

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 214**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2008 E 08735191 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2134750**

54 Título: **La vacunación génica de consenso IG-P protege de inmunopatología dependiente de anticuerpos en enfermedad autoinmunitaria.**

30 Prioridad:

11.04.2007 US 911267 P

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

02.09.2016

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)

1111 Franklin Street, 12th Floor

Oakland, CA 94607, US y

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA (50.0%)

72 Inventor/es:

LA CAVA, ANTONIO;

HAHN, BEVRA, H.;

FILACI, GILBERTO;

FERRERA, FRANCESCA;

RIZZI, MARTA y

INDIVERI, FRANCESCO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 581 214 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

La vacunación génica de consenso IG-P protege de inmunopatología dependiente de anticuerpos en enfermedad autoinmunitaria.

Campo técnico

- 5 La invención se refiere a métodos y composiciones útiles para tratar enfermedades y trastornos autoinmunitarios. En un aspecto, la invención proporciona construcciones genéticas y polipéptidos y métodos para tratar lupus eritematoso sistémico (LES).

Antecedentes

- 10 La presencia de hipergammaglobulinemia con frecuencia se asocia a trastornos inflamatorios crónicos y se observa comúnmente en el lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por múltiples anticuerpos (Ab) para antígenos propios que pueden formar inmunocomplejos que se depositan en el riñón, un procedimiento que conduce a pérdida de la función renal.

- 15 Los ratones (NZB x NZW)_{F1} (NZB/W _{F1}) desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmunitaria sistémica que se parece bastante a LES humano. Estos animales desarrollan auto-Ab en suero para diversos Ag propios incluyendo ADN(ds) bicatenario, cromatina e histonas, y mueren de fallo renal secundario a la deposición de Ab patogénico e inmunocomplejos en los glomérulos del riñón. Aunque las células B son cruciales para el desarrollo de LES y la deficiencia genética de estos linfocitos puede proteger de lupus, las células T son igualmente importantes en la patogénesis de la enfermedad. En particular, las células colaboradoras T (Th) en LES pueden reconocer determinantes de células T dentro de idiotipos de auto-Ab y proporcionan ayuda a las células B para la producción de auto-Ab. Sin embargo, los elevados niveles de IgG policlonal en LES representan un componente patogénico principal de la enfermedad que contribuye altamente tanto a su morbilidad como mortalidad.
- 20

Resumen

- 25 Una producción aumentada de IgG policlonal (hipergammaglobulinemia) y una perturbación de las respuestas inmunitarias humorales son características importantes del lupus eritematoso sistémico (LES). De manera similar a los seres humanos, los ratones con predisposición a lupus (NZB x NZW)_{F1} (NZB/W _{F1}) hembra presentan niveles aumentados en suero de IgG que pueden formar inmunocomplejos cuando son reactivos para antígeno propio. Puesto que esos inmunocomplejos se pueden depositar en el riñón y causar glomerulonefritis - una causa principal de mortalidad en LES - una reducción de la producción de IgG probablemente beneficiaría el pronóstico de LES. La invención demuestra que la transferencia de células B somática de un minigen que codifica una secuencia de consenso de determinantes de células T en IgG de murina puede presentar una producción elevada sostenida de IgG ratones NZB/W _{F1}, con protección resultante de enfermedad renal acelerada y posterior supervivencia aumentada de los animales.
- 30

- 35 El mecanismo implicado en la protección de hipergammaglobulinemia incluye una extensión de células T CD8⁺CD28⁻ productoras de TGFβ que suprime la estimulación específica del antígeno de células T CD4⁺ de una manera independiente del contacto de la célula. De manera significativa, la transferencia adoptiva de células T CD8⁺CD28⁻ de ratones protegidos con minigenes en ratones NZB/W _{F1} con hipergammaglobulinemia también protege del desarrollo de enfermedad renal. Estos datos indican la posibilidad de inducción a base de minigenes de circuitos inmunorreguladores que puedan retrasar el desarrollo de nefritis lúpica murina suprimiendo la hipergammaglobulinemia.

- 40 La invención demuestra que la hipergammaglobulinemia y posterior enfermedad renal acelerada puede ser suprimida en un modelo animal de LES (por ej., ratones NZB/W _{F1}) por células T CD8⁺ inducidas por minigenes Ig que hacen las células T CD4⁺ hiposensibles a estimulación antigénica, produciendo así inhibición de enfermedad renal y posterior supervivencia aumentada de los ratones. La materia de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En particular, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión, en el que el polipéptido de fusión comprende un antígeno propio ligado de manera operable a una región Fc de un anticuerpo, en el que el antígeno propio es pCons SEC ID N°: 2. Además, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido. En un aspecto más, la invención se refiere a dicho polinucleótido para uso en la prevención o tratamiento de lupus eritematoso sistémico induciendo inmunidad tolerogénica en un individuo, en el que el polinucleótido es para expresión en el individuo. Por otra parte, la invención se refiere a un polipéptido de fusión como se define en las presentes reivindicaciones y a una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido de fusión. Finalmente, la invención se refiere a dicho polipéptido de fusión para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario para reprimir una respuesta inmunitaria a un antígeno propio, en particular a un antígeno propio que comprende SEC ID N°: 2, en el que el trastorno autoinmunitario es lupus eritematoso sistémico.
- 45
- 50

55 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Mapas de minigenes, transcripciones y productos génicos. a. Representación esquemática de

construcciones que codifican hlgG₁ (Ig sólo, plg [parte superior]; en asociación con pCons, plgCons [medio] o en asociación con pNeg, plgNeg [fondo]). b. RT-PCR en ARN extraído de células COS-7 transfectadas con los diferentes minigenes (plg, plgCons, plgNeg). El tamaño molecular esperado se marca a la izquierda como "minigen". MPM, marcador de peso molecular. c. Método Western de proteínas de fusión de peso molecular esperado en lisados de células COS-7 transfectadas con los diferentes minigenes. MPM, marcador de peso molecular. d. Respuestas proliferativas de una estirpe (T) de células T específicas de pCons procedente de ratones inmunizados con pCons a células B transfectadas con plg (B/plg) o plgCons (B/plgCons); P<0,004. La especificidad se indica por ausencia de proliferación de células B transfectadas con plgCons cuando se cultivan solas (B/plgCons) y por proliferación óptima de la estirpe de células T cuando se co-cultivan con células B y péptido pCons pero no cuando se co-cultivan con péptido pNeg. Representativo de seis experimentos.

Figura 2. El tratamiento de ratones NZB/W F₁ con plgCons se asocia con el desarrollo retrasado de proteinuria y la supervivencia aumentada de los animales tratados. Cada ratón recibió 6x10⁵ células B transfectadas con el minigen relativo como se describe en los Materiales y Métodos. El grupo de control de PBS sólo recibió PBS. a. Proteinuria cinco semanas después de tratamiento, plgCons frente a plg o plgNeg, P<0,01. Diez semanas después de tratamiento, plgCons frente a plg o plgNeg, P<0,0001 y P<0,0002, respectivamente. b. Se vigiló en los ratones la supervivencia hasta 50 semanas después de transferencia de células B transfectadas con plásmidos plg, plgCons, plgNeg o pCMV. Un grupo de control de ratones recibió sólo PBS. P<0,004 por análisis de Kaplan Meyer.

Figura 3. Histología de los riñones de los ratones usados en el estudio. a. La coloración con hematoxilina-eosina muestra que los ratones tratados con plgCons presentan una implicación glomerular reducida y arquitectura de tejido conservada comparado con ratones tratados con plg o plgNeg. b-c. La coloración por inmunofluorescencia indica precipitación de hlgG (b) y mlgG (c) aumentada en los glomérulos de ratones tratados con plg y plgNeg cuando se compara con ratones tratados con plgCons. Aumento: 200X. d. Puntuación de actividad glomerular acumulativa (PAG) y puntuación de actividad tubulointerstitial (PATI) de riñones de ratones tratados con plg (izquierda), plgNeg (medio) y plgCons (derecha). P<0,0001 para tanto PAG como PATI.

Figura 4. Respuestas anti-Ig después de vacunación con minigenes. Media ± DE de IgG anti-humano (a) e IgG anti-ratón (b) respuestas en ratones tratados y controles (n = 6 a 12 por grupo) a las 5 y 10 semanas después de tratamiento. P<0,0001 a tanto 5 como 10 semanas.

Figura 5. Respuestas de células T a vacunación con minigenes. Se midieron las respuestas de células T específicas de Ag a 4 (a, b) y 8 (c, d) semanas después de tratamiento. El índice de estimulación medio (±DE) se indica sobre el eje y (4-9 ratones por grupo). Fondo cpm: 0,5-2,0 x 10³. a y c, proliferación en presencia de péptidos (eje x) sólo. b y d, proliferación en presencia de péptidos (eje x) más IL-2. P<0,07 a las 4 semanas; P<0,05 a las 8 semanas.

Figura 6. Análisis de citometría de flujo en células mononucleares periféricas dos semanas después de vacunación con minigenes. a. Expresión superficial de CD8 en células T de CD3⁺ de ratones tratados con plg (izquierda), plgNeg (centro) y plgCons (derecha) indica una expansión de células CD8⁺ en ratones plgCons comparado con ratones tratados con plg- y plgNeg. b-c. En el compartimento de células T (regulado) CD8⁺, las células CD8⁺CD28⁻ se extienden en ratones plgCons pero no en ratones de control; P<0,005 (b), P<0,001 (c). d. La coloración para TGF-beta intracelular en linfocitos CD8⁺CD28⁻ regulados de ratones tratados con plgCons (negro) y de ratones tratados con plgNeg (gris) indica la expresión de esta citocina en células T del grupo plgCons pero no en el grupo plgNeg de ratones. Representativo de experimentos por duplicado en ratones individuales (n=5/grupo).

Figura 7. Actividad in vitro e in vivo de linfocitos CD8⁺CD28⁻ de ratones tratados con plgCons. a. Las células CD8⁺CD28⁻ suprimen in vitro la proliferación de células T CD4⁺ (dosis escalar de relación efector a diana); P<0,02 frente a plg o plgNeg; no significativo a relación 1:1. b. La transferencia in vivo de células T CD8⁺CD28⁻ purificadas de ratones tratados con plgCons retrasa la proteinuria en ratones con hipergammaglobulinemia. 1x10⁷ células T CD8⁺CD28⁻ de ratones tratados con plgCons (●) (n = 6) o plgNeg (○) (n = 8) se transformaron en ratones NZB/ W F₁ hembra con IgG de suero >10 mg/ml y se vigiló en los receptores cada dos semanas el desarrollo de proteinuria (≥100 mg/dl). P<0,001 por análisis de Kaplan Meyer.

Descripción detallada

Las descripciones ejemplares proporcionadas en la presente memoria son ejemplares y explicatorias sólo y no son restrictivas de la invención, como se reivindica. Por otra parte, la invención no está limitada a las realizaciones particulares descritas, ya que las mismas pueden variar, por supuesto. Además, la terminología usada para describir realizaciones particulares no está destinada a ser limitante.

Con respecto a los intervalos de los valores, la invención incluye cada uno de los valores que intervienen entre los

límites superior e inferior del intervalo a al menos un décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Además, la invención incluye cualquier otro valor que intervenga indicado. Por otra parte, la invención también incluye intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites superior e inferior del intervalo, a menos que se excluya de manera específica del intervalo indicado.

5 A menos que se defina de otro modo, los significados de todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria son los entendidos comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Un experto en la materia también apreciará que cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se puede usar también para llevar a la práctica o ensayar la invención.

10 Se debe observar que, como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "o" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Así, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido relacionado" incluye una pluralidad de dichos polipéptidos y la referencia a "el agente" incluye referencia a uno o más agentes y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia, etcétera.

15 "Células T CD8+" representa una clase de linfocitos T caracterizados por la posesión del marcador de superficie de células CD8. Las células T CD8+ son "las CTL" restringidas de Clase I MHC o "células T supresoras".

"Células T CD4+" representa una clase de linfocitos T caracterizada por la posesión del marcador de superficie de células CD4. Las células T CD4+ son linfocitos T restringidos de Clase II MHC. Hay dos tipos de células T CD4+ referidas como "células T colaboradoras" de tipo 1 o tipo 2.

20 Se genera una respuesta inmunitaria a un antígeno por la interacción del antígeno con las células del sistema inmunitario. La respuesta inmunitaria resultante puede distinguirse ampliamente en respuestas inmunitarias humorales o mediadas por células (caracterizadas tradicionalmente por anticuerpo y mecanismos de efector celular de protección, respectivamente). Estas categorías de respuesta han sido denominadas respuestas de tipo Th1 (respuesta mediada por las células) y respuestas inmunitarias de tipo Th2 (respuesta humoral). Las respuestas inmunitarias de tipo Th1 se pueden caracterizar por la generación de las CTL restringidas de haplotipo, específicas de antígeno y respuestas de células asesinas naturales. En los ratones, las respuestas de tipo Th1 se caracterizan con frecuencia por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el ser humano éstas corresponden a anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunitarias de tipo Th2 se caracterizan por la generación de un amplio intervalo de isotipos de inmunoglobulina incluyendo en IgG1, IgA e IgM de ratones.

30 Una fuerza impulsora detrás del desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunitarias son las citocinas, una serie de mensajeros de proteínas identificados que sirven para ayudar a las células del sistema inmunitario y dirigir la eventual respuesta inmunitaria a una respuesta de Th1 o Th2. Así, los altos niveles de citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células al antígeno determinado, mientras que los niveles altos de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunitarias humorales al antígeno. Es importante recordar que la distinción de las respuestas inmunitarias de tipo Th1 y Th2 no es absoluta. Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 se asocian a la producción de las citocinas INF- γ e IL-2 por linfocitos T. Otras citocinas asociadas directamente con frecuencia a la inducción de respuestas inmunitarias de tipo Th1 no son producidas por células T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo Th2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y factor de necrosis tumoral- β (TNF- β).

40 Una diferencia entre células B y células T es cómo el antígeno reconoce las células B y T. Las células B reconocen antígeno en su forma natural. Por ejemplo, reconocen el antígeno en la sangre o linfa usando dominios de reconocimiento de antígeno ligado a membrana que comprenden inmunoglobulina ligada. Las células T, tales como las células T colaboradoras, reconocen antígeno en una forma tratada, como un fragmento peptídico presentado por una molécula MHC de células que presentan antígeno al receptor de células T.

45 Cuando una célula B reconoce un antígeno, la célula B ingiere por un procedimiento de endocitosis el antígeno en asociación con el dominio de inmunoglobulina que reconoce el antígeno. La célula B trata entonces el antígeno y une partes del antígeno a una proteína MHC. Este complejo se mueve al exterior de la membrana celular, donde puede ser reconocido por un linfocito T, que es compatible con estructuras similares sobre la membrana celular de un linfocito B. Si las estructuras de la célula B y la célula T coinciden, el linfocito T activa el linfocito B, que produce anticuerpos contra los fragmentos de antígeno presentados en su superficie.

50 La mayoría de los antígenos son T-dependientes, así las células colaboradoras T CD4+ requerían máxima producción de anticuerpos. Cuando una célula B trata y presenta un antígeno apropiado a una célula T, la célula colaboradora T segrega citocinas que activan la célula B. Estas citocinas desencadenan la proliferación de células B y la diferenciación en células plasmáticas y la producción de anticuerpo. Las células T supresoras que comprenden CD8, por otra parte, reducen la producción de anticuerpo. Las células T supresoras son esenciales en la regulación de respuestas inmunitarias en particular cuando se relacionan con antígenos propios.

55 El término "polipéptido Fc" como se usa en la presente memoria incluye formas naturales y de muteína de polipéptidos formados de la región Fc de un anticuerpo que comprende cualquiera o todos los dominios CH de la

región Fc. Polipéptidos Fc ejemplares comprenden un polipéptido Fc procedente de un anticuerpo IgG1 humano. Como una alternativa, se prepara un polipéptido de fusión usando polipéptidos procedentes de inmunoglobulinas ligados de manera operable a un polipéptido antigénico (por ej., pCons). La preparación de polipéptidos de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a varias porciones de polipéptidos derivados de anticuerpo (incluyendo el dominio Fc) se ha descrito, por ej., por Ashkenazi et al. (PNAS USA 88:10.535, 1.991); Byrn et al. (Nature 344:677, 1.990) y Hollenbaugh and Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Polypeptides", en Current Protocols in Immunology, Supl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11, 1.992). Tisch et al. (The Journal of Immunology, The Williams and Wilkins co. Baltimore, vol. 166, n° 3, Enero de 2.001, págs. 2.122-2.132) describen una construcción génica que codifica una proteína de fusión que consta de un fragmento de ácido glutámico descarboxilasa 65 (GAD65) ligada a IgGFc e IL-4.

Una construcción Fc de fusión o minigen comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido/polipéptido de fusión de Fc. Dicho minigen puede ser insertado en un vector de expresión apropiado. El polipéptido/polipéptidos de fusión Fc se expresan en células huésped transformadas o transfectadas con el vector de expresión recombinante o polinucleótido recombinante que codifica el polipéptido de fusión y se permite que se ensamblen y sean procesados. Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud de patente internacional PCT WO 93/10151, es un polipéptido de cadena única que se extiende desde la región bisagra N-terminal al C-terminal natural de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente de EE.UU. N° 5.457.035 y en Baum et al., (EMBO J. 13:3.992, 1.994).

La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia Fc natural presentada en la patente internacional WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 ha sido cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. Los polipéptidos de fusión ya descritos que comprenden restos Fc ofrecen la ventaja de ser tratados por APC de manera que se presenten apropiados por APC. En otras realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden ser sustituidos por la porción variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo. Un "polinucleótido" se refiere en general a cualquier polirribonucleótido (ARN) o polidesoxirribonucleótido (ADN), que puede ser ARN o ADN no modificado o modificado. Los polinucleótidos incluyen, sin limitación, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Los polinucleótidos también incluyen moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario, o más típicamente, bicatenario o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, "polinucleótido" se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Los polinucleótidos también incluyen ADNs o ARNs con una o más bases modificadas y los ADN o ARN con cadenas principales modificadas para estabilidad o por otras razones. Bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se puede realizar una variedad de modificaciones a ADN y ARN; así, "polinucleótido" abarca formas modificadas de manera química, de manera enzimática o de manera metabólica de polinucleótidos como se encuentran típicamente en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. Los oligonucleótidos son polinucleótidos relativamente cortos. Ejemplos de polinucleótidos usados en los métodos y las composiciones de la invención comprenden un polinucleótido que codifica un péptido con determinantes de células T en IgG de mamífero, por ej., IgG de murina o IgG humano, en particular el péptido de consenso pCons (FIEWNKLRFRQGLEW (SEC ID N°: 2), que une I-E^d y K^d). El péptido artificial pCons se basa en un algoritmo que define las secuencias de aminoácidos estimuladoras de células T de las regiones V_H de anticuerpos IgG de murina a ADN (Hahn et al., Arthritis & Rheumatism, John Wiley & Sons, Inc., US, vol. 44, n° 2, Febrero de 2.001, págs. 432-441). En un aspecto, el polinucleótido comprende la secuencia 5'-TTTATCGAGTGAATAAGCTGCGATTCGTCAGGGCCTGGAGTGG-3' (SEC ID N°: 1). Además, la invención describe un polinucleótido que codifica una variante o fragmento funcional del péptido de consenso pCons, por ej., una variante en la que 1, 2 ó 3 aminoácidos de la secuencia pCons han sido sustituidos por diferentes aminoácidos o un fragmento funcional de pCons que comprende 10, 11, 12, 13 ó 14 aminoácidos consecutivos de pCons o una variante de los mismos.

Un "polipéptido" se refiere a cualquier polipéptido que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. Un "polipéptido" se refiere a ambas cadenas cortas, referido comúnmente como péptidos, oligopéptidos u oligómeros y a cadenas más largas, referidas en general como proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los codificados normalmente por un codón. Preferiblemente, los polipéptidos comprenden un péptido con determinantes de células T en IgG de mamífero, por ej., IgG de murina o IgG humano. Un polipéptido ejemplar comprende pCons (SEC ID N°: 2). Además, la invención describe una variante o fragmento funcional del péptido de consenso pCons, por ej., una variante en la que 1, 2 ó 3 aminoácidos de la secuencia pCons han sido sustituidos por diferentes aminoácidos. Este polipéptido presenta preferiblemente una longitud de al menos 10, por ej., al menos 15 aminoácidos y hasta 100, por ej., hasta 20 aminoácidos. En otro aspecto, un polipéptido pCons de SEC ID N°:2 o una variante o fragmento del mismo puede incluir uno o más D-aminoácidos. Los D-aminoácidos (en contraste con L-aminoácidos) aumentan la bioestabilidad y reducen la degradación por enzimas.

Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas por procedimientos naturales, tales como tratamiento postraduccional o por técnicas de modificación química que son conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están descritas en la bibliografía y son conocidas en la técnica. Pueden tener lugar modificaciones en

cualquier parte de un polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas secundarias de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Dichas modificaciones pueden estar presentes para grados iguales o variables en varios sitios en un polipéptido determinado. También, un polipéptido determinado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados como resultado de ubiquitinación y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden proceder de procedimientos naturales postraduccionales o se pueden preparar por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, biotinilación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto heme, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclización, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, tratamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación. El polipéptido útil en los métodos y composiciones de la invención comprende el polipéptido pCons presentado en la SEC ID N°: 2.

La invención proporciona antígenos pCons que son inmunoprotectores por generación de inmunotolerancia. Dichos antígenos se pueden suministrar en una serie de maneras al huésped de manera que se estimule una respuesta inmunitaria protectora tolerogénica. Por ejemplo, el antígeno propio (por ej., pCons) se puede suministrar como un polipéptido de fusión. El polipéptido de fusión comprende un antígeno propio ligado a un polipéptido heterólogo o molécula pequeña. En particular, la presente invención se refiere a un polipéptido de fusión que comprende un primer dominio que comprende un antígeno propio que es una secuencia conservada encontrada en determinantes de células T en la región FR1/CDR1 de V_H de anticuerpos IgG humano y murino, en el que el antígeno propio es la SEC ID N°: 2 y un segundo dominio que comprende un polipéptido heterólogo o molécula pequeña. Típicamente, el polipéptido heterólogo o molécula pequeña ayuda en la absorción, tratamiento o suministro del antígeno propio. Los polipéptidos heterólogos ejemplares incluyen polipéptidos Fc, dominios de transducción de proteínas (por ej., TAT), u otro polipéptido adyuvante conocido en la técnica. Ventajosamente, la invención demuestra que el antígeno pCons suministrado por presentación somática de células B proporciona respuesta tolerogénica mejorada comparado con inyección directa.

Los antígenos de la presente invención pueden ser administrados a un individuo con necesidad de los mismos, por ejemplo como una vacuna de polinucleótidos, una vacuna de polipéptidos o una vacuna viva.

La invención proporciona un minigen que comprende el antígeno propio pCons en asociación operable con una secuencia codificadora de polipéptidos Fc. El minigen se usa para suministrar el antígeno al sistema inmunitario de un individuo.

Alternativamente, los antígenos se pueden suministrar por administración directa del polipéptido a un individuo con necesidad del mismo.

Los antígenos pueden ser suministrados mediante un vector atenuado o célula lograda genéticamente comprendiendo un minigen de la invención que da como resultado la presentación del antígeno vía clase I y/o II MHC. El término "atenuado", cuando se usa con respecto a una bacteria o virus, significa que el vector (por ejemplo, bacteria o virus) ha perdido algo o toda su capacidad para proliferar y/o ocasionar enfermedad u otro efecto adverso cuando la bacteria infecta a un organismo. Por ejemplo, una bacteria "atenuada" puede ser incapaz de replicarse en absoluto o puede limitarse a uno o algunos ciclos de replicación. Alternativamente o adicionalmente, una bacteria "atenuada" podía presentar una o más mutaciones en un gen o genes que estén implicados en patogenicidad de las bacterias. Se conocen muchos genes, puntos u operones, mutaciones en que dará como resultado una bacteria atenuada. Los ejemplos de bacterias atenuadas usadas como vacunas vivas incluyen *S. typhi* que soporta una mutación en su gen galE o htrA y *V. cholerae* que soporta mutaciones en su gen ctxA. El suministro de pCons, por ejemplo, en un vector atenuado lograda genéticamente daría como resultado la endocitosis y la presentación de pCons en asociación con MHC de manera que se supriman de manera apropiada las células T como se describió anteriormente.

Los microorganismos que se usan para expresar los PCON para uso en composiciones inmunoprotectoras incluyen, sin limitación, *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Helicobacter* sp., *Gastrospirillum* sp., *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus gordonii*, *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp. y *Escherichia coli* (véanse por ej., las Patentes de EE.UU. N° 5.858.352 y 6.051.416 y Levine et al., en "New Generation Vaccines Second Edition" ed. Levine et al., Marcel Dekker, Inc. págs 351-361 (1.997), Levine et al., en "New Generation Vaccines Second Edition" ed. Levine et al., Marcel Dekker, Inc. págs 437-446 (1.997), Butters et al., en "New Generation Vaccines Second Edition" ed. Levine et al., Marcel Dekker, Inc. págs 379-385 (1.997) y Fennelly et al., en "New Generation Vaccines Second Edition" ed. Levine et al., Marcel Dekker, Inc. págs 363-377 (1.997)). Por ejemplo, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, *Gastrospirillum hominus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Enterococcus faecalis*. *Escherichia coli* incluye

pero no se limita a cepas entero-tóxicas, entero-hemorrágicas, entero-invasivas, entero-patogénicas u otras cepas puede ser usadas en la invención.

5 Alternativamente, o en adición a, se puede usar un vector atenuado no bacteriano tal como vectores víricos deficientes de replicación que comprenden un minigen de la invención en los métodos y composiciones de la invención. Dichos vectores víricos útiles en los métodos y las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, Vacuna, Avipox, Adenovirus, AAV, virus Vacuna NYVAC, cepa vacuna modificada Ankara (MVA), virus del bosque Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana y virus del herpes.

10 En aún un aspecto más, las células que presentan antígeno autólogo o alogénico (por ejemplo, células B) pueden ser logradas genéticamente usando un vector de expresión adecuado (incluyendo vectores víricos) ex vivo tal que pCons se exprese dentro de la célula en asociación con un polipéptido Fc para facilitar el tratamiento y la presentación por APC.

15 Ejemplos de vectores víricos adecuados incluyen vectores víricos del herpes simple, vectores vacuna o alfa-virus y retrovirus, incluyendo lentivirus, adenovirus y virus adeno-asociados. En una realización, estos vectores son vectores víricos de replicación defectuosa. Las técnicas de transferencia de genes que usan estos virus son conocidas por los expertos en la materia. Los vectores retrovíricos, por ejemplo, se pueden usar para integrar de manera estable el polinucleótido de la invención en el genoma huésped, aunque dicha recombinación puede no ser aconsejable. Los vectores de adenovirus de replicación defectuosa por el contrario siguen siendo episomales y por lo tanto permiten la expresión transitoria.

20 En una realización específica, el adenovirus usado como un vector vivo es un adenovirus humano o de simio de replicación defectuosa. Típicamente estos virus contienen una supresión E1 y pueden cultivarse en estirpes celulares que se transforman con un gen E1. Los adenovirus de simio adecuados son, por ejemplo, virus aislados de Chimpancé. Los ejemplos de virus adecuados para uso en la presente invención incluyen C68 (también conocido como Pan 9) (Patente de EE.UU. N° 6.083.716) y Pan 5, 6 y Pan 7 (Patente Internacional WO 03/046124). Así, estos vectores se pueden manipular para insertar un polinucleótido heterólogo codificador de un antígeno o minigen de manera que se exprese el producto. La formulación de uso y fabricación de dichos vectores adenovíricos recombinantes se explica con detalle en la Patente Internacional WO 03/046142.

25 La invención proporciona una composición y vacuna inmunogénica que usa un método para facilitar que suministre antígenos inmunogénicos pCons y facilita el tratamiento de manera que proporcione una presentación antigénica telerogénica similar al tratamiento natural. Se suministran antígenos pCons en uno o más vectores capaces de inducir presentación vía Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) Clase II y Clase I.

El vector de suministro atenuado libera antígenos potencialmente inmunoprotectores que comprenden un polipéptido Fc unido de manera operable a un antígeno propio (por ej., pCons) en el citoplasma de la célula huésped, después de que se han tratado y presentado al sistema inmunitario. Tales antígenos se presentan al sistema inmunitario vía moléculas de clase I de MHC, dando como resultado el cebado de células T CD8 incluyendo células T supresoras.

35 La invención demuestra que la transferencia de minigenes de péptidos de consenso IgG somática puede reducir hipergammaglobulinemia y retrasar la enfermedad renal en modelos animales reconocidos de LES (por ej., ratones NZB/W F₁). La producción sostenida de IgG que causa sobrecarga de Ig (un síntoma de LES) puede ser suprimida por células T CD8⁺. Cabe destacar, la supresión de respuestas de células T CD4⁺ por supresores de CD8⁺CD28⁻ inducidos por minigenes presenta analogías interesantes con observaciones previas por Suciú-Foca y colaboradores, donde las células T CD8⁺CD28⁻ específicas de Ag restringidas de clase I de MHC fueron capaces de suprimir respuestas proliferativas de células T CD4⁺ específicas de Ag vía mecanismos que incluían anergia en sus dianas. También, el hallazgo de un efecto protector de células T CD8⁺CD28⁻ en LES puede ser de interés en relación con los hallazgos previos de una correlación entre función deficiente de células supresoras T CD8⁺ y actividad de enfermedad en pacientes de LES.

45 El mecanismo de protección inducida por transferencia de minigenes somática de pCons difiere de lo que se observó cuando se administra pCons como péptido soluble para ratones NZB/W F₁. En esos experimentos, se observó una extensión de células que expresan Foxp3 que no se observa usando pCons como minigen. Las diferencias pueden estar relacionadas con el hecho de que los péptidos solubles in vivo han acelerado el catabolismo cuando se compara con la semivida de los productos codificados de vacunas génicas. También, la disponibilidad in vivo a largo plazo de pCons a APC y/o las células T supresoras proporcionadas por vacunación de minigenes conduce a respuesta prolongada o a una diferente manipulación para células inmunitarias. Por ejemplo, los minigenes podían producir disponibilidad de genes codificados dentro de la ruta endocítica (donde tiene lugar carga de moléculas de MHC) – de un modo similar a la manipulación de antígenos endógenos (Ag) – en vez de proporcionar absorción de Ag exógeno como para péptido soluble. Cualquier caso puede contribuir a los efectos protectores de minigen pCons, el estudio extiende la aplicabilidad de la vacunación de células B somáticas a nuevas posibilidades. La transferencia somática de los minigenes en tan poco como 70 células B se mostró que era eficaz en la inducción de inmunidad de células T protectoras contra el virus de la influenza.

La invención demuestra que la transferencia de minigenes de células B somáticas puede inducir respuestas

tolerogénicas protectoras en la autoinmunidad. Las implicaciones de esta memoria descriptiva indican nuevas posibilidades para la intervención con esta estrategia y sugiere que la inducción de supresor T CD8⁺ vía este método puede modular circuitos inmunoreguladores e hipergammaglobulinemia.

5 Una "vacuna" como se usa en la presente memoria se refiere a una composición de materia que comprende una molécula que, cuando se administra a un individuo, induce una reacción inmunitaria. En un aspecto, la reacción inmunitaria es una supresión de activación de células T en a un antígeno propio tal como PCons. Las vacunas pueden comprender moléculas de polinucleótido, moléculas de polipéptidos y moléculas de carbohidratos, así como derivados y combinaciones de cada uno, tales como glucoproteínas, lipoproteínas, conjugados de carbohidrato-proteína, fusiones entre dos o más polipéptidos o polinucleótidos y similares. Una vacuna puede comprender además un diluyente, un adyuvante, un portador o combinaciones de los mismos, como entenderían fácilmente los expertos en la materia.

10 Una vacuna puede estar constituida por componentes separados. Como se usa en la presente memoria, "componente separados" se refiere a una situación en la que la vacuna comprende dos vacunas discretas que se tienen que administrar por separado a un individuo. En ese sentido, una vacuna constituida por componentes separados se puede considerar como un estuche o un envase que comprende componentes de vacuna separados. Por ejemplo, en el contexto de la invención, un envase puede comprender una primera composición inmunogénica que comprende un vector bacteriano atenuado y una segunda composición antigénica que comprende un vector vírico atenuado que comprende los mismos antígenos propios o diferentes.

15 Una vacuna "induce" una reacción inmunitaria cuando el antígeno o los antígenos presentes en la vacuna producen que el individuo vacunado suba o reduzca una respuesta inmunitaria a ese antígeno o antígenos. El individuo vacunado generará una respuesta inmunitaria, como se pone de manifiesto por la activación de, o la reducción (supresión) del sistema inmunitario, que incluye la producción de células B específicas de antígeno de vacuna y la supresión de células T CD4⁺ con actividad aumentada de células T CD8⁺CD28⁺. La respuesta inmunitaria resultante se puede medir por varios métodos incluyendo ELISPOT, ELISA, ensayos de liberación de cromo, coloración de citocinas intracelulares, análisis FACS y coloración de tetrámero de MHC (para identificar células específicas de péptido). Un experto también puede usar estos métodos para medir una respuesta inmunitaria primaria o una respuesta inmunitaria secundaria.

20 Un "antígeno" es una sustancia capaz de generar una respuesta inmunitaria en un individuo expuesto al antígeno. Los antígenos son normalmente polipéptidos y son el foco de la respuesta inmunitaria del huésped. Un "epítipo" o "determinante antigénico" es esa parte de un antígeno al que se unen de manera específica células T y anticuerpos. Un antígeno puede contener epítopos múltiples. Los antígenos de la invención comprenden preferiblemente una secuencia conservada encontrada en determinantes de células T en la región FRI/CDR1 de VH de anticuerpos de IgG humano y murino. Un ejemplo de dicho antígeno incluye pCons que comprende la SEC ID N°: 2.

25 En varios aspectos de la invención, el antígeno propio (por ej., pCons) está conectado de manera operable a un polipéptido Fc u otro polipéptido heterólogo por uso de un ligador. En el caso de que se use un minigen, la región codificadora de antígeno propio y el polipéptido Fc se puede separar por una región codificadora del ligador. Típicamente un ligador será un resto ligador peptídico. La longitud del resto ligador se elige para optimizar la actividad biológica de expresión de un polipéptido de fusión de antígeno propio-Fc y se pueden determinar de manera empírica sin experimentación excesiva. El resto ligador puede ser un péptido entre aproximadamente uno y 30 restos de aminoácidos de longitud, típicamente entre aproximadamente dos y 15 restos aminoácido. Los restos ligadores ejemplares son:

30 --Gly-Gly-, GGGGS (SEC ID N°:3), (GGGGS)_n (SEC ID N°:4), GKSSGSGSESKE (SEC ID N°:5), GSTSGSGKSSEGKG (SEC ID N°:6), GSTSGSGKSSEGSGSTKG (SEC ID N°:7), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEC ID N°:8) o EGKSSGSGSESKEF (SEC ID N°:9). Los restos ligadores se describen, por ejemplo, en Huston, J. S., et al., PNAS 85: 5.879 (1.988), Whitlow, M., et al., Protein Engineering 6: 989 (1.993) y Newton, D. L., et al., Biochemistry 35: 545 (1.996). Otros ligadores peptídicos adecuados son los descritos en las Patentes de EE.UU. N° 4.751.180 y 4.935.233. Una secuencia de ADN que codifica un ligador peptídico deseado se puede insertar en medio y en el mismo marco de lectura como secuencias de ADN de la invención, usando cualquier técnica convencional adecuada. Por ejemplo, el ligador que codifica oligonucleótido sintetizado de manera química puede ser ligado entre una secuencia de polinucleótidos pCons y una secuencia de polinucleótidos Fc. En algunas realizaciones, un polipéptido de fusión puede comprender de dos a cuatro dominios de antígeno propio (por ej., pCONs) y polipéptido Fc, separados por ligadores peptídicos.

35 Cada composición tolerogénica (vacuna) que comprende un minigen de la invención expresado en un vector atenuado o célula inmunitaria autóloga o alogénica se administra, por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intranasal, inhalado o incluso por vía oral a un individuo mamífero. La composición/vacuna se puede administrar como parte de una estrategia cebador-reforzador homólogo o heterólogo.

40 Las vacunas atenuadas se pueden administrar directamente al mamífero. Las composiciones inmunogénicas y las vacunas obtenidas usando los métodos de la invención se pueden formular como composiciones farmacéuticas para administración de cualquier manera adecuada. Una vía de administración es oral. Otras vías de administración

primera inmunización que, basado en la previa experiencia, es un tiempo suficiente para que tenga lugar una respuesta inmunitaria.

Las composiciones inmunoprotectoras se administran típicamente a un individuo que es inmunológicamente original con respecto a PCONs. Normalmente, pueden ser suficientes 2-4 dosis de una composición inmunológica de la invención, sin embargo pueden requerirse dosis adicionales para conseguir un alto nivel de inmunidad. En general, la administración a cualquier individuo debería empezar previamente al primer signo de enfermedad.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de la composición proporcionada por la invención se determina usando procedimientos farmacéuticos clásicos en cultivos celulares o animales experimentales. Se puede determinar la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) usando procedimientos presentados en la presente memoria y los conocidos de otro modo por los expertos en la materia.

Un minigen de la descripción se puede envasar para uso en los laboratorios clínicos y de investigación. Por ejemplo, se puede proporcionar un minigen de la invención que comprende un polinucleótido que codifica un pCONs ligado de manera operable a un polipéptido Fc para uso en la generación de un vector de expresión. Alternativamente, se puede proporcionar el minigen en un vector de expresión. En otro aspecto más, el minigen puede ser proporcionado en un vector huésped para uso en inmunización de un individuo. La composición inmunogénica de la invención se puede envasar en paquetes, dispositivos dispensadores y estuches para administrar vacunas genéticas a un mamífero. Por ejemplo, se proporcionan paquetes o dispositivos dispensadores que contienen una o más formas farmacéuticas unitarias. Típicamente, las instrucciones para administración de los compuestos se proporcionarán con el envase, junto con una indicación adecuada en la etiqueta de que el compuesto es adecuado para tratamiento de una afección indicada.

Los siguientes ejemplos específicos se destinan a ser ilustrativos y no limitantes. Los expertos en la materia reconocerán varias modificaciones y sustituciones que se pueden realizar en las composiciones y métodos que siguen. Dicha modificación y las sustituciones no se apartan de la invención y están incluidas en la misma.

Ejemplos

Materiales y métodos

Ratones. Se adquirieron ratones (NZB x NZW)F₁ (NZB/W F₁) (H-2^{d/z}) de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) o se criaron en UCLA y se trataron de acuerdo con las directrices Institucionales. Todos los experimentos se realizaron en ratones hembra.

Antígenos. El péptido de consenso pCons (FIEWNKLRFRQGLEW, que une I-E^d y K^d) y el péptido de control negativo pNeg (AIAWAKARARQGLEW) son péptidos sintéticos que contienen determinantes de células T comunes a varias regiones V_H J558 diferentes de IgG anti-ADNds de ratones NZB/W F₁¹¹. Otro péptido de control, pHyHEL (VKQRPGHGLEWIGEI), procede de la región V_H CDR 1/marco 2 de un mA b murino a lisozima de huevo de gallina (HEL, por sus siglas en inglés) y también une I-E^d¹⁰. Se sintetizaron péptidos por un método microcorona en Chiron (San Diego, CA), purificados para único pico en HPLC y analizado por espectrometría de masas para el contenido en aminoácidos esperado.

Construcciones de plásmido de minigenes. El vector pCMVscript (pCMV) (Stratagene, La Jolla, CA) contiene el activador de citomegalovirus (CMV) que conduce la expresión de insertos clonados en células de mamífero. Usando pCMV como cadena principal, se insertaron minigenes en el sitio EcoRI del poliligador. El plásmido plg codifica C_{H2}-C_{H3} de IgG₁ clonado por PCR de PBMC humano. El cebador sentido contiene un codón de iniciación y el sitio de restricción XbaI (subrayado): 5-ATGTCTAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGAC-3', el cebador antisentido es específico para el extremo 3' de hlgG₁ (5'-CGGCCGTCGCACTCATTACC-3'). Las condiciones de ciclación de PCR fueron: 95°C para 2 min, seguido por 94°C para 30 s, 57°C para 30 s y 72°C para 45 s para 30 ciclos, después 72°C para 10 min. Los plásmidos plgCons y plgNeg codifican tanto plg como péptidos pCons o pNeg, respectivamente (Figura 1a). Los oligonucleótidos para pCons fueron:

5'-
CTAGATTTATCGAGTGAATAAGCTGCGATTTTCGTCAGGGCCTGGAGTG
GA-3' y

5'-
CTAGTCCACTCCAGGCCCTGACGAAATCGCAGCTTATTCCACTCGATAA
AT-3',

para pNeg:

5'-

CTAGAGCTATCGCTTGGGCTAAAGCTCGCGCTAGACAAGGTTTAGAGT

GGA-3'

5

y

5'-

CTAGTCCACTCTAAACCTTGTCTAGCGCGAGCTTTAGCCCAAGCGATAG

CT-3'.

10 Para cada plásmido, se hibridaron los oligonucleótidos sentido y antisentido y se insertaron en el marco en el extremo 5' de la secuencia IgG₁ humana en los sitios XbaI. Se purificó ADN de plásmido de *E. Coli* transformada usando estuches Maxi-prep endo-exentos (Qiagen, Valencia, CA). La extracción de ARN total y la síntesis de ADNc para la expresión de confirmación de RT-PCR de transcripciones de ARNm se realizaron siguiendo procedimientos clásicos. Se extrajo ARN celular total con reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) a partir de 3 x 10⁶ células. Se realizó RT-PCR usando el RT-PCR de Una Etapa Invitrogen Superscript con estuche Platinum Taq en un termociclador Hybrid PCR Express (Milford, MA). Se realizó multiplicación con el cebador antisentido común 5'- GTCACAAGATTTGGGCTCAAC-3' y los siguientes cebadores sentido: para IgG₁, 5'- ATGTCTAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGAC-3'; para pCons, 5'-ATGTCTAGATTTATCGAGTGG-3'; para pNeg, 5'- ATGTCTAGAGCTATCGCTTG-3'.

20 Las condiciones PCR usadas fueron: 95°C para 2 min, seguido por 94°C para 30 s, 57°C para 30 s, 72°C para 45 s para 30 ciclos y 72°C para 10 min. Los genes constitutivos β-actina se multiplicaron en paralelo usando las mismas condiciones PCR con los cebadores: 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3' y 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'. Se realizaron análisis de secuencias por secuenciación automatizada en una máquina ABI 3100 usando Big Dye Terminator (Applied Biosystem, Foster City, CA).

25 En experimentos seleccionados, se transinfectaron células COS-7 eucariotas (ATCC, Manassas, VA) con los plásmidos usando Fugene 6 (Roche, Indianapolis, IN), según las instrucciones del fabricante. Se realizó la resolución de lisados de proteínas por método western usando un conjugado IgG₁-HRP anti-humano de cabra (Sigma, Saint Louis, MO).

30 Transferencia de minigenes de células B somática. Se ha descrito la transferencia de minigenes de células B somática con detalle en otra parte. En resumen, se prepararon suspensiones de células de bazo únicas de ratones en condiciones asépticas y células B seleccionadas para enriquecimiento (≥ 96%) usando perlas magnéticas anti-CD19 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) en un separador VarioMACS (Miltenyi Biotec). Se volvieron a suspender 4 x 10⁶ células B purificadas en 200 μl de PBS que contenía Ca²⁺ y Mg²⁺ y se incubaron con 25 μg de plásmido durante 1 h a 37°C. Se diluyeron después las células en medio completo (RPMI 1640 enriquecido con FCS al 10%, Hepes 10 mM, glutamina 200 mM, piruvato de sodio 100 mM y aminoácidos no esenciales) y se incubó durante la noche a 37°C en CO₂ al 5%. La persistencia de la expresión de los minigenes en células transinfectadas duró hasta un mes (37) y la eficacia de transinfección previa a la transferencia a ratones se evaluó siempre por clasificación de células activadas por fluorescencia vía coloración de la superficie con mAb conjugado de FITC a CD19 (BD Biosciences, San Diego, CA) acoplado para coloración intracelular con mAb IgG₁ anti-humano conjugado de FITC (Sigma). Se realizó coloración intracelular usando el estuche BD Cytotifx/Cytoperm, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se lavaron células B transinfectadas como se describió anteriormente en PBS y se diluyó en 200 μl de PBS para transferencia a ratones. El número de linfocitos que expresan minigenes se estimó por clasificación de células activadas por fluorescencia previamente a transferencia de 6x10⁵ células B transinfectadas en cada ratón. Los plásmidos usados para transferencia de minigenes de células B somática y tratamiento de los ratones fueron plg, plgCons, plgNeg y pCMV. Un grupo de control de ratones recibió sólo PBS.

45 Control de los ratones. Se valoró proteinuria en todos los grupos de ratones pre- y post-tratamiento, en intervalos semanales, usando tiras Albustix (Bayer, Elkhart, IN).

50 Histología. Se colorearon secciones de riñón (4 μm de espesor) con hematoxilina y eosina (H/E) siguiendo procedimientos clásicos. La clasificación de la patología incluyó la puntuación de la actividad glomerular (PAG) y la puntuación de la actividad tubulointersticial (PATI) y se realizó en un modo ciego en una escala de 0 a 3 donde 0 = ausencia de lesiones; 1 = lesiones en <30% de glomérulos; 2 = lesiones entre 30% a 60%; 3 = lesiones >60% de glomérulos. El GAS incluye proliferación glomerular, cariorrexis, necrosis fibrinoide, células inflamatorias, medialunas celulares y depósitos de hialina. Las PATI incluyen inflamación intersticial, necrosis celular tubular y/o aplanamiento y células epiteliales o macrófagos en lumen tubular. Las puntuaciones brutas se promediaron para obtener una

puntuación media para cada característica individual y después se sumaron las puntuaciones medias para obtener una puntuación promedio para obtener una puntuación de biopsia de riñón compuesta. Para estudios de inmunofluorescencia, se fijaron secciones en acetona fría durante 10 minutos, se lavaron y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2% (BSA) durante 1 hora previamente a adición de IgG anti-ratón de conejo o IgG anti-humano de conejo (Sigma) seguido por anticuerpos anti-conejo conjugados de FITC (BD Biosciences) y contracoloración con H/E.

Ensayos de proliferación de células T. Se sembraron esplenocitos (recuperados después de lisis de glóbulos rojos) en pozos por triplicado a $2-5 \times 10^5$ células/pozo en un volumen de 200 μ l de medio HL-1 (Cambrex, Rockland, ME) en presencia de péptidos (20 μ g/ml) y/o 100 U de medio IL-2 recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los cultivos con medio sólo o conteniendo concanavalina A se usaron como controles negativos y positivos, respectivamente. Se mantuvieron las células a 37°C en CO₂ al 5% durante 3 días y se pulsaron con 1 μ Ci de [³H]-Timidina ([³H]-Thy) durante las últimas 12-18 h; se valoró la incorporación de ADN de [³H]-Thy por recuento de centelleo líquido en un contador automatizado (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Los resultados se expresan como índice de estimulación medio \pm DE de triplicados de grupos de 6 a 8 ratones cada uno.

ELISA. Se recogieron sueros de ratones NZB/W F₁ antes y después de tratamiento de minigenes y se almacenaron a -80°C hasta uso experimental. Los títulos de Ab y los niveles de suero total de IgG, IgG₁ e IgG_{2a}, se ensayaron usando estuches ELISA comerciales de BD Biosciences y R&D Systems, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Citometría de flujo. Después de lavado y bloqueo de Fc-gammaR, se añadió Ab a marcadores superficiales o Ab marcado con fluorocromo emparejado de isotipo de control durante 20 min a 4°C en PBS/FCS al 2%. Para coloración superficial, se usaron los mAb etiquetados con fluorocromo siguientes: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD28, anti-CD19, anti-NK1.1, anti-CD44, anti-CD62L, anti-CD45RB, anti-CD69. Se realizó coloración intracelular con posterioridad con mAb anti-Foxp3 o anti-TGF-beta etiquetado usando las instrucciones del fabricante. Todos los mAb fueron de BD Biosciences excepto mAb anti-Foxp3 (eBiosciences, San Diego, CA).

Análisis estadísticos. Se compararon las diferencias entre grupos de resultados continuos usando la prueba t de Student. Se evaluaron las diferencias entre resultados continuos de grupos en la referencia y en puntos de tiempo sucesivos discretos usando pruebas t pareadas. Se modeló la supervivencia entre grupos usando análisis Kaplan-Meier. Todos los análisis se realizaron usando el programa informático Prism 4 (GraphPad, San Diego). Los valores de P<0,05 se consideraron significativos.

Construcción y expresión de minigenes. Ratones NZB/W F₁ premórbidos experimentaron transferencia de minigenes somática de IgG₁ humano codificador de plásmido (hlgG) (plásmido plg) (Figura 1a). Esta propuesta permitió la discriminación entre IgG procedente de minigen e IgG de ratón endógeno. Las construcciones adicionales usadas en el estudio incluían: i) plásmido pCMV, un plásmido vacío de control negativo; ii) plgNeg, un plásmido que codifica hlgG₁ junto con pNeg – un péptido que une Clase II de MHC pero no tiene efecto sobre la activación de células T o la enfermedad en ratones NZB/W F₁ y iii) plgCons, un plásmido que codifica hlgG junto con péptido de consenso Ig pCons - pCons es un péptido que protege ratones NZB/W F₁ de LES. La validación de transcripciones de ARNm se realizó por RT-PCR sobre células COS-7 transfectadas con plásmidos plgCons o plgNeg o plg (Figura 1b) y expresión de Ig analizada por método western en lisados celulares usando mAb anti-hlgG₁ de conejo (Figura 1c). Finalmente, una estirpe de células T específica de pCons proliferó en respuestas a células B transfectadas con plgCons pero no a células B que habían sido transfectadas con plg (Figura 1 d) o con los otros plásmidos de control.

La transferencia de minigenes de células B somática con plgCons protege a ratones NZB/W F₁ de enfermedad renal acelerada. Ratones NZB/W F₁ hembra prenefríticos de veinte a veintidós semanas con niveles bajos comparables de Ig anti-ADN recibieron cada uno 6×10^5 células B transfectadas con plg (n=19 ratones) o plgCons (n=19 ratones) i. v. una vez. Los ratones de control recibieron números similares de células B transfectadas con plgNeg (n=11) o pCMV (n=6), o recibieron sólo PBS (n=8). Se midió la proteinuria antes del comienzo de tratamiento (ningún ratón era proteinúrico cuando se inició el tratamiento) y se controló a intervalos semanales después. Para medición de los títulos de Ig, se recogieron sueros de sangre periférica antes de tratamiento y cada dos semanas después de tratamiento durante 30 semanas.

Los ratones que recibieron plg desarrollaron proteinuria acelerada cuando se comparó con ratones de control que habían recibido el plásmido vacío pCMV o PBS (Figura 2a). No se observaron diferencias significativas entre los ratones de control tratados con pCMV y PBS, que sugiere que el plásmido de por sí no influirá en la enfermedad renal en los animales tratados. Significativamente, los ratones tratados con plgCons presentaban niveles considerablemente inferiores de proteinuria a tanto 5 como 10 semanas después de tratamiento en comparación con ratones tratados con plg (Figura 2a). La protección de enfermedad renal acelerada inducida por plg se asoció específicamente a pCons, puesto que los ratones que habían recibido plgNeg presentaron desarrollo acelerado de proteinuria similar al de ratones tratados con plg (Figura 2a).

Supervivencia de ratones e histología patológica renal. Los efectos de la transferencia de minigenes somática sobre la proteinuria se asociaron a diferente supervivencia de los animales tratados. Los efectos perjudiciales de hipergammaglobulinemia sobre el diagnóstico de enfermedades se reflejaron por la mortalidad acelerada de ratones

tratados con plg cuando se comparó con ratones tratados con plgCons (Figura 2b). Los animales tratados con plgNeg presentaron una tasa baja similar de supervivencia que los ratones tratados con plg, sugiriendo que sólo pCons ejercía efectos protectores sobre la enfermedad acelerada de Ig que dio como resultado la supervivencia elevada de los ratones. Por otra parte, el plásmido de por sí no influyó sobre la supervivencia de los ratones debido a que los ratones tratados con pCMV presentaron una tasa de supervivencia similar a la de los controles tratados con PBS (Figura 2b).

Se analizó la patología renal en los diferentes grupos de ratones (Figura 3). La arquitectura de los riñones se conservó en ratones tratados con plgCons cuando se compara con ratones de control de plg y pNeg (Figura 3a). Puesto que la arquitectura renal de los ratones pCMV que habían recibido el vector vacío se conservó relativamente, el plásmido de por sí no influyó sobre la patología renal. En gran medida, se observó precipitación de hlg en los glomérulos de ratones plg y plgNeg pero no en ratones plgCons (Figura 3b) y se observó precipitación de mlg en controles pero no en los ratones tratados con plgCons (Figura 3c). También, las puntuaciones de actividad glomerular y tubular fueron inferiores en los ratones tratados con plgCons que en ratones de control tratados con plg- y plgNeg (Figura 3d).

Expresión de Ig en animales tratados. El hallazgo de que los ratones que habían recibido plg y plgNeg presentaron enfermedad renal acelerada cuando se compara con ratones tratados con plgCons o para controlar ratones tratados con PBS o pCMV sugirió que la expresión de minigenes de Ig había contribuido a la enfermedad renal a menos que pCons se expresara de manera simultánea. El efecto protector mediado por pCons podía estar relacionado con el bloqueo de la producción elevada de Ig procedente del plásmido o a un bloqueo de producción de Ig endógena. Para discriminar entre estas dos posibilidades, se analizaron los títulos de los sueros de hlgG procedente de minigenes en los diferentes grupos de ratones a las cinco y diez semanas después de tratamiento (Figura 4). Se encontró que los efectos protectores de pCons no estaban relacionados con una expresión diferencial de hlgG en los diferentes grupos de ratones debido a que se detectaron niveles similares de hlgG en los sueros de ratones que habían recibido plg, plgCons y plgNeg (Figura 5a). Como control, no fueron detectables hlgG en los sueros de ratones que no habían recibido IgG de codificación de minigenes pero que habían recibido el plásmido vacío o PBS (Figura 4a). Estos datos indicaron que la expresión procedente de plásmido de Ig era comparable en los diferentes grupos de ratones y que los efectos protectores observados en ratones tratados con plgCons tenían que ser atribuidos a pCons. Puesto que el tratamiento génico induce Ab al producto¹²⁻¹⁴ génico codificado y una respuesta de anti-hlgG podía haber influido en el título de hlgG circulante, se analizó la concentración en suero de Ab anti-hlgG en los diferentes grupos de ratones. Se encontraron niveles similares (bajos) de Ab anti-hlgG en ratones que recibieron plg, plgCons y plgNeg y ausencia en los ratones de control tratados con pCMV y PBS. En gran medida, sin embargo, el análisis de los niveles en suero de IgG murino después de tratamiento indicó sólo que los ratones tratados con plgCons presentaban títulos reducidos de IgG tanto a las cinco como a las diez semanas postratamiento (Figura 4b), que indica una asociación entre pCons y producción de IgG endógena reducida. Todas las demás condiciones no afectaron a la concentración en suero de IgG de ratón circulante.

Respuestas inmunitarias celulares inducidas por plgCons. Se comparó la respuesta de células T entre los grupos de ratones tratados con los diferentes minigenes. Se midió la proliferación de linfocitos específicos de Ag a las 4 semanas y 8 semanas postratamiento en ausencia o en presencia de rIL-2. Como se muestra en la Figura 6, no se observó una proliferación significativa en ningún grupo de ratones para el Ag del respectivo producto de minigenes. Sin embargo, la adición de IL-2 exógeno a los cultivos invirtió la hiposensibilidad a la estimulación con pCons en los ratones tratados con plgCons y no en ratones tratados con plgNeg o en los otros controles, tanto a los 4 como a las 8 semanas postratamiento (Figura 5). Estos datos indicaron que sólo los animales tratados con plgCons presentaron células T que eran hiposensibles a estimulación antigénica. Para entender mejor las implicaciones de esta observación, se usó citometría de flujo para determinar si la administración de plgCons influía sobre el número de subconjuntos de células inmunitarias esplénicas seleccionadas incluyendo células T, B y NK. No se observaron cambios significativos en los números de porcentaje de células B o células NK después de tratamiento con minigenes durante tanto como dos meses de seguimiento después de tratamiento. Para células T, se observó la extensión de células T CD8⁺ en el grupo de plgCons cuando se comparó con los grupos de control (Figura 6a). Para células T CD4⁺, no hubo diferencia en el fenotipo y/o expresión de CD25, CD44, CD62L, CD45RB o CD69. En su lugar, la extensión del compartimento de células T CD8⁺ después de tratamiento con plgCons asociada con un número aumentado de células T CD8⁺CD28⁻ (Figura 6b-c), que es un fenotipo que había sido asociado previamente con supresión¹⁷⁻²⁰ de células T. Destaca que las células T CD8⁺CD28⁻ extendidas en ratones tratados con plgCons expresaron TGF-beta intracelular, que no se expresó en células T CD8⁺CD28⁻ de ratones tratados con plgNeg o controles (Figura 6d). Estas diferencias fenotípicas en ratones plgCons frente a los controles estuvieron presentes tan pronto como 2 semanas después de tratamiento. (Figura 6) y llegó a ser más pronunciada por 4 semanas después de tratamiento. Cabe destacar, que las células T CD8⁺CD28⁻ clasificadas de animales tratados con plgCons – pero no de los otros grupos de ratones - inhibió la proliferación de células T CD4⁺ estimuladas (Figura 7a). Los efectos de supresión se mantuvieron en experimentos transpozo y se bloquearon por la presencia en cultivo de Ab anti-TGF-beta, indicando que la supresión mediada por células T CD8⁺CD28⁻ no requería el contacto de las células y dependía en parte de TGF-beta. Para ensayar si los supresores de CD8⁺ procedentes de plgCons podían retrasar el desarrollo de enfermedad renal in vivo, se realizaron experimentos de transferencia adoptivos. Se encontró que la transferencia de células T CD8⁺CD28⁻ de ratones tratados con plgCons en ratones NZB/W F₁ con hipergammaglobulinemia retrasó el desarrollo de proteinuria en animales receptores, comparado con ratones que

recibían células T CD8⁺CD28⁻ de controles tratados con plgNeg (Figura 7b).

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión, en el que el polipéptido de fusión comprende un antígeno propio ligado de manera operable a una región Fc de un anticuerpo, en el que el antígeno propio es pCons SEC ID N°: 2.
- 5 2. El polinucleótido según la reivindicación 1, en el que la región Fc de un anticuerpo comprende un dominio CH de IgG1.
3. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
4. El polinucleótido según la reivindicación 1, para uso en la prevención o el tratamiento de lupus eritematoso sistémico por inducción de inmunidad tolerogénica en un individuo, en el que el polinucleótido es para expresión en el individuo.
- 10 5. El polinucleótido para uso según la reivindicación 4, en el que el polinucleótido tiene que ser transformado o transfectado en una célula inmunitaria del individuo.
6. El polinucleótido para uso según la reivindicación 5, en el que la célula inmunitaria es una célula B.
7. El polinucleótido para uso según las reivindicaciones 5 ó 6, en el que la célula tiene que ser transformada *ex vivo*.
- 15 8. Un polipéptido de fusión que comprende:
 - un primer dominio que comprende un antígeno propio que es una secuencia conservada encontrada en determinantes de células T en la región FR1/CDR1 de V_H de anticuerpos IgG humano y murino, en el que el antígeno propio es SEC ID N°: 2 y un segundo dominio que comprende un polipéptido heterólogo o molécula pequeña.
- 20 9. El polipéptido de fusión según la reivindicación 8, en el que en el polipéptido heterólogo comprende una región Fc de un anticuerpo o un polipéptido adyuvante.
10. El polipéptido de fusión según la reivindicación 8, en el que la molécula pequeña comprende una molécula adyuvante.
- 25 11. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de fusión según la reivindicación 8.
12. Un polipéptido de fusión según la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria para reprimir una respuesta inmunitaria a dicho antígeno propio, en particular un antígeno propio que comprende SEC ID N°: 2, en el que la enfermedad autoinmunitaria es lupus eritematoso sistémico (LES).

Figura 1

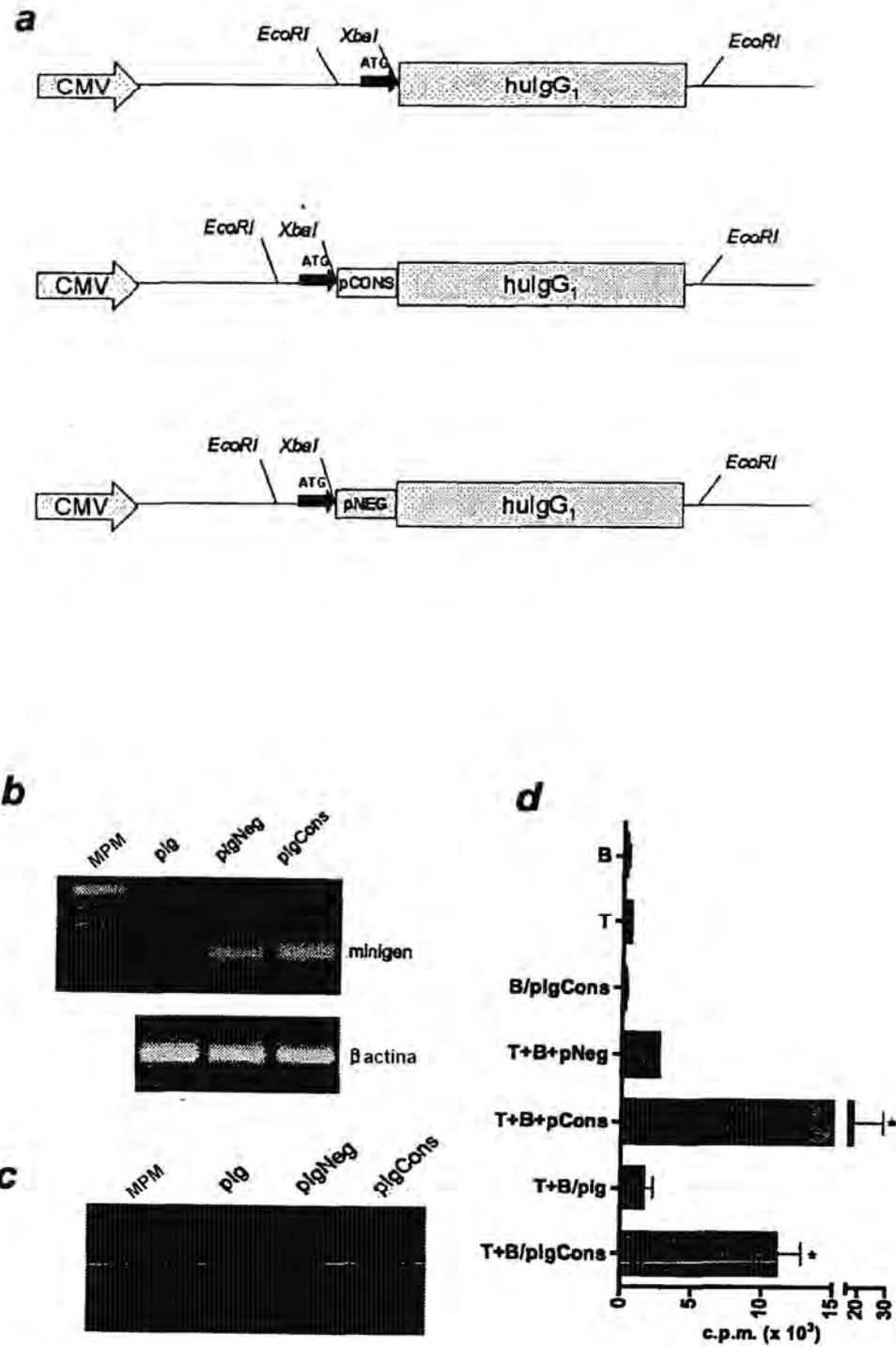
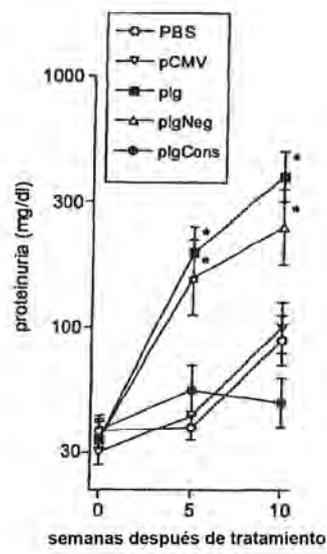


Figura 2

a



b

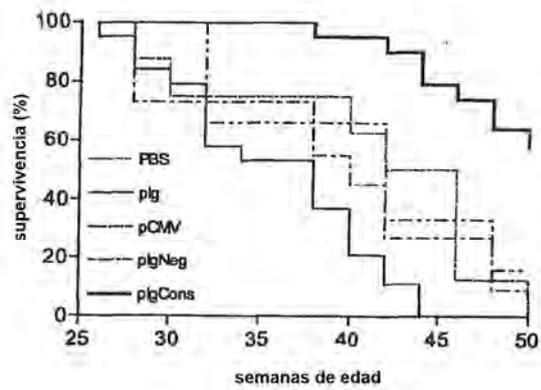


Figura 3

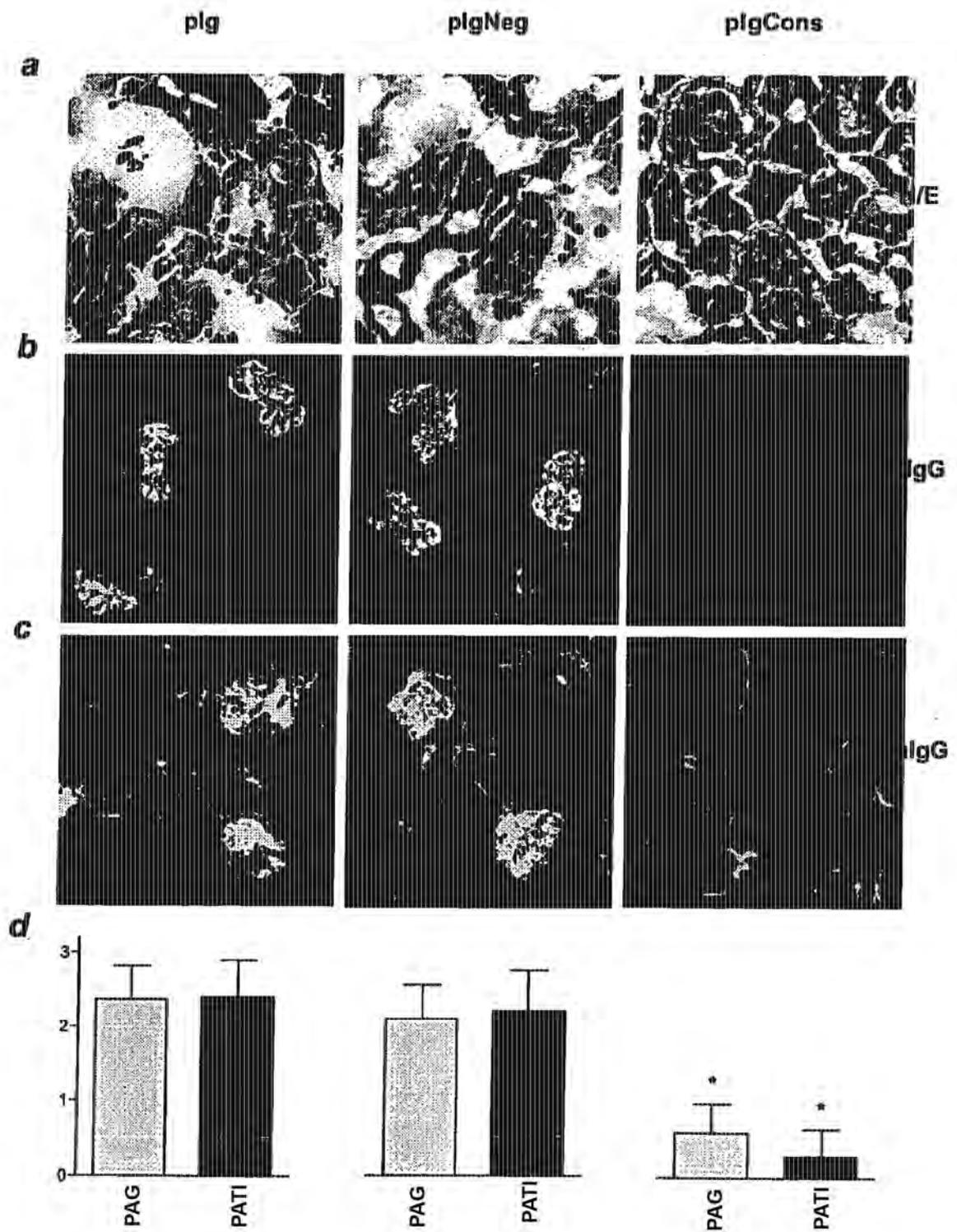


Figura 4

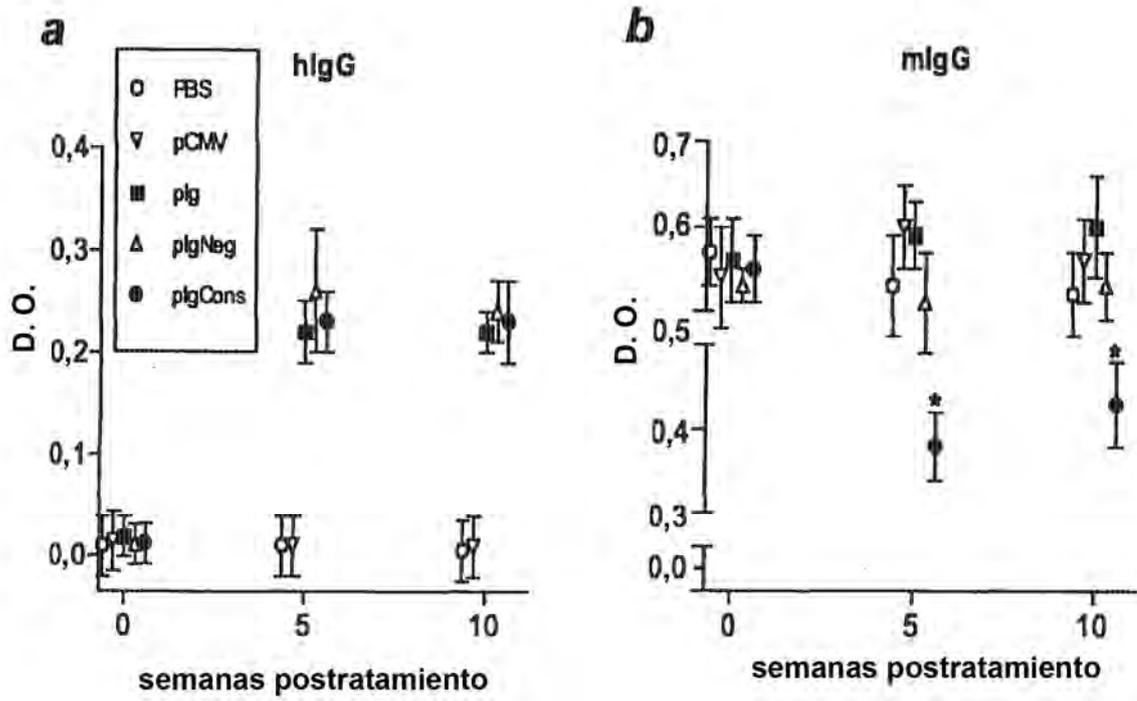


Figura 5

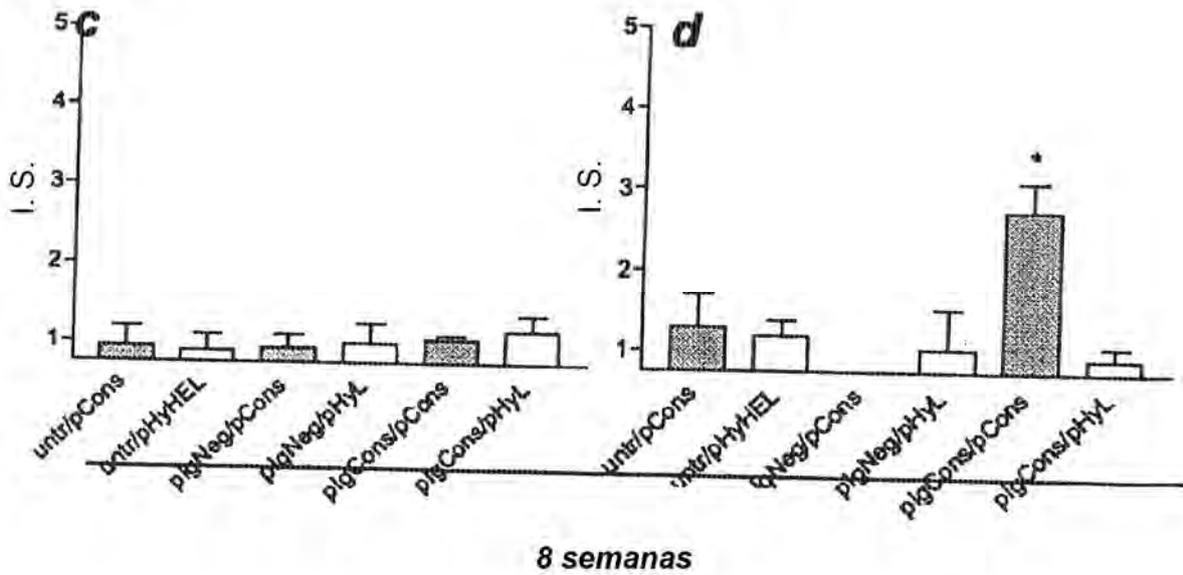
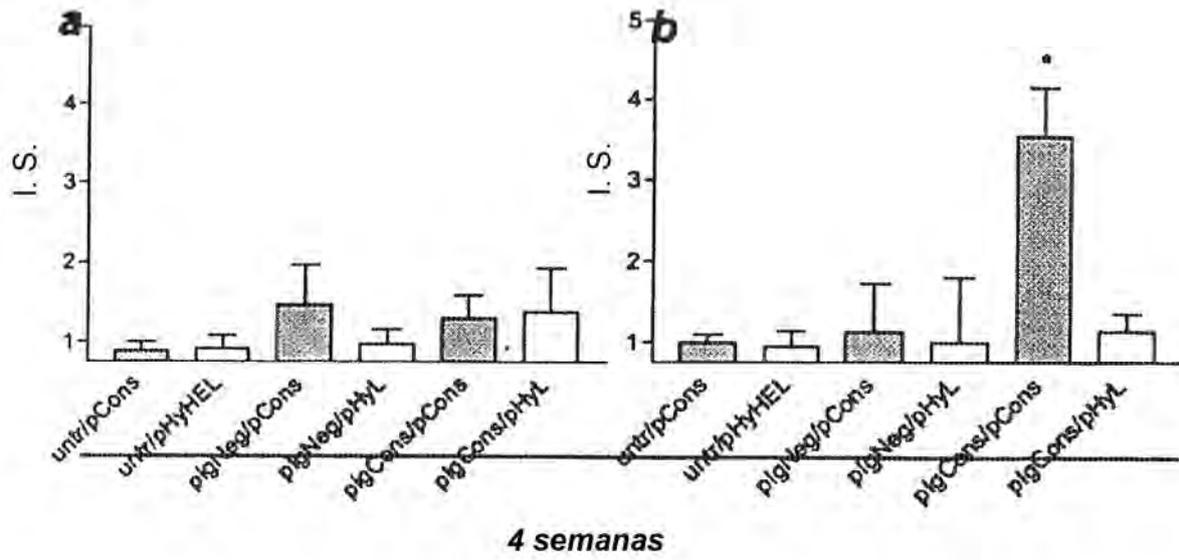


Figura 6

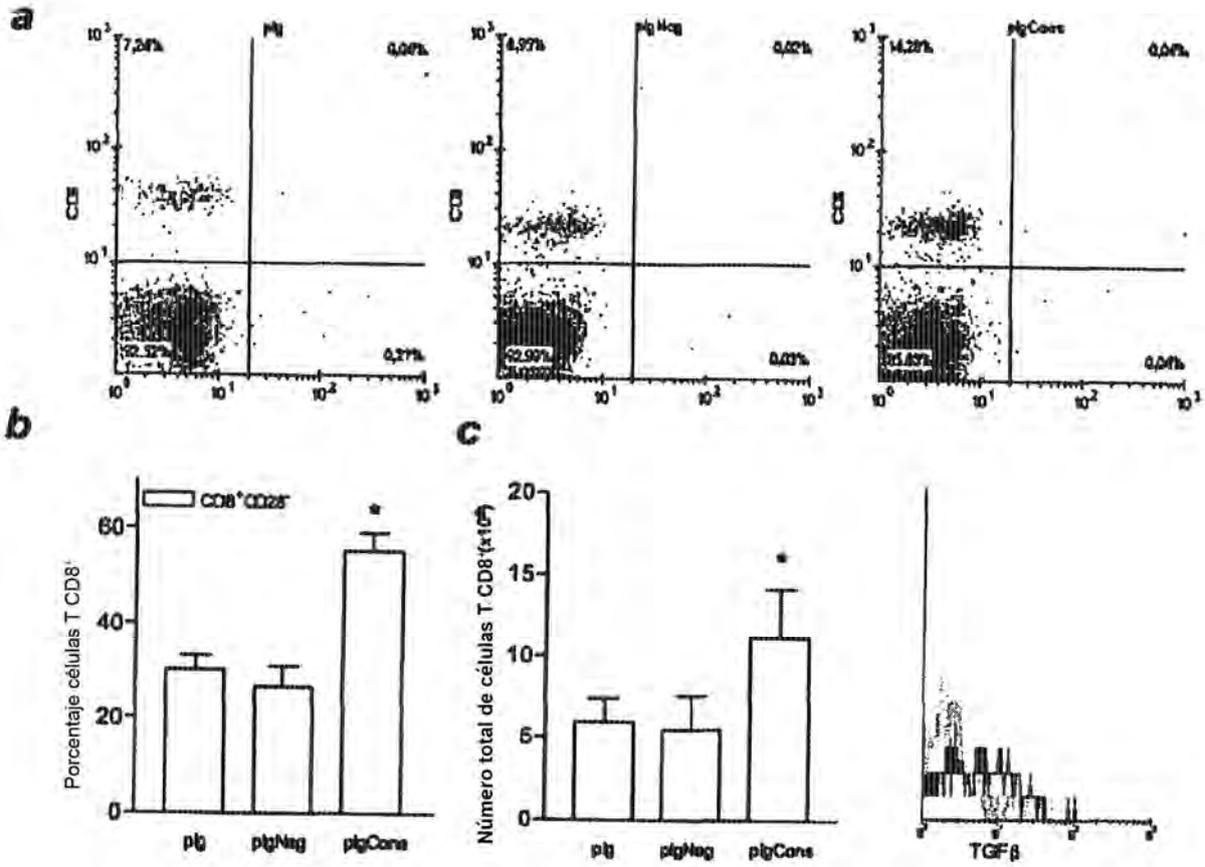


Figura 7

