

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 208**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2000 E 00914899 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 1165109**

54 Título: **Tratamiento de enfermedad autoinmune**

30 Prioridad:

10.03.1999 US 123738 P
08.03.2000 US 521064

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2016

73 Titular/es:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 FRUIT STREET
BOSTON, MA 02114, US

72 Inventor/es:

FAUSTMAN, DENISE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

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

ES 2 562 208 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

Tratamiento de enfermedad autoinmune

Antecedentes de la invención

5 La diabetes mellitus de comienzo temprano, o diabetes tipo I, es una enfermedad autoinmune grave, de la niñez, caracterizada por deficiencia de insulina que evita la regulación normal de los niveles de glucemia. La insulina es una hormona peptídica producida por las células β en los islotes de Langerhans del páncreas. La insulina promueve la utilización de glucosa, la síntesis de proteínas, la formación y almacenamiento de lípidos neutros, y es la fuente principal de energía para el cerebro y el tejido muscular. La diabetes tipo I está provocada por una reacción autoinmune que da como resultado la destrucción completa de las células β del páncreas, que elimina la producción de insulina y eventualmente da como resultado hiperglucemia y cetoacidosis.

10 La terapia de inyección de insulina ha sido útil para prevenir hiperglucemia y cetoacidosis graves, pero no normaliza completamente los niveles de glucemia. Aunque la terapia de inyección de insulina ha sido bastante exitosa, no evita el deterioro vascular prematuro que es actualmente la causa principal de morbilidad entre diabéticos. El deterioro vascular relacionado con la diabetes, que incluye tanto el deterioro microvascular como la aceleración de la aterosclerosis, puede provocar eventualmente insuficiencia renal, deterioro retiniano, angina de pecho, infarto de miocardio, neuropatía periférica, y aterosclerosis.

15 Un tratamiento prometedor para la diabetes, el trasplante de islotes, ha estado en ensayos clínicos humanos durante alrededor de diez años. Desafortunadamente, los resultados en los que la diabetes tipo I es la etiología subyacente son pobres. Ha habido muchos éxitos con el trasplante de los islotes en animales, pero solamente cuando los animales son diabéticos debido a tratamiento químico, en lugar de a la enfermedad natural. Los únicos estudios sustanciados evaluados por nuestros colegas que usan métodos no de barrera y no tóxicos y que muestran éxito con trasplantes de islotes en ratones naturalmente diabéticos usan (auto) islotes isogénicos. Los islotes isogénicos se transplantaron en ratones NOD ya diabéticos pretratados con TNF-alfa (factor α de necrosis tumoral); BCG (bacilo Calmette-Guérin, una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*); y CFA (adyuvante completo de Freund), que es un inductor de TNF-alfa (Rabinovitch et al., *J. Immunol.* (1997) 159(12):6298-303). Este enfoque no es clínicamente aplicable debido principalmente a que los islotes singénicos no están disponibles. En el marco del aoinjerto del trasplante de islotes, los injertos son rechazados presuntamente debido a autoinmunidad. Además, los tratamientos para los hospedantes diabéticos, tales como irradiación del cuerpo y trasplante de médula ósea, son demasiado tóxicos en pacientes con diabetes tipo I, haciendo más atractiva a la alternativa a corto plazo de la terapia con insulina.

20 He desarrollado previamente un método de trasplante para introducir tejidos alogénicos y xenogénicos en hospedantes no inmunosuprimidos, en los que las células se modifican de manera que los antígenos del donante están disfrazados del sistema inmune del hospedante (Faustman patente U.S. 5.283.058). Generalmente, los islotes enmascarados o islotes transgénicos con clase I extirpada están solamente protegidos de forma parcial de la autoinmunidad recurrente en ratones diabéticos no obesos (NOD) espontáneos (Markmann et al., *Transplantation* (1992) 54(6):1085-9). Existe la necesidad de un tratamiento para la diabetes y otras enfermedades autoinmunes que detenga el proceso autoinmune Shehadeh et al., *Lancet* (1994) 343:706-707, describen la vacunación de pacientes diabéticos de tipo 1 recientemente diagnosticados usando una única dosis de BCG.

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona bacilo Calmette-Guérin (BCG) para uso en el tratamiento de enfermedad autoinmune probada en un ser humano, en el que la enfermedad autoinmune se selecciona de diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, insuficiencia ovárica prematura, esclerodermia, enfermedad de Sjögren, lupus, vitiligo, alopecia, insuficiencia poliglandular, enfermedad de Grave, hipotiroidismo, polimiositis, pénfigo, enfermedad de Crohn, colitis, hepatitis autoinmune, hipopituitarismo, miocarditis, enfermedad de Addison, una enfermedad de la piel autoinmune, uveítis, anemia perniciosa, hipoparatiroidismo, y artritis reumatoide, caracterizado por que dicho uso comprende además:

- i) monitorizar periódicamente la tasa de muerte celular de células autoinmunes en dicho ser humano; y
- ii) ajustar periódicamente la dosis de BCG administrada a dicho ser humano basado en la monitorización de la etapa i),

50 en el que dicho uso da como resultado un aumento del número de células funcionales de un tipo predeterminado en dicho ser humano.

Además, la presente descripción describe un método para invertir la autoinmunidad existente.

55 La presente descripción describe un método para incrementar o mantener el número de células funcionales de un tipo predeterminado (por ejemplo, células de los islotes) en un mamífero, que implica las etapas de: (a) proporcionar una muestra de células del tipo predeterminado, (b) tratar las células para modificar la presentación de un antígeno

de las células que es capaz de provocar una respuesta de rechazo mediada por células autoinmunes *in vivo*, (c) introducir las células tratadas en el mamífero, y (d) antes de, después de, o concurrentemente con la etapa (c), tratar al mamífero para exterminar o inactivar las células autoinmunes del mamífero.

5 La etapa (b) puede implicar eliminar, reducir, o enmascarar el antígeno, que es preferiblemente MHC clase I. Tales métodos son conocidos, y se describen, por ejemplo en Faustman, patente U.S. nº 5.283.058.

La etapa (d) puede implicar administrar al mamífero factor alfa de necrosis tumoral ("TNF-alfa"), o una sustancia que induzca TNF-alfa, (es decir, un agonista). Como se explicará con más detalle más abajo, la ruta de señalización de TNF-alfa es una ruta inflamatoria que provoca eficazmente el exterminio de las células autoinmunes que atacan a las células deseadas. Hay muchos métodos para estimular la producción de TNF-alfa, incluyendo los siguientes:

10 vacunación con bacterias muertas o toxoides, por ejemplo BCG, toxoide del cólera, o toxoide de la difteria; inducción de infecciones víricas limitadas; administración de LPS, interleucina-1, o luz UV; activación de células productoras de TNF-alfa, tales como macrófagos, linfocitos B y algunos subconjuntos de linfocitos T; o la administración del péptido quimiotáctico fMET-Leu-Phe; toxoide CFA-pacellus, bacilo de *Mycobacterium bovis*, TACE (una metaloproteinasa que media la liberación de TNF-alfa celular), hidrozamatos, p38 proteína cinasa activada por

15 mitógeno ("MAP"), y antígenos víricos que activan factores de transcripción NF-B que protegen normalmente a las células de la apoptosis (es decir, muerte celular). El uso de BCG para tratar una enfermedad autoinmune probada en un ser humano es parte de la presente invención.

El exterminio de células autoinmunes indeseadas también se puede lograr administrando agentes que actúan como agonistas para la enzima, enzima conversora de TNF-alfa, que escinde el precursor de TNF-alfa para producir TNF-alfa biológicamente activo.

20

Las células autoinmunes también se pueden exterminar administrando agentes que interrumpen las rutas que protegen normalmente a las células autoinmunes de la muerte celular, incluyendo formas solubles de receptores de antígenos tales como CD28 en células T autorreactivas, CD40 en células B que están implicadas en la protección de células autoinmunes, y CD95 (es decir, Fes) en linfocitos T. Otro de tales agentes incluyen p75NTF y el receptor de linfotóxina beta (LtbetaR).

25

Los métodos como se citan anteriormente y BCG para uso según la presente invención en algunos aspectos corren en contracorriente a regímenes de tratamiento para enfermedades autoinmunes. Muchas de las terapias principales probadas para tales enfermedades implican la administración de fármacos antiinflamatorios que inhiben la producción de TNF-alfa, incluyendo inhibidores de COX-2, y antagonistas de TNF. Mis estudios indican que estas terapias convencionales son en realidad dañinas, por cuanto provocan la expansión de la población de células autoinmunes nocivas en el paciente, incrementando el número y gravedad de lesiones autoinmunes e infiltrados autorreactivos. Además, muchas de estas terapias con fármacos antiinflamatorios provocan una enfermedad de rebote grave tras discontinuarlas. Por ejemplo, el tratamiento con agente antiinflamatorio incrementa realmente el número de infiltrados linfocíticos en el páncreas de un diabético. Una vez que se discontinúa el tratamiento, estos linfocitos vuelven a ganar su función normal, dando como resultado una respuesta autoinmune intensificada.

30

35

Los métodos como se citan anteriormente y BCG para uso según la invención se pueden usar para tratar cualquiera de las enfermedades autoinmunes principales relacionadas con HLA clase II caracterizadas por la interrupción en la presentación del péptido de MHC clase I y la sensibilidad a TNF-alfa. Estas enfermedades incluyen, por ejemplo, diabetes tipo I, artritis reumatoide, SLE, y esclerosis múltiple. El método se puede usar en cualquier mamífero, por ejemplo pacientes humanos, que tienen signos presintomáticos tempranos de la enfermedad, o que tienen autoinmunidad probada.

40

La descripción también describe un método para incrementar o mantener el número de un tipo predeterminado, por ejemplo células de los islotes, en un mamífero mediante las etapas de (a) tratar el mamífero con un agente que extermina o inactiva células autoinmunes del mamífero; (b) monitorizar periódicamente la tasa de muerte celular de las células autoinmunes; y (c) ajustar periódicamente la dosis del agente en base a la información obtenida en la etapa (b) de monitorización.

45

En cualquiera de los métodos citados anteriormente en los que se administra o estimula TNF-alfa, se pueden usar dos agentes para ese fin, por ejemplo se pueden usar TNF-alfa e IL-1 en una terapia de combinación, al igual que se puede usar cualquier otra combinación de agentes.

50 Por "célula funcional" se quiere decir células que portan su actividad *in vivo* normal. En ciertas realizaciones preferidas de la invención, se prefiere que las células sean capaces de expresar autopéptido endógeno en el contexto de MHC clase I.

Por "tipo predeterminado", cuando se usa en referencia a células funcionales, se quiere decir que se puede seleccionar un tipo celular específico. Por ejemplo, un experto en la técnica puede decidir llevar a cabo el método de la presente invención a fin de incrementar o mantener el número de células de los islotes funcionales en el páncreas. En este ejemplo, el tipo celular predeterminado es células de los islotes.

55

- 5 Por “clase I y péptido” se quiere decir presentación de péptido de MHC clase I (es decir, autopéptido) en la superficie celular. Se cree que los antígenos citoplásmicos son procesados en péptidos mediante proteasas citoplásmicas y al menos en parte por el proteosoma, un complejo de proteinasas multicatalítico del que la proteína Lmp2, explicada aquí, está asociada. Se piensa que el proceso de presentación de MHC clase I incluye la formación de un complejo
- 10 entre la molécula de MHC clase I recientemente sintetizada, incluyendo una cadena pesada glicosilada asociada no covalentemente con β 2-microglobulina, y el péptido en el retículo endoplásmico rugoso de la célula. De este modo, “clase I y péptido” se refiere al complejo de MHC clase I/péptido como se presenta en la superficie celular para educación del sistema inmune.
- 15 Por “exterminar” o “extermina” significa que provoca la muerte celular por apoptosis. La apoptosis puede estar mediada por cualquier ruta de muerte celular. Según la presente invención, las células que son susceptibles al exterminio son defectuosas en la protección frente a la apoptosis debido a un defecto en una ruta de la muerte celular.
- 20 “Células autoinmunes”, como se usa aquí, incluye células que son defectuosas en la protección frente a la apoptosis. Este defecto en la protección frente a la apoptosis puede estar en la ruta ligada a la apoptosis inducida por TNF, o una ruta apoptótica no relacionada con TNF. Las células autoinmunes de la presente invención incluyen, por ejemplo, esplenocitos adultos, linfocitos T, linfocitos B, y células de origen de médula ósea, tales como células presentadoras de antígeno defectuosas de un mamífero.
- 25 Por “defectuosa” o “defecto” se quiere decir un defecto en la protección frente a la apoptosis.
- 30 Por “exposición” se quiere decir exposición de un mamífero a MHC clase I y péptido (es decir, autopéptido o péptido endógeno) por cualquier medio conocido en la técnica. En una realización preferida, la exposición a MHC clase I y péptido se lleva a cabo administrando al mamífero un complejo de MHC clase I/péptido. En otras realizaciones preferidas, la exposición a MHC clase I y péptido se produce exponiendo el mamífero a células que expresan MHC clase I y péptido.
- 35 Por “células capaces de expresar MHC clase I y péptido” se quiere decir, por ejemplo, células que son clase I⁺ o células que son clase I⁻ (por ejemplo, células que tienen una mutación en el gen β 2M) pero que se reconstituyen *in vivo* mediante un componente compensatorio (por ejemplo, β 2M sérico).
- 40 Por “mantenimiento de los niveles normales de glucemia” se quiere decir que un mamífero es tratado, por ejemplo, mediante inyección de insulina o mediante implante de una pinza euglucémica *in vivo*, dependiendo del hospedante que se esté tratando.
- 45 Por “gen *Imp2* o un equivalente del mismo” se quiere decir una célula que tiene un defecto a la hora de prevenir la muerte celular apoptótica, por ejemplo una célula que tiene una ablación en un punto crítico en una ruta de muerte celular apoptótica. En un aspecto, “gen *Imp2* o un equivalente del mismo” significa que una célula tiene una mutación en el gen *Imp2* o un gen que porta una función igual o similar al gen *Imp2* (es decir, un gen que codifica una subunidad de proteosoma). Como alternativa, la frase “gen *Imp2* o un equivalente del mismo” se puede usar para referirse a una célula que tiene una mutación en un gen que codifica un regulador del gen *Imp2* u otro componente del complejo proteosómico. Por ejemplo, un homólogo humano del gen *Imp2* murino es un equivalente del gen *Imp2* según la presente invención. Como otro ejemplo, un gen que porta la misma función o similar que el gen *Imp2*, pero que tiene una baja similitud de secuencia de aminoácidos, también se consideraría como un equivalente del gen *Imp2* según la presente invención.
- 50 “Terapia de combinación” o “terapia combinada”, como se usa aquí, se refiere al tratamiento en dos partes para incrementar el número de células funcionales de un sitio predeterminado, que incluye tanto la (1) ablación de células autoinmunes como la (2) reeducación del sistema inmune del hospedante.
- 55 “Inducción de TNF-alfa”, “régimen de tratamiento de TNF-alfa” o “TNF-alfa” incluye la administración de TNF-alfa, agentes que inducen la expresión o actividad de TNF-alfa, agonistas de TNF-alfa, agentes que estimulan la señalización de TNF-alfa, o agentes que actúan sobre rutas que provocan la muerte celular acelerada de células autoinmunes, según la invención. La estimulación de la inducción de TNF-alfa (por ejemplo, mediante administración de CFA) se lleva a cabo preferiblemente antes de, después de, o durante la administración (vía implante o inyección) de células *in vivo*.
- 60 Por “eficaz” se quiere decir que la dosis administrada de TNF-alfa, o de agente inductor de TNF-alfa, incrementa o mantiene el número de células funcionales de un tipo predeterminado en un individuo autoinmune, a la vez que minimiza los efectos tóxicos de la administración de TNF-alfa. Típicamente, una dosis eficaz es una dosis reducida, en comparación con dosis que previamente se ha mostrado que son ineficaces en el tratamiento de enfermedad autoinmune, particularmente enfermedad autoinmune probada.
- 65 BCG para uso según la invención y los métodos como se citan anteriormente proporcionan, por primera vez, la impresión eficaz de enfermedades mediadas (en oposición a químicamente inducidas) de origen natural tales como diabetes tipo I.

Otras características y ventajas de la invención serán manifiestas a partir de la siguiente descripción de la realización preferida de la misma, y de la reivindicación.

Breve descripción de los dibujos

5 La Fig. 1 muestra tres gráficas que representan la concentración de glucosa en sangre en tiempos indicados tras el trasplante (paneles de la izquierda) y seis fotografías que muestran la histología de los páncreas (paneles centrales) y el sitio de injerto bajo la cápsula renal (paneles de la derecha) de ratones hembra NOD diabéticos sometidos a trasplantes con islotes procedentes de diversos tipos de donantes y una única inyección de CFA. Los injertos de los islotes procedieron de ratones NOD jóvenes (panel A), ratones C57 (panel B), o ratones $\beta 2M^{-/-}$ C57 (panel C).

10 La Fig. 2 es una gráfica que representa las características histológicas del sitio de injerto y los páncreas de hospedantes NOD individuales sometidos a trasplante de islotes de diversos tipos de donantes en ausencia o presencia de inducción de TNF-alfa. Los cuadrados en blanco indican la falta de estructuras visibles de los islotes y de acumulación linfocítica visible; los cuadrados blancos con puntos indican acumulación linfocítica masiva que oscurece el resto de los islotes; los cuadrados sombreados indican islotes viables sin linfocitos; los cuadrados sombreados con puntos indican estructuras de islotes viables con acumulación linfocítica solamente circunferencial; panc indica páncreas.

15 La Fig. 3 muestra cinco gráficas que representan los niveles de glucemia (paneles de la izquierda) y cinco fotografías que muestran la histología del páncreas (paneles de la derecha) de ratones hembra NOD diabéticos sometidos a trasplantes con islotes procedentes de ratones $\beta 2M^{-/-}$ C57 y una única inyección de CFA. La flecha indica el momento de la retirada del riñón que contiene el injerto de islotes mediante nefrectomía.

20 La Fig. 4 muestra dos gráficas (paneles A y B) y tres fotografías (paneles C, D, y E) que demuestran el efecto de la inducción de TNF-alfa y la exposición repetida a esplenocitos C57 sobre la regeneración de los islotes y la restauración de la normogluceemia en hospedantes NOD diabéticos. El panel A representa hembras NOD tratadas con inyecciones diarias de insulina sola (controles, n = 5). El panel B representa hembras NOD tratadas con insulina (hasta que se restauró la normogluceemia) más una única inyección de CFA e inyecciones bisemanales de 9×10^6 esplenocitos C57 (n = 9). Las flechas representan el momento de la muerte. Histología pancreática de un animal de control (panel C); un animal que permaneció hiperglucémico (panel D); y un animal en el que se restauró la normogluceemia (panel E).

25 La Fig. 5 muestra cuatro gráficas (panel de la izquierda) que representan el efecto del mantenimiento de la normogluceemia durante la inducción de TNF-alfa y el tratamiento con esplenocitos sobre la regeneración de los islotes en ratones NOD diabéticos. Las gráficas van acompañadas de ocho fotografías que muestran la histología de los páncreas, específicamente islotes e infiltrados linfocíticos asociados (paneles centrales) y contenido de insulina de los islotes (paneles de la derecha). Las flechas representan el momento de la retirada de la pinza euglucémica. Los ratones recibieron una única inyección de CFA solo (panel A), CFA más inyecciones bisemanales de esplenocitos (9×10^6) de ratones C57 normales (panel B), ratones $\beta 2M^{-/-}$, TAP1^{-/-} C57 (panel C), o ratones MHC clase II^{-/-} C57 (panel D).

30 La Fig. 6 muestra seis gráficas que representan el análisis citométrico de flujo del efecto de la generación de los islotes sobre el porcentaje de células T CD3⁺ entre esplenocitos de ratones NOD. El porcentaje de células CD3⁺ se muestra en la esquina superior derecha de cada gráfica. El panel A representa ratones hembra C57 de 6 a 7 meses; el panel B representa una hembra NOD diabética tratada con insulina sola durante 12 días; los paneles C a F representan hembras NOD diabéticas a las que se les implantó una pinza euglucémica durante ~40 días y fueron tratadas con una única inyección de CFA ya sea solo (panel D) o junto con inyecciones bisemanales de esplenocitos C57 normales (panel C), esplenocitos MHC clase II^{-/-} C57 (panel E), o esplenocitos $\beta 2M^{-/-}$, TA P^{-/-} C57 (panel F).

Descripción detallada

La presente invención proporciona BCG para uso en un método para incrementar o mantener el número de células funcionales de un tipo predeterminado en un mamífero al evitar la muerte celular establecida para tratar una enfermedad autoinmune en la que se desea la regeneración de células y/o tejidos endógenos, en el que las enfermedades autoinmunes son diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, insuficiencia ovárica prematura, esclerodermia, enfermedad de Sjögren, lupus, vitiligo, alopecia (calvicie), insuficiencia poliglandular, enfermedad de Grave, hipotiroidismo, polimiositis, pénfigo, enfermedad de Crohn, colitis, hepatitis autoinmune, hipopituitarismo, miocarditis, enfermedad de Addison, enfermedades autoinmunes de la piel, uveítis, anemia perniciosa, hipoparatiroidismo, y artritis reumatoide. Un aspecto de la invención proporciona un nuevo enfoque terapéutico en dos partes para extirpar la autoinmunidad existente a la vez que reeducar el sistema inmune vía MHC clase I y péptido. Una característica clave de la invención es el descubrimiento de que la reexpresión de antígenos endógenos en el contexto de MHC clase I es esencial para terminar una respuesta autoinmune en curso.

Como se menciona anteriormente, la diabetes tipo I resulta de la destrucción de las células de los islotes de Langerhans del páncreas vía un proceso autoinmune grave. La meta del tratamiento de pacientes diabéticos tipo I es detener permanentemente el proceso autoinmune de manera que se conserven los islotes pancreáticos. Como alternativa, en casos en los que la destrucción de los islotes por autoinmunidad es completa, la meta es proporcionar un método para reemplazar las células de los islotes, o permitir que se generen. De este modo, la invención describe un nuevo método para incrementar o mantener el número de células funcionales de un tipo predeterminado para el tratamiento de casos probados de diabetes mellitus, en el que se invierte la autoinmunidad existente.

En diabetes de comienzo durante la adultez, o diabetes tipo II, las células β de los islotes del páncreas a menudo son defectuosas en la secreción de insulina. Sin embargo, estudios recientes indican que, en algunos pacientes, la destrucción autoinmune de las células β de los islotes desempeña un papel importante en la progresión de la enfermedad (Willis et al., Diabetes Res. Clin. Pract. (1998) 42(1):49-53). De este modo, la presente invención también se puede usar para tratar diabetes tipo II en la que está presente un componente autoinmune.

Relación de la presente invención con información genética y funcional conocida

Estudios genéticos y funcionales han identificado mutaciones en el gen *Imp2* en ratones diabéticos NOD, un modelo murino de diabetes tipo I humana (Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1994) 91:11128-32; Yan et al., J. Immunol. (1997) 159:3068-80; Fu et al., Annals of the New York Academy of Sciences (1998) 842:138-55; Hayashi et al., Molec. Cell. Biol. (1999) 19:8646-59). *Imp 2* es una subunidad esencial del proteosoma, una partícula multisubunitaria responsable del procesamiento de un gran número de proteínas intracelulares. El defecto proteosómico pronunciado en *Lmp2* da como resultado la producción y activación defectuosas del factor de transcripción NFkB a través del procesamiento proteolítico dañado de NFkB para generar las subunidades de NFkB p50 y p52 y la degradación dañada de la proteína inhibidora de NFkB, Ikb. NFkB desempeña un papel importante en las respuestas inmune e inflamatoria así como también en la prevención de la apoptosis inducida por el factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa). Las células linfoides autorreactivas que expresan el defecto de *Imp2* son eliminadas selectivamente mediante tratamiento con TNF-alfa, o con cualquier agente inductor de TNF-alfa, tal como adyuvante completo de Freund (CFA), o un agente que actúa sobre una ruta requerida para la protección frente a la muerte celular, por ejemplo cualquier ruta que converja en el mecanismo de activación apoptótico defectuoso. Esto está bien ilustrado por la protección fallida frente a la apoptosis en el ratón NOD, que carece de la formación de complejos de NFkB protectores.

El gen *Imp2* está ligado genéticamente al locus de MHC (Hayashi et al., más arriba). Las células presentadoras de antígeno de ratones NOD cesan la producción de la proteína LMP2 a aproximadamente 5-6 semanas, un proceso que termina el procesamiento apropiado de péptidos endógenos para la presentación en el contexto de MHC clase I sobre la superficie celular. La presentación en la superficie de péptido endógeno en el contexto de moléculas del MHC clase I es esencial para la eliminación selectiva de células T reactivas a autoantígenos (Faustman et al., Science (1991) 254:1756-61; Ashton-Rickardt et al., Cell (1993) 73:1041-9; Aldrich et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91(14):6525-8; Glas et al., J. Exp. Med. (1994) 179:661-72). La teoría actual sugiere que la interrupción de la presentación de péptidos endógenos vía MHC clase I evita la educación apropiada de las células T y es responsable de un conjunto diverso de enfermedades autoinmunes (Faustman et al., más arriba; Fu et al., J. Clin. Invest. (1993) 91:2301-7). Estos datos también son consistentes con las claras diferencias específicas del sexo, del tejido y de la edad en la expresión de este error que va en paralelo con el inicio y transcurso de la enfermedad de diabetes insulino dependiente (tipo I). Se teoriza que el desencadenante para el inicio de la autoinmunidad es la desregulación del proteosoma (o MHC clase I) específica del tejido y del desarrollo en células de los islotes, en oposición a linfocitos. Como se menciona anteriormente, es posible que este defecto desencadene una respuesta patológica de las células T a células de los islotes vía la interrupción de la educación apropiada de las células T (Hayashi et al., más arriba).

En un ser humano o animal normal, no diabético, los tejidos periféricos, incluyendo los islotes, expresan de forma consistente antígenos endógenos en el contexto de MHC clase I (Hayashi et al., más arriba). La presentación constitutiva de autopéptido específica de tejidos vía MHC clase I podría mantener la tolerancia periférica en el contexto de linfocitos seleccionados apropiadamente (Vidal-Puig et al., Transplant (1994) 26:3314-6; Markiewica et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1998) 95(6):3065-70). En ausencia de tal presentación específica de tejidos, una selección negativa pobre de linfocitos T podría conducir a la sobreexpansión de linfocitos autorreactivos, una característica notoria en modelos de enfermedad humana y murina.

Como se menciona anteriormente, las células linfoides autorreactivas que expresan el defecto de *Imp2* son eliminadas selectivamente, por ejemplo, mediante tratamiento con TNF-alfa, o cualquier agente inductor de TNF-alfa, tal como adyuvante completo de Freund (CFA). Aunque el defecto génico específico no se ha identificado en pacientes autoinmunes humanos, se sabe que los esplenocitos humanos en el paciente diabético humano, al igual que los esplenocitos murinos en el ratón NOD, tienen defectos en la resistencia a la apoptosis inducida por TNF-alfa (Hayashi et al., más arriba). Células específicas en pacientes autoinmunes humanos pueden expresar un defecto genético, similar al defecto proteosómico en ratones, que incrementa la susceptibilidad a la apoptosis inducida por TNF-alfa o a una ruta análoga de muerte celular apoptótica. Por lo tanto, en pacientes que expresan el defecto genético, solamente son exterminadas las células autoinmunes.

Según la presente teoría no limitante de la invención, existen múltiples rutas de muerte celular en una célula, y una cualquiera o más de estas rutas relacionadas con la muerte celular pueden ser defectuosas, acentuando la sensibilidad de estas células a la muerte celular. Por ejemplo, la susceptibilidad a la apoptosis inducida por TNF-alfa podría ocurrir vía una ruta de inhibición fallida de muerte celular (por ejemplo, por producción y activación defectuosas del factor de transcripción NFκB, como en el ratón NOD). Además, es bien conocido que hay dos receptores diferentes de TNF-alfa. La señalización defectuosa a través de cualquier receptor podría hacer a las células autoinmunes susceptibles a la apoptosis inducida por TNF-alfa. Como otro ejemplo, la señalización celular defectuosa a través de receptores de la superficie que estimulan rutas que interaccionan con la ruta de la muerte celular, es decir, LPS, IL-1, TPA, luz UV, etc., podría hacer a las células autoinmunes susceptibles a la apoptosis según la teoría de la presente invención. Por lo tanto, BCG para uso según la presente invención y los métodos citados anteriormente que son beneficiosos en el tratamiento de enfermedad autoinmune son aplicables a cualquier paciente autoinmune que tenga un defecto en una ruta de muerte celular.

Como se menciona anteriormente, las terapias actuales para enfermedad autoinmune están dirigidas a disminuir la reacción inflamatoria que se piensa que es responsable de la propia destrucción. TNF-alfa es parte de la respuesta inflamatoria. De este modo, según la presente teoría, la inducción de una respuesta inflamatoria, en lugar de la inhibición de una respuesta inflamatoria, es el método preferido para tratar a un individuo autoinmune. Esta teoría va en contra de un dogma existente que rodea actualmente a la terapia autoinmune.

Es posible que TNF-alfa induzca una citocina, toxoide, u otra molécula relacionada inducida en la respuesta inflamatoria que es la responsable del beneficio del tratamiento con TNF-alfa. Si es así, la inducción de inflamación vía tratamiento con TNF-alfa está todavía de acuerdo con la teoría de la invención. En una realización preferida, la inducción de la inflamación vía tratamiento con TNF-alfa induce mediadores de la muerte de células autoinmunes.

Un nuevo ensayo para monitorizar el tratamiento

Es bien conocido que el tratamiento prolongado con TNF-alfa es en sí mismo muy tóxico. A la luz de la elucidación de la ruta de la muerte celular descrita anteriormente, se teoriza que el conocimiento de esta ruta podría permitir el desarrollo de un ensayo *in vitro* sensible que se podría usar para monitorizar el efecto *in vivo* de un régimen de tratamiento con TNF-alfa particular (es decir, cualquier régimen de tratamiento que dé como resultado la inducción de TNF-alfa e inflamación). Más particularmente, se podría desarrollar un sistema de monitorización que combinase la administración de TNF-alfa solo con un ensayo capaz de medir el efecto del tratamiento con TNF-alfa sobre la apoptosis de células autoinmunes en un mamífero diagnosticado con una enfermedad autoinmune. Tal sistema de monitorización haría posible medir el efecto de dosis particulares de TNF-alfa sobre la apoptosis de células autoinmunes concurrentemente con el tratamiento de un individuo autoinmune. Además, tal sistema de monitorización permitiría la optimización o ajuste de la dosis de TNF-alfa (es decir, o de agente inductor de TNF-alfa) para maximizar la muerte de células autoinmunes, a la vez que se minimiza la exposición del mamífero a dosis tóxicas de TNF-alfa.

De este modo, la descripción describe un método para incrementar o mantener el número de células funcionales de un tipo predeterminado en un mamífero, que implica a) tratar un mamífero para exterminar o inactivar células autoinmunes del mamífero; b) monitorizar periódicamente la tasa de muerte celular de las células autoinmunes (por ejemplo, evaluando la tasa de muerte celular de células autoinmunes en el mamífero, en el que un incremento de la tasa de muerte celular de linfocitos T autorreactivos indica un incremento en el número de células funcionales del tipo predeterminado (es decir, resistentes a la muerte celular)); y (c) ajustar periódicamente la dosis del agente en base a la información obtenida en la etapa (b). Las células autoinmunes descritas en la presente invención incluyen cualquier célula defectuosa en la protección frente a la muerte celular apoptótica mediante cualquier estímulo, por ejemplo TNF-alfa, CD40, CD40L, CD28, IL1, Fas, FasL, etc. Según la presente invención, BCG se usa en el método anterior para tratar una enfermedad autoinmune probada en un ser humano.

El ensayo de la etapa b) permite identificar nuevas formulaciones de TNF-alfa, de agentes inductores de TNF-alfa, de agonistas de TNF-alfa, o de agentes que actúan sobre la ruta de señalización de TNF-alfa eficaces en la inducción de la apoptosis de linfocitos T o de células presentadoras de antígeno, que se pueden administrar a lo largo de un curso de tratamiento más largo que el que fue posible antes de la presente invención (por ejemplo, preferiblemente a lo largo de un período de meses, más preferiblemente a lo largo de un período de años, lo más preferible a lo largo de toda la vida).

En una realización relacionada, el presente sistema de monitorización se puede usar para identificar nuevas dosis, duraciones de tratamiento, y regímenes de tratamiento para agentes inductores de TNF que se descontaron previamente como tratamientos útiles debido a que no hubo manera de monitorizar su efecto. Por ejemplo, en contraste con un informe preliminar que identifica BCG, un agente inductor de TNF-alfa, como un tratamiento útil contra la diabetes tipo I (Shehadeh et al., *Lancet*, (1994) 343:706), los investigadores no pudieron identificar una dosis terapéutica de BCG debido a que no hubo manera de monitorizar el efecto de BCG *in vivo* (Allen et al., *Diabetes Care* (1999) 22:1703; Graves et al., *Diabetes Care* (1999) 22:1694).

El ensayo de la etapa b) también se puede usar para adaptar la terapia de inducción de TNF-alfa a las necesidades de un individuo particular. Por ejemplo, como se menciona anteriormente, en una realización preferida, el ensayo de

la etapa b) se puede llevar a cabo cada día o en días alternos a fin de medir el efecto de la terapia de inducción de TNF y/o de agentes inductores de la muerte celular sobre la tasa de muerte de células autoinmunes de manera que se pueda realizar el ajuste de la dosis administrada, de la duración del tratamiento (es decir, el período de tiempo durante el cual el paciente recibirá el tratamiento), o del régimen de tratamiento (es decir, cuántas veces el tratamiento se administrará al paciente) de TNF-alfa para optimizar el efecto del tratamiento con TNF-alfa y minimizar la exposición del paciente a TNF-alfa o a otros agentes inductores de la muerte celular. Por supuesto, el experto apreciará que el ensayo se puede llevar a cabo en cualquier momento considerado necesario para evaluar el efecto de un régimen particular de terapia de inducción de TNF-alfa sobre un individuo particular (es decir, durante la remisión de la enfermedad o en un individuo preautoinmune o cuantas veces sea oportuno).

El ensayo se puede usar para adaptar un régimen particular de inducción de TNF-alfa a cualquier enfermedad autoinmune dada. Por ejemplo, la monitorización *in vitro* del exterminio selectivo de células autoinmunes se puede usar para corregir selectivamente el fármaco (es decir, ajustar la dosis administrada para maximizar el efecto terapéutico). El sistema de monitorización descrito aquí se puede usar para monitorizar *in vivo* ensayos de tratamiento con TNF-alfa midiendo de forma continua la eliminación de células autoinmunes, por ejemplo linfocitos T autorreactivos, con sensibilidad continuada. Por supuesto, el experto apreciará que el presente sistema de monitorización se puede usar para medir el efecto de TNF-alfa sobre el exterminio *in vivo* de células autoinmunes en casos en los que la terapia de inducción de TNF-alfa se cita junto con cualquier otra terapia, por ejemplo reeducación de células T, como se describe aquí.

Es bien sabido que se ha mostrado que la terapia de inducción de TNF-alfa es ineficaz en pacientes con autoinmunidad probada, por ejemplo diabetes probada, pero es eficaz en pacientes en un estado preautoinmune, por ejemplo pacientes en un estado pre-diabético o pre-lupus. Además, se ha demostrado que la inducción de TNF-alfa en ratones NOD y NZB (una raza murina susceptible a la enfermedad semejante a lupus) adultos disminuye los síntomas diabéticos o de lupus respectivamente. Según la invención, la terapia con TNF-alfa puede ser eficaz incluso en pacientes con enfermedad probada, al monitorizar la eliminación de células autoinmunes y optimizar la dosis, duración de tratamiento, y/o programación del tratamiento de nuevo consiguientemente. De este modo, el ensayo de la etapa b) se puede usar para identificar una dosis eficaz, una duración de tratamiento, o el régimen de tratamiento de TNF-alfa (por ejemplo, menores que las dosis que previamente se mostró que eran ineficaces en el tratamiento de diabetes, particularmente en el tratamiento de diabetes probada) que se puede usar como un tratamiento eficaz para enfermedad autoinmune.

En otro aspecto preferido, el ensayo de la etapa b) se usa para identificar una dosis, una duración de tratamiento, o un régimen de tratamiento de TNF-alfa que pueda reducir o eliminar los efectos secundarios asociados con una enfermedad autoinmune particular. Se puede identificar una dosis particular de TNF-alfa que reduzca o elimine los síntomas asociados con, por ejemplo, colapso vascular asociado con diabetes, ceguera o insuficiencia renal asociada con diabetes tipo I, o erupciones cutáneas asociadas con lupus. Está bien probado que son los efectos secundarios asociados con la reacción autoinmune quienes son a menudo responsables de la mortalidad de los pacientes autoinmunes. De este modo, en un aspecto preferido, el sistema de monitorización de la presente invención identifica un régimen de tratamiento para TNF-alfa que reduce los síntomas y/o complicaciones de la enfermedad autoinmune, de manera que se mejora la calidad de vida del paciente y/o se prolonga el tiempo de vida del paciente que está siendo tratado. En un aspecto relacionado, el sistema de monitorización de la presente invención identifica un régimen de tratamiento para TNF-alfa que evita la progresión de la enfermedad o incluso detiene la enfermedad en un paciente diagnosticado con una enfermedad autoinmune.

De este modo, en otro aspecto, la presente descripción proporciona un sistema de monitorización para medir la tasa de muerte celular en un mamífero autoinmune, que incluye a) un régimen de tratamiento para exterminar o inactivar células autoinmunes en un mamífero; y b) un ensayo capaz de medir el efecto del régimen de tratamiento sobre la tasa de muerte celular de células autoinmunes en el mamífero, en el que un incremento en la tasa de muerte celular indica una disminución en la autoinmunidad.

Ensayo *in vitro* para monitorizar la muerte celular

La presente descripción proporciona un ensayo para monitorizar la apoptosis de células autoinmunes en un mamífero. En una realización preferida, la presente invención proporciona un ensayo que implica a) aislar una muestra de sangre de un mamífero, preferiblemente un ser humano, y b) ensayar la muestra de sangre *in vitro* para determinar el exterminio de células autoinmunes en comparación con células no autoinmunes usando técnicas disponibles en la técnica. Como se menciona anteriormente, las células no autoinmunes son generalmente resistentes a la apoptosis inducida por TNF-alfa. Un incremento en la muerte celular de células autoinmunes en comparación con células no autoinmunes indica que la dosis de TNF-alfa o de otro agente inductor de la muerte celular es suficiente para inducir el exterminio de las células autoinmunes o células defectuosas de procedentes de la médula ósea.

Terapia de inducción de TNF combinada (para fines ilustrativos solamente)

La presente descripción también describe una combinación farmacéutica que incluye dos o más agentes inductores de TNF-alfa. Un tratamiento con TNF-alfa combinado particularmente preferido es la combinación de TNF-alfa e IL1.

Esta estrategia de tratamiento va contra el dogma actual que envuelve al tratamiento de enfermedad autoinmune. Por ejemplo, en la TNF Second International Meeting (A Validated Target with Multiple Therapeutic Potential, 24-25 de febrero, 1999, Princeton, NJ, USA) se describió que una combinación de un anticuerpo anti-TNF-alfa y anti-IL1 sería ventajosa en el tratamiento de enfermedad autoinmune. El tratamiento describe la inducción de la inflamación, que es lo opuesto del tratamiento que se cree que es eficaz por aquellos expertos en la técnica, esto es, la supresión de la inflamación. Por supuesto, en el tratamiento, actual, la inflamación no se produce debido a que las células inflamatorias mueren realmente antes de llegar al sitio diana, o son exterminadas en el sitio diana.

La presente descripción describe, aparte de la terapia de inducción de TNF combinada que incluye solamente la combinación de TNF-alfa e IL1, cualquier combinación de terapias inductoras de TNF-alfa, por ejemplo vacunación con BCG, etc., infección vírica, LPS, activación de células que normalmente producen TNF-alfa (es decir, macrófagos, células B, células T), el péptido quimiotáctico fMet-Leu-Phe, proteínas bacterianas y víricas que activan NFkB, agentes que inducen rutas de señalización implicadas en respuestas inmunes adaptativas (es decir, receptores de antígenos en células B y T, CD28 en células T, CD40 en células B), agentes que estimulan receptores específicos de la muerte de células autorreactivas (es decir, TNF, Fas (CD95), CD40, p75NF, y receptor de linfotóxina beta (LtbetaR), fármacos que estimulan la enzima convertidora de TNF-alfa (TACE), que escinde el precursor de TNF-alfa (es decir, para proporcionar actividad biológica capaz de estimular la producción potenciada o la vida potenciada de citocinas tras la secreción), etc.

Una terapia de combinación (para fines ilustrativos solamente)

Los datos presentados en la Tabla 1 y descritos con detalle en el Ejemplo 1, más abajo, demuestran el éxito extraordinario de combinar dos métodos para inducir normoglucemia a largo plazo con trasplante de aloinjerto de los islotes en un hospedante NOD ya diabético. La descripción describe la combinación de dos terapias dirigidas a dos dianas distintas del sistema inmune. Este concepto se ensaya combinando mi tecnología de trasplante previa con una estrategia autoinmune para frustrar la enfermedad subyacente, y por primera vez proporciona normoglucemia a largo plazo en hospedantes naturalmente diabéticos vía trasplante con islotes alogénicos. De este modo, el problema del rechazo se aborda como aquél que implica dos barreras inmunes, es decir, la barrera de rechazo de injerto y la barrera de autoinmunidad recurrente. Para abordar la barrera del rechazo de injerto, usé islotes modificados con antígeno del donante, y para la barrera autoinmune recurrente usé CFA, un fuerte inductor de TNF-alfa.

TABLA 1

Grupos	Donante	Hospedante		Supervivencia individual (días)	
		Raza	Tratamiento	Días de normoglucemia	Media
1.	C57BL/6	NOD-IDDM*	-	2,2,3,9,23	7,8
2.	₂ M-1-	NOD-IDDM	-	5,9,12,12,17,18,71	20,0
3.	C57BL/6	BALB/C	-	5,5,7,10	6,7
4.	₂ M-1-	BALB/C	-	>100,>100,>100, >100	>100
5.	NOD	NOD-IDDM	-	5,10,12,13	10
6.	NOD	NOD-IDDM	CFA	12,26,30,>38,>66, >120,>122	>59
7.	C57BL/6	NOD-IDDM	CFA	10,10,10	10
8.	₂ M-1-	NOD-IDDM	CFA	5,14,32,36,>59,>79, >115,>115	>57

* IDDM representa diabetes mellitus insulino dependiente

La Tabla I, anterior, representa una serie de experimentos que se llevaron a cabo en los que ratones hospedantes se trataron para evitar la autoinmunidad recurrente, vía el exterminio o inactivación de linfocitos autorreactivos, y después se transplantaron con células de los islotes donantes en las que los antígenos que disparan el rechazo se habían eliminado o modificado.

A los ratones se les inyectó una vez intraperitonealmente adyuvante completo de Freund (CFA) (100 ml/50 g de peso corporal) para inducir TNF-alfa.

El mismo día, el trasplante de las células de los islotes se llevó a cabo según lo siguiente. Las células de los islotes con antígenos modificados donantes se aislaron de ratones genosuprimidos para ₂M (2 microglobulina) transgénicos adquiridos de Jackson Labs. Como se menciona anteriormente, el gen ₂M codifica una proteína chaperona crítica esencial para la expresión superficial de proteínas de clase I. ₂M del hospedante, una proteína muy conservada, puede reconstituir en parte ₂M.

Células de los islotes transgénicas o normales se transplantaron en nueve grupos de ratones. Tres de los grupos (grupos 6, 7, y 8) se trataron previamente con CFA; los otros seis grupos no fueron pretratados.

Como se muestra en la Tabla 1, los ratones naturalmente diabéticos (NOD-IDDM) que recibieron trasplantes transgénicos pero no fueron pretratados con CFA (grupo 2) tuvieron tiempos medios de supervivencia de 20 días, sugiriendo que la protección del tejido del donante frente al rechazo de injerto no protege al tejido de una autoinmunidad probada. Igualmente, el grupo 7 establece que el tratamiento del hospedante con CFA, un inmunomodulador que se cree ahora que modifica exclusivamente la respuesta autoinmune, no protege a las células donantes alogénicas normales del rechazo rápido de injerto. Por el contrario, los ratones diabéticos tratados con CFA que recibieron trasplantes transgénicos (grupos 6 y 8) sobrevivieron durante 57 días (media). (Los grupos restantes fueron controles adicionales: grupo 1 (nada de CFA; hospedante diabético, células donantes no transgénicas); grupo 3 (nada de CFA; hospedante no diabético, células donantes no transgénicas); grupo 4 (nada de CFA; hospedante no diabético; células donantes no transgénicas); y grupo 7 (CFA; hospedante diabético; raza donante no transgénica). Como se muestra en la Tabla 1, el único de estos grupos de control que muestra longevidad fueron los hospedantes no diabéticos que recibieron células donantes transgénicas, una terapia que se sabe que impide el rechazo del injerto (grupo 4).

A aproximadamente 120-130 días después del trasplante, los islotes singénicos y alogénicos transplantados se retiraron mediante nefrectomía. Esto fue un experimento de control para demostrar que los animales volvieron nuevamente a hiperglucemia.

Los ratones NOD que recibieron el trasplante singénico tuvieron, en 24 h, azúcares en sangre superiores a 500 mg/ml, y necesitaron ser sacrificados inmediatamente debido a su estado diabético grave. La histología en estos ratones mostró que los islotes transplantados en el riñón sobrevivieron en algunos casos pero no parecieron, en todos los casos, sanos. Hubo islotes granulados, pero infiltrados linfocíticos masivos rodearon e invadieron el tejido de los islotes. La invasión de los islotes por linfocitos del hospedante es un rasgo histológico indicativo de autorreactividad frente al tejido de los islotes. El páncreas endógeno demostró que los islotes no sobrevivieron y estaba salpicado de racimos linfocíticos, presumiblemente en sitios de tejido de islotes previo.

Los ratones NOD que recibieron los islotes alogénicos, por el contrario, permanecieron normoglucémicos después de que se hubieron realizado las nefrectomías para retirar el tejido de los islotes alogénico. No se observó cambio en el azúcar en sangre. Tras aproximadamente siete días de este control perfecto de azúcar en sangre, los ratones se sacrificaron. El examen histológico mostró que los islotes endógenos en el páncreas se regeneraron. El número de islotes fue menor que el normal, pero los islotes presentes eran grandes, sanos, y no tuvieron invasión linfocítica (aunque sí tuvieron un borde NOD característico de linfocitos que rodea al islote sano). Por el contrario, los injertos alogénicos se perdieron en la mayoría de los casos al final del punto de tiempo de 120-140 días después del trasplante. Estos resultados apoyan la tesis de que lo que ocurrió fue un rescate y regeneración del páncreas endógeno. Los resultados apoyan el hecho de que el sistema inmune se reeducó adicionalmente.

Presentación de antígeno clase I (para fines ilustrativos solamente)

Antes de los experimentos descritos anteriormente, observé que una pequeña cantidad de ablación de clase I fue beneficiosa para la inhibición del rechazo de islotes donantes en ratones NOD diabéticos (Faustman et al., Science (1991) 252(5013):1700-2). En base a estos resultados, propuse que una ablación de clase I más completa y permanente podría ser incluso mejor para la supervivencia a largo plazo del injerto. Para lograr una ablación de clase I más permanente, transplanté islotes F2 a los que se les había extirpado tanto el gen $\alpha 2M$ (2 microglobulina) como Tap 1 en ratones NOD ya diabéticos (MHC clase I^{-/-}) (véase el Ejemplo 3). El gen $\alpha 2M$ codifica una proteína chaperona crítica esencial para la expresión superficial de péptidos de clase I. El gen Tap 1 codifica una proteína requerida para el transporte de autopéptidos endógenos al retículo endoplásmico para péptido estable y ensamblaje de clase I antes de la presentación sobre la superficie celular. Sorprendentemente, solamente uno de los seis ratones mostró supervivencia a largo plazo del injerto. Los tiempos individuales de supervivencia del injerto (días) para los seis ratones fueron: 11, 12, 13, 14, 14, y 71. Estos resultados inesperados sugirieron que la reexpresión de péptido y clase I fue una etapa que no solamente no fue perjudicial, sino que realmente fue necesaria para la reeducación del sistema inmune que conduce a la regeneración y rescate de islotes endógenos. De este modo, propongo, sin limitar el mecanismo bioquímico de la invención, que son necesarias algunas moléculas del MHC clase I intactas para que se produzca el proceso de reeducación.

En base a los resultados descritos anteriormente, parece que la barrera de rechazo del injerto sirve realmente a dos funciones importantes que parecen contribuir a la regeneración exitosa de las células de los islotes en este modelo. La ablación temporal de clase I (clase I^{-/-}) sirve inicialmente para proteger el injerto del rechazo inmediato. Subsiguientemente, las proteínas del MHC clase I se vuelven a expresar y se intercambian en el injerto hacia las 24-72 horas después del trasplante a través de abundantes proteínas $\alpha 2M$ del hospedante procedentes del suero (Anderson et al., J. Immunol. (1975) 114(3):997-1000; Hyafil et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1979) 76(11):5834-8; Schmidt et al., Immunogenetics (1981) 13:483-91; Bernabeu et al., Nature (1984) 308(5960):642-5; Li et al., Transplantation (1993) 55(4):940-6). Sorprendentemente, la reexpresión subsiguiente del péptido endógeno vía MHC clase I parece contribuir a la reeducación de los linfocitos T con selección negativa apropiada de células autorreactivas. Acoplada con la eliminación selectiva de células linfoides autorreactivas mediante tratamiento con

CFA, la terapia de combinación proporciona un tratamiento poderoso para enfermedad autoinmune en la que se desea la regeneración de tejido.

El mantenimiento de células de los islotes transplantadas no es necesario para la regeneración de páncreas endógeno (para fines ilustrativos solamente)

5 Los experimentos descritos anteriormente me sugieren además que el mantenimiento de los islotes transplantados *in vivo* puede no ser necesario para la regeneración de las células de los islotes pancreáticas endógenas. A fin de ensayar esta teoría, se transplantaron injertos de islotes de MHC clase I^{-/-} transgénicos en ratones NOD ya diabéticos con inducción de TNF-alfa. Los injertos de los islotes de MHC clase I^{-/-} transgénicos colocados bajo el riñón de ratones NOD diabéticos se retiraron más tarde mediante nefrectomía en diversos momentos después del
10 transplante. Como se describe en el Ejemplo 2, todos los ratones permanecieron normoglucémicos durante al menos 120 días tras la nefrectomía, y la histología pancreática reveló una regeneración excelente de los islotes pancreáticos endógenos. Por el contrario, los ratones NOD que recibieron trasplantes de islotes singénicos volvieron rápidamente a la hiperglucemia tras la nefrectomía.

15 Como se propone anteriormente, estos datos apoyan la teoría de que, para la regeneración endógena de los islotes, u otro tejido regenerante sujeto a ataque inmune (por ejemplo, células hepáticas), el mantenimiento de las células de los islotes transplantadas no es esencial para la regeneración y rescate de las células de los islotes pancreáticas endógenas. De este modo, la invención, en un aspecto, describe el problema de la regeneración y rescate tisular en autoinmunidad como aquel que implica dos barreras diferentes (es decir, la barrera de autoinmunidad recurrente y la barrera de reeducación). Las etapas requeridas para la regeneración tisular parecen ser:

- 20 1): ablación de las células autoinmunes del hospedante (por ejemplo, mediante exterminio o inactivación), y
2) reeducación del sistema inmune con clase I y péptido para proteger el páncreas que se regenera.

De este modo, la presente invención describe un método para reestablecer la tolerancia sistémica y eliminar la autoinmunidad existente que promueve la regeneración y rescate de células y tejido.

Tratamiento mediante inyección de MHC clase I y péptido (para fines ilustrativos solamente)

25 En base al descubrimiento de que la presentación del péptido de clase I es necesaria para reeducar el hospedante NOD, y al conocimiento de que el mantenimiento de las células de los islotes transplantadas no es necesario para la regeneración de las células de los islotes endógenos, propongo que el trasplante y aislamiento de los islotes pueden no ser necesarios para la regeneración *in situ* de los islotes en el marco de la autoinmunidad. El aislamiento y trasplante de los islotes son procedimientos laboriosos con limitaciones de suministro y demanda asociadas en el
30 marco clínico. Un procedimiento para incrementar el número de células de los islotes funcionales que no requiera el aislamiento y trasplante de los islotes proporcionaría un gran beneficio al tratamiento de la diabetes. Este método de tratamiento se podría extender a otras enfermedades autoinmunes en las que se desea la reeducación inmune (patente U.S. n° 5.538.854).

35 Propongo que la simple inyección de células funcionales que expresan clase I (clase I⁺), o incluso del complejo de MHC clase I/péptido, en un mamífero, con la ablación concurrente de células autoinmunes, sería beneficiosa en el tratamiento de un conjunto diverso de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, los islotes pancreáticos normales expresan MHC clase I y tienen pocos linfocitos pasajeros asociados que expresan moléculas tanto el MHC clase I como clase II (esta preparación se denomina aquí como esplenocitos B6). En el caso de diabetes, se puede inyectar una preparación de células de los islotes pancreáticas normales en un paciente para lograr exposición al antígeno
40 de clase I. Aunque la supervivencia de las células donantes puede ser de vida corta, la exposición repetida puede ser suficiente para reeducar al sistema inmune del hospedante con la ablación concurrente de células autoinmunes. En los casos en los que la preparación de células donantes es tediosa, o el tiempo de supervivencia pobre de las células donantes limita la eficacia del método, se puede administrar directamente al hospedante el complejo de clase I/péptido.

45 A fin de ensayar esta hipótesis, ratones NOD diabéticos iniciaron un régimen de 40 días de una inyección de bolo de CFA para inducir transitoriamente TNF-alfa y exposición bisemanal mediante inyección intravenosa a esplenocitos B6 (clase I⁺) (Ejemplo 4). Como se predijo, los esplenocitos inyectados sobrevivieron solo transitoriamente en el hospedante debido a rechazo. Sin embargo, la eliminación transitoria de células autoinmunes (es decir, vía inducción de TNF-alfa mediada por CFA) combinada con exposición repetida a MHC clase I de B6 y péptido fue
50 suficiente para invertir la diabetes en aproximadamente 30% de los hospedantes NOD diabéticos. La protección parcial se logró en aproximadamente 50% de los hospedantes NOD diabéticos.

Los niveles de azúcar en sangre estaban pobremente controlados en ratones que recibieron la terapia de inyección descrita anteriormente. Las fluctuaciones en el nivel de azúcar en sangre podrían influir negativamente en el beneficio de la terapia de inyección combinada. A fin de controlar esta variante, grupos adicionales de ratones NOD
55 diabéticos se trataron de forma similar con inducción de TNF-alfa e inyección de esplenocitos B6, pero con implante intraperitoneal simultáneo de islotes de B6 encapsulados con alginato (denominado aquí como una pinza euglucémica). Una pinza euglucémica proporciona un sistema de barrera de membrana que permite el control

glucémico a corto plazo del intercambio de insulina pero evita el contacto directo de célula-célula (es decir, para la educación de células T). Tras 40 días, los islotes encapsulados se retiraron quirúrgicamente, y los niveles de azúcar en sangre de los ratones NOD diabéticos se monitorizaron en busca de signos de regeneración *in situ* del páncreas. Sorprendentemente, los ratones NOD diabéticos que habían recibido inmunizaciones bisemanales de esplenocitos B6 y una única dosis de terapia de inducción de TNF-alfa permanecieron normoglucémicos durante 40 días tras la retirada de la pinza en el 78% de los casos. Además, después de que la terapia se detuvo y se eliminó la autoinmunidad, la expansión continua del páncreas endógeno fue suficiente para la tolerancia sostenida a autoantígenos. Por el contrario, en experimentos de control, en los que los esplenocitos extirparon permanentemente proteínas del MHC clase I (MHC clase I^{-/-}), se observó una regeneración pobre de los islotes *in situ* (Tabla 3, grupo 4, Fig. 5). Sin embargo, la inyección de esplenocitos que carecen de proteínas del MHC clase II (MHC clase II^{-/-}) permitió la regeneración de los islotes *in situ*, presuntamente debido a la expresión continuada de péptido endógeno en el contexto de MHC clase I (Tabla 3, grupo 5, Fig. 5). Por lo tanto, el restablecimiento de la autotolerancia y la eliminación de la autorreactividad dependió del MHC clase I.

Por lo tanto, he identificado y optimizado un nuevo tratamiento de combinación para diabetes mellitus. De este modo, la presente invención describe un método para incrementar y conservar el número de células funcionales de un tipo predeterminado en un paciente diabético, que incluye las etapas de (1) la ablación de células autoinmunes, (2) la exposición a MHC clase I y péptido, y (3) el mantenimiento del control de la glucosa. Como se menciona anteriormente, la exposición puede producirse, por ejemplo, mediante trasplante de células funcionales que presentan MHC clase I y péptido de un tipo predeterminado, o preferiblemente mediante inyección repetida de tales células. Como alternativa, la exposición a MHC clase I y péptido se puede producir mediante inyección de complejos de clase I/péptido, alimentación de células autólogas mediante péptido, etc.

En un aspecto particularmente preferido del método anterior, la presente invención describe un método para incrementar el número de células funcionales de un tipo predeterminado en un paciente diabético, que incluye las etapas de (1) la ablación de células autoinmunes (es decir, células que son defectuosas en la muerte celular), (2) la exposición a MHC clase I y péptido mediante inyección repetida de células funcionales de un tipo predeterminado, que expresan péptido en el contexto de MHC clase I (o complejo de MHC clase I/péptido), y (3) el mantenimiento del control de la glucosa. En el caso de diabetes, las células funcionales de un tipo predeterminado incluyen células de los islotes, por ejemplo esplenocitos B6. El mantenimiento de los niveles de glucemia se puede lograr por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo inyección de insulina, o mediante uso de una pinza euglucémica. El paciente diabético puede ser cualquier mamífero, preferiblemente un paciente humano.

Tratamiento de enfermedad autoinmune

En base a los descubrimientos descritos aquí, he concebido una nueva terapia para la corrección de cualquier autoinmunidad probada. Usada en combinación, la exposición a autopéptido en el contexto de MHC clase I y el exterminio o inactivación de linfocitos autorreactivos permite poner en acción el potencial regenerativo endógeno de tejido de mamífero. Además, este tratamiento permite la conservación y el rescate de tejido existente. El efecto de esta terapia de combinación es la reeducación del sistema inmune con la inversión simultánea de la autoinmunidad en el hospedante.

Con respecto al tratamiento de la diabetes, teorizo además que las células de los islotes B6 pancreáticas regeneradas con éxito que hiperexpresan MHC clase I y péptido (por ejemplo, determinado mediante examen histológico) mantienen la tolerancia periférica una vez que se ha consolidado un crecimiento suficiente de los islotes. La exposición *in vivo* a células que expresan MHC clase I y péptido mediante trasplante o inyección parece iniciar el proceso educacional para la tolerancia estable y a largo plazo, más allá del período de tratamiento.

Existen varias similitudes sorprendentes entre el ratón NOD y pacientes diabéticos humanos, sugiriendo que este nuevo enfoque terapéutico se puede aplicar fácilmente para tratar pacientes diabéticos humanos. Por ejemplo, los esplenocitos humanos diabéticos, al igual que los esplenocitos murinos, tienen defectos en la resistencia a la apoptosis inducida por TNF-alfa (Hayashi et al., más arriba). Además, al igual que los ratones NOD, los esplenocitos humanos tienen defectos relacionados con la edad en la presentación del MHC clase I de autopéptidos para la selección apropiada de células T (Faustman et al., más arriba; Fu et al., J. Clin. Invest. (1993) 91:2301-7). Finalmente, se ha reconocido durante años que incluso tras un episodio hiperglucémico grave, los seres humanos diabéticos continúan produciendo autoanticuerpos frente a dianas de los islotes, indicando que las células de los islotes o células precursoras de los islotes del páncreas no estaban completamente extirpadas. Esto indica que los seres humanos diagnosticados con autoinmunidad diabética pueden tener un potencial regenerativo de los islotes elevado.

De este modo, en un aspecto, la descripción describe un método para incrementar el número de células funcionales de un tipo predeterminado en un individuo diagnosticado con una enfermedad autoinmune, (1) proporcionando una muestra de células funcionales que expresan MHC clase I y péptido, (b) exponiendo un mamífero al MHC clase I y péptido, y (c) antes de, después de o concurrentemente con la etapa (b), tratando el mamífero para exterminar o inactivar células autoinmunes (es decir, células defectuosas en la apoptosis) en el mamífero.

Cuando el mamífero es un paciente humano diabético, puede ser deseable añadir una etapa adicional de mantenimiento de los niveles normales de glucosa antes de, después de, o concurrentemente con la etapa (b). Como se describe anteriormente, el mantenimiento de los niveles normales de glucemia en un paciente con diabetes probada puede mejorar la eficacia del método.

- 5 Como se menciona previamente, la reeducación del sistema inmune con MHC clase I y péptido puede emplear células que expresan péptido endógeno en el contexto de MHC clase I o complejos de clase I/péptido solos. Se conoce un número de tales métodos de reeducación del sistema inmune, por ejemplo como se describe en la patente U.S. nº 5.538.854.

- 10 De forma similar, en la presente invención se puede usar una variedad de métodos bien conocidos para lograr la ablación de las células autoinmunes. Un tratamiento preferido es la administración de TNF-alfa, que está disponible de Genentech Corporation, South San Francisco, CA; Roache; Boehringer Ingelheim; Asahi Chemical Industry; y Sigma Chemicals. La administración intraperitonealmente de TNF-alfa para disminuir el rechazo en ratones con tendencia a la diabetes se describe en Rabinovitch et al., *J. Autoimmunity* (1995) 8(3):357-366.

- 15 Igualmente se pueden usar otros métodos de tratamiento de hospedantes para extirpar células autoinmunes, por ejemplo la administración de CFA, interleucina-1 (IL-1), inhibidores del proteosoma, inhibidores de NFkB, fármacos antiinflamatorios, activador del plasminógeno tisular (TPA), lipopolisacárido, luz UV, o un mediador intracelular de la ruta de señalización de TNF-alfa. Tales agentes inducen la apoptosis de linfocitos autorreactivos interrumpiendo la ruta aguas abajo de la señalización del receptor de TNF-alfa. Otros agentes útiles son fármacos que actúan aguas abajo de la unión al receptor de TNF-alfa. (Baldwin et al., *Ann. Rev. Immunol.* (1996) 12:141; Baltimore, Cell (1996) 87:13).

- 20 En otros aspectos, la descripción describe un método para incrementar el número de células funcionales de un tipo predeterminado en un individuo diagnosticado con una enfermedad autoinmune, a) proporcionando una muestra de células del tipo predeterminado, b) tratando las células para modificar la presentación de un antígeno de las células que es capaz de provocar una respuesta de rechazo mediada por linfocitos T *in vivo*, c) introduciendo las células tratadas en el mamífero, y d) antes de, después de, o concurrentemente con la etapa c), tratando el mamífero para exterminar o inactivar linfocitos T del mamífero. Este método puede ser particularmente útil para el tratamiento de enfermedad autoinmune de etapa avanzada, en la que se ha logrado la destrucción completa de un tipo celular o tejido particular.

- 25 La etapa b) puede implicar eliminar, reducir o enmascarar el antígeno. Se puede usar un número de métodos para modificar, eliminar, o enmascarar antígenos de las células donantes; algunos de éstos se describen en la patente U.S. 5.283.058 de Faustman mencionado anteriormente. Por ejemplo, la etapa b) puede implicar alterar genéticamente el animal donante de manera que se suprima genéticamente HLA clase I o una molécula en esta ruta, o se estirpe una chaperona para evitar la expresión superficial. Como alternativa, la etapa b) puede implicar enmascarar el antígeno de HLA clase I usando un fragmento de anticuerpo F(ab¹)₂ que forma un complejo con HLA clase I.

- 30 El régimen terapéutico se puede usar no solo para inhibir el rechazo de células que se regeneran, sino también para tratar enfermedades autoinmunes en las que se desea la regeneración de células o tejidos endógenos, por ejemplo para permitir la regeneración de mielina (o la simple conservación de las células diana autoinmunes que quedan que sobreviven) en esclerosis múltiple, o la regeneración articular en artritis reumatoide.

- 40 Cuando no se pretende solamente la protección de células endógenas que se regeneran, por ejemplo células de los islotes, frente al ataque autoinmune, sino también la protección de células y tejidos transplantados, los métodos descritos anteriormente se pueden combinar con otros métodos conocidos para inhibir el rechazo de aloinjertos. Tales métodos incluyen la administración de anticuerpos anti-alfa CD3, anticuerpos anti-CD40L (ligando de CD40, un correceptor para el desencadenamiento de células T) (para prevenir la reducción de tolerancia en el hospedante), FK506, tacrolimus, sirolimus, inducción de alfa-CD25, etc., y ciclosporina A. Como se explica anteriormente, los linfocitos de la diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) autoinmunes son particularmente sensibles a la muerte celular vía la ruta de TNF-alfa, y de este modo se pueden emplear fármacos que potencian esta ruta aguas abajo de la unión al receptor. Los ejemplos de tales fármacos potenciadores son dianas de TRIP, NIK, IKK, TRADD, JUN, NFkB, Traf2, y procesamiento del proteosoma, etc.

- 45 Incluso cuando la meta principal es la regeneración o rescate de células endógenas en lugar del injerto permanente de aloinjertos, puede ser útil implantar un aloinjerto y promover su supervivencia temporal, a la vez que se promueve simultáneamente la reeducación del sistema inmune de manera que se puedan regenerar las células endógenas; los linfocitos autorreactivos son perjudiciales tanto para el aloinjerto como para las células que se regeneran, y por lo tanto el exterminio o inactivación de esas células es doblemente ventajoso.

- 50 De este modo, en el caso de diabetes, por ejemplo, los islotes transplantados se pueden proteger temporalmente del rechazo mediante encapsulamiento temporal o mediante control meticuloso del azúcar en sangre con insulina exógena, mientras que el hospedante es tratado, como se describe anteriormente, para exterminar linfocitos autorreactivos y el sistema inmune es reeducado mediante métodos que usan clase I y péptido o clase II y péptido.

Una ventaja adicional de usar trasplantes de islotes alogénicos durante esta fase es que los islotes normales que son protegidos temporalmente pueden proporcionar capacidades hormonales y secretoras normales que optimizarán la regeneración y rescate *in situ*. La presente invención se demostrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Terapia de combinación (para fines ilustrativos solamente)

Para idear un protocolo clínicamente aplicable para la regeneración de islotes en un hospedante diabético, se combinaron dos terapias y se ensayaron en el ratón NOD diabético (un modelo murino para diabetes tipo I humana). En primer lugar, los islotes B6 donantes se protegieron del rechazo del injerto mediante ablación temporal de clase I (clase^{-/-}) del gen $\beta 2M$ (Anderson et al., más arriba; Hyafil et al., más arriba; Schmidt et al., más arriba; Bernabeu et al., más arriba; Li et al., más arriba). Los islotes B6 donantes transgénicos se retiraron entonces del ratón donante y se transplantaron en el ratón NOD hospedante. Subsiguientemente, se administró simultáneamente una única inyección de CFA en la almohadilla de la pata; un tratamiento que sostiene los niveles de TNF-alfa durante días (Sadelain et al., Diabetes, (1990) 39:583-589; McInerney et al., Diabetes, (1991) 40:715-725; Lapchak et al., Clin. Immunol. Immunopathol. (1992) 65(2):129-134).

La respuesta de ratones hembra NOD severamente diabéticos a los tratamientos de islotes B6 donantes con o sin interrupción transitoria de MHC clase I^{-/-} e inducción de TNF-alfa se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Control de azúcar en sangre en ratones NOD diabéticos que reciben trasplantes de islotes

Grupo	Donante	Inducción de TNF-alfa*	Días de normoglucemia	Media \pm SD
#1	NOD	-	4,6,6,8,10	9 \pm 2,3
#2	B6	-	2,2,3,9,9,23	8 \pm 8,0
#3	B6-Clase I ^{-/-}	-	5,9,12,12,17,18,71	22 \pm 24
#4	NOD	+	30,55,61,70,72,121,136 ,137	85 \pm 40
#5	B6	+	9,9,9,10,11	10 \pm 0,9
#6†	B6-Clase ^{-/-}	+	13,14,14,15,25,32,32,3 2,36,>133,>133,>131,>129,>132	>62 \pm 54
#7††	B6-Clase I ^{-/-/-/-}	+	11,12,13,14,14,>148	35 \pm 55

* La inducción de TNF-alfa se logró con una única inyección de CFA en la almohadilla de la pata en el momento del trasplante.

† Los islotes donantes B6-clase I^{-/-} representan islotes con interrupción transitoria de clase I debido a la ablación del gen de B₂-microglobulina donante (B₂M).

†† Los islotes donantes B6-clase I^{-/-/-/-} con ablación más permanente de clase I se aislaron de ratones con interrupción tanto del gen de B₂M como de *Tap2*, dos proteínas chaperonas esenciales para la expresión de clase I en la superficie.

20 Todos los hospedantes fueron ratones NOD diabéticos hembra, típicamente mayores de 20 semanas, con niveles de azúcar en sangre sostenidos en exceso de 400 mg/dl durante al menos 7 días con administración de insulina de 0,5 U/kg para prevenir la muerte. Esta dosis de insulina mantiene típicamente los niveles de azúcar en sangre de ratones NOD diabéticos en el intervalo normal de 100-200 mg/dl. Ocho a doce horas antes del trasplante, la insulina se detiene. Todos los trasplantes de los islotes se llevan a cabo unilateralmente bajo la cápsula del riñón para facilitar la histología de los islotes después del trasplante usando técnicas estándar.

25 Típicamente, islotes de NOD aislados de ratones NOD hembra prediabéticos de 5-10 semanas son rápidamente rechazados cuando se transplantan en ratones NOD severamente diabéticos (Tabla 2, grupo 1). De forma similar, los islotes B6 transplantados bajo la cápsula renal de ratones NOD diabéticos también son rechazados rápidamente con un tiempo medio de supervivencia de 8 \pm 8,0 (Tabla 2, Grupo 2). Como se publica en la bibliografía, aunque los islotes donantes con ablación de MHC clase I^{-/-} sobreviven indefinidamente en hospedantes no autoinmunes (Faustman, 1991, más arriba), la ablación transitoria de MHC clase I solamente permite un incremento de tres veces en la supervivencia de los islotes en el hospedante NOD diabético expuesto. Todos los hospedantes NOD diabéticos rechazan eventualmente los islotes donantes B6 clase I^{-/-}; la supervivencia media se prolonga hasta 22 \pm 24 días (Tabla 2, grupo 3). Como se muestra en la Tabla 2, grupo 4, aunque la inducción de TNF-alfa facilita el trasplante

de islotes singénico en hospedantes NOD, esta terapia dirigida contra la autoinmunidad tiene un efecto mínimo de la supervivencia de los islotes B6. Los islotes B6 transplantados en ratones NOD diabéticos con inducción de TNF-alfa son rechazados uniformemente hacia el día 10 después del trasplante en todos los receptores NOD diabéticos (Tabla 2, grupo 5).

5 Como se muestra en la Fig. 1, los islotes B6 aislados de ratones NOD jóvenes y transplantados en un ratón NOD diabético con inducción de TNF-alfa demuestran graves infiltrados linfocíticos bajo la cápsula renal en el sitio del trasplante de los islotes (véase también la Fig. 2). Al mismo tiempo, los niveles de azúcar en sangre han aumentado hasta los que eran antes del trasplante. Además, el páncreas endógeno no muestra islotes intactos; las estructuras de islas restantes en el páncreas están oscurecidas por bolsillos densos o linfocitos infiltrantes. De forma similar, los islotes B6 transplantados en un ratón NOD tratado con inducción de TNF-alfa son rechazados; la histología es virtualmente indistinguible; infiltrados lipocíticos masivos bajo la cápsula renal en el sitio del trasplante con el páncreas endógeno mostrando estructuras de los islotes arrasadas con invasión linfocítica (Fig. 1B).

De forma importante, la combinación del trasplante de islotes de MHC clase I^{-/-} con inducción de TNF-alfa en hospedantes diabéticos NOD tuvo éxito (Tabla 2, grupo 6). Se observó normoglucemia continua y sostenida en 5 de los 14 hospedantes NOD diabéticos; la normoglucemia continuó más allá de 129 días después del trasplante de los islotes en los ratones NOD previamente diabéticos que reciben el tratamiento combinado. El tiempo medio de supervivencia para la normoglucemia superó 62 ± 54 días. Los ratones NOD normoglucémicos a largo plazo se sacrificaron después de al menos 129 días de monitorizar el post-trasplante para evaluar el sitio de trasplante de los islotes en la cápsula subrenal y el páncreas endógeno.

20 Sorprendentemente, los 5 ratones NOD normoglucémicos a largo plazo que recibieron islotes B6 clase I^{-/-} con tratamiento de inducción de TNF-alfa demuestran histológicamente que no hay injertos de los islotes que sobreviven bajo la cápsula renal a los 130 días después del trasplante. El páncreas endógeno de estos ratones demostró una regeneración significativa de los islotes (Fig. 3). Además, los islotes en el páncreas carecieron de invasión linfocítica o, como mucho, demostraron ocasionalmente linfocitos circunferenciales rodeando a los islotes regenerados. Como resume la histología de los animales individuales en la Tabla 3, la regeneración *in situ* del páncreas fue exclusivamente un rasgo de ratones NOD diabéticos tratados con TNF-alfa en combinación con trasplante de islotes donantes que tienen interrupción transitoria de MHC clase I^{-/-}. Estos resultados demuestran que la terapia de combinación anterior (administración de TNF-alfa y células de los islotes temporalmente extirpadas para clase I (clase I^{-/-})) elimina con éxito la autoinmunidad existente en ratones NOD severamente diabéticos y promueve la regeneración del páncreas endógeno.

Ejemplo 2: El mantenimiento de las células de los islotes transplantadas no es necesaria para la regeneración del páncreas endógeno (para fines ilustrativos solamente)

Para confirmar la capacidad para eliminar autoinmunidad existente y regenerar el páncreas endógeno, ratones NOD diabéticos adicionales fueron transplantados con islotes de MHC clase I^{-/-} bajo la cápsula renal con inducción de TNF-alfa. En diversos momentos después del trasplante, en presencia de normoglucemia inducida sostenida, los injertos de los islotes colocados bajo el riñón se retiraron mediante nefrectomía y se llevó a cabo la cirugía de supervivencia para evaluar si el mantenimiento de los niveles normales de azúcar en sangre dependía de la presencia del injerto. La Fig. 3 muestra que los cinco ratones severamente diabéticos que recibieron con éxito la inducción de TNF-alfa y la terapia con islotes B6 MHC clase I^{-/-} permanecieron normoglucémicos en los momentos del sacrificio 3 a 60 días después de la nefrectomía. Además, la histología pancreática en los cinco hospedantes reveló un número sorprendente de islotes pancreáticos, con muy pocos números de linfocitos circunferenciales o sin linfocitos rodeando a los islotes regenerados y rescatados. La evaluación de todos los sitios del trasplante de los islotes bajo el riñón demostró que no había islotes transplantados que sobreviven.

En contraste notable, todos los ratones NOD que reciben células de los islotes NOD singénicas mediante trasplante, junto con inducción de TNF-alfa, volvieron rápidamente a hiperglucemia después del trasplante, demostrando el fracaso de este protocolo de trasplante que usa islotes NOD singénicos para promover la regeneración de células de los islotes pancreáticas endógenas.

Ejemplo 3: La ablación temporal de clase I^{-/-} es crítica para el tratamiento exitoso con la terapia de combinación (para fines ilustrativos solamente)

50 A fin de comenzar a analizar minuciosamente el mecanismo del restablecimiento sistémico de la tolerancia suficiente para el recrecimiento de los islotes pancreáticos, se llevaron a cabo experimentos adicionales. A fin de lograr una mayor tasa de éxito de la regeneración de los islotes pancreáticos con autoinmunidad eliminada, en el tratamiento de la terapia de combinación se ensayó un islote con MHC clase I extirpado más permanente. Los islotes procedentes de donantes B6 con genes tanto *2M* como *Tap1* extirpados (MHC clase I^{-/-,-/-}), la chaperona obligatoria y las proteínas de transporte para el ensamblaje del MHC, respectivamente, se transplantaron en ratones NOD severamente diabéticos con inducción de TNF-alfa. Encontré que aunque este enfoque es eficaz para prolongar la normoglucemia en hospedantes murinos sin autoinmunidad, este tratamiento no pudo prolongar la normoglucemia en el hospedante NOD diabético autoinmune. La eliminación de MHC clase I donante más permanente con inducción de TNF-alfa en el hospedante NOD diabético culminó en el rechazo rápido del injerto de islotes y una mala

capacidad para lograr la regeneración de los islotes endógenos (Tabla 2, grupo 7). Aparentemente, cierta expresión de MHC clase I donante y autopéptido es esencial para la inducción de tolerancia de NOD a autoantígenos, incluso si es solamente durante un tiempo limitado, de media 20 días (Tabla 2, grupo 3) antes del rechazo del trasplante.

Ejemplo 4: La inyección de células de los islotes temporalmente extirpadas es suficiente para la inducción de la regeneración del páncreas endógeno (para fines ilustrativos solamente)

En base a los datos del Ejemplo 3, anteriormente, he propuesto que las inmunizaciones con linfocitos clase I⁺ podrían ser una terapia eficaz, incluso si las células donantes sobrevivieran solamente un tiempo corto *in vivo* tras la inyección. A fin de ensayar esta teoría, nueve ratones NOD diabéticos con hiperglucemia severa iniciaron un régimen de 40 días de una inyección de CFA en bolo para inducir transitoriamente TNF-alfa y exposiciones bisemanales mediante inyección intravenosa (IV) de esplenocitos B6 (9 x 10⁶ esplenocitos IV). Los esplenocitos B6 son una población de células linfoides con presentación intacta de MHC clase I y autopéptido que sobrevive solo transitoriamente *in vivo* debido a rechazo por el hospedante.

Adicionalmente, cuatro ratones NOD diabéticos de control se mantuvieron durante el mismo período de tiempo con un tratamiento solamente a base de insulina. Todos los ratones NOD del control se monitorizaron en días alternos para la hiperglucemia, y la insulina se administró diariamente salvo que volvieran a la normoglucemia. Después de aproximadamente 40 días de tratamiento, todos los ratones NOD del control que recibieron solamente insulina estaban muertos. El control pobre del nivel de azúcar en sangre, la caquexia y la pérdida de peso dieron cuenta de la mortalidad uniforme de todos los hospedantes NOD diabéticos hacia el día 20 (Fig. 4A). Los ratones del control tratados solamente con insulina también tuvieron histología pancreática que demuestra infiltrados linfoides impresionantes que oscurecen cualquier estructura de islotes reconocible (Fig. 4C).

En notable contraste, nueve ratones NOD severamente diabéticos que recibieron exposiciones repetidas a esplenocitos B6 más inducción de TNF-alfa estaban vivos en ocho de nueve casos, y tres de los ratones NOD habían vuelto a la normoglucemia hacia el día 40. Además, cuatro ratones NOD diabéticos tratados con inmunización repetida de esplenocitos B6 e inducción de TNF-alfa tuvieron histología mejorada de los islotes hacia el día 40 (Fig. 4D). Los islotes pancreáticos eran visibles y los infiltrados linfoides se redujeron significativamente de forma circunferencial así como adyacentemente a las estructuras de los islotes. Este patrón es característico de un patrón de histología de infiltrados linfocíticos protectores, no destructivos (Gazda et al., Journal of Autoimmunity (1997) 10(3):261-70; Dilts et al., Journal of Autoimmunity (1999) 12(4):229-32). Tres ratones NOD diabéticos con inducción de TNF-alfa e inmunizaciones con esplenocitos B6 produjeron la regeneración completa de los islotes y la independencia de la insulina. La histología en estos tres ratones reveló autorreactividad linfocítica drásticamente reducida y mayor abundancia de islotes (Fig. 4D). Por lo tanto, el tratamiento combinado con inducción de TNF-alfa y exposición repetida a linfocitos B6 MHC clase I unidos a péptido fue suficiente para destruir células T autorreactivas e invertir la diabetes NOD durante al menos 40 días en aproximadamente 30% de los hospedantes ensayados (Fig. 4). La terapia fue parcialmente protectora en aproximadamente 50% de los hospedantes NOD (Fig. 4).

A fin de eliminar los niveles pobremente controlados de azúcar en sangre como factor que obstaculiza la regeneración más completa de los islotes, grupos adicionales de ratones NOD diabéticos se trataron de forma similar, con inducción de TNF-alfa e inyección de esplenocitos B6, pero con el implante simultáneo intraperitonealmente de una pinza euglucémica, durante 40 días. Una pinza euglucémica murina en estos estudios consistió en islotes de B6 encapsulados en alginato. La cápsula de alginato proporciona un sistema de barrera de membrana que permite el control glucémico a corto plazo del intercambio de insulina pero evita el contacto directo de célula-célula (es decir, para la educación de células T). Después de 40 días, los ratones NOD euglucémicos con los islotes encapsulados sufrieron la retirada quirúrgica de las cápsulas de alginato, y los niveles de azúcar en sangre de los ratones NOD diabéticos se monitorizaron en busca de signos de regeneración *in situ* del páncreas.

La Tabla 3 muestra que, tras 40 días, tanto los ratones tratados con la pinza euglucémica en ausencia de inducción de TNF-alfa (Tabla 3, grupo 1) como los ratones tratados con la pinza euglucémica e inducción de TNF-alfa (Tabla 3, grupo 2) mostraron una ausencia de regeneración de islotes endógenos y volvieron rápidamente a hiperglucemia tras la retirada de la pinza. Los resultados indican que en condiciones de control excelente de la glucosa e inducción de TNF-alfa, se induce apoptosis de células autorreactivas existentes durante las fases tempranas de diabetes aguda, pero no se puede alterar ni el estado degenerativo del páncreas (como se evalúa mediante histología) ni el curso de la autoinmunidad preexistente. La histología de los grupos de tratamiento de control NOD consistió en la eliminación linfocítica severa de los islotes en el páncreas (Tabla 3, Fig. 4).

Tabla 3. Impacto del control de azúcar en sangre a corto plazo (40 días) sobre la regeneración de islotes endógenos en ratones NOD diabéticos tras la retirada de la pinza euglucémica

Grupo	Donante de células del bazo	Inducción de TNF-alfa *	Nº de receptores normoglucémicos	%
			Nº total de receptores	
1	-	-	0/7	0

2	-	+	0/6	0
3	B6	+	7/9	78
4	B6 clase I ^{-/-} , ^{-/-}	+	2/6	33
5	C57 clase II ^{-/-}	+	8/11	73

* La euglucemia se mantuvo durante 40 días con un aloinjerto de islotes encapsulado que se retiró quirúrgicamente en el día 40. Todos los injertos encapsulados se retiraron en el día 40 después del trasplante.

¶ Otros cinco receptores rechazaron los injertos encapsulados antes de la retirada de los injertos, descartando la determinación de la euglucemia en la regeneración de los islotes.

†† Las células C57-clase II^{-/-} procedieron de la destrucción del gen *Abb* y no expresan moléculas A o E de MHC clase II, y se adquirieron de Taconic Research Laboratories (Germantown, NY).

* La inducción de TNF-alfa se logró con una única inyección de CFA en la almohadilla de la pata en el momento de la primera inyección de células del bazo de 10^6 células IV.

† Los esplenocitos donantes B6 clase I^{-/-},^{-/-} procedieron de ratones con interrupción tanto del gen 2M como *Tap2*.

5 En notable contraste, los ratones NOD diabéticos que habían recibido semanalmente inmunizaciones de esplenocitos B6 en combinación con una única dosis de terapia de inducción de TNF-alfa permanecieron normoglucémicos durante 40 días después de la retirada de la pinza en el 78% de los casos. Un total de nueve ratones NOD diabéticos se trataron con esta terapia, y siete de los nueve ratones NOD tuvieron histología pancreática que demostró la regeneración sostenida y continuada de los islotes durante días a semanas tras la retirada de la pinza euglucémica (Tabla 3, Fig. 5). En general, los islotes hospedantes tuvieron acumulaciones linfocíticas circunferenciales, y en algunos casos fueron positivas a aldehído fucsina (es decir, tuvieron insulina en exceso, más allá de la cantidad para mantener la normoglucemia).

10 Por lo tanto, la regeneración de los islotes se optimizó en ratones NOD diabéticos probados mediante el mantenimiento de los niveles de glucemia (usando una pinza euglucémica), ablación de linfocitos autorreactivos (mediante inducción breve de TNF-alfa), y exposición repetida a células que presentan MHC clase I y péptido, después de un curso de 40 días de inyecciones bisemanales de esplenocitos B6. Además, después de que la terapia se detuvo y se eliminó la autoinmunidad, el rescate inmediato y la expansión continua del páncreas endógeno fueron suficientes para la tolerancia sostenida a autoantígenos. El mecanismo de reeducación de esplenocitos se definió como dependiente del complejo de educación de MHC clase I y péptidos endógenos. Como se demostró en la Tabla 3, la inyección de esplenocitos a los que se les extirpó permanentemente las proteínas del MHC clase I (MHC clase I^{-/-}) en ratones NOD diabéticos con pinzas euglucémicas condujo a una regeneración pobre *in situ* de los islotes (Tabla 3, grupo 4, Fig. 5). La inyección de esplenocitos que carecen de proteínas del MHC clase II (MHC clase II^{-/-}) permitió la regeneración *in situ* de los islotes, presumiblemente debido a la expresión continuada de péptido endógeno en el contexto de MHC clase I (Tabla 3, grupo 5, Fig. 5). El reestablecimiento de la autotolerancia y la eliminación de la autorreactividad dependió de MHC clase I y fue independiente de MHC clase II. La capacidad de sostenimiento de este tratamiento se demuestra en la Fig. 5. El mantenimiento del azúcar en sangre se observó más allá de 20 días tras la retirada de la pinza euglucémica.

25 **Ejemplo 5: Regeneración del páncreas endógeno** (para fines ilustrativos solamente)

Generalmente, el porcentaje de células T CD3⁺ en ratones NOD jóvenes (< 12 semanas) es bajo, pero después de 30 semanas el porcentaje de células T CD3⁺ aumenta drásticamente y supera el de los ratones del control. A fin de evaluar el impacto de la regeneración exitosa del páncreas y del rescate sobre la selección de linfocitos NOD, se llevó a cabo el análisis citométrico de flujo en células T CD3⁺ procedentes de ratones NOD tratados.

30 Los porcentajes de células T CD3⁺ esplénicas se evaluaron en 5 NOD tratados que reciben diversos tratamientos; representados en la Fig. 6 a 5 hasta 26 días después de que el tratamiento se detuvo. Un ratón hembra NOD de edad parecida sin tratar, tratado con insulina, tuvo 56% de tinción de esplenocitos con anticuerpos anti-CD3. El ratón hembra B6 de edad parecida tuvo 27% de esplenocitos positivos (Fig. 6), una tendencia previamente dada a conocer (Miyazaki Clin. Exp. Immunol. 85:60,622; Pontesilli Clin. Exp. Immunol. 97:70,84). Dos ratones se trataron con éxito a través de inmunizaciones de esplenocitos B6 o B6 clase II^{-/-} junto con inducción de TNF-alfa, y presentaron rescate y regeneración del páncreas. Sorprendentemente, ambos ratones NOD tratados con éxito tuvieron 40% de tinción de esplenocitos con anticuerpos anti-CD3⁺ (Fig. 6). En notable contraste, los ratones NOD de edad parecida tratados sin éxito (tratados con solamente la terapia de inducción de TNF-alfa o con la terapia de inducción de TNF-alfa junto con esplenocitos B6-MHC clase I^{-/-}) no tuvieron alteraciones en el número elevado de células CD3⁺ esplénicas (Fig. 6). Por lo tanto, el impacto de la autoinmunidad detenida y el restablecimiento de la

tolerancia fue sistémico, e incluyó la selección notablemente alterada de células T que normalizó parcialmente los números de linfocitos T CD3⁺ en el bazo.

Ejemplo 6: Monitorización *in vitro*

Escenario II de tratamiento

5 Cribado previo: Un sujeto humano que presenta los síntomas de diabetes tipo I se llevará al hospital para hacer una única donación de sangre que se dividirá en dos tubos. Un tubo se usará para identificar la presencia de autoanticuerpos, y el otro tubo se usará en una identificación *in vitro* de muerte celular apoptótica (es decir, inducida mediante TNF) o muerte celular acelerada debido a cualquier agente medioambiental o químico. Esta muestra inicial se usará para obtener un nivel de péptido C de línea base para verificar la ausencia de islotes funcionales. La sensibilidad *in vitro* aumentada a la muerte celular mediante cualquier ruta de muerte celular apoptótica será un requisito previo para la terapia futura.

10 Tratamiento de diabetes de comienzo juvenil: Si los autoanticuerpos frente a células de los islotes están presentes, concluiremos que el páncreas está todavía intentando regenerarse. De este modo, si la autoinmunidad existente se eliminó mediante tratamiento, los islotes podrían volver a crecer con éxito.

15 Un enfoque barato para intentar rescatar inmediatamente el páncreas sería llevar a cabo repetidamente administraciones de BCG, como un inmunoestimulante no específico que podría elevar con éxito los niveles de la actividad de TNF alfa endógeno. TNF-alfa endógeno exterminará solamente las células autoinmunes (es decir, las células con un defecto en la protección frente a la apoptosis). Inicialmente comenzaremos con una inmunización semanal de BCG. Se recogerán muestras de sangre a las 24-48 horas después de la inmunización de BCG y se ensayarán *in vitro* (en cultivo celular) para determinar la persistencia de células autoinmunes sensibles a TNF-alfa. Las células aisladas, que se hacen crecer en cultivo celular, se examinarán para determinar si las células autoinmunes, sensibles a la muerte, son eliminadas o reducidas mediante esta administración.

25 Si la respuesta a la inmunización de BCG es positiva, entonces comenzaremos la inmunización con linfocitos donantes. Idealmente, estas inmunizaciones linfocíticas podrían ser de ambos progenitores e implicarían infusiones semanales en el niño diabético, para ser administradas simultáneamente con inmunizaciones de BCG. En algunos casos, los linfocitos donantes serán irradiados para disminuir el riesgo de transferencia de infecciones. Introduciremos los linfocitos intravenosamente a una dosis de aproximadamente 9×10^9 a 9×10^{10} para comenzar. Con el ensayo de monitorización *in vitro*, esperamos ser capaces de identificar una dosis óptima. Nuestra meta es continuar este tratamiento desde un mínimo de 40 días hasta alrededor de 6 meses, o hasta que se encuentra péptido C humano positivo en la sangre y se reduce la dosificación de insulina. Los signos tempranos de posible éxito de la inducción de la tolerancia pueden no ser solamente la presencia de péptido C, sino también la presencia de células sensibles a TNF-alfa (autorreactivas). Esto sería una indicación de que la reeducación es completa. También, se predice que el fenotipo de células linfoides periféricas se convertiría posiblemente a un fenotipo más maduro (mostrado por una relación menor de CD45RA a CD45RO). De este modo, la identificación en el laboratorio implicará ensayos de muerte celular y marcadores superficiales de linfocitos de selección de células T mejorada. Esperamos también observar cambios totales, tales como la reselección de células T periféricas y números totales de células CD3 que disminuyen debido a la reintroducción directamente de células linfoides, o debido a la regeneración de islotes que reseleccionan células T periféricas.

40 Tratamiento de comienzo en la adultez: Si el paciente tiene 40 años y ha tenido diabetes durante 20 años o más, seguiremos el mismo protocolo de tratamiento, pero extenderemos el tratamiento durante un período de tiempo más largo. En enfermedad de larga duración, es posible que las células precursoras de los islotes del páncreas sean efectivamente inactivas y ya no puedan multiplicarse debido a años de ataque autoinmune. Este tratamiento puede proteger al paciente de las complicaciones de la enfermedad, que en algunos casos pueden estar relacionadas directamente con las citocinas alteradas de las células linfoides pobremente seleccionadas que provocan fibrosis. Además, este tratamiento puede eliminar las células autorreactivas que provocan fibrosis y otras complicaciones. Finalmente, este tratamiento puede permitir, por primera vez, que los islotes sean transplantados con la barrera siendo solamente supervivencia de los islotes, no supervivencia de los islotes del rechazo de injerto o supervivencia de los islotes frente a autoinmunidad.

Escenario II de tratamiento

50 Sujetos: Para este estudio se reclutarán pacientes que son mayores de 18 años pero menores de 45 años y que tienen diabetes tipo 1 (insulinodependiente y con tendencia a la cetosis). Los participantes tendrán que tener una duración de la diabetes tipo 1, fechada desde el momento de la administración de insulina, de al menos un mes, pero no más de 5 años. La razón para el criterio de duración se afirma en la esperanza de que las personas con menos de 5 años de duración todavía tendrán masa residual de células beta que se puede recuperar. Los pacientes se identificarán para determinar si tienen autoanticuerpos (anticuerpos anti-GAD y anti-IA-2 o células de los islotes) presentes. Además, se determinará la presencia de masa de células beta que funcionan, según se mide mediante niveles detectables (0,2 pmoles/ml) de péptido C tras la estimulación con glucagón, aunque no será un requisito para la inclusión en el estudio. Los criterios de exclusión incluirán a personas que han tenido una vacunación previa con

BCG, un historial de tuberculosis clínica, o un ensayo de PPD positivo, una respuesta positiva a un ensayo de PPD intermedio (5 UI), o cualesquiera condiciones afecciones de la piel agudas o crónicas.

5 Procedimientos del estudio: A los voluntarios idóneos, según se juzga mediante revisión de los historiales médicos, se les pedirá que vengan al Diabetes Research Center donde se les medirá tanto la secreción en ayunas como la estimulada (6 min. después de 1 mg de glucagón administrado iv) de péptido C (insulina endógena). Además, se obtendrán muestras de sangre para medir el estado de autoanticuerpos (véase anteriormente) y el nivel de TNF y linfocitos T autorreactivos o células linfoides periféricas con sensibilidad a la apoptosis. Finalmente, si no hay un nivel reciente de hemoglobina A1c (dentro de las cuatro semanas), se obtendrá uno. También se obtendrá un panel estándar de ensayos de función hepática y un CBC con diferencial.

10 La inducción de TNF-alfa, por ejemplo mediante administración de CFA o "vacunación" de BCG, se llevará a cabo con un método estándar con una inyección percutánea de 0,3 ml de una disolución 50 mg/ml (Organon) en el área del deltoides. Después de que la disolución de BCG se aplica tópicamente a la piel, se demanda un disco de multipunción estéril para administrar percutáneamente BCG.

15 A los voluntarios se les pedirá que vuelvan a intervalos semanales durante cuatro semanas para tener una muestra de sangre obtenida para las medidas repetidas de TNF y linfocitos autorreactivos (1 tubo de tapa verde y 1 tubo de tapa roja). El sitio de vacunación (área del deltoides) se examinará en cada una de estas ocasiones para determinar si se ha producido cualquier ulceración o reacción local significativa. Además, a los pacientes se les preguntará con respecto a cualesquiera síntomas febriles u otros síntomas sistémicos que puedan haber ocurrido. Después de cuatro semanas, se realizará en los pacientes una vacunación repetida en el brazo opuesto y continuará una monitorización semanal similar durante otros dos meses.

20 Dependiendo de los resultados del primer grupo de 5 sujetos, se realizarán ajustes en la dosis y/o frecuencia de la vacunación de BCG para un grupo subsiguiente de 5 individuos.

25 Riesgos: Los riesgos implicados en este estudio son pequeños e incluyen el malestar menor de obtener muestras de sangre. El volumen total de sangre obtenido durante el transcurso del estudio de tres meses será considerablemente menor que el proporcionado habitualmente en una única donación de sangre. El ensayo de péptido C estimulado con glucagón se usa habitualmente en protocolos experimentales. La inyección de glucagón puede estar asociada con una náusea leve que habitualmente desaparece en 5 minutos. Raramente (menos de 1 en 20), los sujetos pueden vomitar después del glucagón.

30 La vacunación de BCG se ha usado durante más de 30 años en muchos países, incluyendo Canadá y en Europa del Este, como vacunación contra la tuberculosis. Los efectos secundarios reconocidos de la vacunación de BCG incluyen malestar local leve en el sitio de vacunación con un exantema papuloso que se desarrolla en el sitio 10-14 días después de la vacunación y que alcanza un diámetro máximo de 3 mm 4-6 semanas después de la vacunación. El exantema se puede descamar después, y raramente deja una cicatriz visible. Raramente se observa adenopatía local en niños, pero casi nunca en adultos. Sucesos raros incluyen osteomielitis, reacciones lupoides, infecciones diseminadas por BCG, y muerte. La frecuencia de estas reacciones graves está entre 1 en 1.000.000 y 1 en 35 5.000.000 de vacunaciones, y han ocurrido casi exclusivamente en niños inmunosuprimidos. La mayoría de la experiencia reciente con BCG ha sido en el tratamiento intravesicular de cáncer de vejiga, en el que se realizan instilaciones semanales de BCG durante 6 semanas. Finalmente, la vacunación de BCG se ha usado en diabetes tipo 1 sin que se hayan observado ninguna consecuencia adversa.

40

REIVINDICACIONES

5 1. Bacilo Calmette-Guérin (BCG) para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune probada en un ser humano, en el que la enfermedad autoinmune se selecciona de diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, insuficiencia ovárica prematura, esclerodermia, enfermedad de Sjögren, lupus, vitíligo, alopecia, insuficiencia poliglandular, enfermedad de Grave, hipotiroidismo, polimiositis, pénfigo, enfermedad de Crohn, colitis, hepatitis autoinmune, hipopituitarismo, miocarditis, enfermedad de Addison, una enfermedad autoinmune de la piel, uveítis, anemia perniciosa, hipoparatiroidismo, y artritis reumatoide,

caracterizado por que dicho uso comprende además:

- i) monitorizar periódicamente la tasa de muerte celular de células autoinmunes en dicho ser humano; y
- 10 ii) ajustar periódicamente la dosis de BCG administrada a dicho ser humano basado en la monitorización de la etapa i),

en el que dicho uso da como resultado un aumento del número de células funcionales de un tipo predeterminado en dicho ser humano.

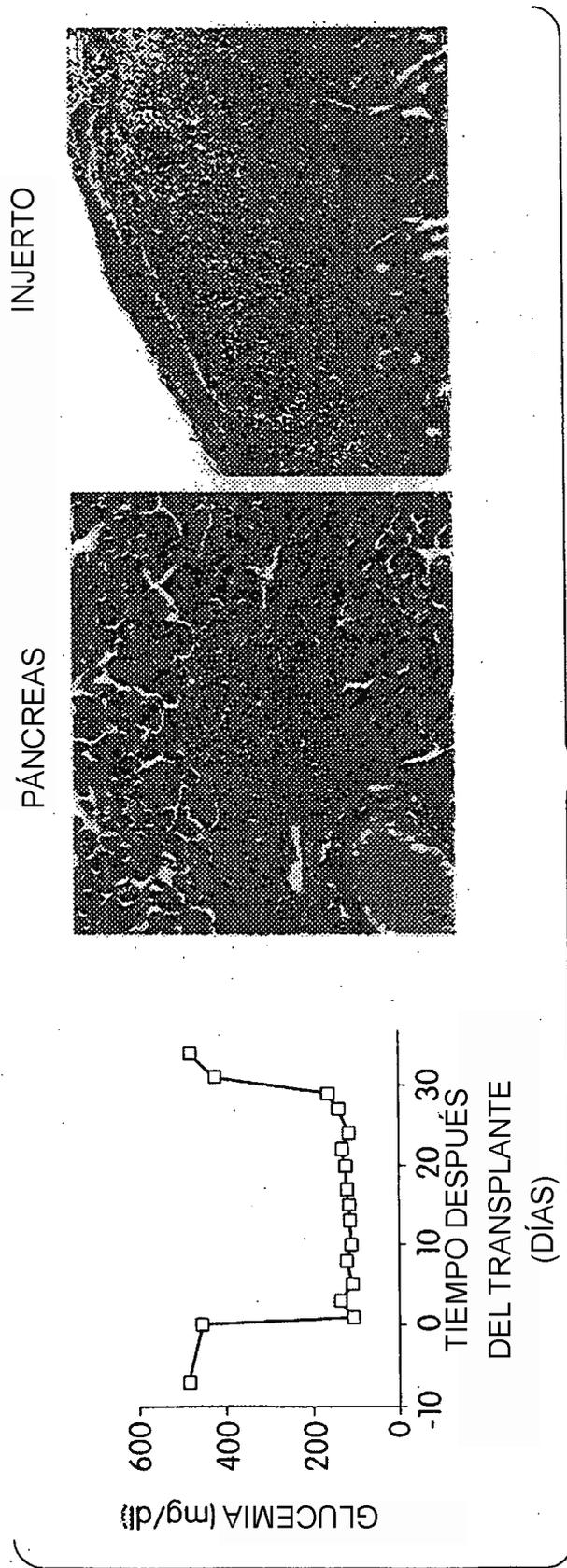


Fig. 1A

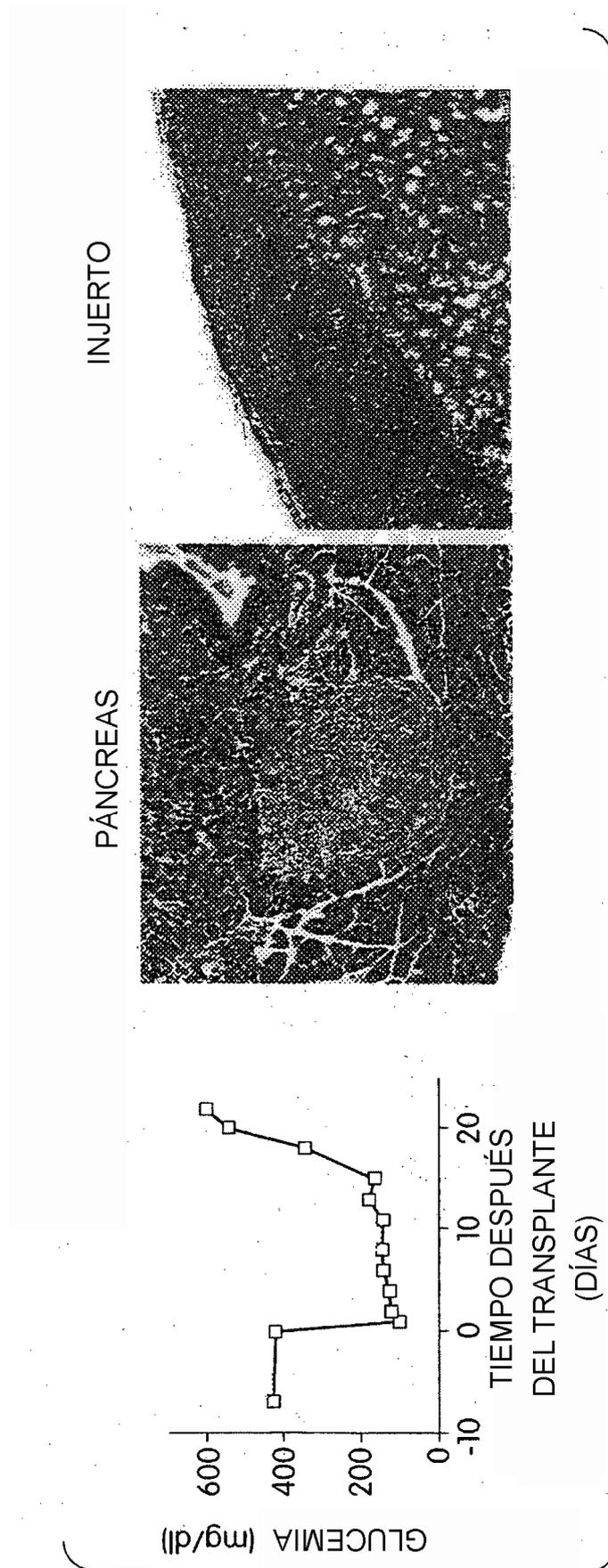


Fig. 1B

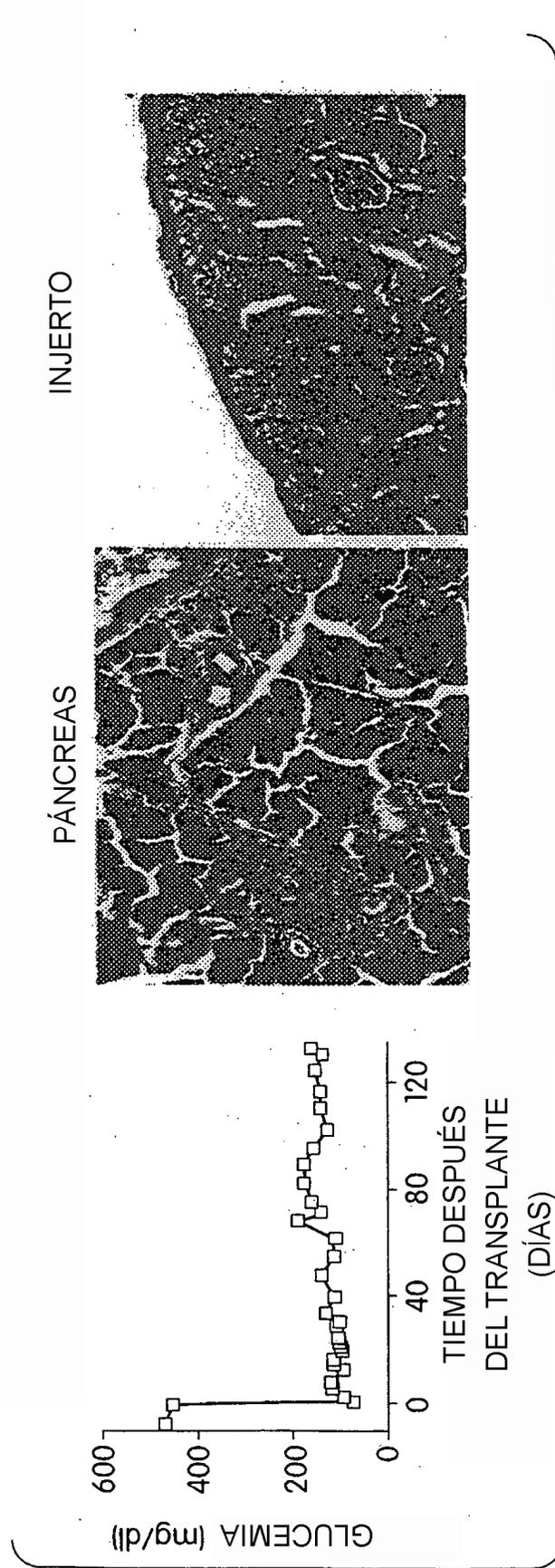


Fig. 1C

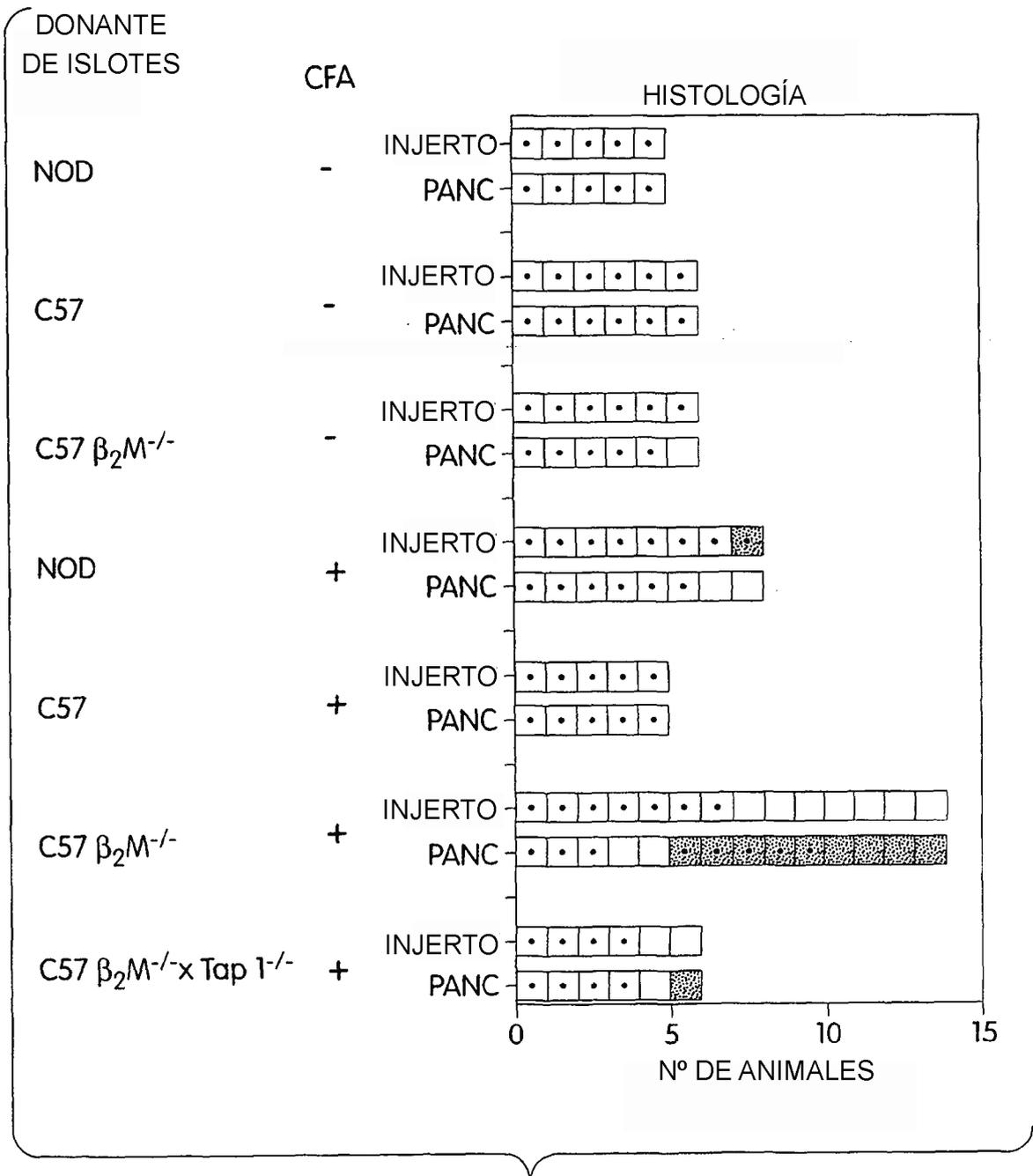


Fig. 2

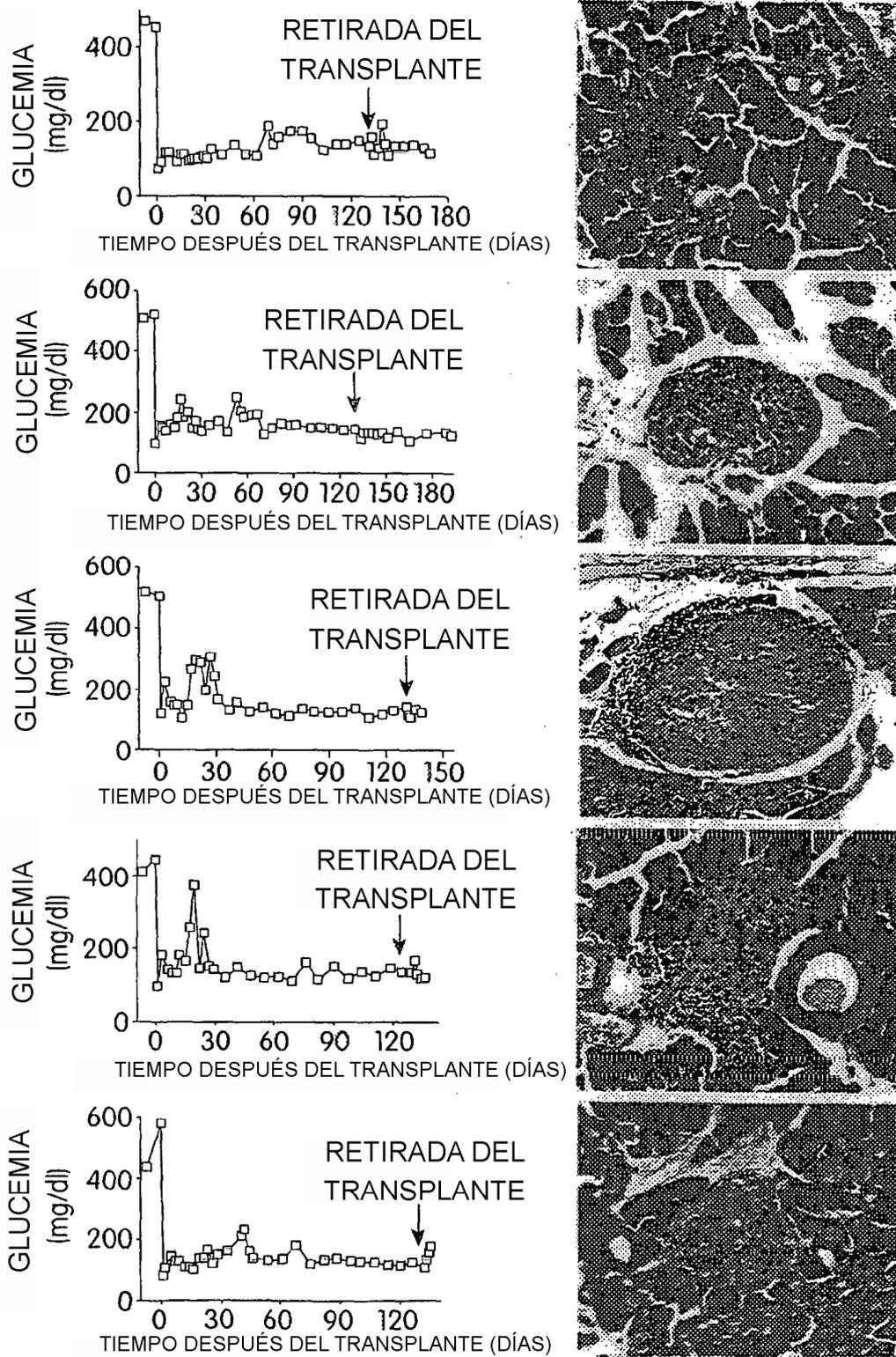


Fig. 3

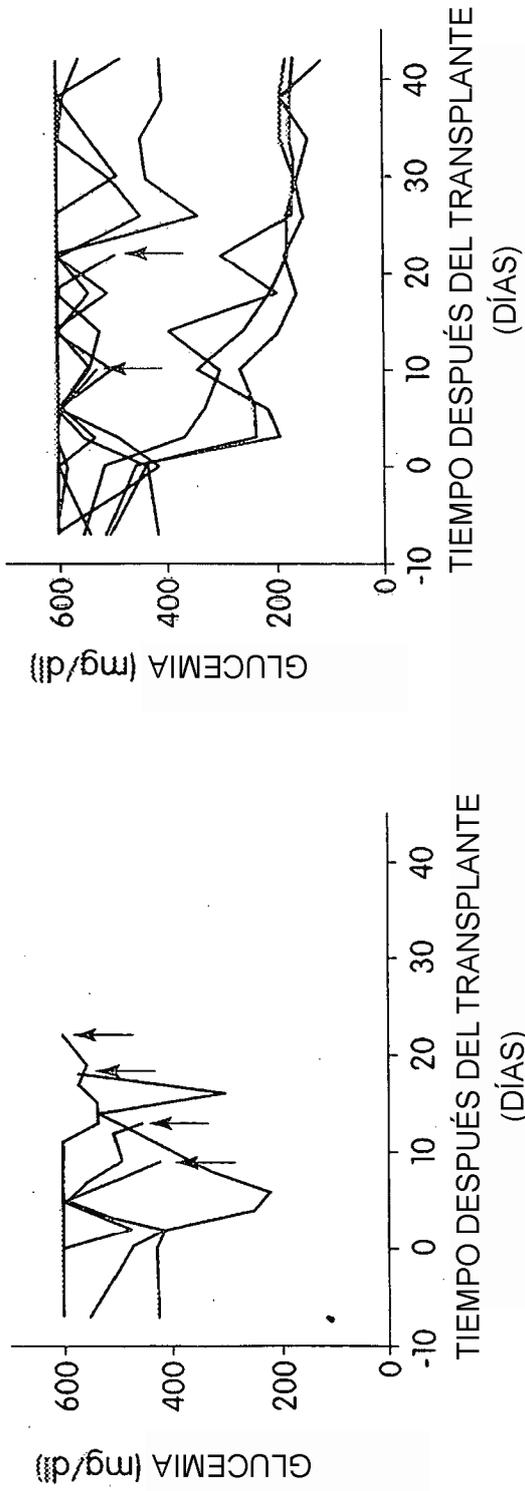


Fig. 4A

Fig. 4B

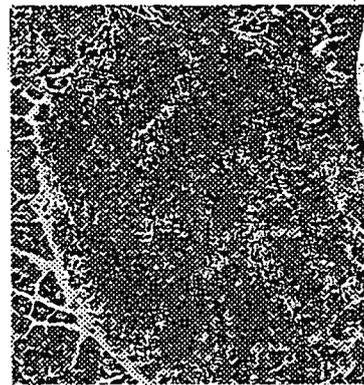


Fig. 4C

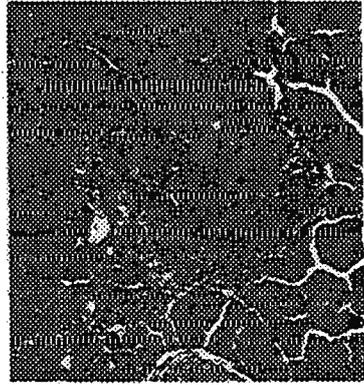


Fig. 4D



Fig. 4E

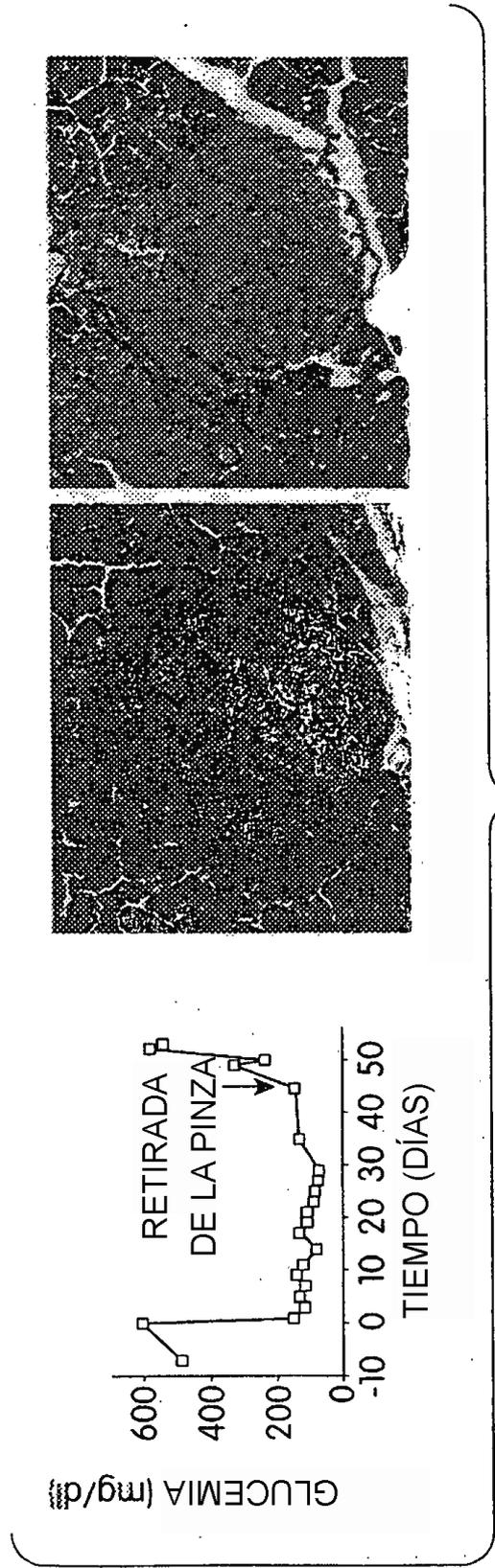


Fig. 5A

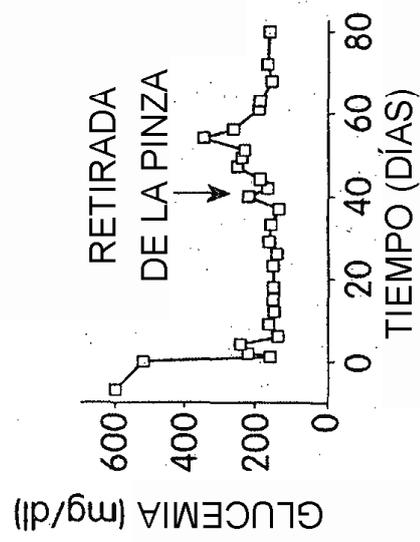
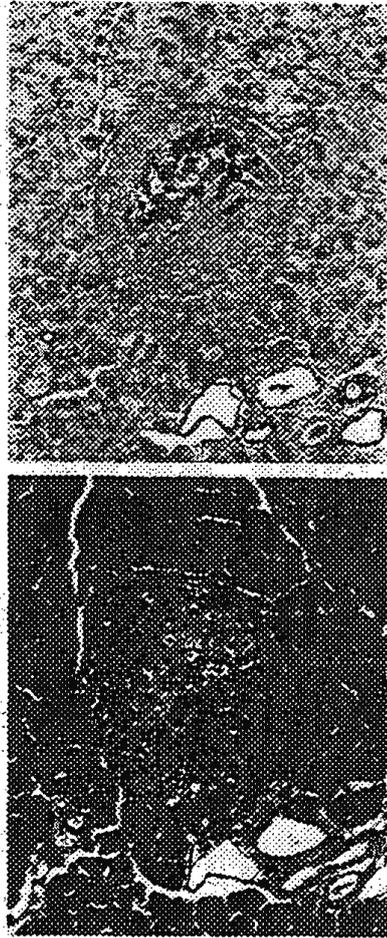


Fig. 5B

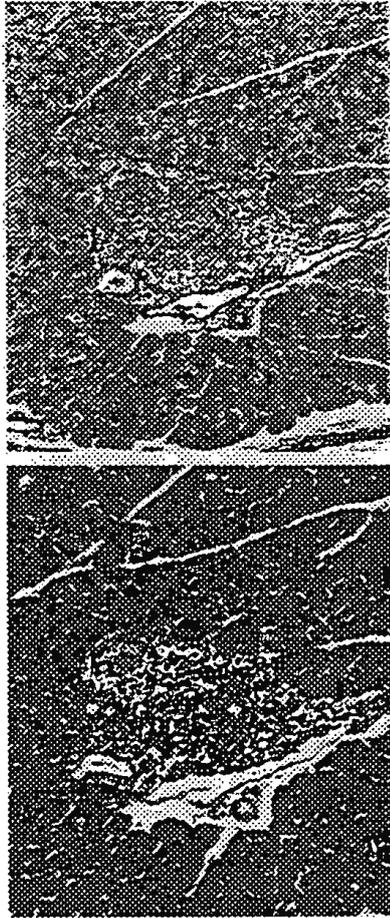
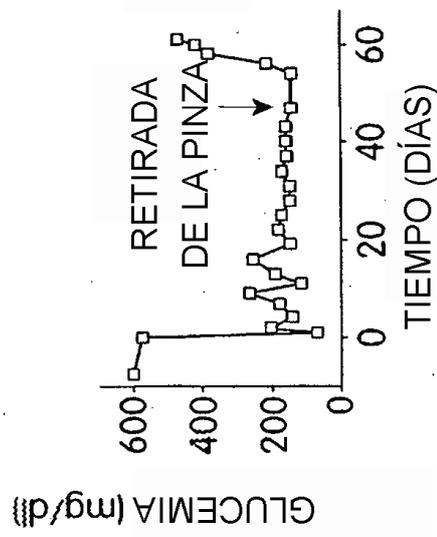


Fig. 5C

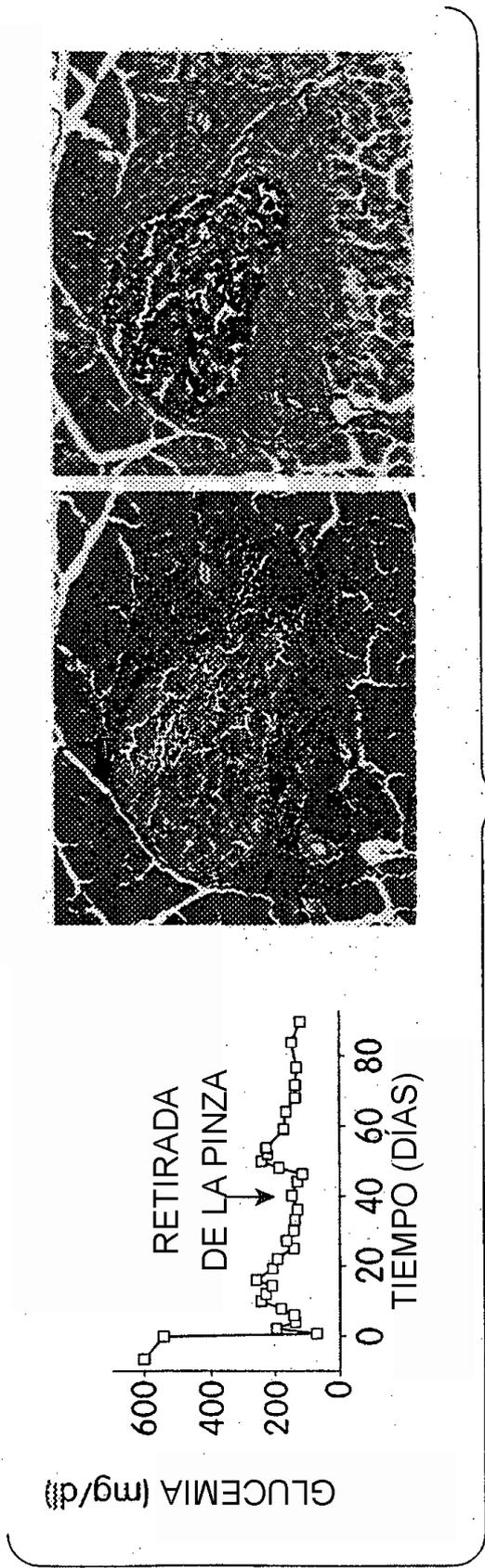


Fig. 5D

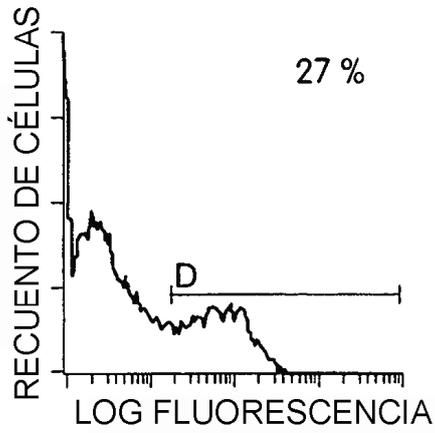


Fig. 6A

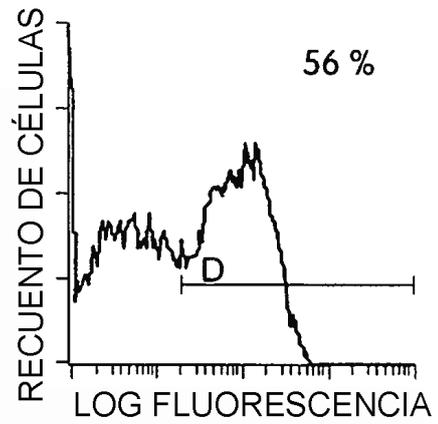


Fig. 6B

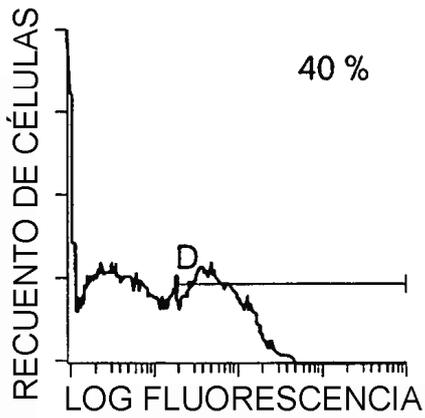


Fig. 6C

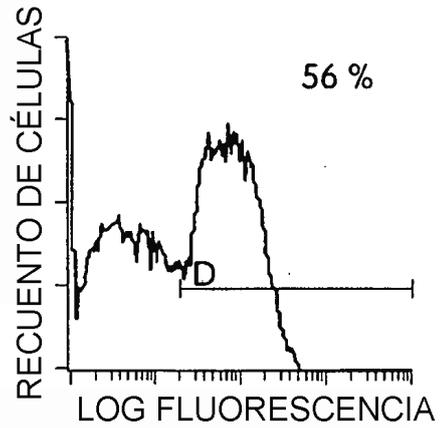


Fig. 6D

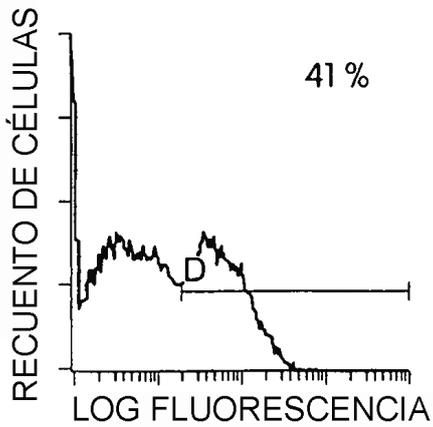


Fig. 6E

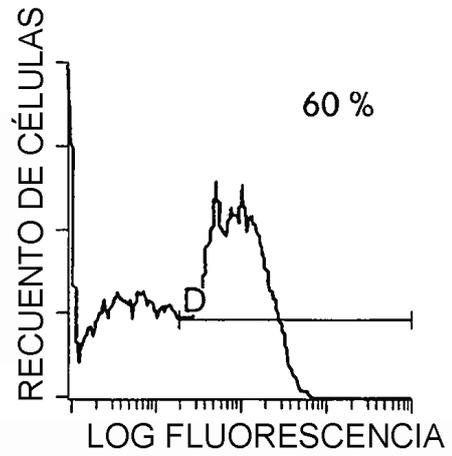


Fig. 6F