Además, la terapia de antígeno no puede controlar qué tipo de célula inmune capta el antígeno. Mientras que los ratones están bajo condiciones libres de patógenos controlados, este no es el caso en los ensayos humanos. El cebado, en lugar de la tolerancia puede tener lugar cuando hay infecciones bacterianas o virales concurrentes. En los animales, la diabetes podría ser inducida por la inmunización de antígeno bajo ciertas condiciones (Blana et al 1996; Bellmann et al., 1998).

Bonifaz et al., (J. Exp. Med. 196 (12), 1627, 2002) describe que la construcción que comprende un anticuerpo DEC-205 y ovoalbúmina puede inducir tolerancia a la ovoalbúmina. Desde la comprensión de cómo el sistema inmune mantiene la tolerancia a los antígenos propios ha crecido sustancialmente en la última década, las estrategias terapéuticas actuales para prevenir o curar la DM T1 tienen como objetivo restablecer la tolerancia inmune a antígenos de células β . Las estrategias de inmunoterapia actuales están dirigidas a la inducción de tolerancia a antígenos de las células β ya sea directamente mediante la inactivación de las células T autorreactivas y / o la inducción de células T con capacidad de regulación. La inducción de células T reguladoras parece ser un enfoque prometedor para el tratamiento de una serie de enfermedades autoinmunes.

10 Resumen

La presente invención se define por las reivindicaciones. En más detalle, la presente invención se refiere a una construcción de anticuerpo / péptido que comprende: (i) un anticuerpo que reconoce L-SIGN y (ii) un péptido unido al anticuerpo, en donde el péptido es un autoantígeno, en el que el autoantígeno se selecciona del grupo constituido por ácido glutámico descarboxilasa (GAD), un epítipo de GAD, insulina, un epítipo de la insulina, proteínas de choque térmico (HSP), un epítipo de HSP y antígenos de células β . La presente invención se refiere además a un método para producir de forma recombinante anticuerpos manipulados, el método comprende unir un anticuerpo que reconoce L-SIGN a un autoantígeno, en el que el autoantígeno se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico descarboxilasa (GAD), un epítipo de GAD, insulina, un epítipo de la insulina, proteínas de choque térmico (HSP), un epítipo de HSP y antígenos de las células β . También se describe aquí un método de tratamiento de la enfermedad autoinmune mediante la inducción de la tolerancia inmune. La tolerancia inmune se induce mediante la presentación de autoantígenos en las células presentadoras de antígeno. Los autoantígenos están unidos a los anticuerpos que reconocen receptores de internalización de antígenos. Los autoantígenos son internalizados por y presentados sobre las células presentadoras de antígeno, causando una inhibición de células T autorreactivas.

Los métodos y los compuestos descritos en este documento se utilizan para tratar la diabetes mellitus mediante la inducción de una tolerancia inmune para un autoantígeno, que puede ser, entre otras cosas, antígenos de células β , GAD o un epítipo del mismo, insulina o un epítipo del mismo, HSP o un epítipo de la misma. El autoantígeno está vinculado a un anticuerpo que reconoce a DC-SIGNR, o una variación de DC-SIGNR, que es un receptor de internalización de antígeno. El autoantígeno se internaliza en las células endoteliales sinusoidales de hígado diana u otras APC con tolerancia que expresan DC-SIGNR en la superficie. El autoantígeno se presenta en las células endoteliales sinusoidales hepáticas diana e inhibe la proliferación de células T autorreactivas.

Las construcciones de anticuerpos / péptido descritos, contienen un anticuerpo para un receptor en una célula presentadora de antígeno unido a un péptido. El péptido puede ser un antígeno o puede ser un autoantígeno. La construcción de anticuerpo / autoantígeno o porción del mismo puede internalizarse por la célula presentadora de antígeno y se logra la tolerancia inmune al autoantígenos. En algunos casos una toxina se puede combinar con los anticuerpos de la presente descripción y se administra a un paciente. Cuando la toxina es, por ejemplo, una célula tumoral, el anticuerpo de la presente descripción puede ser utilizado para dirigir la toxina a la célula tumoral y por lo tanto centrar la administración de la toxina a la célula tumoral.

También se describen aquí métodos para producir de forma recombinante anticuerpos manipulados que contienen un anticuerpo para un receptor o una célula presentadora de antígeno ligado a un autoantígeno.

La presente descripción también se refiere a anticuerpos contra DC-SIGNR que interfieren con la interacción de células que expresan DC-SIGNR y células que expresan ICAM tales como células T.

Los anticuerpos contra DC-SIGNR pueden evitar la entrada de virus en las células del hígado, tales como células sinusoidales del hígado y su infección en otras células. La presente descripción puede incluir el uso de anticuerpos para DC-SIGNR en las vacunas.

Los anticuerpos contra DC-SIGNR de la presente descripción puede ser un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos contra DC-SIGNR de la presente descripción también pueden ser un scFv.

También se describe aquí técnicas profilácticas, así como técnicas de diagnóstico utilizando las composiciones y / o que incorporan los métodos como se describe anteriormente. También se proporcionan composiciones que comprenden los anticuerpos contra DC-SIGNR de la presente descripción en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra de forma esquemática la interacción de una construcción de anticuerpo / autoantígeno en conformidad con la presente descripción con una célula presentadora de antígeno (APC), y una célula T.

La Figura 2A muestra las secuencias de aminoácidos de cadena ligera (Id. de Sec. N°: 1-6) y secuencias de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpos scFv de conejo anti-mSIGNR1.

5 La Figura 2B muestra las secuencias de cadena pesada de aminoácidos (Id. de Sec. N°: 7-12) de anticuerpos scFv de conejo anti-mSIGNR1.

La Figura 3 es un diagrama esquemático de una porción de un vector para la producción de construcciones de anticuerpos peptídicos.

10 La Figura 4 es una representación gráfica de los resultados de los experimentos in vitro de acuerdo con la presente descripción que muestra la reactividad de los clones de IgG1 con DC-SIGNR humana.

La Figura 5 es una representación gráfica de los resultados de los experimentos in vitro de acuerdo con la presente descripción que muestra la reactividad de los clones de IgG2a con DC-SIGNR humana.

15 La Figura 6 es una representación gráfica de los resultados de los experimentos in vitro de acuerdo con la presente descripción que muestra la reactividad de los clones de IgG1 con DC-SIGNR y DC-SIGN humanos.

20 La Figura 7 es una representación gráfica de los resultados de los experimentos in vitro de acuerdo con la presente descripción que muestra la reactividad de los clones de IgG2a con DC-SIGNR y DC-SIGN humanos.

Las figuras 8A-8C muestran las secuencias de aminoácidos de clones de cadena pesada humana reactivos con DC-SIGNR (Id. de Sec. N°:17-36).

25 Las figuras 9A-9B muestran las secuencias de aminoácidos de clones de cadena ligera humana reactivos con DC-SIGNR (Id. de Sec. N°:37-55).

La Figura 10 muestra secuencias de aminoácidos adicionales de clones de cadena pesada humana reactivos con DC-SIGNR (Id. de Sec. N°:63-82).

30 La Figura 11 muestra secuencias de aminoácidos adicionales de clones de cadena ligera reactivos con DC-SIGNR (Id. de Sec. N°:46-226).

35 La Figura 12 muestra secuencias de aminoácidos adicionales de clones de cadena pesada reactivos con DC-SIGNR (Id. de Sec. N°:133-154).

La Figura 13 muestra secuencias de aminoácidos adicionales de clones de cadena ligera reactivos con DC-SIGNR (Id. de Sec. N°:169-189).

40 Descripción detallada

Los métodos actuales inducen la tolerancia inmune a autoantígenos, o péptidos propios, implicados en la enfermedad autoinmune.

45 La inmunotolerancia se induce en conformidad con la presente descripción mediante la administración de una construcción de anticuerpo / autoantígeno (a veces denominado aquí como un "anticuerpo modificado") a un sujeto. La construcción de anticuerpo / autoantígeno incluye un autoantígeno ligado a un anticuerpo.

50 El componente de anticuerpo puede ser un anticuerpo que se une a cualquier receptor en cualquier célula presentadora de antígeno. Como los expertos en la técnica apreciarán, los tipos de células presentadoras de antígenos incluyen células dendríticas, macrófagos, células endoteliales, células de Kupffer y células B. Entre los receptores conocidos actualmente o células presentadoras de antígenos están DEC-205, receptor de manosa, DC-SIGN, DC-SIGNR, MHC, receptor de peaje, langerina, receptor asialoglicoproteína, receptor beta-glucano, receptor de lectina tipo C e inmunoreceptor de células dendríticas. El receptor puede ser uno que internaliza el anticuerpo

55 STT. Ya sea si la internalización se produce en un receptor particular se puede determinar experimentalmente utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los receptores o células presentadoras de antígenos que se sabe que proporcionan actualmente internalización de anticuerpos incluyen DEC-205, receptor de manosa, DC-SIGN y DC-SIGNR.

60 El componente de anticuerpo puede ser un anticuerpo natural (aislado usando técnicas convencionales) o un anticuerpo que se prepara sintéticamente por métodos recombinantes dentro del alcance de los expertos en la técnica. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo no humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o cualquiera de los tipos anteriores de anticuerpos que han sido manipulados de cualquier forma (por ejemplo, modificaciones específicas del sitio o desinmunización). El anticuerpo

65 se puede seleccionar ventajosamente a partir de una biblioteca de anticuerpos usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo presentación de fagos y desplazamiento lateral.

Una vez seleccionado, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede amplificar utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica tales como, por ejemplo, PCR convencional o la técnica de amplificación descrita en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10 / 251.085 presentada el 19 de septiembre de 2002 y 10 / 014.012 presentada el 10 de diciembre de 2001, respectivamente.

Un autoantígeno está ligado al anticuerpo para preparar una construcción de anticuerpo / autoantígeno en conformidad con esta descripción. Cualquier autoantígeno puede ser empleado. El autoantígeno puede ser de origen natural y aislarse usando técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Alternativamente, si se conoce la secuencia de aminoácidos del autoantígeno, puede ser preparada sintéticamente usando técnicas conocidas. Autoantígenos adecuados incluyen insulina, GAD, Hsp, antígenos nucleares, receptor de acetilcolina, la proteína básica de la mielina, la glicoproteína mielina oligodendrocito, proteína proteolípídica, la glicoproteína asociada a mielina, proteínas de la membrana basal glomerular y el receptor de tirotrópina. El autoantígeno puede ser uno que induce la tolerancia inmune tras la presentación por una célula presentadora de antígeno.

El autoantígeno se pueden unir con el anticuerpo mediante cualquier método adecuado. Un método particular se expone en los Ejemplos, más adelante, sin embargo esta descripción no se limita a ningún método particular para realizar la construcción de anticuerpo / autoantígeno.

Los presentes métodos de inducción de tolerancia inmune a los autoantígenos dirigidos a células presentadoras de antígeno ("APC") y dirigen un autoantígeno a las células por medio de un anticuerpo. La Figura 1 muestra esquemáticamente la interacción de una construcción anticuerpo / autoantígeno en conformidad con la presente descripción con una célula presentadora de antígeno (APC), y una célula T. El anticuerpo reconoce un receptor en las células diana. Para la entrega directa del autoantígeno mediante el anticuerpo, los dos están unidos. Esta unión puede realizarse mediante cualquier método, aunque esta descripción delinea el uso de vector de clonación. El anticuerpo se dirige y se une solamente al receptor de antígeno de internalización único, asegurando así la entrega del autoantígeno al tipo de célula deseado.

Después de que el anticuerpo se una al receptor de internalización de antígeno dirigido, el autoantígeno unido y el anticuerpo se internalizan en la célula presentadora de antígeno. El autoantígeno se presenta en la superficie de las APC, presumiblemente a través de la interacción del autoantígeno con el complejo mayor de histocompatibilidad ("MHC") dentro de la célula. Una vez que un autoantígeno se expresa en la superficie de las APC con potencial coestimulador, las células T autorreactivas no expuestas pueden llegar a activarse y dirigirse y reaccionar con su autoantígeno específico. La ausencia de una molécula co-estimuladora en la superficie de la APC es más probable que participe en la limitación de la respuesta de células T. Las células T efectoras autorreactivas pueden matar sólo un número limitado de células de tejido que expresan el antígeno. Después de matar a unas cuantas células diana, la célula efectora muere. Las células presentadoras de autoantígenos se toleran a partir de este momento.

La construcción de anticuerpo / autoantígeno descrito se puede administrar de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, subcutánea, intraocular, intraarterial, intratecal, inhalación o intralesional, tópica o por sistemas de liberación sostenida como se indica más adelante. La construcción de anticuerpo / autoantígeno se puede administrar de forma continua por infusión o por inyección de bolo. Uno puede administrar la construcción de anticuerpo / autoantígeno de una manera local o sistémica.

Las construcciones de anticuerpo / autoantígeno se puede preparar en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición. Esta composición terapéutica puede administrarse por vía intravenosa o a través de la nariz o el pulmón, preferiblemente como un aerosol líquido o en polvo (liofilizado). La composición también puede administrarse por vía parenteral o subcutánea según se desee. Cuando se administra sistémicamente, la composición terapéutica debe ser estéril, libre de pirógenos y en una solución parenteralmente aceptable que tiene debidamente en cuenta el pH, la isotonicidad, y la estabilidad. Estas condiciones son conocidas por los expertos en la técnica.

En resumen, las formulaciones de dosificación de la construcción de anticuerpo / autoantígeno descrito se preparan para su almacenamiento o administración mezclando el compuesto que tiene el grado deseado de pureza con vehículos fisiológicamente aceptables, excipientes, o estabilizadores. Tales materiales no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y pueden incluir tampones tales como TRIS HCl, fosfato, citrato, acetato y sales de otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; péptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos) tales como poliarginina, proteínas tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio y / o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol.

5 Cuando se usa para administración in vivo, la formulación de construcción de anticuerpo / autoantígeno debe ser estéril y puede formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución. El anticuerpo normalmente se almacenará en forma liofilizada o en solución. Otros vehículos tales como aceite vegetal de origen natural como aceite de sésamo, cacahuete, o de semilla de algodón o un vehículo graso sintético como oleato de etilo o similares pueden ser deseables. Tampones, conservantes, antioxidantes y similares pueden incorporarse de acuerdo con la práctica farmacéutica aceptada.

10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso incluyen composiciones en las que una o más construcciones de anticuerpo / autoantígenos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir su propósito previsto. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de anticuerpo eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en el presente documento. Las dosificaciones terapéuticamente eficaces pueden determinarse mediante el uso in vitro y en métodos in vivo.

20 Una cantidad eficaz de construcción anticuerpo / autoantígeno a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración, y la condición del paciente. Además, el médico de cabecera tiene en cuenta diversos factores conocidos para modificar la acción de los fármacos incluyendo la gravedad y el tipo de enfermedad, peso corporal, sexo, dieta, tiempo y vía de administración, otros medicamentos y otros factores clínicos relevantes. En consecuencia, será necesario para el terapeuta titular la dosificación y modificar la ruta de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Típicamente, el clínico administrará la construcción de anticuerpo / autoantígeno hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante ensayos convencionales.

25 Para cualquier construcción de anticuerpo / autoantígeno, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un rango de concentración circulante que incluye la CE_{50} como se determina en cultivo celular (por ejemplo, la concentración de la molécula de ensayo que promueve o inhibe la proliferación o diferenciación celular). Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

35 La toxicidad y la eficacia terapéutica de las construcciones anticuerpos / autoantígeno descritas en este documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre DL_{50} y DE_{50} . Las moléculas que presentan índices terapéuticos elevados pueden ser utilizadas. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales moléculas puede estar dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y dosis puede elegirse por el médico en vista de la condición del paciente. (Véase, por ejemplo, Finigl et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1 pág. 1.)

45 La cantidad de dosificación y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles de plasma de la construcción de anticuerpo / autoantígeno que son suficientes para promover o inhibir la proliferación o diferenciación celular o la concentración eficaz mínima (MEC). La MEC variará para cada construcción de anticuerpo / autoantígeno, pero puede estimarse a partir de datos in vitro utilizando ensayos descritos. Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y la vía de administración. Sin embargo, los ensayos de HPLC o los bioensayos pueden utilizarse para determinar las concentraciones plasmáticas.

50 Los intervalos de dosificación también pueden determinarse utilizando el valor MEC. Las moléculas de construcción de anticuerpo / autoantígeno deben administrarse utilizando un régimen que mantenga los niveles plasmáticos por encima de la MEC durante el 10-90% del tiempo, preferiblemente entre 30-90% y más preferiblemente entre 50-90%.

60 En los casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de la construcción de anticuerpo / autoantígeno puede no estar relacionada con la concentración plasmática.

Una dosis diaria típica podría oscilar desde aproximadamente $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ hasta $1000 \text{mg} / \text{kg}$ o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Típicamente, el clínico administrará la construcción de anticuerpo / autoantígeno hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante ensayos convencionales.

- Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 0,001 mg / kg hasta aproximadamente 1000 mg / kg, más preferiblemente desde aproximadamente 0,01 mg a 100 mg / kg, más preferiblemente desde aproximadamente 0,010 a 20 mg / kg de la construcción anticuerpo / autoantígeno puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más tiempo, dependiendo de la condición, el tratamiento se repite hasta que ocurre una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad o se consigue la mejora deseada en la condición del paciente. Sin embargo, otros regímenes de dosificación también pueden ser útiles.
- Los métodos descritos se pueden usar para tratar la diabetes mellitus mediante la inducción de la tolerancia inmune a las células β productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas. Los autoantígenos de estas células están ligados a anticuerpos que reconocen el antígeno del receptor de internalización deseado. Los autoantígenos adecuados para su uso en esta descripción son antígenos de células β , y epítomos o péptidos que representan epítomos de insulina, descarboxilasa del ácido glutámico ("GAD") y proteína de choque térmico ("HSP"). La unión de un conjunto de péptidos que abarcan epítomos de insulina, GAD y hsp a un anticuerpo anti-DC-SIGNR tiene el potencial para inducir la tolerancia a todos los principales antígenos implicados en la DM T1. Otros autoantígenos pueden ser conocidos y utilizados, o descubiertos y utilizado, por los expertos en la técnica.
- El receptor de antígeno de internalización se presenta en APC especializados. Para este método, el receptor de antígeno de internalización elegido es DC-SIGNR (receptor no relacionado con integrina de captura de molécula de adhesión intercelular 3 específica de células dendríticas). DC-SIGNR se expresa por células endoteliales sinusoidales hepáticas ("CESH"), que son células presentadoras de antígeno residentes de hígado. (Pohlmann et al, 2001). DC-SIGNR pertenece a la familia de los receptores de internalización de patógenos que internalizan proteína unida a receptor y facilitan la presentación de antígenos. (¹Geijtenbeek et al., 2002). Se ha demostrado que la presentación de un antígeno por CESH resulta en una tolerancia específica de antígeno (Limmer et al., 2000). En contraste con otros tipos de células dendríticas que pueden madurar de un estado inmaduro tolerogénico a un estado de activación, las células sinusoidales hepáticas no pueden ser inducidas a convertirse en una célula que presentan antígeno activadora (²Knolle et al., 1999). El homólogo humano DC-SIGNR (también llamado L-SIGN) para DC-SIGN humano muestra 77% de identidad con DC-SIGN en el nivel de aminoácidos y tiene el dominio típico de internalización de receptores (Bashirova et al, 2001; Soilleux et al, 2000). DC-SIGNR es altamente expresado en CESH y también se encuentra en una subpoblación de células similares a macrófagos de los ganglios linfáticos, pero no se expresa por DC.
- A los fines de la presente descripción, los términos "DC-SIGNR" y "L-SIGN" se utilizan indistintamente.
- La lectina tipo C de ratón DC-SIGN (CD209) se ha identificado recientemente como un receptor específico de DC. DC-SIGN media la migración transendotelial de DC, que permite respuestas inmunes primarias al iniciar interacciones transitorias de células DC-T (³Geijtenbeek et al, 2000; ²Geijtenbeek et al, 2000). DC-SIGN también sirve como un receptor de internalización de antígeno de reconocimiento de patógenos a través de estructuras de hidratos de carbono. Además de su importante papel en la agrupación de células DC-T y la iniciación de respuestas de células T, DC-SIGN es un receptor importante implicado en la infección de DC y posterior transmisión a las células T de virus tales como el VIH-1, VIH-2, SIV-1, virus de la hepatitis C (HCV), virus de Ebola, citomegalovirus (CMV) y el virus dengue; bacterias tales como *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Mycobacteria tuberculosis*; levaduras tales como *Candida albicans*; y parásitos como *Leishmania pifanoi* y *Schistosoma mansoni*.
- El homólogo murino de DC-SIGNR, mSIGNR1, capta antígenos que se internalizan rápidamente y dirigidos a lisosomas para su procesamiento (¹Geijtenbeek et al, 2002). Basado en la secuencia de aminoácidos, el mSIGNR1 murino es igualmente homóloga a DC-SIGNR humano, como al DC-SIGN humano y es por lo tanto útil para los estudios de modelado animal.
- Los anticuerpos contra DC-SIGNR pueden modular, es decir, inhibir o potenciar, la interacción de células que expresan DC-SIGNR con células que expresan ICAM. Los anticuerpos anti-DC-SIGNR pueden unirse al sitio del receptor DC-SIGNR en la superficie de una célula presentadora de antígeno tal como CESH, y dificultan la interacción entre la CESH y una célula T. Más específicamente, los anticuerpos contra DC-SIGN reducen la adhesión entre las células T y CESH al interferir con la adhesión entre DC-SIGNR y un receptor ICAM en la superficie de una célula T.
- Tal como se usa en el presente documento, "receptor ICAM" significa tanto el receptor ICAM-2 y ICAM-3, especialmente el receptor de ICAM-3.
- Los anticuerpos contra DC-SIGNR de la presente descripción pueden no unirse a DC-SIGN.
- Los anticuerpos contra DC-SIGNR de la presente descripción pueden bloquear la entrada del virus en las células del hígado, tales como células sinusoidales del hígado y su infección en otras células.
- Al interferir con la adhesión de las células T a células presentadoras de antígeno, el uso de anticuerpos para DC-SIGNR afectará a la agrupación celular de células T presentadoras de antígeno, la activación de células T y otras

interacciones que se basan en el contacto entre las células presentadoras de antígeno y las células T. Estas otras interacciones incluyen tanto el contacto directo de célula a célula o en proximidad a las células presentadoras de antígeno y las células T.

5 En otras realizaciones, los anticuerpos anti-DC-SIGNR de la presente descripción están unidos con péptidos tales como autoantígenos, o péptidos. Estos péptidos se pueden unir a anticuerpos anti-DC-SIGNR por cualquier método adecuado, incluyendo el trasplante de un vector a un fragmento de anticuerpo y la clonación del enlace vector / anticuerpo, o enlace químico. Los métodos de unión de un vector, clonación o de unión química son bien conocidos para los expertos en la técnica.

10 Los péptidos, preferiblemente autoantígenos, junto con el anticuerpo unido, se internalizan en la CESH. Las CESH son portadoras de moléculas de superficie necesarias para la presentación de antígenos tales como MHC II, CD80 y CD86 (Lohse et al, 1996; Rubinstein et al, 1986). Además de inducir un fenotipo regulador en células T CD4+ no expuestas (Knolle et al, 1999), las CESH pueden inducir tolerancia en las células T CD8+ mediante la presentación cruzada de antígeno exógeno (Limmer et al, 2000). Las CESH responden a estímulos como TNF- α y endotoxina mediante desregulación de MHC, y dificultando el procesamiento endosomal (²Knolle et al, 1999). Además, las CESH no migran fuera del hígado a los órganos linfáticos.

20 Esta internalización facilita la presentación de péptidos auto-antígeno a la superficie para las CESH, a través de interacciones mediadas por MHC. Una vez que un autoantígeno se expresa en la superficie de las CESH que poseen potencial coestimulador, las células T autorreactivas no expuestas pueden llegar a activarse. Las células T dirigen y reaccionan con el autoantígeno unido. Las células T efectoras matan unas cuantas CESH y mueren sin moléculas coestimuladoras. Esta presentación de un autoantígeno por CESH resulta en tolerancia específica de autoantígeno.

25 El hígado tiene un microambiente único con una gran cantidad de mediadores tolerogénicas tales como IL-10 y TGF- β y APC especializadas que favorecen el desarrollo de tolerancia inmunológica (¹Knolle y Gerken, 2000). Las propiedades tolerogénicas del hígado están apoyadas por el hallazgo de que los trasplantes hepáticos alogénicos pueden ser aceptados a través de barreras de MHC (Calne, 1969). Además, la aplicación de antígenos a través de la vena porta es más probable que conduzca a la tolerancia que la aplicación sistémica del antígeno (Kamei et al, 1990). El drenaje a través del hígado se ha descrito que es un requisito previo para la inducción de la tolerancia oral (Yang et al, 1994). La sangre que pasa a través de los vasos hepáticos primero entra en contacto con las células de Kupffer y las CESH. La sangre fluye a través de los sinusoides hepáticos lentamente, permitiendo el contacto entre las poblaciones de células hepáticas sinusoidal y los leucocitos que pasan. Las CESH llevan moléculas de superficie necesarias para la presentación de antígenos tales como MHCII, CD80 y CD86 (Lohse et al, 1996; Rubinstein et al, 1986). Además de inducir un fenotipo regulador en células T CD4+ no expuestas (³Knolle et al, 1999), las CESH pueden inducir tolerancia en las células T CD8+ mediante la presentación cruzada de antígeno exógeno (Limmer et al, 2000). Klugewitz et al (Klugewitz et al, 2002) demostró que la inyección de Th1, células TCR transgénicas productoras de IFN- γ en ratones resulta después de la inmunización intravenosa de proteínas en la supresión de la producción de IFN- γ por estas células en el hígado y la promoción de las células Th2. En contraste con APC mieloides profesionales que puede diferenciarse de un estado tolerogénico inmaduro, en una etapa de iniciación de la inmunidad madura, las CESH responden a estímulos como TNF- α y la endotoxina mediante desregulación de MHC y dificultando el procesamiento endosomal (²Knolle et al, 1999). Además, las CESH no migran fuera del hígado a los órganos linfáticos. Las CESH podrían no ser las únicas APC especializadas en la inducción de tolerancia. Pugliese et al. identificaron recientemente un pequeño subconjunto de DC del bazo que indujeron la tolerancia mediante la presentación de autoantígeno expresado de forma endógena (Pugliese et al, 2001). En general, las CESH parecen ser un tipo de célula favorable para la presentación de antígenos de células β con el propósito de inducción de la tolerancia.

50 La práctica de los métodos descritos se comprenderán más plenamente a partir de los siguientes ejemplos, que se presentan sólo para ilustración y no deben interpretarse como limitantes en modo alguno.

Ejemplo 1 - Obtención de anticuerpos anti-mSIGNR1

55 Usando la tecnología de presentación de fagos, un panel de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) que reconocen mSIGNR1 fue identificado. Los scFv contienen la región variable de la cadena ligera y pesada conectadas por un enlazante. Su longitud corta hace que estos fragmentos de anticuerpos sean muy adecuados para la unión de antígeno, y la capacidad de unión al receptor se conserva. Los conejos fueron inmunizados con mSIGNR1 recombinante, y una biblioteca de anticuerpos scFv se construyó utilizando el vector pRL4 de presentación de fagos que se describe en la solicitud internacional N° WO 02/46436 A2 publicada el 13 de junio de 2002. Los fragmentos de anticuerpos en este sistema se muestran en el gen III de la proteína de la cubierta del fago. Los anticuerpos que reconocen mSIGNR1 se aislaron por 4 rondas de solapamiento en fase sólida sobre mSIGNR1 recombinante. Se identificaron seis anticuerpos diferentes. Las secuencias de aminoácidos de estos seis anticuerpos se presentan en las Figuras 2A y B (Id. de Sec. N°: 1-6 y 7-12, respectivamente). Todos los anticuerpos reconocieron mSIGNR1 en ELISA en fase sólida, y no se observó ninguna reactividad cruzada con mDC-SIGN, el homólogo murino de DC-

SIGN humano. Los anticuerpos se marcaron para el epítipo con HA y HIS6. Tanto mSIGNR1 y DC-SIGNHIS se produjeron por células 3T3 EBNA y se purificaron sobre una columna de níquel.

5 Ejemplo 2 - Identificación de anticuerpos anti-mSIGNR1 que se internalizan tras la unión a la superficie celular del receptor

Cribaje de de líneas celulares que expresan mSIGNR1

10 Un panel de líneas celulares de macrófagos murinos (P388D1, 1-13,35, WEHI-3 y J774) son examinados para detectar la expresión de mSIGNR1 por RT-PCR por métodos estándar. Los cebadores se diseñaron basándose en la secuencia de Genbank de SIGNR1 y se utilizan éstos en RT-PCR de órganos de ratón. Se identifica una línea celular que expresa mSIGNR1 en el nivel de RNAm y la expresión en la superficie se confirmó mediante análisis de FACS. Se incubaron 5×10^5 células con $1 \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-mSIGNR1 en PBS que contenía 1% de BSA y 0,1% NaN_3 en hielo durante 15 minutos, condiciones que no permiten la internalización de anticuerpos. Después de 2 lavados con PBS que contenía 1% de BSA y 0,1% NaN_3 , anti-mSIGNR1 unido se detecta mediante anti-HA biotinilado (Roche) seguido de estreptavidina conjugada con PE (Becton Dickenson) y las células se analizan mediante FACS Calibur (Becton Dickinson). Alternativamente, la internalización se determina en células primarias conocidas para expresar mSIGNR1 tales como las células endoteliales sinusoidales del hígado. La expresión de mSIGNR1 en las CESH también puede ser confirmada por FACS como se describió anteriormente, pero sólo 1×10^5 células se añade por reacción.

Medición de la internalización

25 Una vez que una línea celular que expresa mSIGNR1 o tipo de célula primaria ha sido identificado, la internalización del panel de anticuerpos se evaluó mediante el análisis FACS. Para mostrar que la internalización se basa en la unión de mSIGNR1, se incluye una línea celular que no expresa mSIGNR1 tales como células dendríticas JAWS1 de ratón. La detección de anti-mSIGNR1 usando anticuerpo anti-HA biotinilado seguido de estreptavidina conjugado con PE en células intactas y permeabilizadas se compara como se describe para anticuerpos anti-DEC-205 (Mahnke et al, 2000). $1,5 \times 10^6$ células para líneas celulares o 3×10^5 células para células primarias se incuban con $3 \mu\text{g}$ de mSIGNR1 en PBS que contenía 1% de albúmina de suero bovino (BSA) durante 20 minutos a 4°C para permitir la unión del anticuerpo a la superficie sin internalización. El anticuerpo no unido se elimina mediante lavado 2 veces con PBS que contenía 1% de BSA a 4°C . Cada muestra se divide en 3. Un tercio se fija con 4% de paraformaldehído y la superficie anticuerpo se detecta como se ha descrito anteriormente. Los otros dos tercios se incuban adicionalmente durante 30 minutos a 37°C para permitir la internalización antes de fijarse. La mitad se detecta directamente con anti-HA y estreptavidina, la otra mitad se permeabiliza mediante la incubación de las células con PBS que contenía 0,1% (vol / peso) de saponina (Sigma-Aldrich). La cantidad de anticuerpo internalizado se calcula restando la fluorescencia media en las células fijadas de la registrada con las células fijadas y permeabilizadas. Los anticuerpos con los porcentajes más altos de internalización en 30 minutos se eligen para realizar nuevos estudios que unen péptidos a anticuerpos. Un scFv de conejo existente sin relación se utiliza como un control negativo, el anticuerpo ER-TR9 comercialmente disponible que se ha demostrado recientemente que se une a mSIGNR1 (1Geijtenbeek et al, 2002) se utiliza como un control positivo. También, fragmentos Fab de ER-TR9 se produjeron por digestión con papaína y se ensayaron para la internalización para verificar que la dimerización no es un requisito para la internalización. Si se desea, los scFv se pueden convertir en Fab'2 o IgG.

45 En una realización alternativa, una biblioteca mSIGNR1 se solapa para la internalización de anticuerpos como se describe por el grupo de James D. Marks (Poul et al., 2000). Un proceso adecuado para esta realización se describe a continuación.

Selección de anticuerpos de internalización de la biblioteca de fagos mSIGNR1

50 5×10^6 células identificadas como se ha descrito anteriormente para expresar mSIGNR1 se incuban con 1×10^{12} unidades formadoras de colonias de fagos de una biblioteca de mSIGNR1 presentando fragmentos de anticuerpo fusionado con la proteína del gen 3 en su superficie durante 1,5 horas a 4°C para permitir la unión del fago sin internalización. Después de la unión del fago, las células se lavaron 5 veces con solución salina tamponada con fosfato para eliminar el fago unido débilmente o de forma no específica. Las células se incubaron entonces durante 15 minutos a 37°C para permitir la endocitosis del fago unido a la superficie, pero evitar la degradación del fago dentro de la célula. Para eliminar el fago unido a la superficie de la célula, las células se separan mediante tres lavados con un tampón de glicina a pH bajo. Luego, las células se tratan con tripsina y se lavan con PBS antes de ser lisadas con trietilamina a pH alto. El lisado celular que contiene el fago se utilizó para infectar E. coli para preparar los fagos para la siguiente ronda de selección. Se realizó un total de tres rondas de selección. El título de fago unido a la superficie celular (que se encuentra en el primer lavado de glicina a pH bajo) y el número de fago recuperado dentro de la célula son monitorizados para cada ronda. Un aumento en el número de fagos endocitados indica una selección exitosa de la internalización de anticuerpos de fagos.

65 Para determinar si cualquiera de los fragmentos de anticuerpo scFv internalizados se unen a mSIGNR1, 500 clones de la ronda 3 se seleccionan utilizando un sistema robótico Qpix (Genetix) y se cultivaron en placas de 96 pocillos en

medio SB durante la noche en un agitador HiGrow (Gene Machines). El día siguiente, los platos se centrifugan y los sobrenadantes se analizan en ELISA mSIGNR1 de fase sólida usando un sistema robótico Genesis freedom 200 (Tecan). Las placas de ELISA de 96 pocillos se recubren con 1 μ de g mSIGNR1 / ml de PBS durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se bloquean con 1% de BSA, seguido de 3 lavados con PBS que contenía 0,05% de Tween. Las placas de control se recubren con 1% de BSA. Los sobrenadantes que contienen anticuerpos se añaden a los pozos con mSIGNR1 o BSA solo en concentraciones entre 0,05 - 5 μ g / ml en PBS que contenía 1% de BSA. Después de 2 horas en un agitador a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía 0,05% de Tween. Para la detección del scFv unido, se añade anticuerpo anti-HA (12CA5 líquido ascítico de ratón, Strategic Biosolutions, DE) en una dilución 1:1000 en PBS con 1% de BSA. Después de 2 horas en un agitador a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo y se añade IgG anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) durante 2 horas. Después de 3 lavados más, el anticuerpo unido se detectó usando sustrato Sigma 104®. Las placas se leen en diversos puntos temporales a una DO₄₀₅ con un lector de placas de ELISA (Molecular Devices).

Los clones que dan una señal positiva en el ELISA se caracterizan por el patrón de digestión de enzimas de restricción. El DNA se aisló utilizando equipo miniprep de Qiagen. 2 μ g de DNA se digirió con 5 U de EcoRII durante 2 horas a 37 °C y luego las muestras se colocan en un gel de agarosa NuSieve al 4%. Los patrones se compararon y las secuencias se purificaron en pequeñas cantidades (alrededor de 100 a 300 μ g). Los scFv se ensamblan adecuadamente en el espacio periplásmico de las bacterias y se secretan. Los scFv se pueden aislar a partir del sobrenadante o del espacio periplásmico. Los clones se cultivan en 4 litros de SB a una DO₆₀₀ de 0,8 y se indujeron con isopropil-PD-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG) durante 3-4 horas a 30 °C para producir cantidades óptimas de scFv. Para aislar anticuerpos de cadena sencilla del espacio periplásmico, los sedimentos celulares se resuspendieron en PBS frío con la adición de inhibidor de la proteasa Complete Mini (Roche) y se sonicaron utilizando un Sonics Vibra-cell VC750. Los restos celulares se sedimentaron y los sobrenadantes se aplicaron a las columnas Qiagen Ni-NTA usando una FPLC Akta (Pharmacia). El anticuerpo se eluyó con imidazol. Este método generalmente produce aproximadamente 100-300 μ g de anticuerpo purificado / litro. La endotoxina se elimina por filtración a través de filtros Sartorius QI5 generalmente produciendo preparaciones de anticuerpos que contienen menos de 10 U / ml de endotoxina como se determinó mediante la prueba de LAL (un ensayo comercialmente disponible de Bio Whittaker). Los anticuerpos se analizaron de nuevo para la internalización como se ha descrito anteriormente, así como para la unión a mSIGNR1 recombinante en ELISA en fase sólida. El anticuerpo con el mayor porcentaje de internalización a los 30 minutos y una buena señal en un ELISA en fase sólida (> 10D después de 1 hora a 1 μ g / ml) se seleccionan para producir construcciones de péptido-anticuerpo.

Ejemplo 3 – Unión de péptidos GAD a anticuerpos

Vector y estrategia de clonación

Después de la identificación del mejor scFv producido por bacterias, se hace una conversión a un sistema de expresión de mamífero. La expresión en mamíferos permite las modificaciones secundarias apropiadas de los péptidos y la producción libre de endotoxinas. Se utiliza un vector (por ejemplo, descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.355.245) con sitios de restricción compatibles como se muestra en la figura 3. El DNA del anticuerpo de interés en pRL4 (descrito anteriormente) se corta con Sfi y se inserta en el vector Apex 3P que contiene un promotor CMV y la secuencia líder de los anticuerpos de mamíferos. Para insertar los nucleótidos que codifican los péptidos de interés, se eligen sitios de restricción entre los sitios disponibles (MCS = NaeI, FseI, XbaI, EcoRI, PstI, EcoRV, BsaBI, BstXI, NotI, BsrBI, Xho, PbvIOI, SphI, NsiI, XbaI) que no están contenidos dentro de la secuencia del anticuerpo. Los oligonucleótidos que codifican los péptidos son sintetizados mediante Operon con los sitios de restricción apropiados en cada extremo y se insertan utilizando la ligasa T4 de DNA. La construcción resultante contendrá el scFv seguido por un espaciador determinado por la enzima de restricción elegida seguido de un péptido y un marcador de His (Figura 3). Las secuencias se confirman usando técnicas estándar antes de la transfección del DNA en células 393EBNA para la producción de anticuerpos.

Elección del péptido

Si bien se debe entender que cualquiera de los péptidos de los autoantígenos conocidos de la diabetes, insulina, hsp y GAD 65 y 67 pueden ser utilizados en los procesos descritos en el presente documento, para el siguiente experimento, GAD es elegido como el péptido. Las células T GAD-reactivas son las primeras células T autorreactivas para ser detectadas en el ratón NOD (Tisch et al. 1993; Kaufman et al, 1993) y han demostrado ser importantes en el proceso de la enfermedad. Además, el GAD humano y murino tienen un 95% de homología. Los epítomos reconocidos por las células T NOD de bazo han sido ampliamente caracterizados (Kaufman et al, 1993; Tisch et al. 1999; Zechel et al. 1998) y muchos péptidos inmunodominantes son similares en los ratones NOD y los pacientes con DM T1 y se han utilizado indistintamente en ensayos in vitro de células T (Kaufman et al. 1993). La respuesta inmune inicial en los ratones NOD se dirige contra una región definida en la región carboxi-terminal de GAD65 (péptido 509-528, péptido 524-543 (Kaufman et al. 1993). Las respuestas tardías de células T son también dirigidas contra otras regiones entre 200-300, así como otros autoantígenos. Uno de los primeros epítomos de células T GAD65 CD4, el péptido 524-543 (SRLSKVAPVIKARMMMEYGGT (Id. de Sec. N°: 13), la misma secuencia en

ratones y seres humanos) y dos de los últimos epítomos GAD65 murinos que se producen, péptido 247-266 (NMYAMLIARYKMFPEVKEKG (Id. de Sec. N°: 14), 1 amino ácido de diferencia entre la secuencia humana y de ratón, subrayado), y el péptido 290-309 (ALGIGTDSVILIKCDERK (Id. de Sec. N°: 15), la misma secuencia en ratones y humanos) se seleccionan para su uso como los péptidos en este experimento. Los 3 epítomos pueden inducir una respuesta proliferativa espontánea en esplenocitos de NOD. Además, la inmunización con el péptido 247-266 y el péptido 290-309 han demostrado retrasar la aparición de la diabetes en ratones NOD (Ma et al.1997; Tisch et al. 1999; Zechel et al. 1998). Además de epítomos de células T CD4, la tolerancia a los epítomos de células T CD8 también se ha descrito que es importante (Quinn et al. 2001; Bercovici et al, 2000). Como control negativo, una construcción de anticuerpo se hace con péptido 116-124 de lisozima de huevo de gallina (KGTDVQAWI) (Id. de Sec. N°: 16). Los péptidos más eficaces de estos estudios in vitro se unen en varias combinaciones con una construcción de anticuerpo y se analizaron en el modelo de diabetes NOD.

Ejemplo 4 - Producción y purificación de la construcción de anticuerpo-péptido

Para los experimentos de células T, aproximadamente 300 µg de cada construcción de anticuerpo se produce en EBNA293 de células riñón de embriones humanos. Las células se cultivan en DMEM con 10% de FCS, glutamina 2 mM y 250 U / ml de G418 (Sigma). Las células en matraces Ti75 son transfectadas con DNA usando el reactivo Effectine de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El medio se intercambia por medio libre de suero después de 3 días. El sobrenadante se recoge en el día 4 y el día 8, los desechos de células se retiran por centrifugación y el sobrenadante clarificado se carga en una columna de Ni-utilizando un Akta-FPLC. El anticuerpo se eluye con imidazol, se dializa en PBS y el tamaño correcto se verifica mediante 1 µg en un gel de SDS.

Ejemplo 5 - Internalización de la construcción de anticuerpo-péptido mediante CESH que resulta en la presentación del péptido y el efecto de esta presentación en las células T

Las células sinusoidales hepáticas están dirigidas in vitro con la construcción de péptido-anticuerpo y se determina si estas células pueden inducir un cambio fenotípico en las células T derivadas de ratones NOD jóvenes o ratones Balb/c.

Aislamiento de células endoteliales sinusoidales murinas

Las células endoteliales sinusoidales hepáticas se aíslan de ratones NOD de 3 semanas de edad o ratones Balb/c de 4-6 semanas de edad. Las células se obtienen por perfusión portal primero con EGTA para quelar el calcio y aflojar los contactos célula-célula, seguido por perfusión con 0,05% de colagenasa A en tampón de Hank para degradar la matriz intercelular como se describe por Kretz-Rommel (Kretz-Rommel y Boelsterli, 1995). El hígado perfundido se retira del ratón y se trabajó suavemente con un par de pinzas en ángulo. La suspensión celular en bruto resultante se filtró a través de una serie de tamices metálicos (30, 50, 80 de malla) para eliminar los fragmentos de tejido más grandes. Las células sinusoidales se separan de las células del parénquima por centrifugación en gradiente de densidad en un gradiente de metrizamida (1,089 g / cm³), seguido de 2 etapas de lavado para eliminar los desechos celulares (Knolle et al, 1999). En este punto, se obtiene una mezcla de células de Kupffer y células sinusoidales del hígado. Para los experimentos FACS esto es suficiente, ya que las células de Kupffer se pueden distinguir de las células endoteliales sinusoidales del hígado utilizando el anticuerpo F4/80 que reconoce las células de Kupffer, pero no las células sinusoidales hepáticas. Sin embargo, para los experimentos de co-cultivo con células T y péptido, las células de Kupffer se eliminan mediante el marcaje de las células con F4/80 conjugado con PE (BD Pharmingen) seguido de microperlas anti-PE de Miltenyi y clasificación magnética de las células marcadas utilizando la columna MACS y el separador de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La población de células restante se sembró en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% y 2% de glutamina. La pureza de las poblaciones de células se analiza el día 3 después de aislamiento por tinción FACS para marcadores de superficie utilizando anti-mSIGNR1 y anti-F4/80. mSIGNR1 está ausente en las células de Kupffer (Geijtenbeek et al, 2002). El 90% de pureza se considera suficiente para continuar con los experimentos. Se utilizan 2 hígados de ratones por experimento con un rendimiento esperado de aproximadamente 2 x 10⁷ células (Knook y Sleyster, 1976, extrapolado para el ratón).

Ensayos fenotípicos de células T

Los ensayos de células T demuestran si las construcciones de anticuerpos-péptidos resultan en la presentación de péptidos por células endoteliales sinusoidales hepáticas y si la presentación de péptidos pueden inducir un cambio fenotípico en las células T. Las células endoteliales sinusoidales del hígado se cultivan en placas de microtitulación de fondo plano a una densidad de 1 x 10⁵ células / pocillo. Después de mantener las células sinusoidales durante 3 días, las células T CD4+ se purificaron como se describe anteriormente a partir de ratones NOD de 3-semanas de edad y 8 semanas de edad o ratones Balb/c de 4-6 semanas de edad y se añaden a 10⁴ o 10⁵ células / pocillo. Además, se añade cada construcción anticuerpo-péptido a concentraciones de 0,1 -5 pg / pocillo. Como control positivo, se incluyen cada GAD y péptido control por sí mismo. Los péptidos son sintetizados por SynPep (Dublin, CA). Los pocillos de control negativos incluyen cualquiera de las células T solas o células sinusoidales hepáticas solas.

Hay 4 posibles resultados de presentación de péptidos por CESH a las células T: 1) inducción de células T reguladoras que se caracterizan por la producción de TGF-P y / o IL-10 y IL-4 o la expresión de CD4+ CD25+ CD62L, 2) eliminación de las células T o 3) una falta completa de respuesta. 4) También es concebible que la presentación del péptido en lugar de inducir tolerancia resulte en la estimulación de las células Th1 productoras de IL-2. Para distinguir entre estas posibilidades, los sobrenadantes de cultivo (100 μ l cada uno) se recogen a las 24 y 48 horas y se analizaron para la producción de citoquinas como se describe a continuación. Las respuestas de células T de 3 semanas de edad se comparan con las de los ratones NOD de 8 semanas de edad, así como con las células T derivadas de ratones Balb/c que no muestran una respuesta espontánea a GAD. Los ensayos se establecieron por triplicado y se repitieron dos veces. Puesto que se utiliza una mezcla de células T, una respuesta de citoquinas en el sobrenadante podría no verse fácilmente. Sin embargo, una mezcla de células refleja la situación y las respuestas de células T in vivo específicas de GAD se ven usando esplenocitos totales (Tisch et al, 1993).

Como una medida más sensible para la inducción de células T reguladoras, las células se evalúan para la expresión de marcadores de superficie típicos, tales como CD25, CD4 y CD62L (Lafaille y Lafaille, 2002) por análisis FACS después de 3 días en cultivo. Todos los reactivos están disponibles a partir de BD-Pharmingen. Además, se analizó la producción de IL-4 mediante FACS. Una prueba funcional de las propiedades inmunorreguladoras potenciales de las células T expuestas a CESH / péptido que se describen a continuación son la prueba definitiva para la inducción de tolerancia en este sistema. La posibilidad que el péptido presentado por CESH induzca la muerte celular se analizó en sobrenadantes de cultivo usando el equipo de ELISA de muerte celular de Roche de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de los esplenocitos y células T CD4+

Los bazo de los ratones NOD o Balb/c se extraen en un ambiente estéril y se colocan en PBS como se realiza habitualmente en nuestro laboratorio. Las células se separan mediante agujas de calibre 18 a 21, y los trozos más grandes se dejan sedimentar. El sobrenadante se retira y se centrifuga a 200 g durante 7 min. Los glóbulos rojos se lisaron utilizando 5 ml de NH_4Cl al 0,83% por bazo. Las células se lavaron dos veces en PBS y luego se resuspendieron en medio. Para ciertos experimentos, se utilizan esplenocitos totales. Para otros experimentos, las células T CD4+ se aislaron usando el equipo de aislamiento de células T CD4+ de Miltenyi (Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El aislamiento magnético de varias poblaciones de células está dentro del alcance de un experto en la técnica. En un procedimiento, el aislamiento se basa en el agotamiento de las células T no CD4+ utilizando un cóctel de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina contra CD8a, CDI 1 b, CD45R, DX5 y Ter 1 19. La pureza de la población aislada se evalúa por tinción de una mezcla de anti-CD4 conjugado con FITC, anti-CD8 conjugado con PE, anti-CD11 conjugado con APC, y CD45R conjugado con Cy-5 (eBioscience, San Diego, CA). La pureza esperada es del 90-95%, con un rendimiento del 70%. Ya que al menos 1×10^6 células se pueden obtener a partir de un bazo de ratón y aproximadamente el 25% de los esplenocitos son CD4+, se pueden obtener aproximadamente $1,75 \times 10^7$ células, suficiente para 175 placas de microtitulación de 96 pocillos.

Medición de la producción de citoquinas

La presencia de IL-10, TGF-P, IFN- γ , IL-4 e IL-2 en los sobrenadantes de cocultivos de células T / CESH se determinan mediante ELISA sándwich estándar como se describe (Kretz-Rommel y Rubin, 1997). Todos los pares de anticuerpos están disponibles a partir de BD Pharmingen. Un anticuerpo de captura de citoquinas se recubre en la placa en PBS durante la noche a 4 °C. Después de 3 lavados con PBS / 0,05% de Tween, se añaden los sobrenadantes de cultivo y una curva estándar de citoquina recombinante de ratón y se incubaron durante 2 horas en un agitador a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y de citoquinas unidas se detectaron con un anticuerpo anti-citoquina conjugado con fosfatasa alcalina. Después de 3 lavados, se añade sustrato Sigma 104 TM y las placas se leen en varios puntos de tiempo a una DO_{405} con un lector de placas ELISA (Molecular Devices).

Ejemplo 6 - Evaluar si las células T expuestas a los péptidos de GAD presentados en CESH, pueden prevenir posteriormente la activación de células T autorreactivas por las APC profesionales que presentan GAD

En un experimento adicional se analizó si las células T expuestas a péptidos en las células endoteliales sinusoidales hepáticas durante 3 días podían regular negativamente la activación de células T autorreactivas mediante el péptido presentado en APC profesionales esplénicas. La viabilidad de la inducción de células T con propiedades reguladoras *in vitro* ha sido demostrada por una serie de laboratorios (Wakkach et al 2001; Barrat et al 2002; Thorton y Shevach, 1998). Las propiedades inmunosupresoras pueden comprobarse mediante la adición de células T reguladoras a un sistema de cultivo en el que normalmente se observa la estimulación inmune. La adición de péptido GAD a células de bazo de un ratón NOD de 7 semanas de edad, que comprenden tanto APC como células T proporciona este sistema inmunoestimulador como se puede observar por la fuerte respuesta proliferativa. La adición de las células T reguladoras evita esta respuesta. Se añadieron 10^5 o 10^6 esplenocitos junto con péptido de 0,1, 1, o 10 μ m por pocillo, que contiene células T expuestas a CESH y anticuerpo con péptido acoplado. Los pocillos de control incluyen esplenocitos solo con péptido y solo con células T CESH+. Además, para excluir una contribución significativa de la proliferación por parte de las presuntas células T reguladoras, los pocillos de control también contenían esplenocitos irradiados (600 RAD, realizado en el servicio de irradiación del UCSD por Joe Aguilera) y

células T previamente expuestas a CESH y la construcción péptido-anticuerpo. Los esplenocitos irradiados pueden presentar el antígeno, pero no proliferan. Se añadió 1 μ Ci de 3 H-timidina a cada pocillo durante las últimas 16 horas de un periodo de cultivo de 72 horas para marcar el DNA recién sintetizado como una señal de proliferación. Las células se recogieron usando el Universal Cell Collector de Packard y la incorporación de 3 H-timidina se evaluó mediante un Topcount (Packard). Si la incorporación de 3 H-timidina en los cultivos que contenían los esplenocitos y las células T previamente expuestas al péptido CESH+ se reducía en comparación con los cultivos de esplenocitos, las células T se habían inducido con éxito con propiedades reguladoras. También se analizó si el anticuerpo anti-mSIGNR1 conjugado con el péptido podía inducir a las células T reguladoras en el ratón NOD, y si la enfermedad se podía detener.

Ejemplo 7

Se identificaron anticuerpos de ratón anti L-SIGN humano utilizando la tecnología de fagos recombinantes. Se prepararon bibliotecas de ratón (IgG1k y IgG2ak) derivadas de la combinación de las cadenas pesada y ligera de ratones inmunizados con L-SIGN humano recombinante mediante los métodos descritos en el documento WO 03/025202. Una vez preparadas, las bibliotecas se analizaron para ordenar por solapamiento primero sobre DC-SIGN humano para eliminar los anticuerpos de reacción cruzada con DC-SIGN. Los sobrenadantes no unidos se utilizaron para la selección de clones reactivos únicamente con L-SIGN. Un total de noventa y cinco colonias (36/ronda) para cada una de las dos bibliotecas (IgG1 y IgG2a) se indujeron y se determinaron su producción de anticuerpos y su reactividad con L-SIGN mediante un ELISA de captura. Brevemente, placas de ELISA se recubrieron de Fc anti-humano (Caltag) a 500 ng/ml durante la noche. Las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1%, seguido por la adición de L-SIGN recombinante a 2 mg/ml. Después de lavar la placa con PBS, se añadieron los sobrenadantes. Después de una incubación de 12 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces y se añadió un anticuerpo anti-Fab conjugado con fosfatasa alcalina durante 2 horas. Tras la adición del sustrato SigmaS se evaluó la señal usando un lector de ELISA (Molecular Devices).

La mayoría de los clones mostraron buena unión (DO 405 > 1,0) del anticuerpo en el fago. Varios clones de ambas bibliotecas IgG1 e IgG2a mostraron una reactividad positiva con L-SIGN humano. Los resultados se exponen en las Figuras 4 y 5. La Figura 4 muestra los clones de IgG1 con L-SIGN humana y la Figura 5 muestra la reactividad de los clones IgG2a con L-SIGN humano.

Ejemplo 8

Para identificar los clones que sólo eran reactivos con L-SIGN humano, se seleccionaron todos los clones del Ejemplo 7 con valores de DO de al menos cinco veces por encima del valor basal para analizar su reactividad con DC-SIGN humano mediante ELISA. Placas de ELISA se revistieron de Fc anti-humano (Caltag) a 500 ng/ml durante la noche. Las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1%, seguido por la adición de DC-SIGN recombinante a 2 mg/ml. Después de lavar la placa con PBS, se añadieron los sobrenadantes. Después de una incubación de 12 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces y se añadió un anticuerpo anti-Fab con fosfatasa alcalina conjugada durante 2 horas. Tras la adición de sustrato SigmaS se evaluó la señal usando un lector de ELISA (Molecular Devices).

Se encontraron diez clones de la biblioteca de IgG1 y tres clones de la biblioteca IgG2a que reaccionaban de forma única con L-SIGN humano (valores de DO de cinco a diez veces más elevados que con DC-SIGN). Los resultados se exponen en las Figuras 6 y 7. La Figura 6 muestra la reactividad de los clones positivos IgG1 con L-SIGN y DC-SIGN y la Figura 7 muestra la reactividad de los clones de IgG2a con L-SIGN y DC-SIGN.

Ejemplo 9

Trece clones identificados como reactivos sólo con L-SIGN humana y nueve clones fuertemente reactivos tanto con L-SIGN como con DC-SIGN, como se identificó anteriormente en el Ejemplo 8, se secuenciaron para determinar el número de clones únicos. La secuenciación se realizó mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Las secuencias de estos clones se muestran en las Figuras 8 y 9: las secuencias de los clones de la cadena pesada se muestran en la Figura 8A-8C (Id. de Sec. N° 17-36) y las secuencias de los clones de la cadena ligera se exponen en las figuras 9A-9B (Id. de Sec. N°: 37-55).

Los resultados de la secuenciación mostraron un grupo más diverso de cadenas pesadas comparado con las cadenas ligeras. La diversidad de los clones de anticuerpo también se mejoró mediante emparejamiento cruzada de las diferentes cadenas ligeras con la misma cadena pesada. Se identificaron un total de cinco clones únicos reactivos con L-SIGN y los clones fueron agrupados en base a la similitud de sus secuencias de aminoácidos (véase la Tabla 1 a continuación).

TABLA 1

Agrupación de clones de anticuerpos reactivos con L-SIGN humano basado en la secuencia de aminoácidos similitudes			
Grupos de anticuerpos	cadena ligera	cadena pesada	clones de L-sign únicos

ES 2 527 414 T3

1	B1; B2; D1; F1; H1 C2 (stop/ CDR1)	A1a, G1a, B1 (idénticas) B2; C2; D1; F1; H1 (1/FR1 vs. A1, B1, G1)	2
2.1 ^c	B3; C3	B3; C3 ^a	1
2.2	D3(1/CDR2); H3	D3; H3 ^b	0
2.3	A3 (1/CDR2); A4 ^b (1/CDR3)	A3 ^a	1
3.1	B4; E3 (stop/FR1) G3 (1/CDR3)	B4 ^b , E3 ^b G3 ^b (2/FR1; 1/FR2)	0
3.2	A1 y G1 (stop/CDR2)		
4		D2 ^a	1
5	A2	A2 ^b	0
6		F3 ^b	0
7		C1 ^b (sec. incompleta)	0

^a clones de anticuerpo reactivos sólo con L-SIGN
^b clones de anticuerpo reactivos tanto con L- como con DO-SIGN
^c 2.1...2.3 indica cadenas ligeras similares, pero cadenas pesadas únicas

Las reactividades (valores de DO) de los clones seleccionados para la secuenciación con L-SIGN y DC-SIGN se exponen a continuación en la Tabla 2.

5 TABLA 2

Biblioteca IgG1k			Biblioteca IgG1k	Biblioteca IgG2ak			Biblioteca IgG2ak
Nº pocillo de sec.	Profundidad pocillo	DO 405	clones para purificar	Nº pocillo de sec.	Profundidad pocillo	DO 405	clones para purificar
A1	A5	3	A5	A3	E11	2.2	E11
B1	C5	3.2		B3	F11	2	
C1	B6*	1.4		C3	F12	2	F12
D1	E6	3.2		D3	A3*	2	
E1	D7	3,1		E3	D5*	2,9	
F1	G9	3.1		F3	C6*	2.3	
G1	H9	2,6		G3	D7*	2,9	D7
H1	C10	3,1		H3	E10*	2,2	
A2	C11*	1,4		A4	A11*	2,2	
B2	H11	3,5	H11	B4	B12*	2,6	
C2	B12	1,8					
D2	C12	3,1	C12				

* = clones seleccionados para la secuenciación con L- SIGN y DOC-SIGN

10 Como se indica en la Figura 8, se encontró que las regiones CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos que se unían al DC-SIGNR humano tenían una de las siguientes secuencias de aminoácidos: LGGL (Id. de Sec. Nº: 56); EFTTKAMD (Id. de Sec. Nº: 57); GLFYGYAWFN (Id. de Sec. Nº: 58). Como se expone en la Figura 9, se encontró que las regiones CDR3 de la cadena ligera de los anticuerpos que se unían al DC-SIGNR humano tenían una de las siguientes secuencias de aminoácidos: QQYSSYPLT (Id. de Sec. Nº: 59); QQSNEDPRT (Id. de Sec. Nº: 60); QQNNEDPYT (Id. de Sec. Nº: 61); LQNNEDPYT (Id. de Sec. Nº: 62).

15 Ejemplo 10

15 De otros clones del anterior Ejemplo 7 se examinó su capacidad de unirse a L-SIGN utilizando los procedimientos descritos anteriormente en el Ejemplo 7. La secuenciación se realizó mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Las secuencias de estos clones adicionales se muestran en la Figura 10 (grupo de Id. Nº: 63-82).
 20 Como se indica en la Figura 10, se encontró que cinco regiones adicionales CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos que se unen a DC-SIGNR humano tienen una de las siguientes secuencias de aminoácidos: PSDNSYAWFA (Id. de Sec. Nº: 83); QATTTAFD (Id. de Sec. Nº: 84); TATALSTMD (Id. de Sec. Nº: 85); NDYYWGFG (Id. de Sec. Nº: 86); TATALYTMD (Id. de Sec. Nº: 87); y EFTTKALD (Id. de Sec. Nº: 88). Se encontró que las regiones CDR2 de estos clones que se unían a DC-SIGNR humano tenían una de las siguientes secuencias de aminoácidos: MIDPSNSEARLNQRFKD (Id. de Sec. Nº: 89); TISSGGSFTFYPSVKG (Id. de Sec. Nº: 90); NIDPYYGGTSYNQKFKG (Id. de Sec. Nº: 91); VIWRGGNTDYNAAFMS (Id. de Sec. Nº: 92); NFDPPYYGVITYNQKFKG (Id. de Sec. Nº: 93); NIDPYYGGSSYNQKFKG (Id. de Sec. Nº: 94) y TISSGGSFTYYPDNVKG (Id. de Sec. Nº: 95).

30 La Tabla 3 muestra los clones adicionales del anticuerpo IgG1k seleccionados en función de su reactividad con las células que expresaban L-SIGN.

TABLA 3

Grupos de anticuerpo	Cadena ligera	Cadena pesada	Clones únicos
1	A10, H10	A10, B10, B5, D12, E9, F12, G10, H10	A10, H10
2	D8, F10	D8, E4, E7, F10	D8, F10
3	E12 H6,	E12, H6	E12, H6
4	B7, C7	B7, C7	B7, C7
5	C8	C8	C8 (stop/CL)
6	D10	D10	D10
7	E10	E10	E10
8	G3	G3	G3 (stop/CL)
9	B5	-	B5 (stop/CL)
10	B10	-	B10
11	D12	-	D12
12	E4	-	E4
13	E7	-	E7
14	E9	-	E9
15	F12	-	F12
16	G10	-	G10

- 5 La Tabla 4 muestra la reactividad de los clones adicionales del anticuerpo IgG1k con células que expresaban L-SIGN (media geométrica de la fluorescencia) y proteínas recombinantes L-SIGN y DC-SIGN (valores de DO).

TABLA 4

IgG1k	Media geométrica de fluorescencia	Media geométrica de fluorescencia	DO405	DO405
Nombre del clon	K562	K562 / L-SIGN	L-SIGN	DC-SIGN
A10	3,4	21,3	2,9	0,1
B5	1,5	10,5	2,1	0,1
B7	2,2	90,9	2,7	0,1
B10	2,0	53,1	3,5	0,1
C7	2,0	101,0	3,5	0,1
C8	1,7	13,4	0,1	0,1
D8	1,8	17,3	2,1	0,1
D10	1,6	10,2	0,9	0,5
D12	2,0	152,0	3,5	0,1
E4	1,9	50,4	3,5	0,1
E7	1,8	19,3	1,4	0,1
E9	1,9	25,5	2,9	0,1
E10	1,7	27,2	2,6	0,6
E12	3,0	22,9	2,9	0,1
F10	2,4	13,8	0,8	0,1
F12	2,8	168,7	3,5	0,1
G1	2,1	14,1	2,0	0,1
G3	1,6	41,5	0,4	0,1
G10	2,0	86,1	2,0	0,1
H6	2,4	26,2	3,5	0,1
H10	3,4	12,3	2,7	0,1

- 10 Como se indica en la Figura 11, se identificaron clones adicionales que se unían a DC-SIGN humano (Id. de Sec. N°: 96-115). Se encontró que estos clones tenían regiones CDR3 de la cadena ligera de IgG1k con una de las siguientes secuencias de aminoácidos: QYHRSPQT (Id. de Sec. N°: 116); CQQFTSSPS (Id. de Sec. N°: 117); QQYSGYPLT (Id. de Sec. N°: 118); QQYSGYPGT (Id. de Sec. N°: 119). HQYHRSPPMT (Id. de Sec. N°: 120); QQRSSYPFT (Id. de Sec. N°: 121); QQYSYPFT (Id. de Sec. N°: 122); QQNNEDPPT (Id. de Sec. N°: 123); QQYSGYSLT (Id. de Sec. N°: 124); QQYSGYPLMLT (Id. de Sec. N°: 125); QQYGGYPLT (Id. de Sec. N°: 126);
- 15 QQNEDPIT (Id. de Sec. N°: 127); QQYSGSPLT (Id. de Sec. N°: 128). Se encontró que regiones CDR2 de estos clones que se unían a DC-SIGN humano tenían una de las siguientes secuencias de aminoácidos: STSNLASG (Id. de Sec. N°: 129); LASNESLG (Id. de Sec. N°: 130); STSNQAPG (Id. de Sec. N°: 131); WASTRTHG (Id. de Sec. N°: 132).
- 20 La Tabla 5 muestra clones adicionales del anticuerpo IgG2ak seleccionados en función de su reactividad con las células que expresaban L-SIGN.

TABLA 5

Grupos de anticuerpo	Cadena ligera	Cadena pesada	Clones únicos
1	A12*, B11, C12*, C6, E12, E8*, F10*, H7*	A12, C10, C12, H7	A12, C12, H7
2	F6*, F12*	F12, F6,	F12, F6
3	C10, G10, G5	A3, F10, G5	A3
4	A4, B9	A4, C7, D12	A4
5	A3	A5, D8	C7
6	A5	C5*	D12
7	C7	C6	F10
8	D8	B9	G5
9	D12	E12	C5*
10	H6	H6	H6
11	-	G10	B9
12	-	B11	E12
13	-	E8	G10
14			B11
15			E8
16			C6
17			A5
18			D8
19			C10

* Estas secuencias contienen un codón de parada

La Tabla 6 muestra la reactividad de los clones adicionales del anticuerpo IgG2ak con células que expresaban L-SIGN (media geométrica de la fluorescencia) y proteínas recombinantes L-SIGN y DC-SIGN (valores de DO).

5

TABLA 6

IgG2ak	Media geométrica de fluorescencia	Media geométrica de fluorescencia	DO405	DO405
Nombre del clon	K562	K562 / L-SIGN	L-SIGN	DC-SIGN
A3	2,8	15,4	3,5	1,0
A4	2,8	12,1	3,5	0,1
A5	1,8	59,8	3,5	0,1
A12	2,3	23,4	3,5	0,8
B9	3,5	31,4	3,5	0,1
B11	3,4	14,2	3,5	0,6
C5	3,3	13,9	3,5	0,6
C6	2,6	13,2	3,5	0,6
C7	2,5	21,2	3,5	0,1
C10	2,8	25,8	3,5	0,7
C12	2,9	23,3	3,5	1,0
D8	3,2	17,3	3,5	0,1
D12	2,3	41,0	3,5	0,1
E8	2,9	11,2	3,5	0,4
E12	3,5	19,4	3,5	0,7
F6	2,7	13,8	3,5	0,6
F10	2,6	18,3	3,5	1,0
F12	2,0	9,5	3,5	0,5
G5	3,1	10,7	3,5	0,4
G10	2,6	21,5	3,5	0,7
H6	3,2	12,7	3,5	0,6
H7	2,1	11,5	3,5	1,0

Como se indica en la Figura 12, se identificaron clones adicionales de cadena pesada que se unían a DC-SIGN humano (Id. de Sec. Nº: 133-154). Se encontró que estos clones tenían regiones CDR3 de la cadena pesada de IgG2ak con una de las siguientes secuencias de aminoácidos: TREFTTKALD (Id. de Sec. Nº: 155); T RETTFKAMD (Id. de Sec. Nº: 156); ARTATALYTMD (Id. de Sec. Nº: 157); LRTLPCI (Id. de Sec. Nº: 158); SRETTFKAMD (Id. de Sec. Nº: 159); ARQLXXYFXMD (Id. de Sec. Nº: 160). Se encontró que las regiones CDR2 de estos clones que se unían a DC-SIGN humano tenían una de las siguientes secuencias de aminoácidos: TISSGGSFTYYPDVKKG (Id. de Sec. Nº: 161); NIDPYYDSISYNQKFKG (Id. de Sec. Nº: 162), NFDPPYGVITYNQKFKG (Id. de Sec. Nº: 163); TISSGGSYTYYPDVKKG (Id. de Sec. Nº: 164); XXFTDWFYXT (Id. de Sec. Nº: 165). NFDPPYGVISYNQKFKG (Id. de Sec. Nº: 166); TISSGGGFTYYPDVKKG (Id. de Sec. Nº: 167); XIYPGTDNTYYNEXFKG (Id. de Sec. Nº: 168).

10

15

Como se indica en la Figura 13, se identificaron clones adicionales de cadena ligera que se unían a DC-SIGNR humano (Id. de Sec. N°: 169-189). Se encontró que estos clones tenían regiones CDR3 de la cadena ligera de IgG2ak con una de las siguientes secuencias de aminoácidos: QQNNEDPYT (Id. de Sec. N°: 190); SGYPLTFGS (Id. de Sec. N°: 191); HRSPPMTEFG (Id. de Sec. N°: 192); QQNNEDPFT (Id. de Sec. N°: 193); YSGYPLTFG (Id. de Sec. N°: 194); NTLPLTFG (Id. de Sec. N°: 195); QQSKEVPWT (Id. de Sec. N°: 196); LQNNEDPYTF (Id. de Sec. N°: 197). Se encontró que las regiones CDR2 de estos clones que se unían a DC-SIGNR humano tenían una de las siguientes secuencias de aminoácidos: LASNLES (Id. de Sec. N°: 198); LASNLEF (Id. de Sec. N°: 199); NLAGSVP (Id. de Sec. N°: 200); NLAGSV (Id. de Sec. N°: 201); AASNQGS (Id. de Sec. N°: 202).

- Aspod C, Thivolet C (2002) Nasal administration of CTB-insulin induces active tolerance against autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol* 130:
- Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell L, Gibbs KA, Shah SC, Bu DF, Erlander MG, Tobin AJ, Maclaren NK (1992) Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet* 339: 458-459.
- Atkinson MA, Leiter EH (1999) The NOD mouse model of type I diabetes: As good as it gets? *Nat Med* 6: 601-604.
- Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R (1990) Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes* 39: 956-960.
- Bach JF (2001) Immunotherapy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Curr Opin Immunol* 13: 601-605.
- Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Lolimena M, Cascalho F, Folli F, Richter-Oelsen H, Decamilli P (1990) Identification of the 64 K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151 -156.
- Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkouf HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A (2002) In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1) and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195: 603-616.
- Bashirova AA, Geijtenbeek TBH, van Duijnhoven GCF et al (2001) A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 193: 671-678.
- Bellmann K, Kolb H, Rastegar S, Jee P, Scott FW (1998) Potential risk of oral insulin with adjuvant for the prevention of type I diabetes: a protocol effective in NOD mice may exacerbate disease in BB rats. *Diabetologia* 41: 844-847.
- Bercovici N, Heurtier A, Vizier C, Pardigon N, Cambouris C, Desreumaux P, Liblau R (2000) Systemic administration of agonist peptide blocks the progression of spontaneous CD8-mediated autoimmune diabetes in transgenic mice without bystander damage. *J Immunol* 165:202-210.
- Blana E, Carbone FR, Allison H, Miller JF, Heath WR (1996) Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen. *Science* 274: 1707-1709.
- Boitard C, Yasunami R, Dardenne M, Bach JF (1989) T cell mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med* 169: 1669-1680.
- Calne R (1969) Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223:427-476.
- Cameron MJ, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S, Delovitch TL (1997) IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J Immunol* 159: 4686-4692.
- Chaillous L, Lefevre H, Thivolet C, Boitard C, Lahlou N, Atlan Gepner C, Bouhanick B, Mognet A, Nicolino M, Carel J, Lecomte P, Marechaud R, Bougneres P, Charbonnel B, Sai P (2000) Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomized controlled trial. *Lancet* 356: 545-549.
- Chatenoud L, Primo J, Bach JF (1997) CD3 antibody-induced self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol* 158:2947-2954.
- Chatenoud L, Thervet E, Promo J, Bach JF (1994) Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3434-3438.
- Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D (1995) Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur. J Immunol* 25: 1056-1062.
- Dhodapkar MV, Steinman RM (2001) Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193:233-238.
- Dhodapkar MV, Steinman RM (2002) Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 100:174-177.
- Diabetes Prevention Trial-Type 1 (DPT) Study Group (2002): Effects of parental insulin in relatives at high risk of type 1 diabetes mellitus. *N Eng J Med* 346: 1685-1691.
- Elias D, Cohen IR (1994) Peptide therapy for diabetes in NOD mice. *Lancet* 343: 704-706.
- Elias D, Meilin A, Ablamuntis V, Birk OS, Carmi P, Konen-Waisman S, Cohen IR (1997) Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and down regulates autoimmunity to various beta cell antigens. *Diabetes* 46: 758-764.
- Elias D, Reshef T, Birk OS, Van der Zee R, Walker MD, Cohen IR (1991) Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T cell epitope of the human 65 kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3088-3091.
- Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ et al (2002) The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 168: 21 18-2126.

- Feutren G, Papoz L, Assan R et al (1988) Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicenter double-blind trial. *Lancet* ii:119-124.
- Geijtenbeek TBH, Groot PC, Nolte MA, van Vliet SJ, Gangaram-Panday ST, van Duijnhoven GCF, Kraal G, van Oosterhout AJM, van Kooyk Y (2002) Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood* 100: 2908-2916.
- 5 • ²Geijtenbeek TBH, Krooshoop DJEB, Bleijs DA et al (2000) DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 1: 252-257.
- ³Geijtenbeek TBH, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG (2000) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific CAMPS receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100: 575-585.
- 10 • Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC (2001) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194:769-779.
- Heath WR, Carbone FR (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19: 47-64.
- 15 • Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, Gitelman SE, Harlan D, Xu D, Zivin RA, Bluestone JA (2002) Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type I diabetes mellitus. *N Eng J Med* 346: 1692-1698.
- Homann D, Holz A, Bot A, Coon B, Wolfe T, Petersen J, Dyrberg TP, Grusby MJ, von Herrath MG (1 999) Autoreactive CD4+ T cells protect from autoimmune diabetes via bystander suppression using the IL-4/Stat6 pathway. *Immunity* 11: 463-472.
- 20 • Honeyman MC, Cram DS, Harrison LC (1993) Glutamic acid decarboxylase 67-reactive T cells: a marker of insulin-independent diabetes. *J. Exp. Med.* 177:335-340.
- Huges S, Mougneau E Ferlin W, Jeske D, Hofman P, Homann D, Beaudoin L, Schrike C, von Herrath M, Lehuen A et al (2002) Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells. *Immunity* 16:169-181.
- 25 • Hurlbert MS, Stallard JF, Furlanetto RW (2001) Symposium summary, Experimental Biology. *J Investig Med* 49:554-558.
- Hutchings PR, Cooke A (1 990) The transfer of autoimmune diabetes in NOD mice can be inhibited or accelerated by distinct cell populations present in normal splenocytes taken from young males. *J Autoimmun* 3: 175-1 85.
- 30 • Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH (2000) Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4 T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192: 121 3-1222.
- Kamei T, Callery MP, Flye MW (1990) Pretransplant portal venous administration of donor antigen and portal venous allograft drainage synergistically prolong rat cardiac allograft survival. *Surgery* 108: 41 5-421.
- 35 • Kaufman DL, Claire-Salzier M, Tian J, Forsthuber T, Ting GSP, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV (1993) Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366:69-72.
- Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzer M., Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ (1992) Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 89:283-292.
- 40 • King C, Mueller HR, Malo CM, Murali-Krishna K, Ahmed R, King E, Sarvetnick N (2002) Interleukin-4 acts at the locus of the antigen-presenting dendritic cell to counter-regulate cytotoxic CD8+ T cell responses. *Nat Med* 7:206-214.
- Klugewitz K, Blumenthal-Barby F, Schrage A, Knolle PA, Hamann A, Crispe IN (2002) Intramodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4+ cells and suppression of IFN- γ producing cells after intravenous protein immunization. *J Immunol* 169: 2407-241 3.
- 45 • ¹Knolle P, Gerken G (2000) Local regulation of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 174: 21-34.
- ²Knolle PA, Germann T, Treichel U, Uhrig A, Schmitt E, Hegenbarth S, Lohse AW, Gerken G (1999) Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 162: 1401 -1407.
- 50 • ³Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, Gerken G, Lohse AW (1999) Induction of cytokine production in naive CD4 T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 1 16:1428-1 440.
- Knook DL, Sleyster ECH (1976) Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation. *Exp Cell Res* 99: 444-449.
- 55 • Kretz-Rommel A, Boelsterli UA (1995) Cytotoxic activity of T cells and non-T cells from diclofenac-immunized mice against cultured syngeneic hepatocytes exposed to diclofenac. *Hepatology* 22: 21 3-222.
- Kretz-Rommel A, Rubin RL (1997) A metabolite of the lupus-inducing drug procainamide prevents anergy induction in T cell clones. *J Immunol* 158: 4465-4470.
- Kurts C, Sutherland RM, Davey G, Li M, Lew AM, Blanas E, Carbone FR, Miller JFAP, Heath WR (1999) CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12703-12707.
- 60 • Lafaille MACD and Lafaille JJ (2002) CD4+ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol* 14:771-778.
- Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA (2000) Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6: 1348-1354.
- 65

- Lohman T, Leslie RGD, Londei M (1996) T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun* 9: 385-389.
- Lohse AW, Knolle PA, Bilo K, Uhrig A, Waldmann C, Ibe M, Schmitt E, Gerken G, Meyer Zum Buschenfelde KH (1996) Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* 110: 1 175-1 181.
- Ma SW, Zhao DL, Yin ZQ, Mukherjee R, Singh B, Qin HY, Stiller CR, Jevnikar AM (1997) Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nat Med* 3: 793-796.
- Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM (2000) The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151: 673-685.
- Miyazaki A et al (1985) Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese (NOD) mice: a longitudinal study. *Clin Exp Immunol* 60:622-630.
- Notkins AL, Lernmark A (2001) Autoimmune type I diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 108: 1247-1252.
- O'Reilly LA, Hutchings PR, Crocker PR, Simpson E, Lund T, Kiousses D, Takei F, Baird J, Cooke A (1991) Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression. *Eur J Immunol* 21:1171-1180.
- Pakkala SV, Kurrer MO, Katz JD (1997) T helper 2 (Th2) cells induce acute pancreatitis and diabetes in immunocompromised nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 186:299-306.
- Park CG, Takahara K, Umemoto E et al (2001) Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int Immunol* 13: 1283-1290.
- Parving HH, Tarnow L, Nielsen F, Rossing P, Mandrup-Poulsen T, Osterby R, Nerup J (1999) Cyclosporine nephrotoxicity in type 1 diabetic patients. A 7-year follow-up study. *Diabetes Care* 22: 478-483.
- Pohlmann S, Soilleux EJ, Baribaud F et al(2001) DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2670-2675.
- Poul MA, Becerril B, Nielsen UB, Morisson P, Marks JD (2000) Selection of tumor specific internalizing human antibodies from phage libraries. *J Mol Biol* 301: 1149-1161.
- Pozzilli P, Pitocco D, Visalli N, Cavall MG, Buzzetti R, Crino A, Spera S, Suraci C, Multari G, Cervoni M (2000) No effect of oral insulin on residual beta-cell function in recent-onset type I diabetes (the IMDIAB VII). *Diabetologia* 43: 1000-1004.
- Pugliese A, Brown D, Garza D, Murchison D, Zeller M, Redondo M, Diez J, Eisenbarth GS, Patel DD, Ricordi C (2001) Self-antigen presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs. *J Clin Invest* 107: 555- 564.
- Quinn A, McInerney MF, Sercarz EE (2001) MHC Class I-restricted determinants on the glutamic acid decarboxylase 65 molecule induce spontaneous CTL activity. *J Immunol* 167: 1748 1757.
- Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR (2001) P-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep 277): a randomized, double-blind phase II trial. *Lancet* 358: 1749-1 753.
- Reijonen H, Novak EJ, Kochik S, Henninger A, Liu AW, Kwok WW, Nepom GT (2002) Detection of GAD65-specific T cells by major histocompatibility complex class II tetramers in type I diabetic patients and at-risk subjects. *Diabetes* 51: 1375-1382.
- Roep BO, Arden SD, de Vries RRP, Hutton JC (1990) T cell clones from a type-I diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins. *Nature* 345:632-634.
- Rohane PW, Shimada A, Kim DT, Edwards CT, Charlton B, Shultz LD, Fathman CG (1995) Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice. *Diabetes* 44: 550-554.
- Roncarolo MG, Levings MK, Traversi C (2001) Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med* 193:F5-F9.
- Rubinstein D, Roska AK, Lipsky PE (1986) Liver sinusoidal lining cells express class II major histocompatibility antigens but are poor stimulators if fresh allogenic lymphocytes. *J Immunol* 137: 1803-3818.
- Sempe P, Richard MF, Bach JF, Boitard C (1994) Evidence of CD4+ regulatory T cells in the non-obese diabetic male mouse. *Diabetologica* 37:337-343.
- Skyler J, Rabinovitch A (1992) Effects of cyclosporine in recent onset type I diabetes mellitus. Effects on islet beta cell function. Miami Cyclosporine Diabetes Study Group. *J Diabetes* 6: 77- 88.
- Smith JA, Tang Q, Bluestone JA (1 998) Partial TCR signals delivered by Fc-R-nonbinding anti-CD3 monoclonal antibodies differentially regulate individual Th subsets. *J Immunol* 160:4841-4849.
- Smith JA, Tso JY, Clark MR, Cole MS, Bluestone JA (1997) Nonmitogenic anti-CD3 antibodies deliver a partial T cell receptor signal and induce clonal anergy. *J Exp Med* 185: 1413-1422.
- Soilleux EJ, Batten R, Trowsdale J (2000) Cutting Edge: DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19~13. *J Immunol* 165: 2937-2942.
- Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188: 287-296.
- Thornton AM, Shevach EM (2000) Suppressor function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164: 183-1 90.
- Tian JD, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Middleton B, Newman D, Mueller R, Arita S, Evans C, Atkinson MA,

- Mullen Y, Sarvetnick N, Tobin AJ, Lehmann PV, Kaufman DL (1996) Modulating autoimmune responses to GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nat Med* 2: 1348-1353.
- 5 • Tian J, Atkinson MA, Clare-Salzer M, Herschenfeld A, Forsthuber T, Lehmann PV, Kaufman DL (1996) Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulindependent diabetes. *J Exp Med* 183: 1561-1567.
- Tisch R., Yang XD, Singer SM, Liblau R, Fugger L, McDevitt H (1993) Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366: 72-75
- 10 • Tisch R, Wang B, Atkinson MA, Serreze DV, Friedline R (2001) A glutamic acid decarboxylase 65-specific Th2 cell clone immunoregulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 166: 6925-2936.
- Tisch R, Wang B, Serreze DV (1999) Induction of glutamic acid decarboxylase 65-specific Th2 cells and suppression of autoimmune diabetes at late stages of disease is epitope dependent. *J Immunol* 163: 1178-1187.
- Wakkach A, Cottrez F, Groux H (2001) Differentiation of regulatory T cells is induced by CD2 co-stimulation. *J Immunol* 167:3107-3113.
- 15 • Weiner HL (2001) Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta secreting regulatory T cells. *Microbes Infect* 3: 947-954.
- Wen L, Wong FS, Burkly L, Altieri M, Mamalaki C, Kioussis D, Flavell RA, Sherwin RS (1998) Induction of insulinitis by glutamic acid decarboxylase peptide-specific and CD4(+) T cells from human DQ transgenic mice. *J Clin Invest* 102: 947-957.
- 20 • Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA Jr (1996) CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med* 183: 67-76.
- Yagi H, Matsumoto M, Kunimoto K, Kawaguchi J, Makino S, Harada M (1992) Analysis of parts of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic mice. *Eur J Immunol* 22: 2387-2393.
- Yamigawa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA (2001) A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166: 7282-7289.
- 25 • Yang R, Liu Q, Grosfeld JL, Pescovitz MD (1994) Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J Pediatr Surg* 29: 1145-1148.
- Zechel MA, Elliott JF, Atkinson MA, Singh B (1998) Characterization of novel T-cell epitopes on 65 kDa and 67 kDa glutamic acid decarboxylase relevant in autoimmune responses in NOD mice. *J Autoimmun* 11:83-95.
- 30 • Zekzer D, Wong SF, Ayalon O, Millet I, Altieri M, Shigeki S, Solimena M, Sherwin R (1998) GAD-reactive CD4+Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *J Clin. Invest* 101:68-73.
- Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL (1991) Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10252-10256.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de anticuerpo/péptido que comprende: (i) un anticuerpo que reconoce a L-SIGN y (ii) un péptido unido al anticuerpo, en el que el péptido es un autoantígeno, en el que el autoantígeno se selecciona de entre el grupo que consiste en la decarboxilasa del ácido glutámico (GAD), un epítipo de la GAD, insulina, un epítipo de la insulina, la proteína de choque térmico (HSP), un epítipo de la HSP y antígenos de las células β .
- 10 2. La construcción de anticuerpo/péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en la que i) el L-SIGN es un L-SIGN humano y ii) el péptido es un péptido humano.
- 15 3. Una composición que comprende una construcción de anticuerpo/péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y un transportador aceptable a nivel farmacéutico.
- 20 4. Un método para producir anticuerpos modificados mediante métodos recombinantes, cuyo método comprende la unión de un anticuerpo que reconoce a L-SIGN con un autoantígeno, en el que el autoantígeno se selecciona de entre el grupo que consiste en la decarboxilasa del ácido glutámico (GAD), un epítipo de la GAD, insulina, un epítipo de la insulina, la proteína de choque térmico (HSP), un epítipo de la HSP y antígenos de las células β .
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que i) el L-SIGN es un L-SIGN humano y ii) el péptido es un péptido humano.

Figura 1:

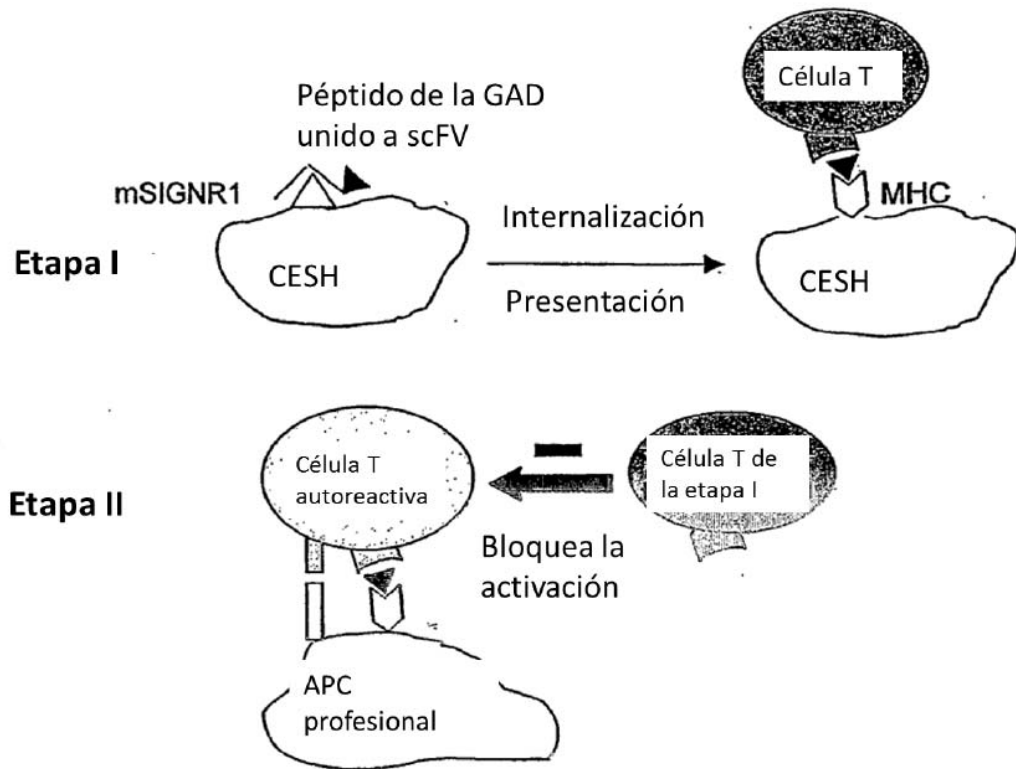


Figura 2A

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo de conejo scFv anti-mSIGNRI

ScFv	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2
MSIGNR1P4D2	EQLMESGDLVFKPGASLTLTCTAS	GFDVSGSYFISH	WVROAPGKGLEWIG	MIYNGDGSTWYPSW
MSIGNR1P4C3	QSVESGDDLKFKPGASLTLTCTAS	GFFSNYYIWI	WVROAPGKGLEWIG	WINTVSDGAYASWA
MSIGNR1P4B3	EQLMESGDLVFKPGASLTLTCTAS	GFDVSGSYFISH	WVROAPGKGLEWIG	MIYNGDGSTWYPSW
MSIGNR1P4B4	EQLMESGDLVFKPGASLTLTCTAS	GFDVSGSYFISH	WVROAPGKGLEWIG	MIYNGDGSTWYPSW
MSIGNR1P4B7	EQLMESGDLVFKPGASLTLTCTAS	GFDVSGSYFISH	WVROAPGKGLEWIG	MIYNGDGSTWYPSW
MSIGNR1P4B9	QSVESGDDLKFKPGASLTLTCTAS	GFDVSGSYFISH	WVROAPGKGLEWIG	MIYNGDGSTWYPSW
ScFv	Marco 3	CDR3	Fragmento 4	
MSIGNR1P4D2	NGRFSISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCAR	NLGL	WGPTPGHR	
MSIGNR1P4C3	KGRFTISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCIN	NGLL	WGPTLVTV	
MSIGNR1P4B3	NGRFSISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCAR	DLGL	WGPTLVTV	
MSIGNR1P4B4	NGRFSISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCAR	DLGL	WGPTLVTV	
MSIGNR1P4B7	NGRFSISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCAR	DLGL	WGPTLVTV	
MSIGNR1P4B9	NGRFSISKTSSTTVILQMTSLTAADTATYFCAR	DLGL	WGPTLVTV	

ALL (Vk1, VH3)

Figura 2B

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo de conejo scFV anti-mSIGNR1

ScFV	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2
MSIGNR1P4D2	AVGGTVTIKC	QSSQSIHNNNYLS	WYQQKPGQPPKLLIY	QASTLAS
MSIGNR1P4C3	PVGDVTITNC	QSSQNYNSN-YLS	WFQKFKPGQPPKLLIY	RASNLAS
MSIGNR1P4B3	AVGGTVTIKC	QSSQSI-NN-YLS	WYQQKPGQPPKLLIY	QASTLAS
MSIGNR1P4B4	AVGGTVTIKC	QSSQSIYNNYLS	WYQQKPGQPPKLLIY	QASTLAS
MSIGNR1P4B7	AVGGTVTIKC	QSSQSIHNNNYLS	WYQQKPGQPPKLLIY	QASTLAS
MSIGNR1P4B9	AVGGTVTIKC	QASQSIKX--YLA	WYQQKPGQPPKLLIY	SASKLAS

ScFV	Marco 3	CDR3	Fragmento 4
MSIGNR1P4D2	GVPSRFKSGSGGTQFTLTISDLECCDDAATYYC	AGGYDCSSAD	CFAFGGGTE
MSIGNR1P4C3	GVPPRFSGSGGTDTLTIGGVQAEADAATYYC	LGGYSYSTG	LTFGAGTIV
MSIGNR1P4B3	GVPSRFKSGSGGTQFTLTISDLECCDDAATYYC	AGGYDCSSAD	CFAFGGGTE
MSIGNR1P4B4	GVPSRFKSGSGGTQFTLTISDLECCDDAATYYC	AGGYDCSSAD	CFAFGGGTE
MSIGNR1P4B7	GVPSRFKSGSGGTQFTLTISDLECCDDAATYYC	AGGYDCSSAD	CFAFGGGTE
MSIGNR1P4B9	GVPSRFKSGSGGTQFTLTISGVQCCDDAATYYC	AGGYGGIFA	FGGGTELEI

Figura 3

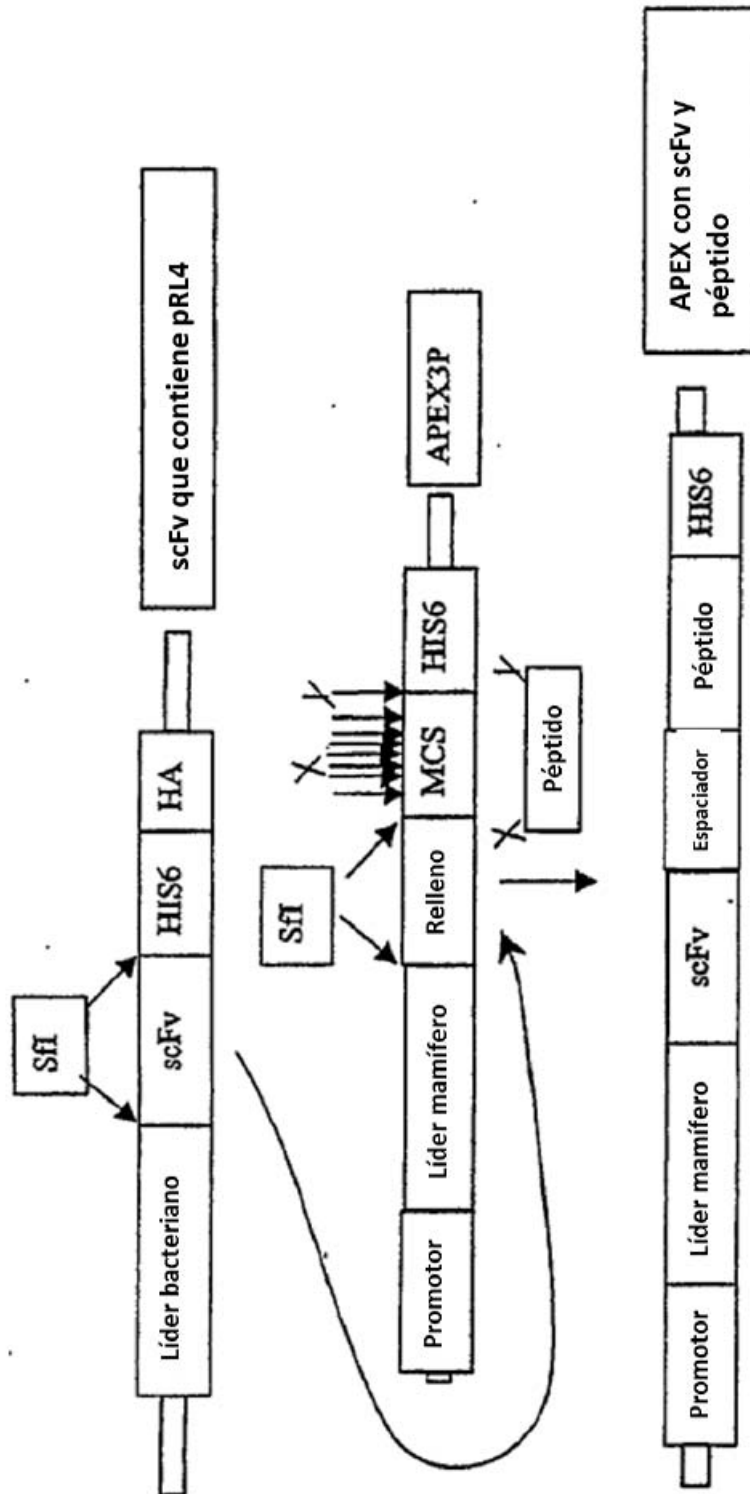


Figura 4

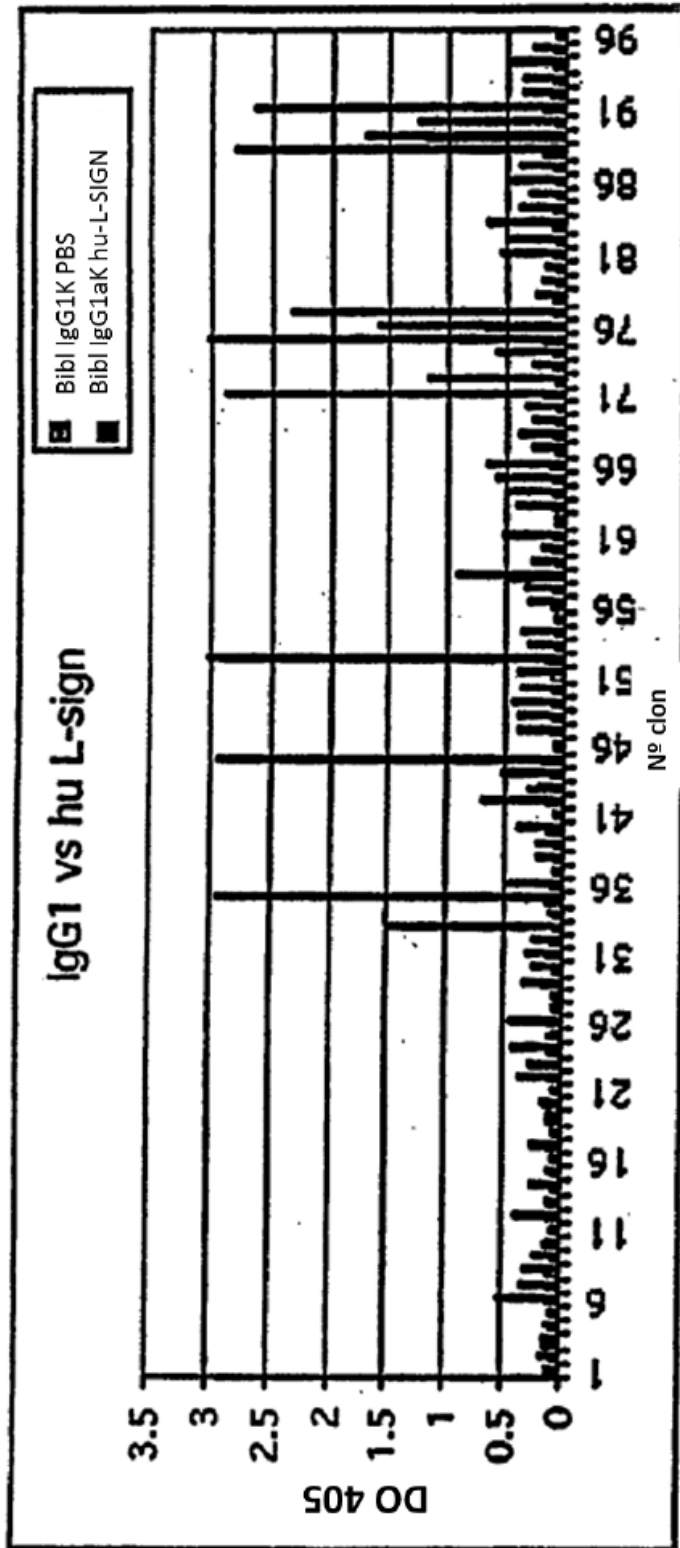


Figura 5

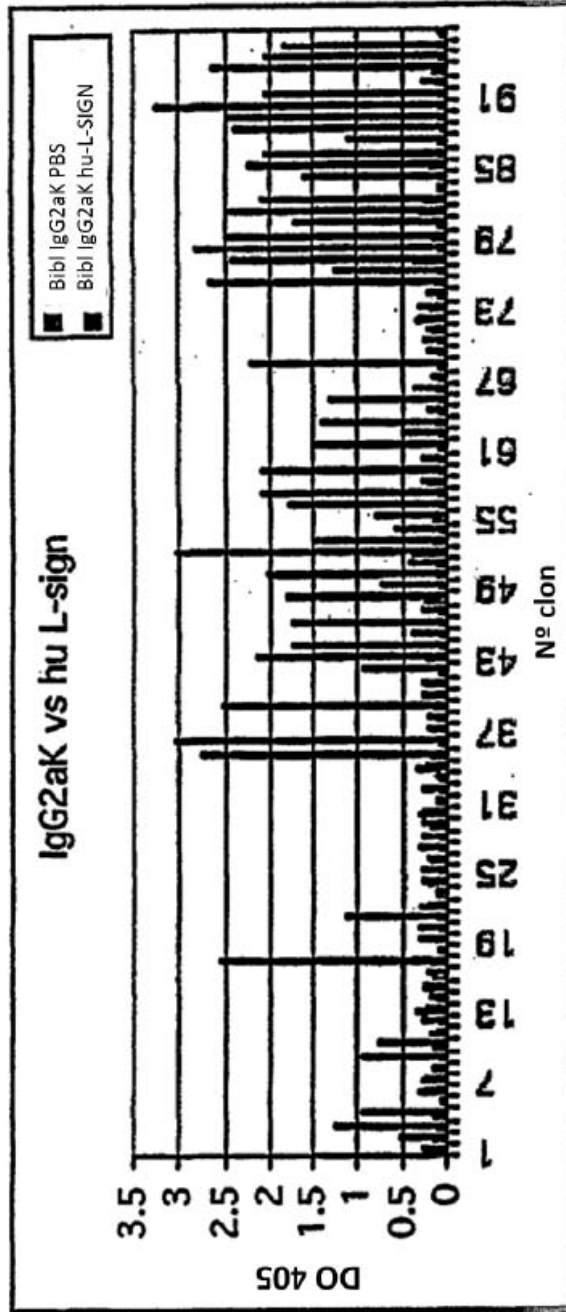


Figura 6

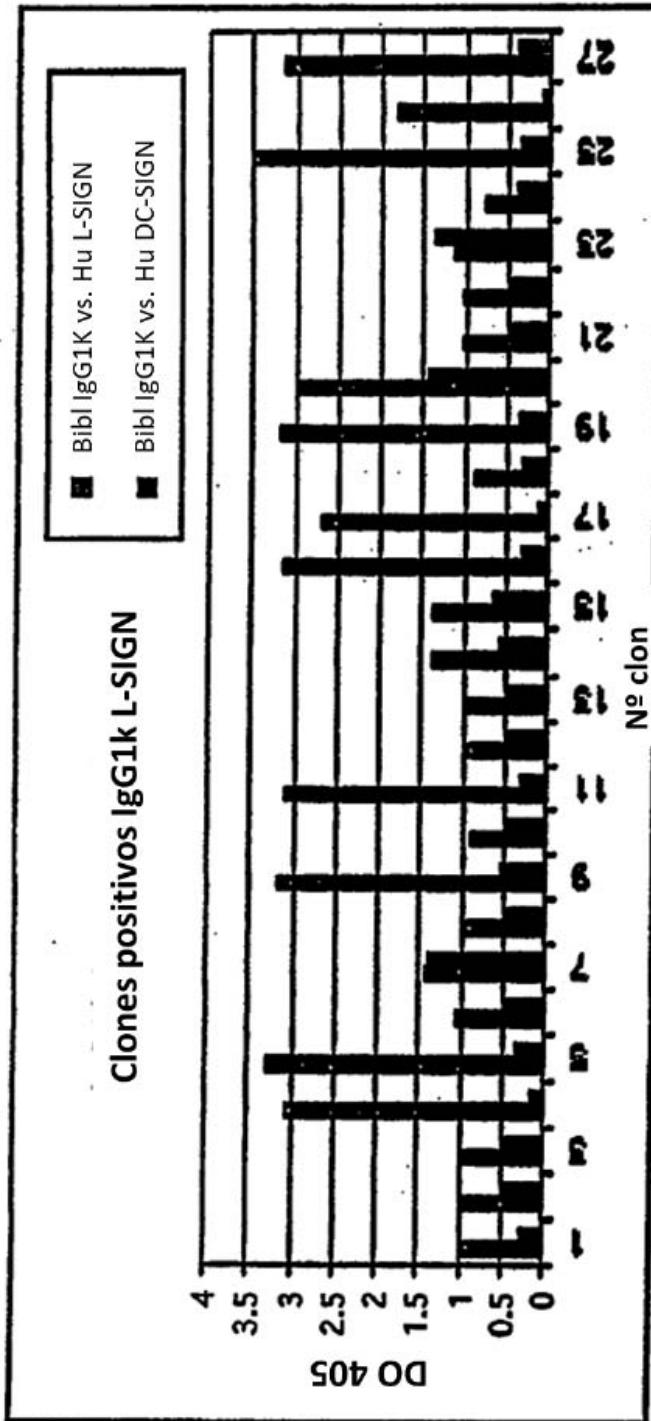


Figura 7

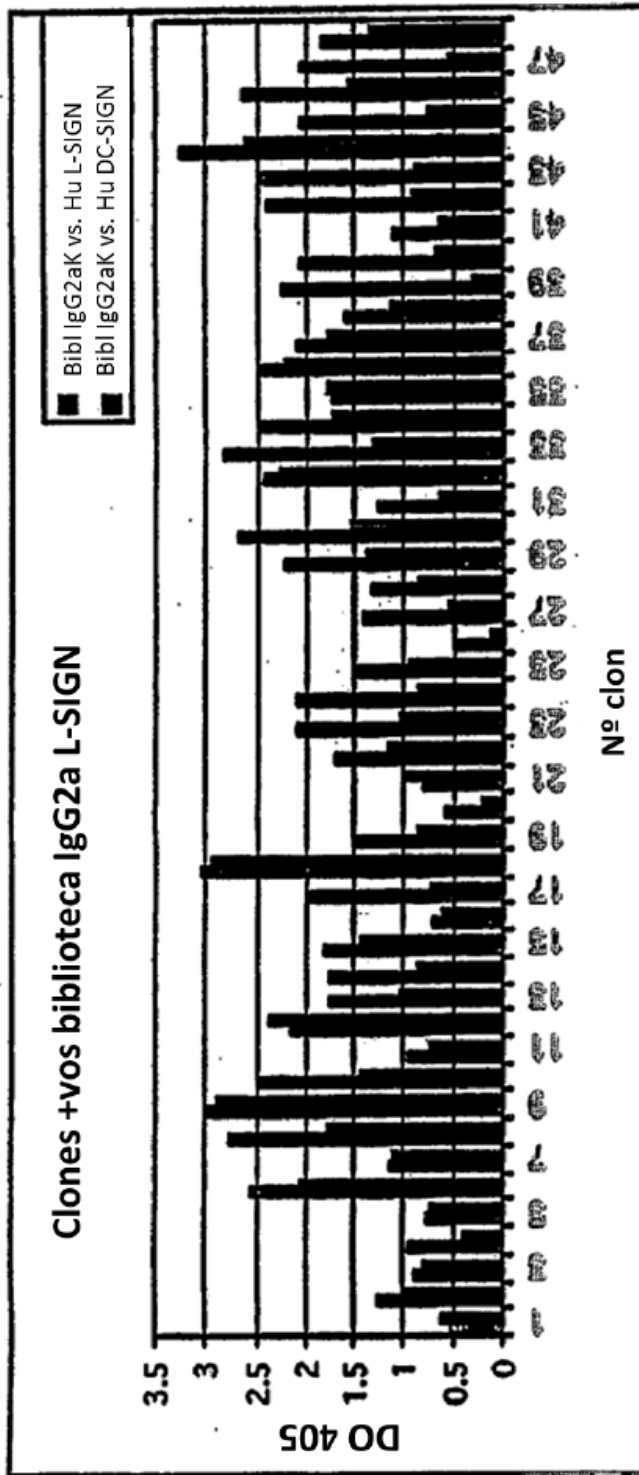


Figura 8A

Clones de la cadena pesada de L-SIGN humano

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR **Mayorit**

-----|-----|-----|-----|-----
 10 20 30 CDR1 40

1 EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR
A1PRN
 1 EVQLQQSGAELVLRPGASVTLSCKASGYTFIDYEMHWVKQT
A2PRN
 1 EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSFWMHWVKQR
A3PRN
 1 EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR
B1PRN
 1 EVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR
B2PRN
 1 EVKLVESGGGSVKPGGSLKLSCAASGFTFSSHYLMSWVRQT
B3PRN
 1 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYTHMSWVRQT
B4PRN
 1 EVXLOQSGXELVRTGASVKXSCKASXYSFTX-----
C1PRN
 1 EVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR
C2PRN
 1 EVKLVESGGGSVKPGGSLKLSCAASGFTFSSHYLMSWVRQT
C3PRN
 1 EVQLQQSGPKLVKPGASVKMSCKASGYTFTGYWIHWVKQR
D2PRN
 1 EVKLVESGGGSVKPGGSLKLSCAASGFTFSSHYLMSWVRQT
D3PRN
 1 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYTHMSWVRQT
E3PRN
 1 EVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR
F1PRN
 1 EVQLQQSGAELVLRPGASVKLSCKASGYTFTDYYIHWVKQR
G2PRN
 1 EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR
G1PRN
 1 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTHMSWVRQT
G3PRN
 1 EVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR
H1PRN
 1 EVKLVESGGGSVKPGGSLKLSCAASGFTFSSHYLMSWVRQT
H3PRN
 1 EVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR
D1PRN

PGHGLEWIGEISPGNGRRTNYNEKFKGKATLTVDKSSSTAY

Mayoritaria -----|-----|-----|-----|-----
 50 CDR2 60 70 80

41 PGHGLEWIGEISPTNGRRTNYNEKFKTKATLTVDKSSSTAY
A1PRN
 41 PVHGLEWIGTIDPETGGTAYNOKPKDKATLTADKSSSTAY
A2PRN
 41 PGQGLEWIGEINPSNGRRTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAY
A3PRN
 41 PGHGLEWIGEISPTNGRRTNYNEKFKTKATLTVDKSSSTAY
B1PRN
 41 PGHGLEWIGEISPTNGRRTNYNEKFKTKATLTVDKSSSTAY
B2PRN
 41 PEKRLEWVATISSGGGFTYYPDNVKGRFTISRDNKNTLY
B3PRN

5

Figura 8B

```

41 PEKRLEWVATISSGGNYTFYPDSVKGRFTISRDNAKNTLY
B4PRN
32 - - - - -DYI
C1PRN
41 FGHGLEWIGEISPTNGRTNYNEKFKTKATLTVDKSSSTAY
C2PRN
41 PEKRLEWVATISSGGGFYYYPDNVKG RFTISRDNAKNTLY
C3PRN
41 FGQGLEWIGMIDPSNSETXLNXXFKKATLNVDNSSHTAY
D2PRN
41 PEKRLEWVA FISSGGGSFTYYPDNVKG RFTISRDNAKNTLY
D3PRN
41 PEKRLEWVATISSGGNYTFYPDSVKGRFTISRDNAKNTLY
E3PRN
41 FGHGLEWIGEISPTNGRTNYNEKFKTKATLTVDKSSSTAY
F1PRN
41 TGQGLEWIGEIYPGTDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAY
F3PRN
41 FGHGLEWIGEISPTNGRTNYNEKFKTKATLTVDKSSSTAY
G1PRN
41 PEKRLEWVATISSGGNYTFYPDSVKGRFTISRDNVKNNTLY
G3PRN
41 FGHGLEWIGEISPTNGRTNYNEKFKTKATLTVDKSSSTAY
H1PRN
41 PEKRLEWVA FISSEGGSEFTYYPDNVKG RFTISRDNAKNTLY
H3PRN
41 FGHGLEWIGEISPTNGRTNYNEKFKTKATLTVDKSSSTAY
D1PRN

MQLSSLTSEDSAVYYCTR - - - - - LGGLNWGQGT LVT
-----
Majoritaria -----
-----
90 100 CDR3 110 120
-----
81 MQLSSLTSEDSAVYYCTR - - - - - LGGLNWGQGT LVT
A1PRN
01 MELRGLTSEDSAVYYCTR WYDYDSYVLYGMDYWGQGT SVT
A2PRN
01 MQLSSLTSEDSAVYYCARSTHIS - - - - - TGPPTWGQGT LVT
A3PRN
81 MQLSSLTSEDSAVYYCTR - - - - - LGGLNWGQGT LVT
B1PRN
81 MQLSSLTSEDSAVYYCTR - - - - - LGGLNWGQGT LVT
B2PRN
81 LQMSSLKSEDTAMYYCSR - - - - - EPTTKAMDYWGQGT SVT
B3PRN
81 LQMSSLKSEDTAMYYCTRGL - - - - - FYGYAWPNYWGQGT LVT
B4PRN
34
C1PRN
81 MQLSSLTSEDSAVYYCTR - - - - - LGGLNWGQGT LVT
C2PRN
81 LQMSSLKSEDTAMYYCSR - - - - - EPTTKAMDYWGQGT SVT
C3PRN
81 MHLSSLTSEDSAVYYCARXYGDX - - - - - YAXFX
D2PRN
81 LQMSSLKSEDTAMYYCTR - - - - - EPTTKAM YNGQGT SVT
D3PRN
81 LQMSSLKSEDTAMYYCTRGL - - - - - FYGYAWPNYWGQGT LVT
E3PRN
81 MQLSSLTSEDSAVYYCTR - - - - - LGGLNWGQGT LVT
F1PRN
81 MQLSSLTSEDSAVYFCARQLGHY - - - - - FAMDYWGQGT SVT
F3PRN
81 MQLSSLTSEDSAVYYCTR - - - - - LGGLNWGQGT LVT
G1PRN
81 LQMSSLKSEDTAMYYCTRGL - - - - - FYGYAWPNYWGQGT LVT
G3PRN

```


Figura 8C

```
81 MQLSSLTSEDSAVYYCTR-----LGGLNWGQGLVT  
H1PRN  
81 LQMSSLEKSEDTAMYYCTR-----EPTTKAMH YWGQGLSVT  
H3PRN  
81 MQLSSLTSEDSAVYYCTR-----LGGLNWGQGLGT  
D1PRN
```

Figura 9A

Clones de la cadena ligera de L-SIGN humano

D I V L T Q S P K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q S V G - - - - T A V A W Y Mayoritaria

	10	20	CDR1	30	40
1	D I V L T Q S P K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q S V G - - - - T A V A W Y				
A11C	1 D I V M T Q S H K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V G - - - - T A V A W Y				
A21Cprot	1 E N V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V - - - - S Y M Y W Y				
A31Cprot	1 D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G N S F M H W Y				
A41Cprot	1 D I A V T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G N S F M H W Y				
B11Cprot	1 D V V M T Q T Q K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q N V G - - - - T A V A W Y				
B21Cprot	1 D V V M T Q T Q K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q N V G - - - - T A V A W Y				
B31Cprot	1 D N V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G N S F M H W Y				
B41Cprot	1 D N V L T . S H K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V G - - - - T A V A W Y				
C21Cprot	1 D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S I T C . A S Q N V G - - - - T A V A W Y				
C31Cprot	1 D N V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G N S F M H W Y				
D11Cprot	1 D I V L T Q S Q K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q N V G - - - - T A V A W Y				
D21Cprot	1 D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G N S F M H W Y				
E31Cprot	1 D N V L T . S H K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V G - - - - T A V A W Y				
F11Cprot	1 D V A M T Q T Q K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q N V G - - - - T A V A W Y				
G11Cprot	1 D I V M T Q S H K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V G - - - - T A V A W Y				
G31Cprot	1 D V V M T Q T Q K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V G - - - - T A V A W Y				
H11Cprot	1 D V V M T Q T Q K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q N V G - - - - T A V A W Y				
H31Cprot	1 D I A L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D S Y G N S F M H W Y				

Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S N R E T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S

Mayoritaria -----

	50	CDR2	60	70	80
109	Q Q K P G Q S P K L L I Y [] A S T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S				
A11C	36 Q Q K P G S S P R L L I Y D T S N L A S G V P V R F S G S G S G T S Y S L T I S				
A21Cprot	41 Q Q K P G Q P P K L L I Y [] A S N L E S G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N				
A31Cprot	41 Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P A R F S G S G S R T D F T L T I D				
A41Cprot	37 Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S N R Y T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S				
B11Cprot	37 Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S N R Y T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S				
B21Cprot	41 Q . K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P A R F S G S G S R T D F T L T I D				
B31Cprot	37 Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S				
B41Cprot	37 Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S N R Y T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S				
C21Cprot	37 Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S N R Y T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S				

Figura 9B

41 Q . K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P A R F S G S G S R T D F T L T I D
 C3Lcprot
 37 Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S N R Y T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S
 D1Lcprot
 41 Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E E G V P A R F S G S G S R T D F T L T I D
 D3Lcprot
 37 Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S
 E3Lcprot
 37 Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S N R Y T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S
 F1Lcprot
 37 Q Q K P G Q S P K L L I Y A S T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S
 G1Lcprot
 37 Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S
 G3Lcprot
 37 Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S N R Y T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S
 H1Lcprot
 41 Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P A R F S G S G S R T D F T L T I D
 H3Lcprot

 N V Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R A - - - - -
 Mayoritaria -----
 ----- 90 cons3 100 110 120 -----
 229 N V Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R A D A R P T V S
 A1Lc
 76 R E E A E D A A T Y Y C Q Q W S S Y P P T F G G G T K L E I K R A
 A2Lcprot
 81 P V E A D D V A T Y Y C E Q S H E D P E T F G G G T K L E
 A3Lcprot
 81 P V E A D D A A T Y Y C Q Q N N E D P Y T F G G G T K L E
 A4Lcprot
 77 N M Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R A
 B1Lcprot
 77 N M Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R A
 E2Lcprot
 81 P V E A D D A A T Y Y C L Q N N E D P Y T F G G G T K L E
 E3Lcprot
 77 N V Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R A
 B4Lcprot
 77 N M Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R A
 C2Lcprot
 81 P V E A D D A A T Y Y C L Q N N E D P Y T F G G G T K L E
 C3Lcprot
 77 N M Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R A
 D1Lcprot
 81 P V E A D D A A T Y Y C Q Q N N E D P Y T F G G G T K L E
 D3Lcprot
 77 N V Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R A
 E3Lcprot
 77 N M Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R
 F1Lcprot
 77 N V Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R A
 G1Lcprot
 77 N V Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P Y T F G G G T K L E
 G3Lcprot
 77 N M Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E L K R A
 H1Lcprot
 82 P V E A D D A A T Y Y C E Q N N E D P Y T F G G G T K L E

Figura 10

Clones de la cadena pesada IgG1k reactivos con K562-LiGN

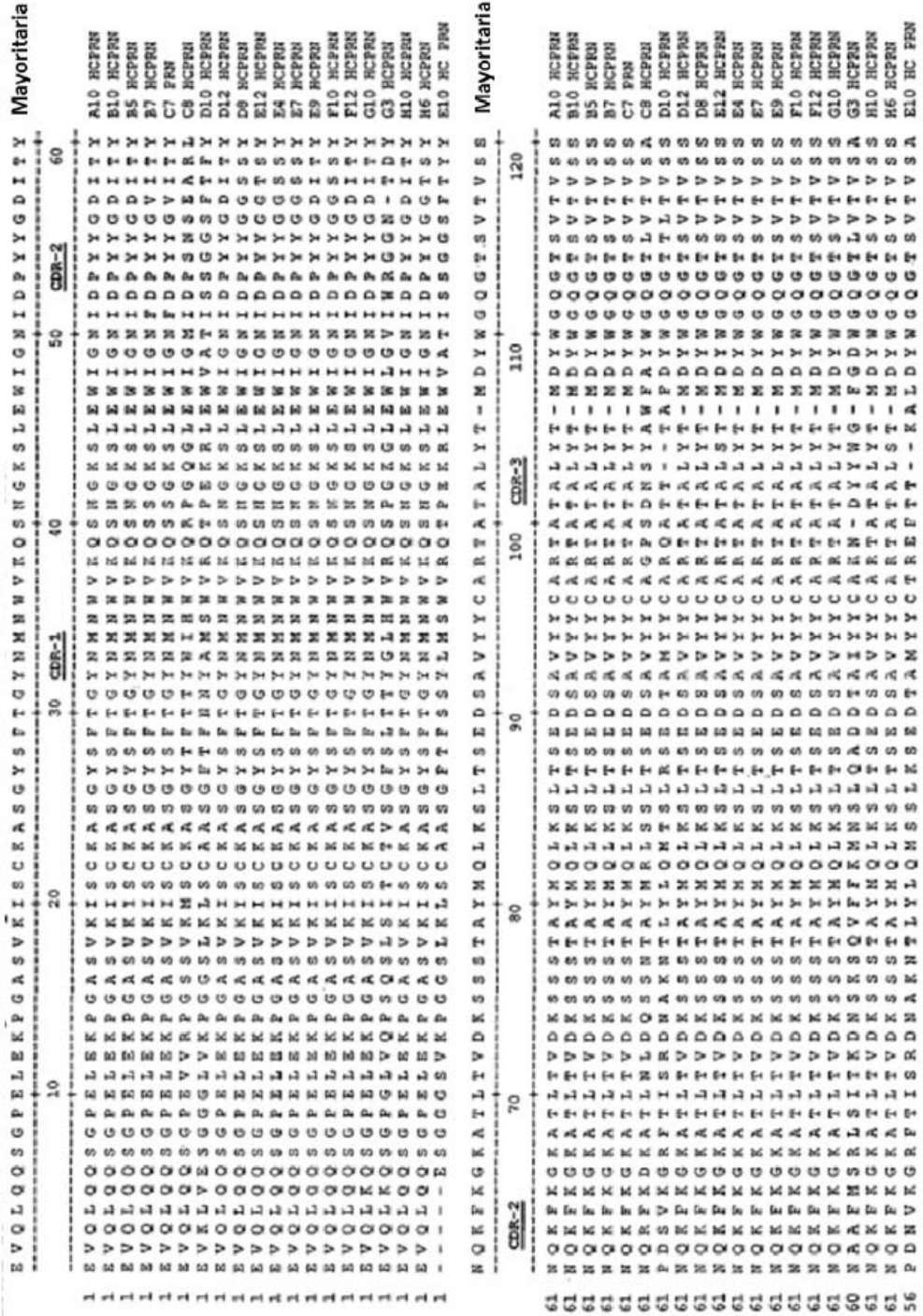


Figura 11

Clones de la cadena ligera IgG1k reactivos con K562-LSIGN

	10	20	30	40	50	60	
	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGASPKLWIYSTSNLA					Mayoritaria
			CDR-1		CDR-2		
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					A10 LCPFN
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					B10 LCPFN
1	- QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					B5 LCPFN
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					B7 LCPFN
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					C7 LCPFN
1	- QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--YHMHVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					C8 LCPFN
1	- DIVLTQSPAPLAVSLGQRATISCRASRVDSDYGM	SHHMYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					D10 LCPFN
1	- EIKLCSFSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					D12 LCPFN
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					D8 LCPFN
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					E10 FPN
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					E12 LCPFN
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					E4 LCPFN
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					E7 LCPFN
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					E9 LCPFN
1	- EIVLXQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					F10 LCPFN
1	- EKLCSRSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					F12 LCPFN
1	- EKLCSRSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					G10 LCPFN
1	- EMLCCXRLTHSCPHO	ETGFSITCKASQDVG					G3 LCPFN
1	- EIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					H10 LCPFN
1	- EIVLSSRSPAIMSASLGERVTMTCTCRASSSVSS	--SYLHMVYQQKPGSSPKLWIYSTSNLA					H6 LCPFN
							Mayoritaria
	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSVAEADAATYCCQYSGSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					
			CDR-3				
57	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					A10 LCPFN
57	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					B10 LCPFN
57	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					B5 LCPFN
57	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					B7 LCPFN
55	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					C7 LCPFN
60	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					C8 LCPFN
58	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					D10 LCPFN
57	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					D8 LCPFN
58	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					E10 FPN
58	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					E12 LCPFN
58	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					E4 LCPFN
49	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					E9 LCPFN
57	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					F10 LCPFN
58	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					F12 LCPFN
58	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					G10 LCPFN
57	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					G3 LCPFN
57	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					H10 LCPFN
58	SGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEEADAATYCHQYHRSP	--LTFGGGTEKLEIKRA					H6 LCPFN

Figura 12

Clones de la cadena pesada IgG2ak reactivos con K562-LSiGN

