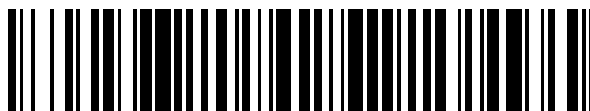


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 278**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C12N 5/0784** (2010.01)

**A61K 35/15** (2015.01)

**A61K 35/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2012 E 12735156 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2731963**

54 Título: **Composiciones y métodos para la inmunomodulación**

30 Prioridad:

**15.07.2011 EP 11382240**

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

**05.09.2016**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ  
BIOMÈDICA DE BELLVITGE (IDIBELL) (100.0%)  
Hospital Duran i Reynals, 3 planta, Av. Gran Via,  
199  
08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**ARAN PERRAMON, JOSEP M. y  
OLIVAR MIRÓ, RUT**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 581 278 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

Composiciones y métodos para la inmunomodulación

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la inmunología y, más en particular, a composiciones basadas en isoformas del complemento C4BP que carece de cadenas  $\beta$  que son capaces de inducir un estado tolerogénico en células dendríticas y a los usos de las mismas para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una activación no deseada del sistema inmunitario.

**Antecedentes de la invención**

Las células dendríticas (CD) son las CPA profesionales del sistema inmunitario. En su estado inmaduro, las CD captan antígenos extracelulares mediante fagocitosis o pinocitosis y procesan los antígenos en péptidos en el compartimento endocitótico, tal como en endosomas y fagosomas, en donde los péptidos se unen a moléculas de clase II del CMH. También tienen la capacidad única de cargar los péptidos desde proteínas exógenas a la ruta de presentación de la clase I del CMH, un proceso denominado "presentación cruzada". Dadas las señales de diferenciación adecuadas, las CD pueden desarrollarse en una CD inmunogénica, que está dotada de la capacidad para activar a las células T tanto vírgenes como de memoria. En la otra parte del espectro, las CD inmaduras también pueden diferenciarse en un fenotipo tolerogénico, que se cree que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la tolerancia periférica (Steinman, Ann. Rev. Immunol. 2003, 21: 685-711; Morelli, Immunol Rev 2003: 125-146).

Se han descrito numerosos protocolos para la generación de CD tolerogénicas *in vitro* (Xiao et al., J. Immunother. 2006 (29) 465-471). Los métodos mejor caracterizados utilizan mediadores farmacológicos (tales como fármacos inmunosupresores, incluyendo análogos de la vitamina D, glucocorticoides, oestrógeno), citocinas y factores de crecimiento (tales como IL-10, TGF-beta, IL-4, IFN-gamma) o ingeniería genética, bien sea para suprimir la expresión de las moléculas coestimuladoras de las células T (tales como CD86 y CD40) o para potenciar la expresión de moléculas inhibitoras de células T (tales como CTLA-4 e indoleamina 2,3-dioxigenasa).

La forma activada de la vitamina D, 1,25-dihidroxitamina D3 (1,25(OH)2D3), es una hormona secosteroide que tiene, además de su función principal en el metabolismo del calcio y del hueso, efectos importantes en el crecimiento y diferenciación de diversos tipos celulares y propiedades inmunorreguladoras pronunciadas (van Etten et al., J Steroid Biochem and Mol Biol 2005 (97) 93-101). El efecto biológico del 1,25(OH)2D3 está mediado por el receptor de vitamina D (VDR), un miembro de la superfamilia de receptores de hormonas nucleares que funciona como un factor de transcripción activado por agonista que se une a elementos de secuencia de ADN específicos, elementos de respuesta a la vitamina D, en genes de respuesta a la vitamina D y en última instancia influencia su tasa de transcripción mediada por ARN polimerasa II. Las CPA y de manera destacable las CD expresan el VDR y son dianas clave de los agonistas de VDR *in vitro* e *in vivo*. La IL-10 se produce principalmente por linfocitos activados, monocitos y macrófagos. La IL-10 se une a un receptor compuesto de dos subunidades, el IL-10R1 de unión a ligando e IL-10R2 de señalización. La IL-10 regula negativamente a la clase II del CMH y la expresión de la molécula coestimuladora, IL-12 y la secreción de citocinas proinflamatorias y la función estimuladora de células T de varias CPA (Moore et al., Ann Rev Immunol 2001 (19)683-785).

La manipulación genética de las CD, tal como la inhibición de las moléculas coestimuladoras de células T CD40, CD80 y CD86 mediante el uso de oligonucleótidos antisentido ha demostrado ser eficaz para generar CD tolerogénicas (Machen et al., J. Immunol. 2004, 173: 4331-4341). Dichas CD produjeron niveles reducidos de IL-12p70 y TNF-alfa y previnieron la diabetes en ratones diabéticos no obesos.

Hasta la fecha, la mayoría de las terapias aprobadas por la FDA de Estados Unidos para enfermedades autoinmunitarias se han centrado en la inhibición sistémica de la actividad inflamatoria inmunitaria. Aunque la supresión inmunitaria no específica es parcialmente eficaz para inhibir la función de las células inmunitarias auto-reactivas, los fármacos usados para suprimir la respuesta inmunitaria tienen numerosos efectos secundarios y la terapia continua no conduce a una supervivencia a largo plazo del huésped. Por lo tanto, es deseable desarrollar tratamientos específicos para auto-antígenos que permitan el bloqueo específico de los efectos perjudiciales de la función de células inmunitarias auto-reactivas, a la vez que se mantiene la capacidad del sistema inmunitario de eliminar infecciones. Por tanto, existe una gran necesidad de métodos que generen CD adecuadamente equipadas que puedan inducir de manera eficaz tolerancia inmunitaria específica de antígeno.

Además, las CD generadas *ex vivo* con función tolerogénica adecuada también podrían implementarse como vacuna terapéutica en el tratamiento de alergias y para la inducción de tolerancia a trasplantes. Al igual que con la inmunoterapia para enfermedades autoinmunitarias, la supresión eficaz de las respuestas inmunitarias perjudiciales implica la inducción de tolerancia de células T tanto CD4+ como CD8+. Por lo tanto, podría esperarse que las CD tolerogénicas generadas *ex vivo* deberían tener las mismas características para tratar enfermedades autoinmunitarias, la alergia y para la prevención del rechazo de injertos.

Sin embargo, los métodos nuevos y alternativos para la producción de células dendríticas tolerogénicas que tengan un fenotipo tolerogénico distinto y que tengan expresión de determinantes tolerogénicos son siempre un objeto recurrente de investigación en este campo.

## 5 Sumario de la invención

La invención se refiere a una isoforma de C4BP, que carece de la cadena beta, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad inmunológica causada por una activación no deseada del sistema inmunitario en la que, si al menos una de las cadenas alfa que forman dicha isoforma es un mutante de delección que carece de al menos una de las regiones CCP, la región CCP6 se conserva en dicha cadena alfa; y en la que la enfermedad inmunológica se selecciona del grupo que consiste en;

(i) una enfermedad inmunoinflamatoria seleccionada del grupo que consiste en infarto o ictus, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda, asma, preeclampsia y eclampsia;

(ii) septicemia;

(iii) una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en: enfermedades sanguíneas autoinmunitarias, enfermedades autoinmunitarias de la musculatura, enfermedades autoinmunitarias del oído, enfermedades autoinmunitarias del ojo, enfermedades autoinmunitarias del riñón, enfermedades autoinmunitarias de la piel, enfermedades autoinmunitarias cardiovasculares, enfermedades autoinmunitarias endocrinas, enfermedades autoinmunitarias gastroentéricas, enfermedades nerviosas autoinmunitarias y una enfermedad autoinmunitaria sistémica seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, enfermedad linfoproliferativa autoinmunitaria, poliendocrinopatía autoinmunitaria, enfermedad de Bechet, enfermedad de Goodpasture, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren y psoriasis;

(iv) rechazo de trasplante;

(v) enfermedad de injerto contra huésped; y

(vi) una enfermedad de hipersensibilidad.

También se divulga un polipéptido que comprende el dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP o una variante funcionalmente equivalente del mismo, en el que dicho polipéptido no comprende la cadena alfa C4BP de longitud completa y en el que dicho polipéptido no comprende una región de una proteína diferente de C4BP, y un péptido que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5 o una variante funcionalmente equivalente de la misma, polinucleótidos que codifican dicho polipéptido o péptidos y vectores que comprenden dichos polinucleótidos.

En otro aspecto, se divulga una composición farmacéutica que comprende un polipéptido, un péptido, un polinucleótido o un vector tal como se divulga de anteriormente.

En otro aspecto, se divulga una composición de materia seleccionada del grupo que consiste en:

(i) un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo

(ii) un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo

(iii) un vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo

para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad inmunológica.

En otro aspecto, se divulga un método para la generación de una población de células dendríticas tolerogénicas que comprende las etapas de

(i) incubar una población de células precursoras dendríticas en condiciones adecuadas para la formación de una población de células dendríticas inmaduras y

(ii) incubar la población de células dendríticas inmaduras obtenidas en la etapa (i) en condiciones adecuadas para la formación de células dendríticas maduras

en el que las etapas (i) y/o (ii) se llevan a cabo en presencia de una composición de materia seleccionada del grupo que consiste en

(a) isoforma de C4BP que carece de la cadena beta,

(b) un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente,

(c) un péptido tal como se ha divulgado anteriormente,

(d) un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente,

(e) un vector tal como se ha divulgado anteriormente,

(f) factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo,

(g) un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo y

(h) un vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

En otro aspecto más, se divulga una célula dendrítica tolerogénica obtenida mediante el método divulgado anteriormente, una composición farmacéutica que comprende una población de células dendríticas tolerogénicas tal como se ha divulgado anteriormente y los usos de la población de células dendríticas tolerogénicas para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad inmunológica.

#### Descripción de las figuras

##### Figura 1. Las isoformas de C4BP que carecen de la cadena beta regular negativamente el fenotipo de activación de Mo-CD humanas.

$\alpha 7\beta 0$  y  $\alpha 6\beta 0$  recombinante pero no  $\alpha 7\beta 1$  de C4BP inhiben la regulación positiva de marcadores de superficie clave de Mo-CD humanas. Se incubaron Mo-CD humanas a lo largo de su proceso de diferenciación y maduración con las concentraciones indicadas de las isoformas de C4BP. La maduración de las CD se logró mediante tratamiento con LPS (véase para más detalles la sección de Materiales y Métodos). Después se recogieron las células y se analizaron mediante citometría de flujo respecto de la expresión superficial de CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, CD1a y HLA-DR. Las columnas representan el porcentaje de células positivas (A) y la MIF (B) para los diferentes marcadores de superficie. iCD, CD inmaduras no tratadas; mCD, CD no tratadas maduras con LPS. Los resultados son la media +/- DT de 8 experimentos independientes (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  respecto de mCD).

##### Figura 2. El tratamiento de C4BP no afecta a la viabilidad de las Mo-CD humanas

Se evaluó la viabilidad de las Mo-CD obtenidas mediante tratamiento con C4BP  $\alpha 7\beta 0$  o C4BP  $\alpha 7\beta 1$  (2  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con LPS mediante tinción con anexina-V más 7-ADD y análisis por citometría de flujo, tal como se describe en la sección Materiales y Métodos. Como referencia, se incluyeron Mo-CD tratadas con el inmunosupresor vitamina D3 (calcitriol, Caligex®, Abbot Laboratories, S.A.; 2,4  $\mu\text{M}$ ). iCD, CD inmaduras no tratadas; mCD, CD no tratadas maduras con LPS. Los resultados son la media +/- DT de 8 experimentos independientes.

##### Figura 3. Las Mo-CD humanas expuestas a isoformas de C4BP que carecen de cadena beta expresan menos CCR7 y los marcadores de maduración de CD IDO y BIC-1

(A) Perfil de expresión génica de Mo-CD tratadas con C4BP y maduras con LPS. Cuantificación relativa de la expresión génica de CCR7, IDO y BIC mediante RT-qPCR usando la tecnología LightCycler®. Los resultados mostrados son la media +/- DT de 6 (CCR7), 4 (IDO) y 3 (BIC-1) experimentos independientes. (B) Análisis de expresión superficial de CCR7 en Mo-CD tratadas con C4BP y maduras con LPS mediante citometría de flujo (MIF). Los resultados mostrados son la media +/- DT de 3 experimentos independientes. iCD, CD inmaduras no tratadas; mCD, CD no tratadas maduras con LPS. (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  respecto de mCD).

##### Figura 4. Las isoformas de C4BP que carecen de cadena beta inhiben la liberación de citocinas inflamatorias por Mo-CD maduras con LPS.

Las Mo-CD tratadas con diferentes isoformas de C4BP a 2  $\mu\text{g/ml}$  se maduraron con LPS y se analizaron las concentraciones de IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes respectivos. Los resultados mostrados son la media +/- DT de 3 experimentos independientes llevados a cabo en duplicado. iCD, CD inmaduras no tratadas; mCD, CD no tratadas maduras con LPS. (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  respecto de mCD).

##### Figura 5. Las isoformas de C4BP que carecen de cadena beta modifican la morfología de las Mo-CD humanas

Se examinó mediante MEB la morfología superficial de Mo-CD tratadas con las principales isoformas ( $\alpha 7\beta 0$  o  $\alpha 7\beta 1$ ) de C4BP a 2  $\mu\text{g/ml}$  y maduras con LPS y se comparó con aquellas de CD no tratadas tanto inmaduras (iCD) como maduras con LPS (mCD). Nótese la ausencia de largas proyecciones dendríticas en las CD tratadas con C4BP  $\alpha 7\beta 0$ , asemejándose más al fenotipo de CD inmaduras.

##### Figura 6. Las isoformas de C4BP que carecen de cadena beta alteran la quimiotaxis de las Mo-CD humanas

Se evaluó la migración de Mo-CD sin tratar y tratadas con C4BP después de la maduración con LPS hacia la quimioquina CCL21 en un ensayo transpocillo. Se muestran los porcentajes de CD migradas hacia la cámara inferior que contenía CCL21 después de 2 h de incubación, en relación a los valores de migración de CD no tratadas maduras con LPS (mCD) (100 %). También se evaluó la migración espontánea de CD hacia una cámara inferior sin CCL21. Los resultados son la media +/- DT de 4 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado (\*,  $p < 0,05$  respecto de mCD).

**Figura 7. Las Mo-CD humanas expuestas a isoformas de C4BP que carecen de cadena beta inhiben la proliferación de células T alogénicas.**

Se cultivaron Mo-CD sin tratar (mCD), tratadas con C4BP ( $\alpha 7\beta 0$  o  $\alpha 7\beta 1$  a 2  $\mu\text{g/ml}$ ) o tratadas con VitD3 (calcitriol, Calcigex®, Abbott Laboratories, S.A.; 2,4  $\mu\text{M}$ ) y maduras con LPS por triplicado con células T CD3+ alogénicas purificadas ( $10^5$ /pocillo) a una relación celular de CD:T de 1:40 (n=10), 1:80 y 1:160 (ambos n=4) durante 5 días. Se añadió [ $^3\text{H}$ ]-timidina (1  $\mu\text{Ci/pocillo}$ ) durante las últimas 16 h de cultivo y se midió la incorporación mediante un contador de placa  $\beta$  (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001 respecto de mCD). iCD, CD inmaduras no tratadas.

**Figura 8. El dominio CCP6 de C4BPA es necesario para la actividad “tolerogénica” de C4BP en Mo-CD humanas.**

Se incubaron Mo-CD humanas a lo largo de su proceso de diferenciación y maduración con las concentraciones indicadas de mutantes de C4BP de delección de la cadena  $\alpha$  de CCP ( $\Delta\text{CCP}1$  a  $\Delta\text{CCP}8$ ; todos a 2  $\mu\text{g/ml}$ ). (A) Se logró la maduración de las CD mediante tratamiento con LPS (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Entonces se recogieron las células, se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo respecto de la expresión en la superficie celular de CD14, CD83, CD1a y HLA-DR. Las columnas representan el porcentaje de células positivas (B) y la MIF (C) para los diferentes marcadores de superficie. iCD, CD inmaduras no tratadas; mCD, CD no tratadas maduras con LPS. Los resultados son la media +/- DT de 8 experimentos independientes (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001 respecto de mCD).

**Figura 9. El péptido basado en CCP6, PS6-04, previene el fenotipo de maduración de Mo-CD humanas**

(A) Representación lineal de la secuencia de aminoácidos de CCP6 y los cuatro péptidos basados en CCP6 empleados. (B) Se incubaron Mo-CD humanas a lo largo de su proceso de diferenciación y maduración con péptido PS6-01, PS6-02, PS6-03 o PS6-04 (todos a 100  $\mu\text{M}$ ). La maduración de las CD se logró mediante tratamiento con LPS (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Entonces se recogieron las células, se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo respecto de la expresión en la superficie celular del marcador específico de maduración de CD, CD83. Las columnas representan el porcentaje de células positivas (%) y la mediante de la intensidad de fluorescencia (MIF). iCD, CD inmaduras no tratadas; mCD, CD no tratadas maduras con LPS. Los resultados son la media +/- DT de 3 experimentos independientes (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001 respecto de mCD). n.d., no determinado.

**Figura 10. El factor H regula negativamente el fenotipo de activación de Mo-CD humanas**

El factor H inhibe la regulación positiva de marcadores superficiales clave de Mo-CD humanas. Se incubaron Mo-CD humanas a lo largo de su proceso de diferenciación y maduración con las concentraciones indicadas de factor H. La maduración de las CD se logró mediante tratamiento con LPS (véase para más detalles la sección Materiales y métodos). Entonces se recogieron las células, se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo respecto de la expresión en la superficie celular de CD 14, CD40, CD80, CD83, CD86, CD1a y HLA-DR. Las columnas representan el porcentaje de células positivas (A) y la MIF (B) para los diferentes marcadores de superficie. iCD, CD inmaduras no tratadas; mCD, CD no tratadas maduras con LPS. Los resultados son la media +/- DT de 5 experimentos independientes (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001 respecto de mCD).

**Figura 11. El tratamiento con factor H no afecta a la viabilidad de Mo-CD humanas**

Se evaluó la viabilidad de Mo-CD obtenidas mediante tratamiento con factor H (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con LPS mediante tinción de anexina V más 7-ADD y análisis por citometría de flujo, tal como se describe en la sección Materiales y métodos. Como referencia, se incluyeron Mo-CD tratadas con el inmunosupresor, vitamina D3 (calcitriol, Calcigex®, Abbot Laboratories, S.A.; 2,4  $\mu\text{M}$ ). iCD, CD inmaduras no tratadas; mCD, CD no tratadas maduras con LPS. Los resultados son la media +/- DT de 8 experimentos independientes.

**Figura 12. Las Mo-CD humanas expuestas a factor H expresan menos CCR7 y los marcadores de maduración de CD IDO, BIC-1 y SOD2.**

(A) Perfil de expresión génica de Mo-CD tratadas con factor H (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con LPS. Cuantificación relativa de la expresión génica de CCR7, IDO, BIC-1 y SOD2 mediante RT-qPCR usando la tecnología LightCycler®, Los resultados mostrados son la media +/- DT de 4 experimentos independientes. (B) Análisis de expresión superficial de CCR7 en Mo-CD tratadas con factor H y maduras con LPS mediante citometría de flujo (MIF). Los resultados mostrados son la media +/- DT de 3 experimentos independientes. iCD, CD inmaduras no tratadas; mCD, CD no tratadas maduras con LPS. (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001 respecto de mCD).

**Figura 13. El factor H inhibe la liberación de citocinas inflamatorias por Mo-CD humanas maduras con LPS**

Las Mo-CD tratadas con las diferentes isoformas de C4BP a 5  $\mu\text{g/ml}$  fueron maduras con LPS y se analizaron las concentraciones de IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes respectivos. Los resultados mostrados son la media +/- DT de 5 experimentos independientes, llevados a cabo por duplicado. iCD, CD

inmaduras no tratadas; mCD, CD no tratadas maduras con LPS. (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  respecto de mCD).

**Figura 14. El factor H modifica la morfología de Mo-CD humanas**

Se examinó mediante MEB la morfología superficial de Mo-CD tratadas con factor H (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con LPS y se comparó con aquellas tanto de CD inmaduras no tratadas (iCD) como maduras con LPS (mCD). Nótese la ausencia de largas proyecciones dendríticas en las CD tratadas con factor H, asemejándose más al fenotipo de CD inmaduras.

**Figura 15. El factor H reduce el potencial endocítico de las iCD**

Se incubaron Mo-CD inmaduras sin tratar o tratadas con factor H (2, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) con DQ-OVA fluorescente a 37 °C durante 15 min en la oscuridad y se examinaron mediante citometría de flujo para medir la captación específica. El nivel de fagocitosis de las iCD (iCD) tratadas con factor H fue significativamente menor que el de las iCD (\*,  $p < 0,05$ ). Los resultados se presentan como la MIF media  $\pm$  DT de 3 experimentos independientes.

**Figura 16. El factor H altera la quimiotaxis de las Mo-CD humanas**

Se evaluó la migración de Mo-CD maduras con LPS sin tratar y tratadas con factor H hacia la quimiocina CCL21 en ensayos transpocillo. Se muestran los porcentajes de CD migradas hacia la cámara inferior que contenía CCL21 después de 2 h de incubación, en relación a los valores de migración de CD no tratadas (mCD) (100 %). También se evaluó la migración espontánea de CD hacia una cámara inferior sin CCL21. Los resultados son la media  $\pm$  DT de 4 experimentos independientes llevados a cabo en duplicado (\*,  $p < 0,05$  respecto de mCD).

**Figura 17. Las Mo-CD humanas expuestas a factor H inhiben la proliferación de células T alogénicas**

Se cultivaron Mo-CD sin tratar (mCD), tratadas con factor H a 5  $\mu\text{g/ml}$  o tratadas con VitD3 (calcitriol, Calcigex®, Abbott Laboratories, S.A.; 2,4  $\mu\text{M}$ ) y maduras con LPS por triplicado con células T CD3+ alogénicas purificadas (10<sup>5</sup>/pocillo) a una relación celular de CD:T de 1:40 ( $n=10$ ), 1:80 y 1:160 (ambos  $n=4$ ) durante 5 días. Se añadió [<sup>3</sup>H]-timidina (1  $\mu\text{Ci/pocillo}$ ) durante las últimas 16 h de cultivo y se midió la incorporación mediante un contador de placa  $\beta$  (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  respecto de mCD). iCD, CD inmaduras no tratadas.

**Figura 18. Las CD tolerogénicas inducidas por C4BP( $\beta$ -) o por FH muestran un fenotipo estable.**

Se evaluó la estabilidad de CD tratadas con C4BP( $\beta$ -) o tratadas con FH y maduras con LPS después de 24 h adicionales de inducción con TNF-alfa proinflamatorio (100 U/ml) + IFN-gamma (1000 U/ml) en medio completo sin agentes inmunomoduladores (C4BP( $\beta$ ) o FH). Se determinaron las medianas de las intensidades de fluorescencia (MIF) de los marcadores de CD CD83 (A) y CD86 (B) para todas las condiciones de CD (con o sin TNF-alfa + IFN-gamma). iCD, CD inmaduras; mCD, CD no tratadas maduras con LPS; B-5, CD tratadas con C4BP( $\beta$ -) (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con LPS; Rect2, CD tratadas con C4BP( $\beta$ -) recombinante (2  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con LPS; FH5, CD tratadas con FH (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con LPS ( $n=6$  por grupo).

**Figura 19. Producción y secreción reducidas de IFN-gamma por linfocitos T estimulados con C4BP( $\beta$ -) o CD tratadas con FH.**

Se obtuvieron linfocitos T en proliferación a partir de cultivos aloestimuladores. Se midió la producción de IFN-gamma mediante tinción intracelular después de volver a estimular las células con PMA + ionomicina en presencia de brefeldina durante 5 h, (A) Resumen de los resultados de la producción total de IFN-gamma de células T de cultivos de CD:T maduras con LPS tratadas con C4BP( $\beta$ -) o con FH en relación a cultivos de CD:T maduras con LPS no tratadas (tomadas como 100 % de producción). (B) Porcentajes de células T productoras de IFN-gamma que responden a la aloestimulación (células CFSE<sup>bajo</sup>CD3+). Cada símbolo representa una muestra individual. iCD, CD inmaduras; mCD, CD no tratadas maduras con LPS; C4BP( $\beta$ -) o B, CD tratadas con C4BP( $\beta$ -) (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con LPS; TS, CD tratadas con C4BP( $\beta$ -) (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con LPS; FH, CD tratadas con FH (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con LPS; VitD, CD tratadas con VitD y maduras con LPS. Se indican las diferencias significativas ( $n=4$  por grupo, excepto mCD/TS:  $n=3$ ); \*  $p < 0,05$ ; prueba de t emparejada).

**Figura 20. Las CD tratadas con C4BP( $\beta$ -) o con FH promueven la inducción de CD4+CD25<sup>alto</sup>CD127<sup>bajo</sup>FoxP3+ a partir de blastocitos.**

Después de 6 días de cultivo sin re-estimulación ni cualquier citocina complementaria, se evaluaron los tamaños celulares mediante FACS representando los parámetros de dispersión directa (FSC) frente a la dispersión lateral (SSC) (columna de la izquierda). Fenotipo de células T como CD4+, FoxP3+ (columna en el medio) y CD25+ con expresión baja o nula de CD127 (columna de la izquierda). Se muestra uno de 4 experimentos representativos. iCD, CD inmaduras; mCD, CD no tratadas maduras con LPS; B, CD tratadas con C4BP( $\beta$ -) (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y maduras con

LPS; TS, CD tratadas con C4BP( $\beta$ +) (5  $\mu$ g/ml) y maduras con LPS; FH, CD tratadas con FH (5  $\mu$ g/ml) y maduras con LPS; VitD, CD tratadas con VitD y maduras con LPS.

### Descripción detallada de la invención

#### 5 *Usos terapéuticos de isoformas de C4BP que carecen de cadena beta*

Los autores de la presente invención han descubierto que las isoformas de C4BP que carecen de la cadena beta son capaces de inhibir la maduración de células dendríticas en presencia de estímulos de maduración y de promover la generación de células dendríticas que muestran características de células dendríticas tolerogénicas. Tal como se muestra en los ejemplos 1 a 6 de la presente invención, las isoformas de C4BP que carecen de la cadena beta son capaces de regular negativamente marcadores de activación de Mo-CD humanas y la liberación de citocinas inflamatorias por las Mo-CD maduras con LPS. Además, las isoformas de C4BP que carecen de la cadena beta modifican la morfología de las Mo-CD humanas, reducen la quimiotaxis de las Mo-CD humanas y la proliferación de células T alogénicas en respuesta a la exposición a células dendríticas.

Además, los autores de la presente invención han descubierto que las isoformas de C4BP que carecen de la cadena beta generan células dendríticas tolerogénicas que tienen una capacidad estimuladora de células T reducida y la capacidad no solo de prevenir la diferenciación de Th1 en condiciones proinflamatorias, sino también de generar células T reguladoras.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica causada por una activación no deseada del sistema inmunitario en la que, si al menos una de las cadenas alfa que forman dicha isoforma es un mutante de eliminación que carece de al menos una de las regiones CCP, la región CCP6 se conserva en dicha cadena alfa; y en la que la enfermedad inmunológica se selecciona del grupo que consiste en;

- (i) una enfermedad inmunoinflamatoria seleccionada del grupo que consiste en infarto o ictus, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda, asma, preeclampsia y eclampsia;
- 30 (ii) septicemia;
- (iii) una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en: enfermedades sanguíneas autoinmunitarias, enfermedades autoinmunitarias de la musculatura, enfermedades autoinmunitarias del oído, enfermedades autoinmunitarias del ojo, enfermedades autoinmunitarias del riñón, enfermedades autoinmunitarias de la piel, enfermedades autoinmunitarias cardiovasculares, enfermedades autoinmunitarias endocrinas, enfermedades autoinmunitarias gastroentéricas, enfermedades nerviosas autoinmunitarias y una enfermedad autoinmunitaria sistémica seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, enfermedad linfoproliferativa autoinmunitaria, poliendocrinopatía autoinmunitaria, enfermedad de Bechet, enfermedad de Goodpasture, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren y psoriasis;
- 40 (iv) rechazo de trasplante;
- (v) enfermedad de injerto contra huésped; y
- (vi) una enfermedad de hipersensibilidad.

En otra realización, se divulga el uso de una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica.

En otro aspecto, se divulga un método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad inmunológica en un sujeto que lo necesite que comprende la administración a dicho sujeto de una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta.

En otro aspecto, se divulga un método para aumentar las poblaciones de células dendríticas tolerogénicas y/o de células T reguladoras en un sujeto que lo necesite que comprende la administración a dicho sujeto de una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta.

En otro aspecto, se divulga una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta para su uso en el aumento de una población de células dendríticas tolerogénicas y/o de células T reguladoras.

El término "C4BP", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un componente regulador de la ruta clásica que se sintetiza principalmente por células hepáticas que actúa como cofactor para la degradación de C3b y C4b dependiente de factor I y acelera la degradación de las convertasas C3/C5 de la ruta clásica. C4BP circula en el plasma como tres isoformas, cuyas proporciones dependen de los niveles relativos de las cadenas C4BP $\alpha$  (70 kDa) y C4BP $\beta$  (45 kDa). La principal isoforma de C4BP está compuesta de 7 cadenas  $\alpha$  idénticas y 1 cadena  $\beta$  ( $\alpha_7\beta_1$ ) mientras que tras la inflamación, se regula positivamente una isoforma normalmente menos abundante que está compuesta exclusivamente de cadenas  $\alpha$  ( $\alpha_7\beta_0$ ). Además, la expresión recombinante de las cadenas  $\alpha$  en células eucariotas da como resultado un oligómero que comprende 6 cadenas  $\alpha$  ( $\alpha_6\beta_0$ ). Por lo tanto, las isoformas de C4BP

que son útiles en el método de la presente invención incluyen cualquier isoforma resultante de la asociación de una diversidad de cadenas  $\alpha$  y que esté desprovista de cadena  $\beta$ .

5 El experto en la materia entenderá que las isoformas de C4BP que carecen de una cadena  $\beta$  pueden formarse exclusivamente por cadenas  $\alpha$ , ya que estas aparecen de manera natural (por ejemplo, cadena  $\alpha$  de C4BP humana, de ratón, de rata o bovina) tal como se define más adelante o puede contener una o más variantes de cadena  $\alpha$ . Por ejemplo, las isoformas de C4BP que carecen de cadena  $\beta$  pueden contener al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis variantes de cadena  $\alpha$  (en el caso de que la isoforma de C4BP sea  $\alpha_6\beta_0$ ) o al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete variantes de cadena  $\alpha$  (en el caso de que la isoforma de C4BP sea  $\alpha_7\beta_0$ ).

15 La expresión "cadena  $\alpha$  de C4BP", también conocida como PRP o proteína rica en prolina, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la forma madura procesada del polipéptido humano definido con el número de referencia P04003 en la base de datos del NCBI (versión del 5 de abril de 2011) y que comprende los aminoácidos 49 a 597. La expresión cadena  $\alpha$  de C4BP también se usa para referirse a ortólogos de la cadena  $\alpha$  de C4BP, tales como la cadena  $\alpha$  de C4BP de ratón correspondiente a la forma madura del polipéptido mostrada en la base de datos del NCBI con el número de referencia P08607 (aminoácidos 57 a 469), la cadena  $\alpha$  de C4BP de rata correspondiente a la forma madura del polipéptido mostrado en la base de datos del NCBI con el número de referencia Q36514 (aminoácidos 14 a 558), la cadena  $\alpha$  de C4BP bovina correspondiente a la forma madura del polipéptido mostrado en la base de datos del NCBI con el número de referencia Q28065 (aminoácidos 49 a 610).

25 La cadena  $\alpha$  de C4BO contiene 8 dominios de proteína de control de complemento (CCP) que tienen 60 restos de aminoácidos de longitud con cuatro restos de cisteína unidos por disulfuro en una disposición 1-3-2-4 y un núcleo hidrófobo unido alrededor de un resto de triptófano prácticamente invariable. Las extensiones C-terminales de las cadenas tanto  $\alpha$  como  $\beta$  contienen 2 restos de cisteína cada una y una región de  $\alpha$  hélice anfipática, que es necesaria para la polimerización intracelular de la molécula.

30 La expresión "cadena  $\alpha$  de C4BP" también se usa en el presente documento para referirse a cualquier variante de las cadenas  $\alpha$  de C4BP definidas anteriormente que resulten de la modificación, inserción o eliminación de uno o más aminoácidos y que conservan sustancialmente la capacidad para formar oligómeros con otra cadena  $\alpha$  de C4BP o variantes de la misma. Los expertos en la materia disponen de métodos para determinar si una variante es capaz de formar oligómeros e incluyen, por ejemplo, un método tal como se describe en Blom et al. (J. Biol. Chem. 2001, 276: 27136-27144) basado en el análisis mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) en condiciones nativas de un C4BP purificado obtenido mediante expresión recombinante de la cadena  $\alpha$  variante en células eucariotas (por ejemplo, células 293) seguido de purificación por afinidad usando un anticuerpo específico para una de las regiones CCP que no se ha eliminado.

Las variantes de cadena  $\alpha$  de C4BP para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación:

- 40 - Variantes polimórficas de origen natural (es decir, variantes alélicas) así como variantes de cadena  $\alpha$  manipuladas o diseñadas de manera recombinante. Las variantes de cadena  $\alpha$  de C4BP adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, polipéptidos que tienen una identidad de al menos un 99 %, al menos un 98 %, al menos un 97 %, al menos un 96 %, al menos un 95 %, al menos un 94 %, al menos un 93 %, al menos un 92 %, al menos un 91 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 65 %, al menos un 60 %, al menos un 55 %, al menos un 50 % con polipéptidos de cadena  $\alpha$  de C4BP tal como se han definido anteriormente y, en particular, con la cadena  $\alpha$  de C4BP de origen natural humana.
- 50 El porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de una variante de cadena  $\alpha$  de C4BP respecto de la secuencia de aminoácidos expuesta anteriormente puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia mediante comparación de secuencia. Tal como se usa en el presente documento, dos secuencias de aminoácidos tienen una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 por ciento si los restos de aminoácidos de las dos secuencias de aminoácidos son iguales cuando se alinean para máxima correspondencia. Las comparaciones de secuencia de polipéptidos y polinucleótidos (por ejemplo, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos descritos en el presente documento) pueden llevarse a cabo usando cualquier método, tales como aquellos que usan algoritmos informáticos bien conocidos para los expertos habituales en la materia. Dichos algoritmos incluyen Align o el algoritmo BLAST Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992), que están disponibles en la página web del NCBI (véase [en línea], el sitio de internet en [ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)). Pueden usarse parámetros por defecto. Además, hay disponibles programas informáticos convencionales, tales como aquellos incluidos en el paquete de programas de cálculos bioinformáticos LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.); el programa CLUSTALW (Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22:4673-80 (1991)); y "GeneDoc" (Nicholas et al., EMBNEW News 4:14 (1991)). Los expertos en la materia ponen en práctica otros métodos para comparar dos secuencias de aminoácidos mediante la determinación de un alineamiento óptimo (véase, por ejemplo, Peruski y Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wu et al. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins" en Methods in Gene Biotechnology,



páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); y Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2ª Ed. (Academic Press, Inc. 1998)).

- Mutantes de delección que carecen de al menos una de las regiones CCP, siempre que se conserve la región CCP6 (véase el ejemplo 7) tales como, por ejemplo, mutantes que carecen del dominio CCP1, que carecen del dominio CCP2, que carecen del dominio CCP3, que carecen del dominio CCP4, que carecen del dominio CCP5, que carecen del dominio CCP7 y/o que carecen del dominio CCP8.

- Proteínas de fusión que comprenden una primera región que comprende la cadena  $\alpha$  de C4BP y una segunda región que comprende un polipéptido que no forma parte de la cadena alfa de C4BP. La proteína de fusión de la presente invención puede comprender en dirección de amino terminal a carboxi terminal, (a) la región que comprende el dominio CCP6 y (b) la región que comprende un polipéptido que no forma parte de la cadena alfa de C4BP. Como alternativa, la proteína de fusión de la invención puede comprender, en dirección de amino terminal a carboxi terminal, (a) la región que comprende un polipéptido que no forma parte de la cadena alfa de C4BP y (b) la región que comprende el dominio CCP6. Los ejemplos de proteínas de fusión que mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen, sin limitación, fusiones con albúmina humana, una región Fc de inmunoglobulina, dominios Fc, secuencias de poli Glu o poli Asp, ferritina y transferrina. Además, la fusión con secuencias polipeptídicas conformacionalmente desordenadas compuestas de los aminoácidos Pro, Ala y Ser ("PASilación") o hidroxietilalmidón (HESilación.RTM) proporciona una vía sencilla para aumentar el volumen hidrodinámico del péptido C. Esta extensión adicional adopta una estructura voluminosa al azar que aumenta significativamente el tamaño de la proteína de fusión resultante. En una realización preferida, la región que comprende un polipéptido que no forma parte de la cadena alfa de C4BP es una región Fc de inmunoglobulina.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "región Fc de inmunoglobulina" significa la porción carboxilo terminal de una región constante de cadena de inmunoglobulina, preferentemente una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma. Por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina puede comprender 1) un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3 o 5) una combinación de dos o más dominios CH y una región bisagra de inmunoglobulina. La región Fc de la proteína de fusión de la presente invención comprende o consiste en una Fc o una porción de una Fc de una inmunoglobulina de isotipo seleccionado entre IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, más preferentemente, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, sIgA, más preferentemente IgG2 o IgG4, lo más preferentemente IgG2.

La expresión "enfermedad inmunológica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad que esté causada por una activación no deseada del sistema inmunitario, incluyendo el sistema inmunitario innato o adaptativo, así como el humoral o la rama celular del sistema inmunitario.

En una realización preferida, la enfermedad inmunológica se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad inmunoinflamatoria, septicemia, enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped y enfermedades de hipersensibilidad.

La expresión "enfermedad inmunoinflamatoria", tal como se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades y trastornos inflamatorios en los que las células inmunitarias y/o las citocinas están implicadas en la patofisiología de la enfermedad o trastorno. Los ejemplos de enfermedades inmunoinflamatorias incluyen afecciones tales como artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artrosis, síndrome del distrés respiratorio agudo y asma. La expresión enfermedad inmunoinflamatoria incluye trastornos inflamatorios tanto agudos como crónicos.

La expresión "trastorno inflamatorio agudo" pretende incluir trastornos y episodios de trastornos caracterizados por la rápida aparición de los síntomas asociados con una respuesta inflamatoria y síntomas de duración relativamente corta, mientras que un "trastorno inflamatorio crónico" pretende incluir trastornos caracterizados por la presencia continuada de síntomas asociados con una respuesta inflamatoria y una duración continua de los síntomas. Las enfermedades inmunoinflamatorias que pueden tratarse con los métodos de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, enfermedades cardiovasculares, tales como infarto o ictus, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artrosis, síndrome de dificultad respiratoria aguda, asma y cáncer. También están comprendidas entre las enfermedades inmunoinflamatorias que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención, enfermedades que aparecen durante el embarazo, tales como, preeclampsia y eclampsia. La preeclampsia es una enfermedad relacionada con el embarazo, caracterizada por, hipertensión, proteinuria y edema. Se entiende y debe definirse en el presente documento que la preeclampsia abarca y reside en un espectro de trastornos de preeclampsia, incluyendo insuficiencia placentaria, retraso del crecimiento intrauterino, aborto temprano, alumbramiento prematuro, muerte intrauterina y eclampsia.

El término "septicemia", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta sistémica del huésped a microorganismos en tejidos previamente estériles caracterizada por disfunción de órganos terminales alejada del sitio primario de infección. Para que se considere septicemia, tiene que haber una infección sospechada o demostrada (mediante cultivo, tinción o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) o un síndrome clínico patológico de infección. Las pruebas específicas de infección incluyen RGB en fluido normalmente estéril (tal como orina o fluido cefalorraquídeo (FCR)), pruebas de una víscera perforada (aire libre en rayos X o escáner TC

abdominal, signos de peritonitis aguda), rayos X torácico (RXT) anormales coherentes con neumonía (con opacificación focal) o petequias, púrpura o púrpura fulminante. Los subconjuntos más críticos de la septicemia son la septicemia grave (septicemia con disfunción de órganos terminales aguda) y el choque séptico (septicemia con hipotensión arterial refractaria). Como alternativa, cuando se cumplen dos o más de los criterios de síndrome de respuesta inflamatoria sin pruebas de infección, puede diagnosticarse a los pacientes simplemente de "SRIS". Los pacientes con SRIS y disfunción de órganos terminales aguda pueden denominarse "SRIS agudo". Se define que los pacientes tienen "septicemia grave" si tienen síntomas de septicemia más signos de hipoperfusión sistémica: disfunción de órganos terminales o lactato en suero mayor de 4 mmol/dl. Otros signos incluyen oliguria y estado mental alterado. Se define que los pacientes tienen choque séptico si tienen septicemia más hipotensión tras una resucitación agresiva con fluidos (típicamente más de 6 litros o 40 mg/kg de cristaloides). Los ejemplos de disfunción de órganos terminales incluyen lesión pulmonar aguda o síndrome de dificultad respiratoria aguda, encefalopatía o disfunción que afecta al hígado (alteración de la función sintética de proteínas y las funciones metabólicas), al riñón (oliguria y anuria, anomalías de electrolitos, sobrecarga de volumen) y al corazón (fallo cardíaco sistólico y diastólico).

Las afecciones septicémicas que pueden tratarse con la composición de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, la septicemia grave y el choque séptico. En una realización, la afección asociada con el síndrome septicémico se selecciona del grupo que consiste en una disfunción orgánica, preferentemente una disfunción de riñón o una disfunción del hígado, un síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO), un síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y coagulación intravascular diseminada (DIC).

La septicemia puede estar inducida por una bacteria o más de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas. Preferentemente, la bacteria Gram negativa se selecciona del grupo que consiste en *Escherichia coli*, especies de *Klebsiella*, especies de *Serratia*, especie de *Enterobacter*, especies de *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, especies de *Neisseria* y especies de *Listeria*. Como alternativa, la bacteria Gram positiva se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, estafilococos negativos a coagulasa, especies de *Enterococcus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus viridans*. En una realización, se induce el síndrome septicémico por LPS. En otra realización más, la septicemia se induce por un microorganismo o más de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en bacterias anaerobias, hongos, rickettsias, clamidias, micoplasma, espiroquetas y virus.

Las expresiones "enfermedad autoinmunitaria", "enfermedad asociada con la disfunción/desregulación inmunitaria" o "enfermedad inmunitaria inflamatoria" se usan a lo largo de la memoria descriptiva para referirse a una afección patógena en la que el sistema inmunitario del paciente da como resultado una enfermedad a causa de un autoantígeno (autoinmunidad) o de un antígeno exógeno (disfunción/desregulación inmunitaria o enfermedad inflamatoria inmunitaria). La autoinmunidad está presente en todo el mundo hasta cierto punto. Normalmente es inofensiva y es probablemente un fenómeno universal de la vida de los vertebrados. Sin embargo, la autoinmunidad puede ser la causa de un amplio espectro de enfermedades humanas, conocidas como enfermedades autoinmunitarias. Este concepto de autoinmunidad como la causa de enfermedades humanas es relativamente nuevo y no se aceptó en las principales corrientes de pensamiento médico hasta las décadas de 1950 y 1960. Por lo tanto, las enfermedades autoinmunitarias se definen cuando se produce la progresión de autoinmunidad benigna a autoinmunidad patógena. Esta progresión se determina tanto por influencias genéticas como por desencadenantes ambientales. El concepto de la autoinmunidad como la causa real de enfermedad humana (en lugar de una consecuencia o acompañamiento inofensivo) puede usarse para establecer criterios que definen una enfermedad, como una enfermedad autoinmunitaria. Las enfermedades autoinmunitarias o enfermedades que se caracterizan por que implican una disfunción o desregulación inmunitaria (enfermedad inmunoinflamatoria), que puede tratarse mediante la presente invención incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus (tipo I), asma, colitis ulcerosa, enfermedad de Grave, artritis, incluyendo artritis reumatoide y artrosis, anemia perniciosa y esclerosis múltiple, entre otras muchas. Pueden tratarse numerosas enfermedades autoinmunitarias usando el método de la presente invención incluyendo enfermedades autoinmunitarias sanguíneas, incluyendo anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia aplásica, púrpura trombocitopénica idiopática, espondilitis anquilosante; enfermedades autoinmunitarias de la musculatura, incluyendo polimiositis y dermatomiositis, enfermedades autoinmunitarias del oído incluyendo pérdida auditiva autoinmunitaria y síndrome de Meniere, enfermedades autoinmunitarias oculares, de incluyendo síndrome de Mooren, síndrome de Reiter y enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada, enfermedades autoinmunitarias del riñón incluyendo la glomerulonefritis y nefropatía por IgA; diabetes mellitus (tipo I); enfermedades cutáneas autoinmunitarias incluyendo pénfigo (enfermedades ampollosas autoinmunitarias), tales como pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo eritematoso, pénfigoide ampollar, vitíligo, epidermolisis ampollosa adquirida, psoriasis y alopecia areata; enfermedades autoinmunitarias cardiovasculares, incluyendo miocarditis autoinmunitaria, vasculitis incluyendo el síndrome de Churg-Strauss, arteritis de células gigantes, enfermedad de Kawasaki, poliarteritis nodosa, arteritis de Takayasu y granulomatosis de Wegener; enfermedades autoinmunitarias endocrinas, incluyendo enfermedad de Addison, hipoparatiroidismo autoinmunitario, hipofisitis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I (PAS-I), síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo 2 (PAS-2) y síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo 3 (PAS-3); enfermedades gastroentéricas autoinmunitarias, incluyendo hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn; enfermedades nerviosas autoinmunitarias, incluyendo esclerosis múltiple, miastenia

grave, síndrome de Guillan-Barre y neuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; y enfermedades autoinmunitarias sistémicas, incluyendo lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, enfermedad linfoproliferativa autoinmunitaria, poliendocrinopatía autoinmunitaria, enfermedad de Bechet, enfermedad de Goodpasture, artritis, incluyendo artritis reumatoide, artrosis y artritis séptica, sarcoidosis, esclerodermia y síndrome de Sjogren y psoriasis, entre otras.

La expresión "rechazo de trasplante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una afección inmunitaria en la que una célula, tejido u órgano trasplantado no es aceptado por el organismo del receptor del trasplante. La expresión rechazo de trasplante abarca el rechazo de trasplante tanto agudo como crónico.

El "rechazo agudo" o "RA" es el rechazo por parte del sistema inmunitario de un receptor de trasplante cuando el tejido trasplantado es inmunológicamente exógeno. El rechazo agudo se caracteriza por infiltración del tejido trasplantado por células inmunitarias del receptor, que llevan a cabo su función efectora y destruyen el tejido trasplantado. La aparición del rechazo agudo es rápida y sucede generalmente en los seres humanos a las pocas semanas después de la cirugía del trasplante.

El "rechazo crónico de trasplante o RC" sucede generalmente en seres humanos después de varios meses a años del injerto, incluso en presencia de una inmunosupresión exitosa del rechazo agudo. La fibrosis es un factor común en el rechazo crónico de todos los tipos de trasplantes de órganos. El rechazo crónico puede describirse típicamente mediante una diversidad de trastornos específicos que son característicos del órgano concreto. Por ejemplo, en los trasplantes de pulmón, dichos trastornos incluyen destrucción fibroproliferativa de la vía respiratoria (bronquiolitis obliterante); en los trasplantes de corazón o trasplantes de tejido cardíaco, tales como los reemplazos de válvulas, dichos trastornos incluyen aterosclerosis fibrótica; en los trasplantes de riñón, dichos trastornos incluyen nefropatía obstructiva, nefroesclerosis, nefropatía túbulointersticial; y en los trasplantes de hígado, dichos trastornos incluyen síndrome de la desaparición del conducto biliar. El rechazo crónico también puede estar caracterizado por una lesión isquémica, denervación del tejido trasplantado, hiperlipidemia e hipertensión asociada con los fármacos inmunosupresores.

Tal como se conoce en el campo de los trasplantes, el órgano, tejido o células trasplantados pueden ser alogénicos o xenogénicos, de tal forma que los injertos pueden ser aloinjertos o xenoinjertos. Una característica del fenotipo tolerante a los injertos detectado o identificado mediante los presentes métodos es que es un fenotipo que aparece sin terapia inmunosupresora, es decir, está presente en un huésped que no se está sometiendo a terapia inmunosupresora, de tal forma que no se están administrando agentes inmunosupresores al huésped. El injerto de trasplante puede ser cualquier órgano sólido y trasplante de piel. Los ejemplos de trasplantes de órganos que pueden analizarse mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, trasplante de riñón, trasplante de páncreas, trasplante de hígado, trasplante de corazón, trasplante de pulmón, trasplante intestinal, trasplante de páncreas después de riñón y trasplante simultáneo de páncreas-riñón.

Los métodos de acuerdo con la presente invención también son adecuados para la prevención y/o tratamiento de la función del injerto retrasada (FIR) debido a lesión por isquemia-reperusión. La expresión "función del injerto retrasada", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una forma de fallo renal agudo que da como resultado oliguria postrasplante, inmunogenicidad aumentada del aloinjerto y riesgo de episodios de rechazo agudo y supervivencia reducida a largo plazo. La FIR puede estar causada por diferentes factores relacionados con el donante y factores del trasplante pre-renales, renales o post-renales relacionados con el receptor. Sin embargo, una causa importante de la función retrasada del injerto es la isquemia y la restitución del flujo sanguíneo en riñones dañados isquémicamente después de su conservación hipotérmica.

La expresión "enfermedad de injerto contra huésped" o EICH, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una afección que aparece cuando las células T presentes en el tejido donante atacan al huésped o receptor de las células o tejido injertado. Puede tratarse cualquier tipo de EICH mediante los agentes terapéuticos de la presente invención, incluyendo EICH aguda y EICH crónica.

La expresión "enfermedad de hipersensibilidad" se refiere a una afección en la que el sujeto tiene una sensibilidad anormal a un agente inocuo, conocido como alérgeno. La enfermedad de hipersensibilidad puede caracterizarse en cuatro tipos, tipo I, tipo II, tipo III y tipo IV. El tipo I se describe como atópico o anafiláctico, que es el resultado de la liberación de mediadores de basófilos y mastocitos sensibilizados a IgE. El tipo II se describe como citotóxico, lo que implica anticuerpo de fijación a complemento con lisis celular o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. El tipo III se describe como mediado por complejo inmunitario, que se asocia con complejos de antígeno-anticuerpo solubles. El tipo IV se describe como mediado por células o hipersensibilidad retrasada que es el resultado de la liberación de linfocinas por linfocitos T sensibilizados después del contacto con un antígeno.

La prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica se logra mediante el aumento de las poblaciones de células dendríticas y/o células T reguladoras tolerogénicas.

Se entiende que la expresión "aumentar la población de células dendríticas tolerogénicas" significa que la administración de una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta produce un aumento en el número de

células dendríticas tolerogénicas respecto de un sujeto no tratado. La población de células dendríticas tolerogénicas está aumentada en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con un sujeto no tratado. La capacidad de la isoforma C4BP que carece de la cadena beta para aumentar una población de células dendríticas tolerogénicas puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos 1 a 5.

La expresión “aumentar la población de células T reguladoras”, tal como se usa en el presente documento, significa que la isoforma de C4BP que carece de la cadena beta produce un aumento en el número de células T reguladoras respecto de un sujeto no tratado. La población de células T reguladoras está aumentada en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con un sujeto no tratado. La capacidad de la isoforma C4BP que carece de la cadena beta para aumentar una población de células T reguladoras puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 17.

#### *Variantes y péptidos de cadena $\alpha$ de C4BP inmunológicamente activos*

Los autores de la presente invención han identificado que el dominio CCP6 aislado de la cadena alfa de C4BP es una región necesaria para inhibir la maduración de células dendríticas y que determinados polipéptidos derivados del dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP son capaces de restaurar el efecto de las isoformas de C4BP que carecen de la cadena beta en la inhibición de la maduración de células dendríticas y en la promoción de la adquisición del fenotipo tolerogénico por dichas células.

Por tanto, en otro aspecto, se divulga un polipéptido que comprende el dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP, una variante funcionalmente equivalente del mismo, en el que dicho polipéptido no es cadena alfa de C4BP de longitud completa. La expresión “dominio CCP”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno de los dominios de control de complemento encontrado en la cadena alfa de C4BP. Los CCP tienen 60 restos de aminoácidos de longitud y comprenden cuatro restos de cisteína unidos mediante disulfuro en una disposición 1-3-2-4 y un núcleo hidrófobo construido alrededor de un resto de triptófano prácticamente invariante. CCP6 corresponde a la región observada entre los aminoácidos 363 y 424 respecto de la cadena alfa de C4BP humana definida en la secuencia proporcionada en la base de datos del NCBI con el número de referencia P04003 (SEQ ID NO: 1) y que corresponde a la secuencia:

```
LCCPEPKLNN  GEITQHRKCR  PANHCVYFYG  DEISFSCHET  CRFSAICQGD
GTWSPRTPSC  GD (SEQ ID NO:1)
```

Preferentemente, el polipéptido que comprende el dominio CCP6 no comprende una región de una proteína diferente de C4BP. En otra realización, el polipéptido que comprende el dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP carece de al menos el dominio CCP1, al menos el dominio CCP2, al menos el dominio CCP3, al menos el dominio CCP4, al menos el dominio CCP5, al menos el dominio CCP7 y/o al menos el dominio CCP8 de la cadena alfa de C4BP. En una realización aún más preferida, el polipéptido que comprende el dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP no contiene cualquiera de los otros dominios CCP encontrados en la cadena alfa de C4BP. Los polipéptidos adecuados que comprenden el dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP incluyen, sin limitación:

- un polipéptido que comprende los dominios CCP5, CCP6 y CCP7 de la cadena alfa de C4BP,
- un polipéptido que comprende los dominios CCP5, CCP6 y CCP7 de la cadena alfa de C4BP pero que carece de uno o más de cualquiera de los otros dominios CCP encontrados en la cadena alfa de C4BP y en particular, que carecen de CCP8 y
- un polipéptido que comprende los dominios CCP5, CCP6 y CCP7 de la cadena alfa de C4BP y en el que dicho polipéptido no comprende una región de una proteína diferente de C4BP.

La expresión “variante funcionalmente equivalente”, cuando se refiere al polipéptido que comprende el dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP se refiere a cualquier polipéptido que tenga una secuencia que proceda de dicho polipéptido mediante inserción, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos y que conserva sustancialmente la actividad funcional del polipéptido original. Las variantes adecuadas incluyen aquellos polipéptidos que comprenden una variante del dominio CCP6 que muestra una identidad de al menos el 99 %, al menos el 98 %, al menos el 97 %, al menos el 96 %, al menos el 95 %, al menos el 94 %, al menos el 93 %, al menos el 92 %, al menos el 91 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 65 %, al menos el 60 % o menor con el dominio CCP6 humano. Los métodos adecuados para determinar la identidad de dos polipéptidos se han definido en detalle anteriormente. En una realización preferida, la variante contiene uno o más de los restos de cisteína sustituidos por serina. La expresión “que conserva sustancialmente la actividad funcional del polipéptido original”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos que son capaces de inhibir la maduración de células dendríticas determinada, por ejemplo, tal como se muestra en los ejemplos 1 a 5 de la presente invención. Por lo tanto, se considera que un polipéptido es un equivalente funcional de la isoforma de C4BO que carece de la cadena  $\beta$  si muestra una actividad de al menos el 100 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 65 %, al

menos el 60 % o al menos el 50 % de la actividad de la isoforma de C4BP que carece de  $\beta$ , en particular, las isoformas  $\alpha_7\beta_0$  o  $\alpha_6\beta_0$ .

5 Por ejemplo, la variante funcionalmente equivalente del polipéptido que comprende el dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP puede modificarse para modular la afinidad por el receptor, modular la semivida circulante, modular la semivida terapéutica, modular la estabilidad del polipéptido, modular la escisión por proteasas, modular la dosis, modular la liberación o la biodisponibilidad, facilitar la purificación o mejorar o alterar una vía de administración particular. De manera similar, las variantes del polipéptido que comprende el dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP puede comprender secuencias de escisión de proteasas, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpos  
10 (incluyendo, sin limitación FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluyendo, pero sin limitación, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas unidas (incluyendo, pero sin limitación, biotina) que mejoran la detección (incluyendo, pero sin limitación, GFP), la purificación u otros rasgos del polipéptido.

15 En otra realización, la variante funcionalmente equivalente del polipéptido que comprende el dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP es una proteína de fusión que comprende una primera región que comprende el dominio CCP6 y una segunda región que comprende un polipéptido que no forma parte de la cadena alfa de C4BP. La proteína de fusión divulgada puede comprender en dirección de amino terminal a carboxi terminal, (a) la región que comprende el dominio CCP6 y (b) la región que comprende un polipéptido que no forma parte de la cadena alfa de C4BP. Como alternativa, la proteína de fusión divulgada puede comprender, en dirección de amino terminal a carboxi terminal, (a)  
20 la región que comprende un polipéptido que no forma parte de la cadena alfa de C4BP y (b) la región que comprende el dominio CCP6. Preferentemente, el polipéptido que forma parte de la proteína de fusión y que comprende el dominio CCP6 carece de al menos el dominio CCP1, al menos el dominio CCP2, al menos el dominio CCP3, al menos el dominio CCP4, al menos el dominio CCP5, al menos el dominio CCP7 y/o al menos el dominio CCP8 de la cadena alfa de C4BP. En una realización aún más preferida, el polipéptido que comprende el dominio  
25 CCP6 de la cadena alfa de C4BP no contiene cualquiera de los otros dominios CCP encontrados en la cadena alfa de C4BP. Los polipéptidos adecuados que comprenden el dominio de la cadena alfa de C4BP para su uso en la proteína de fusión divulgada incluyen, sin limitación:

- un polipéptido que comprende los dominios CCP5, CCP6 y CCP7 de la cadena alfa de C4BP,
- 30 - un polipéptido que comprende los dominios CCP5, CCP6 y CCP7 de la cadena alfa de C4BP pero que carecen de los uno o más de cualquiera de los otros dominios CCP encontrados en la cadena alfa de C4BP y en particular que carecen de CCP8 y

35 En una realización preferida, el polipéptido divulgado no comprende una región de una proteína diferente de C4BP. Por ejemplo, el polipéptido divulgado no puede ser una proteína de fusión que comprende una región que forma parte de una proteína diferente a C4BP.

Los autores han descubierto que los fragmentos del dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP en los que uno o más restos de cisteína están sustituidos por serina, conservan sustancialmente la actividad funcional del polipéptido original. Específicamente, los autores de la invención han sintetizado cuatro péptidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5.  
40

En otro aspecto más, se divulga un péptido que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5 o una variante funcionalmente equivalente de la misma (véase la tabla I).

Péptido	secuencia	SEQ ID NO:
<b>PS6-01</b>	<b>LSSPEPKL NNGEITQHRK SRPANHSVYF YG</b>	2
<b>PS6-02</b>	<b>HRK SRPANHSVYF YGDEISFSSH ETSRFS</b>	3
<b>PS6-03</b>	<b>EISFSSH ETSRFS AISQ GDGTWSPRTP SSG</b>	4
<b>PS6-04</b>	<b>ITQHRK SRPANHSV</b>	5

Tabla I. Péptidos derivados del dominio CCP6

45 En una realización preferida, el péptido es la SEQ ID NO: 5.

El término "péptido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena lineal de aproximadamente 2 a 40 aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos.

50 Las variantes funcionalmente equivalentes de los péptidos divulgados incluyen, sin limitación, péptidos modificados mediante inserción, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos de los péptidos mencionados anteriormente así como peptidomiméticos de los mismos que mantienen sustancialmente la actividad del péptido. Los métodos adecuados para determinar si un polipéptido o péptido dado puede considerarse como una variante funcionalmente  
55 equivalente del polipéptido CCP6 aislado (SEQ ID NO: 1) o de los polipéptidos de las SEQ ID NO: 2-5 incluyen, por ejemplo, los ensayos proporcionados en el ejemplo 8 de la presente invención, en los que se considera que un péptido es una variante de la isoforma de C4BP que carece de cadenas  $\beta$  si muestra una capacidad para generar células dendríticas tolerogénicas cuando se añade a monocitos durante la etapa de diferenciación a células dendríticas inmaduras y/o cuando se añade a células dendríticas inmaduras durante su etapa de maduración a

- células dendríticas maduras. La capacidad de la variante para promover la generación de células dendríticas tolerogénicas puede determinarse, por ejemplo, midiendo los niveles de expresión en las células dendríticas de marcadores de maduración, tales como CD83, CD14 y/o CD1a de células dendríticas que se hayan madurado en presencia de la variante (ejemplos 1 y 2 de la presente invención). Por lo tanto, un péptido puede considerarse como
- 5 funcionalmente equivalente con la isoforma de C4BP que carece de cadena  $\beta$  si muestra una actividad de al menos el 100 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 65 %, al menos el 60 % o al menos el 50 % de la actividad de la isoforma de C4BP que carece de  $\beta$ , en particular, la  $\alpha_7\beta_0$  o la  $\alpha_6\beta_0$ .
- 10 Las variantes funcionalmente equivalentes del polipéptido CCP6 aislado (SEQ ID NO: 1) o de los polipéptidos de SEQ ID NO: 2-4 adecuadas para su uso incluyen, sin limitación:
- Péptidos resultantes de la derivatización de cualquiera de los péptidos anteriores, incluyendo derivados acilados, amidados, esterificados y similares.
  - 15 - Péptidos resultantes de la modificación de cualquiera de los péptidos anteriores mediante sustituciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas) y/o inserciones (por ejemplo, inserciones pequeñas de aminoácidos individuales o inserciones que abarcan 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 o más aminoácidos contiguos) y/o deleciones (por ejemplo, deleciones pequeñas de aminoácidos individuales o deleciones que abarcan 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 o más aminoácidos contiguos). Por lo tanto, en determinadas realizaciones, una variante de una
  - 20 secuencia peptídica nativa es una que difiere de una secuencia de origen natural en (i) una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituciones de aminoácidos conservativas, (ii) deleción de 1 o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más) aminoácidos o (iii) una combinación de las mismas. Los aminoácidos delecionados o insertados pueden ser contiguos o no contiguos.
  - Al producir dichos cambios, se tiene en consideración el índice hidropático de los aminoácidos ya que se sabe que pueden sustituirse determinados aminoácidos por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y dan como resultado un polipéptido con actividad biológica similar. Por ejemplo, el carácter hidropático relativo de un resto de aminoácido afecta a la estructura secundaria y terciaria del polipéptido resultante, lo que a su vez define la interacción del polipéptido con otras moléculas, tales como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos y similares. Tal como se ha indicado
  - 25 anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que tienen en consideración varias de las características anteriores se conocen bien por los expertos en la materia y se exponen a continuación en la tabla 2.

Sustituciones de aminoácidos			
Resto original	Sustitución ejemplar de resto	Resto original	Sustitución ejemplar de resto
Ala	Gly;Ser	Ile	Leu;Val
Arg	Lys	Leu	Ile;Val
Asn	Gln;His	Lys	Arg
Asp	Glu	Met	Leu;Tyr
Cys	Ser	Ser	Thr
Gln	Asn	Thr	Ser
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Ala	Tyr	Trp
His	Asn;Gln	Val	Ile;Leu

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos

- 35 En una realización preferida, los péptidos se modifican reemplazando uno o más de los restos de serina por cisteína.
- Péptidos que tienen cualquiera de las secuencias anteriores pero modificadas para que incluyan cualquiera de una diversidad de grupos químicos o moléculas conocidos. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, glucosilación, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente a polietilenglicol (por ejemplo, PEGilación), unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma
  - 40 carboxilación, glucosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, acilación, amidación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, ubiquitinación, modificaciones con ácidos grasos, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN transferente, tal como arginilación, etc. También se incluyen los análogos de aminoácidos (incluyendo aminoácidos no naturales) y péptidos con enlaces sustituidos.
  - 50 - Peptidomiméticos de los péptidos anteriores. Un "mimético de péptido" o "peptidomimético" se refiere a diversos tipos de clases de moléculas, en tanto que la molécula resultante imite o se asemeje a un elemento estructural secundario (o terciario localizado) deseado de un péptido. Por ejemplo, un peptidomimético es un oligómero que imita la estructura peptídica secundaria mediante el uso de isoésteres de enlaces amida y/o la

modificación de la estructura peptídica nativa, incluyendo la extensión de cadena o la incorporación de heteroátomos; los ejemplos de estos incluyen azapéptidos, oligocarbamatos, oligoureas, beta-péptidos, gamma-péptidos, oligo(fenilenos etilenos), sulfonopéptidos vinílicos, glicinas poli-N-sustituidas (peptoides) y similares. Los expertos en la materia conocen bien métodos para diseñar y sintetizar peptidomiméticos. En determinadas realizaciones, se contempla que se use un peptidomimético para superar la sensibilidad a proteasa, estabilizar la estructura secundaria y/o mejorar la biodisponibilidad en relación a un análogo de péptido CCP6 de origen natural. En determinadas realizaciones, un peptidomimético es un mimético de giro inverso, por ejemplo, un mimético de giro alfa, un mimético de giro beta, un mimético de giro beta bicíclico, un mimético de giro gamma o un mimético de giro gamma monocíclico.

#### *Polinucleótidos, vectores y células hospedadoras*

También se divulgan polinucleótidos que codifican los polipéptidos divulgados anteriormente. Por lo tanto, en otro aspecto se divulga un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende el dominio CCP6 de la cadena alfa de C4BP o una variante funcionalmente equivalente del mismo, en el que dicho polipéptido no es la cadena alfa de C4BP de longitud completa y en el que dicho polipéptido no comprende una región de una proteína diferente de C4BP.

Se divulga un polinucleótido que codifica un péptido que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

Los términos o expresiones "polinucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se usan de manera intercambiable para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Los nucleótidos pueden tener una estructura tridimensional y pueden llevar a cabo cualquier función, conocida o desconocida. El término "polinucleótido" incluye, por ejemplo, moléculas monocatenarias, bicatenarias y triple helicoidales, un gen o fragmento génico, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Además de una molécula de ácido nucleico nativa, una molécula de ácido nucleico también puede comprender moléculas de ácido nucleico modificadas. Tal como se usa en el presente documento, ARNm se refiere a un ARN que puede traducirse en una célula.

Los polinucleótidos divulgados anteriormente pueden comprender además una sola región promotora que regula la transcripción de la región que codifica los polipéptidos divulgados anteriormente siempre que dichos promotores sean compatibles con las células en las que se van a expresar los polipéptidos. Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos divulgados anteriormente pueden encontrarse aislados como tales o formando parte de vectores que permiten la propagación de dichos polinucleótidos en células hospedadoras adecuadas. Los vectores adecuados para la inserción de dichos polinucleótidos son vectores derivados de vectores de expresión en procariontes, tales como pUC18, pUC19, Bluescript y los derivados de los mismos, mp18, mp19, pBR322, pMB9, Co1E1, pCR1, RP4, fagos y vectores "lanzadera", tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levaduras, tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micrómetros, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos de centrómeros y similares, vectores de expresión en células de insecto, tales como vectores de la serie pAC y de pVL, vectores de expresiones en plantas, tales como las series pBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas, incluyendo baculovirus adecuados para transfectar células de insecto usando cualquier sistema de baculovirus disponible en el comercio. Los vectores para células eucariotas incluyen preferentemente vectores víricos (adenovirus, virus asociados a adenovirus, retrovirus y en particular, lentivirus) así como vectores no víricos, tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg, pHMCV/Zeo, pCR3.1, pEFI/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACERHCMV, pUB6N5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL and PKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

Los vectores también pueden comprender un gen indicador o marcador que permite identificar aquellas células que han incorporado el vector después de haberse puesto en contacto con estas. Los genes indicadores útiles incluyen lacZ, luciferasa, timidina cinasa, GFP y similar. Los genes marcadores útiles incluyen, por ejemplo, el gen de resistencia a neomicina, que confiere resistencia al aminoglucósido G418; el gen de higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a higromicina; el gen ODC, que confiere resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa (2-(difluorometil)-DL-ornitina (DFMO)); el gen de dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a la metotrexato; el gen de puromicina-N-acetil transferasa, que confiere resistencia a la puromicina; el gen ble, que confiere resistencia a la zeocina, el gen de adenosina desaminasa, que confiere resistencia a 9-beta-D-xinofurano adenina; el gen de citosina desaminasa, que permite a las células crecer en presencia de N-(fosfonoacetil)-L-aspartato; timidina cinasa, que permite a las células crecer en presencia de aminopterina; el gen de xantina-guanina fosforibosiltransferasa, que permite a las células crecer en presencia de xantina y en ausencia de guanina; el gen trpB de *E. coli*, que permite a las células crecer en presencia de indol en lugar de triptófano; el gen hisD de *E. coli*, que permite a las células usar histidinol en lugar de histidina. El gen de selección se incorpora en un plásmido que puede incluir además un promotor adecuado para la expresión de dicho gen en células eucariotas (por ejemplo, los promotores CMV o SV40), un sitio de inicio de la traducción optimizado (por ejemplo, un sitio que sigue las denominadas reglas de Kozak o un IRES), un sitio de poliadenilación tal como, por ejemplo, el sitio de poliadenilación o de fosfoglicerato

cinasa de SV40, intrones tales como, por ejemplo, el intrón del gen de beta-globulina. Como alternativa, es posible usar una combinación tanto del gen indicador y el gen marcador simultáneamente en el mismo vector.

5 También se proporcionan en el presente documento vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el que puede unirse de manera operativa un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente. Dichos vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*. Para optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro*, puede ser necesario retirar, añadir o alterar porciones 5' y/o 3' no traducidas de los clones para eliminar codones de iniciación de la traducción alternativos adicionales, potencialmente inadecuados u otras secuencias que puedan interferir con o reducir la expresión, al nivel de la transcripción o de la traducción. Como alternativa, pueden insertarse sitios de unión a ribosomas inmediatamente en 5' del codón de inicio para potenciar la expresión. Los portadores de suministro génico también incluyen varios vectores no víricos, incluyendo complejos de ADN/liposoma, y complejos de proteína vírica-ADN dirigidos. Los liposomas que también comprenden un anticuerpo de direccionamiento o un fragmento del mismo pueden usarse en los métodos de la presente invención. Para potenciar el suministro a una célula, los ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención pueden conjugarse a anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que se unen a antígenos de la superficie celular.

15 *Métodos para la generación de una población de células dendríticas tolerogénicas obtenidas usando isoformas de C4BP que carecen de la cadena  $\beta$*

20 Los autores de la presente invención han observado que las células dendríticas puestas en contacto bien con una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta, con un polipéptido que comprende el dominio CCP6 aislado de la cadena  $\alpha$  de C4BP, con un polipéptido tal como se define en la SEQ ID NO: 2 a 5 con las variantes funcionalmente equivalentes del mismo, con un polinucleótido que codifica cualquiera de dichos polipéptidos, con un vector que comprende dicho polinucleótido muestra un fenotipo tolerogénico, es decir.

25 Por lo tanto, en otro aspecto se divulga un método para la generación de una población de células dendríticas tolerogénicas que comprende las etapas de

- 30 (i) incubar una población de precursores de células dendríticas en condiciones adecuadas para la formación de una población de células dendríticas inmaduras y  
 (ii) incubar la población de células dendríticas inmaduras obtenidas en la etapa (i) en condiciones adecuadas para la formación de células dendríticas maduras

35 en donde las etapas (i) y/o (ii) se llevan a cabo en presencia de una composición de materia seleccionada del grupo de:

- 40 (a) una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta,  
 (b) un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente,  
 (c) un péptido tal como se ha divulgado anteriormente,  
 (d) un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente y  
 (e) un vector tal como se ha divulgado anteriormente.

45 La expresión "célula dendrítica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de una población diversa de tipos celulares morfológicamente similares halladas en tejidos linfoides o no linfoides. Las células dendríticas son una clase de células presentadoras de antígenos "profesionales" y tienen una alta capacidad para sensibilizar a células T restringidas al CMH. Las células dendríticas pueden reconocerse por su función o por su fenotipo, en particular, por su fenotipo de la superficie celular. Estas células están caracterizadas por su morfología distintiva, niveles de intermedios a altos de expresión de la clase II del CMH y la capacidad para presentar antígenos a células T, en particular a células T vírgenes (Steinman et al. (1991) Ann. Rev. Immunol. 9:271; incorporado al presente documento por referencia por su descripción de dichas células). Las células dendríticas afectadas por los métodos divulgados anteriormente pueden seleccionarse para que sean células dendríticas inmaduras o maduras.

55 Las células dendríticas incluyen grupos de células derivadas de médula ósea con morfología dendrítica distribuidas en diversos tejidos y órganos en el organismo, grupos de células con morfología dendrítica distribuida en diversos órganos y tejidos en el organismo que son el resultado de la diferenciación *in vitro* usando citocinas similares de células madre derivadas de médula ósea o sangre y células equivalentes. Específicamente, las células dendríticas incluyen, por ejemplo, células dendríticas linfocíticas (incluyendo células que inducen a Th2 o tolerancia inmunitaria), células dendríticas de médula ósea (células dendríticas usadas de manera general, incluyendo células dendríticas maduras e inmaduras), células de Langerhans (células dendríticas importantes como células presentadoras de antígenos en la piel), células intercalantes (distribuidas en la región de células T de los nódulos linfáticos y el bazo y que se considera que funcionan en la presentación de antígenos a células T) y células dendríticas foliculares (importantes como células presentadoras de antígenos para células B). La superficie celular de las células dendríticas es inusual, con proyecciones similares a velos características y se caracteriza por la expresión de los marcadores de la superficie celular CD1a<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> o HLA-DR<sup>+</sup>. Las células dendríticas maduras son típicamente CD11c<sup>+</sup>, mientras que los precursores de las células dendríticas incluyen aquellos que tienen el fenotipo



CD11c<sup>-</sup>, IL-3Rα<sup>bajo</sup>; y aquellas que son CD11- IL-3Rα<sup>alto</sup>. El tratamiento con GM-CSF *in vivo* expande preferentemente a las CD CD11b<sup>alto</sup>, CD11c<sup>alto</sup>, mientras que se ha demostrado que el ligando Flt-3 expande a las CD CD11c<sup>+</sup> IL-3Rα<sup>bajo</sup> y precursores de CD CD11c<sup>-</sup> IL-3Rα<sup>alto</sup>.

5 “Célula dendrítica tolerogénica” significa una célula dendrítica que deriva de una célula dendrítica inmadura expuesta a un estímulo de diferenciación que puede ser una combinación de citocinas, hormonas, vitaminas y otros agentes biológicos mediante la cual la célula dendrítica adquiere la capacidad de inducir tolerancia. Una célula dendrítica tolerogénica tiene baja capacidad para activar a células T efectoras pero una alta capacidad para inducir y activar células T reguladoras. Puede observarse una células dendrítica tolerogénica como una célula resistente a la  
10 maduración que actúa como “una CD inmadura” con un fenotipo estable que se conserva, incluso en presencia de señales proinflamatorias.

En una primera etapa, el método para obtener una población de células dendríticas tolerogénicas comprende incubar una población de precursores de células dendríticas en condiciones adecuadas para la formación de una  
15 población de células dendríticas inmaduras.

La expresión “precursor de célula dendrítica”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula capaz de diferenciarse en una célula dendrítica inmadura en presencia de una citocina adecuada (específicamente, G-CSF, GM-CSF, TNF-α, IL-4, IL-13, SCF (ligando de c-kit), ligando de Flt-3 o una combinación  
20 de los mismos) y es preferentemente una célula que puede diferenciarse en una célula dendrítica inmadura en cuatro semanas o menos, más preferentemente en 20 días o menos, aún más preferentemente en 18 días o menos y aún más preferentemente en 16 días o menos. Los ejemplos de precursores de células dendríticas incluyen, pero sin limitación, precursores de células dendríticas mieloides, precursores de células dendríticas linfoides y precursores de células dendríticas plasmacitoides. Los marcadores fenotípicos superficiales expresados por varios  
25 subconjuntos de precursores de células dendríticas se conocen bien en la técnica y pueden usarse con el fin de identificación, por ejemplo, mediante citometría de flujo o usando técnicas inmunohistoquímicas.

En una realización preferida, la población de precursores de células dendríticas es una población de precursores de células dendríticas monocíticas. Los “precursores de células dendríticas monocíticas”, tal como se usan en el  
30 presente documento, comprenden monocitos que tienen el receptor de GM-CSF en su superficie y otras células precursoras mieloides que responden a GM-CSF. Las células pueden obtenerse de cualquier tejido en donde residan, en particular tejidos linfoides, tales como el bazo, la médula ósea, los nódulos linfáticos y el timo. Los precursores de células dendríticas monocíticas también pueden aislarse del sistema circulatorio. La sangre periférica es una fuente fácilmente accesible de precursores de células dendríticas monocíticas. La sangre de cordón umbilical  
35 es otra fuente de precursores de células dendríticas monocíticas.

Los precursores de células dendríticas monocíticas pueden obtenerse a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que pueden obtenerse de sangre completa diluida 1:1 con suero salino tamponado o de  
40 concentrados de leucocitos (fracciones de “capa leucocitaria”, Banco de Sangre MSKCC) mediante centrifugación estándar con Ficoll-Paque PLUS (sin endotoxinas, n.º 17-1440-03, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia). Los precursores de Mo-CD son PBMC adherentes a plástico de cultivo tisular (n.º 35-3003; Falcon, Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) y pueden cultivarse en RPMI 1640 completo más suero humano normal (SHN) al 1 % en presencia de GM-CSF (1000 U/ml) e IL-4 (500 U/ml) con rellenado cada 2 días tal como se ha descrito. (Thurner B. et al., 1999, J. Immunol. Meth.; 223:1-15 y Ratzinger G. et al., 2004, J. Immunol. 173:2780-  
45 2791). En general, los precursores de células monocíticas pueden identificarse mediante la expresión de marcadores, tales como CD13 y CD33. Los precursores de células mieloides pueden diferenciarse en células dendríticas mediante las vías de CD14 o de CD1a. Por consiguiente, un precursor de célula dendrítica puede ser un precursor de célula dendrítica CD14<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> o un precursor de célula dendrítica CD14<sup>-</sup>CD1a<sup>+</sup>. En determinadas realizaciones, un precursor de célula dendrítica mieloides puede caracterizarse por un fenotipo  
50 CD34<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup>CD10<sup>-</sup>. En una realización preferida, el precursor de célula dendrítica mieloides es un monocito CD14<sup>+</sup>. El monocito CD14<sup>+</sup> también puede expresar el receptor de GM-CSF.

Los precursores de células dendríticas que se están usando como material de partida para el método divulgado anteriormente pueden ser autólogos para el sujeto que se va a tratar. En otras realizaciones, las células dendríticas  
55 que se están usando como material para los métodos divulgados anteriormente son células dendríticas heterólogas. Por ejemplo, si se va a tratar la enfermedad de injerto contra huésped, las células dendríticas que se van a usar como material de partida son células dendríticas que se obtuvieron del donante. El sujeto puede ser, por ejemplo, un ratón, una rata, un perro, un pollo, un caballo, una cabra, un burro o un primate. Más preferentemente, el sujeto es un ser humano.

La expresión “condiciones adecuadas para la formación de una población de células dendríticas inmaduras”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones que dan como resultado la diferenciación de los precursores de células dendríticas en células precursoras inmaduras. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, el cultivo durante aproximadamente tres días en presencia de SCF (50 ng/ml), GM-CSF (500 U/ml) y TNF-α (50 ng/ml) seguido de cultivo en presencia de CSF (50 ng/ml), GM-CSF (500 U/ml), IL-4 (250 U/ml) y TNF-α (50  
65 ng/ml).

ng/ml), más preferentemente, en presencia de GM-CSF (20 ng/ml) e IL-4 (20 ng/ml) o en presencia de GM-CSF (20 ng/ml) y SCF (10 ng/ml).

Este tratamiento da lugar a la generación de células dendríticas inmaduras. “Células dendríticas inmaduras” se refiere a células dendríticas que tienen una capacidad activadora de células T significativamente baja en comparación con un estado maduro. Específicamente, las células dendríticas inmaduras pueden tener una capacidad presentadora de antígenos que es menor de  $\frac{1}{2}$ , preferentemente menor de  $\frac{1}{4}$  que la de las células dendríticas cuya maduración se ha inducido mediante la adición de LPS (1  $\mu$ g/ml) y cultivo durante dos días. La capacidad presentadora de antígenos puede cuantificarse, por ejemplo, usando la capacidad activadora de células T alogénicas (prueba de linfocitos mixtos: se cultivan conjuntamente las células T alogénicas y las células dendríticas a una proporción de células T:células dendríticas de 1:10, o preferentemente a diversas proporciones; se añade [<sup>3</sup>H]-timidina 8 horas antes de terminar el cultivo y se evalúa la capacidad de crecimiento de las células T basándose en la cantidad de [<sup>3</sup>H]-timidina incorporada en el ADN de las células T (véase Gene Therapy 7; 249-254 (2000)). Como alternativa, puede evaluarse probando la capacidad para inducir células T citotóxicas específicas (CTL) usando un péptido, en el que se añade un péptido conocido restringido a la clase I de un antígeno determinado a las células dendríticas; las células dendríticas se cultivan conjuntamente con células T obtenidas de sangre periférica del mismo donante sano del que se habían recogido las células dendríticas (con 25 U/ml o preferentemente 100 U/ml de IL-2 en el día 3 o posterior). Las células T se estimulan preferentemente con células dendríticas tres veces durante 21 días, más preferentemente, se estimulan con células dendríticas dos veces durante 14 días. Las células efectoras resultantes se cultivan conjuntamente durante cuatro horas con células diana marcadas con <sup>51</sup>Cr (células tumorales positivas a péptido restringido a la clase I) a una relación de 100:1 a 2,5:1 (100:1, 50:1, 25:1, 20:1, 12,5:1, 10:1, 5:1 o 2,5:1), preferentemente a una relación de 10:1; y se cuantifica el <sup>51</sup>Cr liberado por las células diana (véase Arch Dermatol Res 292:325-332 (2000)). Además, las células dendríticas inmaduras tienen preferentemente capacidad fagocítica para antígenos y más preferentemente muestran expresión baja (por ejemplo, significativamente baja en comparación con las CD maduras inducidas por LPS, tal como se han descrito anteriormente) o negativa de receptores que inducen la coestimulación para la activación de células T.

En una realización preferida, la primera etapa del método se lleva a cabo en presencia de una composición de materia seleccionada del grupo que consiste en

- (i) una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta,
- (ii) un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente,
- (iii) un péptido tal como se ha divulgado anteriormente,
- (iv) un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente y
- (v) un vector tal como se ha divulgado anteriormente.

Las expresiones “isoforma de C4BP que carece de la cadena beta”, “polipéptido”, “péptido”, “polinucleótido” y “vector” se han descrito en detalle anteriormente.

La etapa llevada a cabo en presencia de una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta o del polinucleótido que codifica dicha molécula puede llevarse a cabo *in vivo* o *ex vivo*. En general, en estos métodos, las células dendríticas inmaduras pueden exponerse a la isoforma de C4BP que carece de la cadena beta dentro de un intervalo que tiene: un extremo inferior de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 50 o 100 microgramos por ml de medio; y un extremo superior de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 50, 100 o 200 microgramos por ml de medio. Lo más preferentemente, las CD se maduran en presencia de 1-10  $\mu$ g/ml de las isoformas  $\alpha_7\beta_0$  o  $\alpha_6\beta_0$  de C4BP y, lo más preferentemente, a 2, 5 y 10  $\mu$ g/ml.

En una segunda etapa, las células dendríticas inmaduras aisladas de acuerdo con la primera etapa se incuban entonces en condiciones adecuadas para la maduración de dichas células dendríticas inmaduras en células dendríticas maduras tolerogénicas. De este modo se logran composiciones altamente enriquecidas para células dendríticas tolerogénicas.

Las células dendríticas humanas maduras son células que son positivas para la expresión de CD40, CD80, CD86 y la clase II de HLA. Una célula dendrítica inmadura puede diferenciarse de una célula dendrítica madura, por ejemplo, basándose en marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD80 y CD86. Una célula dendrítica inmadura es débilmente positiva y preferentemente negativa para estos marcadores, mientras que una célula dendrítica madura es positiva.

Las CD maduras pierden la capacidad para captar antígeno y las células muestran expresión regulada positivamente de moléculas coestimuladoras de la superficie celular y secretan diversas citocinas. Específicamente, las CD maduras expresan mayores niveles de antígenos de la clase I y II del CMH y se identifican generalmente como CD80<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup> y CD86<sup>+</sup>. Una mayor expresión del CMH da lugar a un aumento en la densidad de antígenos en la superficie de la CD, mientras que la regulación positiva de las moléculas CD80 y CD86 fortalece la señal de activación de células T por los homólogos de las moléculas coestimuladoras, tales como CD28 en las células T.

65

La expresión “condiciones adecuadas para la maduración de dichas células dendríticas inmaduras en células dendríticas maduras tolerogénicas”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a métodos que permiten la maduración de una célula dendrítica inmadura en una célula dendrítica madura tolerogénica. Las células dendríticas maduras pueden prepararse (es decir, madurarse) poniendo en contacto las células dendríticas inmaduras con cantidades o concentraciones eficaces de un agente de maduración de células dendríticas. Los agentes de maduración de células dendríticas pueden incluir, por ejemplo, BCG, IFN $\gamma$ , LPS, TNF $\alpha$  y similares. Las cantidades eficaces de BCG se encuentran en el intervalo de aproximadamente 10<sup>5</sup> a 10<sup>7</sup> ufc por mililitro de medio de cultivo. Las cantidades eficaces de IFN $\gamma$  se encuentran en el intervalo de aproximadamente 100-1000 U por mililitro de medio de cultivo tisular. El Bacilo de Calmette Guerin (BCG) es una cepa no virulenta de *M. bovis*. Tal como se usa en el presente documento, BCG se refiere a BCG completo así como a componentes de la pared celular, lipoarabidomananos derivados de BCG y otros componentes de BCG que se asocian con la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo 2. El BCG está opcionalmente inactivado, tal como BCG inactivado con calor, BCG tratado con formalina y similares.

Las CD inmaduras se ponen típicamente en contacto con cantidades eficaces de BCG e IFN $\gamma$  durante aproximadamente una hora a aproximadamente 48 horas. Las células dendríticas inmaduras pueden cultivarse y madurarse en condiciones de cultivo adecuadas para maduración. Los medios de cultivo tisular adecuados incluyen AIM-V<sup>y</sup> n.º 174, RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 15™ y similares. El medio de cultivo tisular puede complementarse con aminoácidos, vitaminas, citocinas, tales como GM-CSF, cationes divalentes y similares para promover la maduración de las células. Típicamente se usan aproximadamente 500 unidades/ml de GM-CSF.

En una realización preferida, la segunda etapa se lleva a cabo en presencia de una composición de materia seleccionada del grupo que consiste en

- (i) una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta,
- (ii) un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente,
- (iii) un péptido tal como se ha divulgado anteriormente,
- (iv) un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente y
- (v) un vector tal como se ha divulgado anteriormente.

La maduración de células dendríticas puede controlarse mediante métodos conocidos en la técnica para células dendríticas. Pueden detectarse marcadores de la superficie celular en ensayos familiares en la técnica, tales como citometría de flujo, inmunohistoquímica y similares. También puede controlarse la producción de citocinas en las células (por ejemplo, mediante ELISA, otro ensayo inmunitario o mediante el uso de una matriz de oligonucleótidos). Las CD maduras también pierden la capacidad para captar antígenos, lo que puede analizarse mediante ensayos de captación familiares para un experto habitual en la materia.

La expresión “células dendríticas maduras” se refiere a células dendríticas que tienen una capacidad de presentación de antígenos significativamente alta para células T o similares en comparación con el estado inmaduro. Específicamente, las células dendríticas maduras pueden tener una capacidad de presentación de antígenos que es la mitad o más fuerte, preferentemente equivalente o más fuerte que la capacidad presentadora de antígenos de células dendríticas en las que se ha inducido la maduración añadiendo LPS (1  $\mu$ g/ml) y cultivando durante dos días. Además, las células dendríticas maduras tienen preferentemente una capacidad fagocítica débil o nula para antígenos y más preferentemente son positivas para la expresión de receptores que inducen la coestimulación para la activación de células T. La activación de células dendríticas se refiere a la transición de célula dendrítica inmadura a madura; y las células dendríticas activadas abarcan células dendríticas maduras y células dendríticas en el proceso de transición, en las que está elevada la expresión de CD80 y CD86 que inducen señales coestimuladores mediante los estímulos activadores.

La población de células tolerogénicas puede comprender exacta o aproximadamente un 50 % o más de la composición celular y puede ser preferentemente exacta o aproximadamente un 75 % o más de la composición celular y puede ser del 90 % o más. Las células deseadas se identifican según su fenotipo superficial, mediante la capacidad para inducir tolerancia, etc. La población de células enriquecidas puede usarse inmediatamente o puede congelarse a temperaturas de nitrógeno líquido y almacenarse durante largos periodos de tiempo, descongelarse y ser capaces de volver a usarse. Las células se almacenarán normalmente en medio de DMSO al 10 %, FCS al 50 %, RPMI 1640 al 40 %. La población de células enriquecidas respecto de células dendríticas tolerogénicas puede usarse en una diversidad de ensayos y cultivos de exploración, tal como se describe más adelante.

Opcionalmente, las CD pueden purificarse adicionalmente mediante clasificación de células marcadas por fluorescencia usando anticuerpos contra marcadores de CD. Las CD también pueden aislarse usando anticuerpos contra CD, en los que los anticuerpos se unen a perlas magnéticas. En una realización específica, se aíslan las CD que coexpresan CD32a y CD32b usando FACS.

Las células separadas pueden recogerse en cualquier medio adecuado que mantiene la viabilidad de las células, que normalmente tiene un lecho de suero en el fondo del tubo de recogida. En el comercio se dispone de diversos medios y pueden usarse de acuerdo con la naturaleza de las células. El medio de cultivo puede ser líquido o

semisólido, por ejemplo, que contiene agar, metilcelulosa, etc. La población celular puede suspenderse de manera conveniente en un medio nutricional adecuado, tal como DMEM, HBSS, dPBS, RPMI de Iscove, medio Iscove, DMEM o RPMI-1640 y similares, normalmente complementados con suero de ternero fetal (aproximadamente un 5-10 %), L-glutamina, un tiol, particularmente 2-mercaptoetanol y antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomina.

Opcionalmente, pueden usarse técnicas convencionales, tales como observación morfológica y tinción inmunológica, para verificar la presencia de células dendríticas. Por ejemplo, puede evaluarse la pureza de las células dendríticas mediante citometría de flujo usando anticuerpos marcados con fluorocromo dirigidos contra uno o más de los marcadores de la superficie celular característicos.

En determinadas realizaciones, se divulgan métodos para producir células dendríticas tolerogénicas específicas de antígeno. Para generar células dendríticas tolerogénicas específicas de antígeno, se somete a las células dendríticas a un método tal como se ha divulgado anteriormente para inhibir la maduración de las células dendríticas y posteriormente o de manera concurrente, se ponen en contacto las células dendríticas con uno o más antígenos contra los que se desea la tolerancia. Si se van a usar células dendríticas tolerogénicas para tratar una enfermedad autoinmunitaria, el antígeno o antígenos son los antígenos que causan la reacción inmunitaria que subyace a la enfermedad inmunitaria. En determinadas realizaciones más específicas, las células dendríticas tolerogénicas (es decir, células dendríticas cuya maduración se ha inhibido mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente) se ponen en contacto con una diversidad de antígenos diferentes para producir una población de células dendríticas tolerogénicas específicas de antígeno. En otras realizaciones, por ejemplo, si las células dendríticas tolerogénicas se van a usar para tratar la enfermedad de injerto contra huésped, las células dendríticas tolerogénicas (es decir, células dendríticas cuya maduración se ha inhibido mediante un método tal como se divulga anteriormente) se ponen en contacto con tejido del injerto, en el que el tejido está en complejo con o unido a anticuerpo para producir una población de células dendríticas tolerogénicas específicas para antígenos del injerto.

En determinadas realizaciones, las células dendríticas tolerogénicas específicas de antígeno pueden generarse (a) poniendo en contacto una célula dendrítica inmadura con una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta, un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente, un péptido tal como se ha divulgado anteriormente, un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente o un vector tal como se ha divulgado anteriormente y (b) exponiendo a la célula a un antígeno, en el que el antígeno es el antígeno contra el que se desea tolerancia, por ejemplo, un autoantígeno. En una realización específica, las etapas (a) y (b) se llevan a cabo secuencialmente, de tal forma que la etapa (a) se lleva a cabo en primer lugar seguido de la etapa (b). Las células dendríticas tolerogénicas específicas de antígeno también pueden cargarse con antígeno para su presentación transduciendo las células con ARN que codifica el antígeno (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.387.701; la Patente de Estados Unidos n.º 6.670.186; la Solicitud de Estados Unidos n.º 10/362.715). Los métodos divulgados anteriormente también pueden combinarse con otros métodos conocidos en la técnica para proporcionar ventajas adicionales (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.831.068; la Solicitud de Estados Unidos n.º 11/246.387).

En algunas realizaciones, las células dendríticas tolerogénicas se usan para producir células T reguladoras (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 10/661.804). En resumen, pueden producirse células T reguladoras a partir de una población que comprende células T CD4+ y/o células T CD8+. Estas poblaciones de células T pueden aislarse de un sujeto o pueden cultivarse. También pueden usarse subpoblaciones de células T, tales como, por ejemplo, poblaciones clasificadas según los marcadores superficiales que comprendan poblaciones enriquecidas de células particulares (por ejemplo, células T CD4+CD25+ o células T CD4+CD25<sup>-</sup>). Entonces las células T se cultivan o incuban con células dendríticas tolerogénicas. Si las células T reguladoras se producen *in vitro*, las células dendríticas tolerogénicas pueden ser alogénicas para o singénicas con las células T. En algunas realizaciones, las CD tolerogénicas se cargan con antígeno (por ejemplo, se pulsan con antígeno o se transfectan con ARN que codifica el antígeno). En dichas realizaciones, las CD tolerogénicas pueden presentar el antígeno a células T. Durante la producción de células T reguladoras, pueden exponerse las células T a y/o cultivarse con las CD tolerogénicas una vez o más de una vez. Por ejemplo, pueden cultivarse las células T con CD durante días o semanas; las CD en el cultivo mixto pueden rellenarse en caso necesario. En algunas realizaciones, el cultivo continuará hasta que se haya obtenido una cantidad terapéutica de células T reguladoras. Pueden usarse otras técnicas de cultivo y/o aditivos para mejorar los resultados obtenidos; por ejemplo, el medio de cultivo también puede contener citocinas, tales como IL-2.

En general, las células T reguladoras secretan IL-10 y/o TGF-beta (véase, por ejemplo, Walsh et al., 2004, J. Clin. Invest. 114: 1398-1403); se conocen en la técnica ensayos para confirmar la secreción de estas citocinas. En algunas realizaciones, las células T reguladoras inhibirán una reacción de linfocitos mixtos en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 % o 100 %. Los ensayos de reacción de linfocitos mixtos se conocen bien en la técnica. Las células T reguladoras pueden ser específicas de antígeno. Las células T reguladoras CD4+CD25+ expresan generalmente marcadores de la superficie celular característicos, incluyendo CD4, CD25 y Foxp3; se conocen bien en la técnica ensayos para marcadores de la superficie celular.

*Células dendríticas tolerogénicas obtenidas usando isoformas de C4BP que carecen de la cadena β y usos terapéuticos de las mismas*

En otro aspecto, se divulgan células dendríticas tolerogénicas obtenidas diferenciando y/o madurando células dendríticas en presencia de una isoforma de C4BP que carece de la cadena  $\beta$ , un polipéptido que comprende la cadena alfa de C4BP, un péptido tal como se ha definido anteriormente, un polinucleótido que codifica cualquiera de dichos polipéptidos o un vector que comprende dicho polipéptido.

Las células dendríticas tolerogénicas se caracterizan por que muestran una o más de las siguientes características:

- 10 - La célula es HLA-DR<sup>+</sup>. El término “positiva”, cuando se aplica a un marcador dado, indica que el nivel de expresión de un marcador de la superficie celular particular en una CD tolerogénica producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente es sustancialmente el mismo que en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa, o una CD inmunoestimuladora nativa obtenida mediante maduración *in vitro*).
- 15 - La célula es CD80<sup>-</sup>, CD83<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD1a<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>, IDO<sup>-</sup> y/o BIC-1<sup>-</sup>. El término “negativa”, cuando se aplica a un marcador dado, indica que el nivel de expresión de un marcador de la superficie celular específico en una CD tolerogénica producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable en comparación con el nivel de expresión del mismo marcador de la superficie celular en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa, o una CD inmunoestimuladora nativa obtenida mediante maduración *in vitro*).
- 20 - La célula no secreta o secreta cantidades reducidas de citocinas inflamatorias, tales como IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8 y/o IL-6 con respecto a las células dendríticas maduras. La expresión “cantidades reducidas”, cuando se aplica a una citocina dada, indica que el nivel de expresión de una citocina dada en una CD tolerogénica producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable en comparación con el nivel de expresión del mismo marcador de la superficie celular en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa, o una CD inmunoestimuladora nativa obtenida mediante maduración *in vitro*).
- 25 - La célula secreta cantidades aumentadas de IL-10 con respecto a las células dendríticas maduras. La expresión “secreta cantidades aumentadas”, cuando se aplica a una citocina dada, indica que el nivel de secreción de una citocina particular en una CD tolerogénica producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente está aumentada en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con el nivel de secreción del mismo marcador de la superficie celular en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa, o una CD inmunoestimuladora nativa obtenida mediante maduración *in vitro*).
- 30 - La célula muestra una morfología redondeada. La expresión “morfología redondeada”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una morfología en la que las células muestran una serie de proyecciones que sobresalen de la superficie celular que está reducida en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable en comparación con el número de proyecciones en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa, o una CD inmunoestimuladora nativa obtenida mediante maduración *in vitro*). La morfología de una célula puede determinarse, por ejemplo, mediante microscopía electrónica de barrido, tal como se describe en el ejemplo 4 de la presente invención.
- 35 - La célula permanece viable después del proceso de diferenciación/maduración. El término “viable”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a poblaciones en las que menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 % sufren apoptosis después del tratamiento con un estímulo de maduración. La apoptosis puede determinarse mediante cualquier método conocido comúnmente en la técnica, tal como tinción de anexina V/7-ADD, ensayo de activación de caspasa-3, ensayo TUNEL y de fragmentación de ADN, determinación del potencial de membrana mitocondrial y similares.
- 40 - La célula muestra un comportamiento quimiotáctico reducido hacia CCL21 con respecto a las células dendríticas maduras. La expresión “comportamiento quimiotáctico reducido”, tal como se usa en el presente documento, indica que el nivel de quimiotaxis de una célula producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente hacia CCL21 en una CD tolerogénica está aumentado en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable en comparación con el nivel de quimiotaxis hacia la misma citocina en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa, o una CD inmunoestimuladora nativa obtenida mediante maduración *in vitro*). El comportamiento quimiotáctico de una célula dendrítica tolerogénica hacia CCL21 puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 5 de la presente invención y/o
- 45 - La célula muestra una capacidad reducida para inhibir la proliferación de células T alogénicas con respecto a las células dendríticas maduras. La expresión “capacidad reducida para inhibir la proliferación de células T alogénicas”, tal como se usa en el presente documento, indica que el nivel de proliferación de las células T alogénicas puestas en contacto con una célula producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente está reducido en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable, en comparación con el nivel de proliferación observado en células T alogénicas puestas en contacto con una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD
- 50
- 55
- 60
- 65

inmunoestimuladora madura nativa, o una CD inmunoestimuladora nativa obtenida mediante maduración *in vitro*). Puede llevarse a cabo la capacidad de una célula dendrítica tolerogénica para inhibir la proliferación de células T alogénicas, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 6 de la presente invención.

- La célula muestra un fenotipo inmunomodulador estable que se conserva en presencia de señales proinflamatorias, en contraste con las CD inmaduras. La capacidad de una célula dendrítica tolerogénica para mostrar un fenotipo inmunomodulador estable puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 16 de la presente invención.
- La célula muestra la capacidad de inhibir la diferenciación de Th1 en condiciones proinflamatorias con respecto a células dendríticas maduras. la expresión "inhibir la diferenciación de Th1", tal como se usa en el presente documento, indica que el nivel de células Th1 producidas por las células T puestas en contacto con una célula producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente está reducida en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con el nivel de diferenciación de Th1 observado en células T alogénicas puestas en contacto una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa, o una CD inmunoestimuladora nativa obtenida mediante maduración *in vitro*). La capacidad de una célula dendrítica tolerogénica para inhibir la diferenciación de Th1 puede determinarse, por ejemplo, midiendo la producción de IFN-gamma, tal como se describe en el ejemplo 17 de la presente invención.

La célula muestra una capacidad aumentada para generar células T reguladoras (Treg) con respecto a las células dendríticas maduras. La expresión "capacidad aumentada para generar células T reguladoras", tal como se usa en el presente documento, indica que el nivel de generación de células T reguladoras de células T puestas en contacto con una célula producida mediante un método tal como se divulga anteriormente está aumentada en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con el nivel de generación de células T puestas en contacto con una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa, o una CD inmunoestimuladora nativa obtenida mediante maduración *in vitro*). La capacidad de una célula dendrítica tolerogénica para generar células T reguladoras (Treg) puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 17 de la presente invención. En una realización preferida, las células tolerogénicas son HLA-DR<sup>+</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD83<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD1a<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>, IDO<sup>-</sup> y/o BIC-1<sup>-</sup>. En una realización preferida, las células tolerogénicas son CD40<sup>+</sup>. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son CD40<sup>-</sup>.

En una realización preferida, las células tolerogénicas se caracterizan por que muestran una o más de las características anteriores:

- CD1a<sup>-</sup>,
- CD86<sup>-</sup>
- IDO<sup>-</sup>
- Resistencia a la apoptosis

En una realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup>. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup> e IDO<sup>-</sup>. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>, IDO<sup>-</sup> y resistentes a la apoptosis. En una realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup> e IDO<sup>-</sup>. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup> y resistentes a la apoptosis. En una realización preferida, las células tolerogénicas son CD86<sup>-</sup> e IDO<sup>-</sup>. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son CD86<sup>-</sup> y resistentes a la apoptosis. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son IDO<sup>-</sup> y resistentes a la apoptosis.

En otra realización, las células dendríticas tolerogénicas son capaces de inducir tolerancia específica de Ag (o hiporreactividad) de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria humanas mediante las presentes CD tolerogénicas tratadas con C4BP(b<sup>-</sup>) o con factor H. La tabla 3 proporciona un resumen de las características de las células tolerogénicas en comparación con células dendríticas inmaduras, células dendríticas maduras y células dendríticas tolerogénicas obtenidas tratando células dendríticas inmaduras con vitamina D3.

**+ Inducción con LPS**

Fenotipo (Expresión de ARN/proteína)	<u>iCD</u>	<u>mCD</u>	<u>CD C4BP (β)</u>	<u>CD FH</u>	<u>CD Vit D<sub>3</sub></u>
<b>Marcadores de superficie</b>					
HLA-DR	++	+++	+++	++	+
CD40	++	+++	++	++	+
CD83	-	+++	+	+	+
CD86	+	+++	+	+	-
CD14	-	-	+	+	+
CD1a	++	++	+	+	-

+ Inducción con LPS					
<u>Fenotipo</u> (Expresión de ARN/proteína)	<u>iCD</u>	<u>mCD</u>	<u>CD C4BP (<math>\beta</math>)</u>	<u>CD FH</u>	<u>CD Vit D<sub>3</sub></u>
<b>Marcadores de superficie</b>					
CCR7	+	+++	++	++	++
<b>Citocinas</b>					
IL-12	-	+++	-	-	- (*)
IL-6	-	+++	+	+	n.d.
IL-8	+	+++	++	++	n.d.
IL-10	-	++	+++	+	++ (*)
TNF- $\alpha$	-	+++	+	+	n.d.
IFN- $\gamma$	-	+++	-	-	n.d.
<b>Perfil transcripcional</b>					
IDO	+	+++	-	-	+++(**)
BIC-1	+	+++	+	+	n.d.
SOD-2	++	+++	n.d.	+	
<b>Morfología</b>					
Densidad y longitud de dendritas	+	+++	+	+	n.d.
<b>Viabilidad</b>					
Apoptosis después del tratamiento	-	-	-	-	+
<b>Ensayos funcionales</b>					
Endocitosis (DQ-OVA)	+++	+	+	+	n.d.
Quimiotaxis (CCL21)	n.d.	+++	-	-	n.d.
Aloproliferación (T CD3 <sup>+</sup> )	+	+++	+	+	-

Tabla 3.- Rasgos diferenciales de células dendríticas tratadas con C4BP ( $\beta$ ) y tratadas con factor H. iCD, CD inmaduras no tratadas. mCD, CD no tratadas e inducidas con LPS; CD C4BP ( $\beta$ ), CD tratadas con C4BP ( $\alpha 7\beta 0$ ) o C4BP ( $\alpha 6\beta 0$ ) e inducidas por LPS; CD FH, CD tratadas con factor H e inducidas con LPS; CD Vit D<sub>3</sub>, CD tratadas con Vit D<sub>3</sub> e inducidas con LPS. (-) despreciable; (+) bajo; (++) moderado; (+++) alto; n.d., no determinado.

(\*) Datos extraídos de: Naranjo-Gomez et al. (2011) *J. Transl. Med.* 9:89.

(\*\*) Datos extraídos de: Heitger (2011) *Curr. Med. Chem.* 18:2222-33

5 En otro aspecto, se divulga una población de células que comprende al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de células dendríticas tolerogénicas tal como se han divulgado anteriormente; preferentemente, la población de células comprende al menos un 80 % de células dendríticas tolerogénicas tal como se han divulgado anteriormente.

10 En otro aspecto más, se divulga una población de células dendríticas tolerogénicas obtenidas usando una isoforma de C4BP que carece de cadena  $\beta$ , un polipéptido que comprende la cadena alfa de C4BP tal como se ha definido anteriormente, un péptido tal como se ha definido anteriormente, un polinucleótido que codifica cualquiera de dichos polipéptidos o un vector que comprende dicho polipéptido para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica.

15 En otro aspecto, se divulga el uso de una célula tolerogénica obtenida usando una isoforma de C4BP que carece de la cadena  $\beta$ , un polipéptido que comprende la cadena alfa de C4BP tal como se ha definido anteriormente, un péptido tal como se ha definido anteriormente, un polinucleótido que codifica cualquiera de dichos polipéptidos o un vector que comprende dicho polipéptido para la producción de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica.

20 En otro aspecto, se divulga un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica en un sujeto que lo necesite que comprende la administración a dicho sujeto de una célula tolerogénica obtenida usando una isoforma de C4BP que carece de la cadena  $\beta$ , un polipéptido que comprende la cadena alfa de C4BP tal como se ha definido anteriormente, un péptido tal como se ha definido anteriormente, un polinucleótido que codifica cualquiera de dichos polipéptidos o un vector que comprende dicho polipéptido.

25 En otro aspecto, se divulga un método para aumentar la población de células T reguladoras en un sujeto que lo necesite que comprende la administración a dicho sujeto de una población de células dendríticas tolerogénicas obtenidas usando una isoforma de C4BP que carece de la cadena  $\beta$ , un polipéptido que comprende la cadena alfa

de C4BP tal como se ha definido anteriormente, un péptido tal como se ha definido anteriormente, un polinucleótido que codifica cualquiera de dichos polipéptidos o un vector que comprende dicho polipéptido.

5 En otro aspecto, se divulga una población de células dendríticas tolerogénicas obtenida usando una isoforma de C4BP que carece de la cadena  $\beta$ , un polipéptido que comprende la cadena alfa de C4BP tal como se ha definido anteriormente, un péptido tal como se ha definido anteriormente, un polinucleótido que codifica cualquiera de dichos polipéptidos o un vector que comprende dicho polipéptido para su uso en el aumento de una población de células T reguladoras.

10 La prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica se logra mediante el aumento de una población de células T reguladoras.

15 La expresión "aumento de una población de células T reguladoras", tal como se usa en el presente documento, significa que la población de células dendríticas tolerogénicas tal como se ha divulgado anteriormente produce un aumento en el número de células T reguladoras con respecto a un sujeto tratado con una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa o una CD inmunoestimuladora madura obtenida mediante maduración *in vitro*). La población de células T reguladoras está aumentada en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % 99 % o 100 % en comparación con un sujeto tratado con una célula de control. La capacidad de la población de células dendríticas tolerogénicas para aumentar la población de células T reguladoras puede determinarse, por ejemplo, tal como se ha descrito en el ejemplo 17.

#### *Métodos terapéuticos*

25 En otra realización, se proporcionan métodos para tratar y/o prevenir enfermedades inmunológicas usando los polipéptidos, polinucleótidos y vectores divulgados anteriormente. La enfermedad inmunológica que se va a tratar con las composiciones tal como se han divulgado anteriormente incluye, sin limitación, una enfermedad inflamatoria, septicemia, una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped y una enfermedad de hipersensibilidad. Un sujeto que necesite dicho tratamiento puede ser un ser humano o puede ser un primate no humano u otro animal (es decir, para uso veterinario) que haya desarrollado síntomas de una enfermedad inmunológica o que esté en riesgo de desarrollar una enfermedad inmunológica. Los ejemplos de primates no humanos y otros animales incluyen, pero sin limitación, animales de granja, mascotas y animales de zoológico (por ejemplo, caballos, vacas, búfalos, llamas, cabras, conejos, gatos, perros, chimpancés, orangutanes, gorilas, monos, elefantes, osos, grandes felinos, etc.).

30 Las expresiones "enfermedad inmunoinflamatoria", "septicemia", "enfermedad autoinmunitaria" y "rechazo de trasplante" se han descrito con detalle anteriormente y se usan con el mismo significado en el contexto del método terapéutico.

35 Tal como se usa en el presente documento, un paciente (o sujeto) puede ser un mamífero, incluyendo un ser humano, que pueda tener o estar afectado de una enfermedad o trastorno inmunológico o que pueda estar libre de enfermedad detectable. Por consiguiente, el tratamiento puede administrarse a un sujeto que tenga una enfermedad existente o el tratamiento puede ser profiláctico, administrado a un sujeto que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.

40 La dosis de la composición para tratar una enfermedad o trastorno inmunológico puede determinarse de acuerdo con parámetros comprendidos por una persona experta en la técnica médica. Por consiguiente, la dosis adecuada puede depender de la afección del paciente (por ejemplo, ser humano), eso es, estadio de la enfermedad, estado de salud general, así como la edad, género y peso y otros factores familiares para un experto en la técnica médica.

45 En un aspecto, se divulga un método para aumentar las poblaciones de células dendríticas tolerogénicas y/o de células T reguladoras en un sujeto que lo necesite que comprende la administración ad icho sujeto de un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente, un péptido tal como se ha divulgado anteriormente, un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente o un vector tal como se ha divulgado anteriormente.

50 En otro aspecto más, se divulga un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente, un péptido tal como se ha divulgado anteriormente, un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente o un vector tal como se ha divulgado anteriormente para su uso en el aumento de una población de células dendríticas tolerogénicas y/o de una población de células T reguladoras.

55 La prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica se logra mediante el aumento de una población de células dendríticas tolerogénicas y/o de una población de células T reguladoras.

60 Se entiende que la expresión "aumento de la población de células dendríticas tolerogénicas" significa que la administración de un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente, un péptido tal como se ha divulgado anteriormente, un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente o un vector tal como se ha divulgado anteriormente produce un aumento en el número de células dendríticas tolerogénicas con respecto a un sujeto no



tratado. La población de células dendríticas tolerogénicas aumenta en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % 99 % o 100 % en comparación con un sujeto no tratado. La capacidad de un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente, un péptido tal como se ha divulgado anteriormente, un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente o un vector tal como se ha divulgado anteriormente para  
5 aumentar una población de células dendríticas tolerogénicas puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos 1 a 5.

La expresión “aumento de una población de células T reguladoras”, tal como se usa en el presente documento, significa que un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente, un péptido tal como se ha divulgado  
10 anteriormente, un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente o un vector tal como se ha divulgado anteriormente produce un aumento en el número de células T reguladoras con respecto a un sujeto no tratado. La población de células T reguladoras aumenta en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % 99 % o 100 % en comparación con un sujeto no tratado. La capacidad de un polipéptido tal como se ha  
15 divulgado anteriormente, un péptido tal como se ha divulgado anteriormente, un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente o un vector tal como se ha divulgado anteriormente para aumentar la población de células T reguladoras puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 17.

#### *Composiciones farmacéuticas*

20 Se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido tal como se ha divulgado anteriormente, un polinucleótido tal como se ha divulgado anteriormente, un vector tal como se ha divulgado anteriormente, una célula tal como se ha divulgado anteriormente o una célula dendrítica tolerogénica tal como se ha divulgado anteriormente.

25 Una composición puede ser una composición farmacéutica que sea una solución, suspensión o emulsión acuosa o no acuosa estéril que comprende adicionalmente un portador fisiológicamente aceptable o adecuado. Un portador farmacéuticamente aceptable o adecuado puede incluir (o referirse a) un excipiente (es decir, un material no tóxico que no interfiere con la actividad del principio activo) y/o un diluyente. Dichas composiciones pueden estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Como alternativa, las composiciones descritas en el presente documento  
30 pueden formularse en forma liofilizada o pueden encapsularse los compuestos dentro de liposomas usando tecnología conocida en la técnica. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otros componentes que pueden ser biológicamente activos o inactivos. Dichos componentes incluyen, pero sin limitación, tampones (por ejemplo, suero salino neutro tamponado o suero salino tamponado con fosfato), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos, tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión, estabilizantes, colorantes, agentes aromatizantes, agentes de  
35 suspensión y/o conservantes.

Puede emplearse cualquier excipiente o portador conocido por los expertos habituales en la materia para su uso en composiciones farmacéuticas, en las composiciones descritas en el presente documento. Los excipientes para uso  
40 farmacéutico se conocen bien y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro ed. 1985). En general, el tipo de excipiente se selecciona basándose en el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier modo de administración adecuado incluyendo, por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intratecal, rectal, vaginal, intraocular, subconjuntival, sublingual o parenteral incluyendo inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular,  
45 intraesternal, intracavernosa, intrameatal o intrauretral. Para administración parenteral, el portador comprende preferentemente agua, suero salino, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, puede emplearse cualquiera de los excipientes anteriores o un excipiente o portador sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, caolín, glicerina, dextrinas de almidón, alginato sódico, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, glucosa, sacarosa y/o carbonato de magnesio.

50 Una composición farmacéutica (por ejemplo, para administración oral o suministro mediante inyección) puede estar en forma de un líquido. Una composición farmacéutica líquida puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles que pueden servir como disolvente o  
55 medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos; antioxidantes; agentes quelantes; tampones y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una preparación parenteral puede estar confinada en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis fabricados de vidrio o de plástico. Se prefiere el uso de suero salino fisiológico y una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

60 Los agentes descritos en el presente documento, incluyendo polipéptidos, péptidos, polinucleótidos, vectores, células y células dendríticas tolerogénicas, pueden formularse para liberación sostenida o lenta. Dichas composiciones pueden prepararse generalmente usando tecnologías bien conocidas y administrarse, por ejemplo, mediante implante oral, rectal o subcutáneo o mediante implante en el sitio diana. Las formulaciones de liberación sostenida pueden contener un agente disperso en una matriz portadora y/o estar contenidos en un depósito rodeado  
65 por una membrana que controla la velocidad. Los excipientes para su uso en dichas formulaciones son

biocompatibles y también pueden ser biodegradables; preferentemente, la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación del componente activo. La cantidad de compuesto activo contenido en una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implante, de la velocidad y la duración esperada de la liberación y de la naturaleza de la afección que se va a tratar o prevenir.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de un modo adecuado para la enfermedad que se va a tratar (o prevenir) según se determina por los expertos en la técnica médica. Se determinarán una dosis adecuada y una duración y frecuencia adecuada de la administración por medio de factores tales como la afección del paciente, el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, la forma particular del principio activo y el método de administración. En general, un régimen de dosis y tratamiento adecuado proporciona las composiciones en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico (por ejemplo, un resultado clínico mejorado, tal como remisiones completas o parciales más frecuentes o una mayor supervivencia sin enfermedad y/o general o una reducción de la gravedad de los síntomas). Para uso profiláctico, una dosis debería ser suficiente para prevenir, retrasar la aparición de o reducir la gravedad de una enfermedad asociada con una enfermedad o trastorno inmunológico.

20 Las dosis óptimas pueden determinarse generalmente usando modelos experimentales y/o ensayos clínicos. La dosis óptima puede depender de la masa corporal, el peso o el volumen sanguíneo del paciente. En general, la cantidad de polipéptido presente en una dosis o producida in situ mediante ADN presente en una dosis varía de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 1000 µg por kg de huésped. Normalmente se prefiere el uso de la dosis mínima que es suficiente para proporcionar una terapia eficaz. En general puede controlarse a los pacientes respecto de la eficacia terapéutica o profiláctica usando ensayos adecuados para la afección que se esté tratando o previniendo, siendo dichos ensayos familiares para los expertos habituales en la técnica. Cuando se administra en forma líquida, el tamaño adecuado de la dosis variará según el tamaño del paciente, pero típicamente estará en el intervalo de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 500 ml (que comprenden de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 1000 µg por kg) para un sujeto de 10-60 kg.

30 Para composiciones farmacéuticas que comprenden un agente que es una molécula de ácido nucleico, incluyendo un aptámero, la molécula de ácido nucleico puede estar presente dentro de cualquiera de una diversidad de portadores de suministro conocidos para los expertos en la materia, incluyendo ácidos nucleicos y sistemas de expresión bacterianos, víricos y de mamífero tales como, por ejemplo, construcciones recombinantes tal como se proporcionan en el presente documento. Las técnicas para incorporar ADN en dichos sistemas de expresión se conocen bien por los expertos habituales en la técnica. El ADN también puede estar "desnudo", tal como se describe, por ejemplo, en Ulmer et al., Science 259:1745-49, 1993 y revisado por Cohen, Science 259:1691-1692, 1993. La captación de ADN desnudo puede aumentarse recubriendo el ADN sobre perlas biodegradables, que se transportan de manera eficaz al interior de las células.

40 Las moléculas de ácido nucleico pueden suministrarse a una célula de acuerdo con uno cualquiera de varios métodos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, Akhtar et al., Trends Cell Bio. 2:139 (1992); Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer et al., Mol. Membr. Biol. 16:129-40 (1999); Hofland y Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-92 (1999); Lee et al., ACS Symp. Ser. 752:184-92 (2000); Patente de Estados Unidos n.º 6.395.713; Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 94/02595); Selbo et al., Int. J. Cancer 87:853-59 (2000); Selbo et al., Tumour Biol. 23:103-12 (2002); Publicaciones de las Solicitudes de Patente de Estados Unidos n.º 2001/0007666 y 2003/077829). Dichos métodos de suministro conocidos por los expertos en la materia incluyen, pero sin restricción, encapsulación en liposomas mediante iontoforesis o mediante incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas (véase, por ejemplo, Gonzalez et al., Bioconjug. Chem. 10: 1068-74 (1999); Wang et al., Publicaciones de Solicitudes Internacionales n.º WO 03/47518 y WO 03/46185); microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y PLGA (también útiles para el suministro de péptidos y polipéptidos y otras sustancias) (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.447.796; la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2002/130430); nanocápsulas biodegradables; y microesferas bioadhesivas o mediante vectores proteicos (Publicación de Solicitud Internacional n.º WO 00/53722). En otra realización, las moléculas de ácido nucleico para su uso en la alteración (supresión o potenciación) de una respuesta inmunitaria en una célula inmunitaria y para tratar una enfermedad o trastorno inmunológico también pueden formularse o complejarse con polietilénimina y derivados de la misma, tales como derivados de polietilénimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilénimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL) (véase también, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2003/0077829).

60 Las composiciones farmacéuticas/medicamentos pueden comprender, por ejemplo, principios activos adicionales, por ejemplo, otros anticuerpos inmunomoduladores, tales como anti-ICOS, anti-CD154, anti-CD134L o proteínas recombinantes, tales como, pero sin limitación rCTLA-4 (CD152), rOX40 (CD134) o agentes antiinflamatorios o compuestos inmunomoduladores, tales como, pero sin limitación ciclosporina A, FTY720, RAD, rapamicina, FK506, 15-desoxipergualina, esteroides; tal como se ha descrito anteriormente.

65 *Usos terapéuticos del factor H*

Los autores de la presente invención también han descubierto que el factor H es capaz de inhibir la activación de células dendríticas y de promover la adquisición de rasgos característicos de células tolerogénicas. Tal como se muestra en los ejemplos 9 a 15 de la presente invención, el factor H es capaz de regular negativamente marcadores de activación de Mo-CD humanas y la liberación de citocinas inflamatorias por Mo-CD maduras con LPS.

5 Además, el factor H modifica la morfología de las Mo-CD humanas, reduce el potencial endocítico de las CD inmaduras, reduce la quimiotaxis de Mo-CD humanas y la proliferación de células T alogénicas en respuesta a la exposición a células dendríticas.

10 Además, los autores de la presente invención han descubierto que el factor H genera células dendríticas tolerogénicas que tienen una capacidad estimuladora de células T reducida y la capacidad no solo de prevenir la diferenciación de Th1 en condiciones proinflamatorias, sino también de generar células T reguladoras.

Por lo tanto, en otro aspecto, se divulga una composición de materia seleccionada del grupo que consiste en

- 15 (i) Factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo,  
 (ii) Un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo y  
 (iii) Un vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo

20 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad inmunológica.

Por lo tanto, en otro aspecto, se divulga el uso de una composición de materia seleccionada del grupo que consiste en

- 25 (i) Factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo,  
 (ii) Un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo y  
 (iii) Un vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo

30 para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica

En otro aspecto, se divulga un método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad inmunológica en un sujeto que lo necesite que comprende la administración a dicho sujeto de una composición de materia seleccionada del grupo de:

- 35 (i) Factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo,  
 (ii) Un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo y  
 (iii) Un vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

40 En otro aspecto, se divulga un método para aumentar las poblaciones de células dendríticas tolerogénicas y/o de células T reguladoras en un sujeto que lo necesite que comprende la administración a dicho sujeto de una composición de materia seleccionada del grupo de:

- 45 (i) Factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo,  
 (ii) Un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo y  
 (iii) Un vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

50 En otro aspecto, se divulga una composición de materia seleccionada del grupo que consiste en:

- 55 (i) Factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo,  
 (ii) Un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo y  
 (iii) Un vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo

para su uso en el aumento de poblaciones de células dendríticas tolerogénicas y/o de células T reguladoras.

60 La expresión "factor H", tal como se usa en el presente documento se refiere a una glucoproteína de 155 kDa que se encuentra en el plasma humano a una concentración de aproximadamente 550 µg/ml y que comprende 20 CCP dispuestos de cabeza a cola, de los cuales los cuatro CCP N-terminales contienen la actividad reguladora de complemento y los dos CCP C-terminales median la unión a la superficie y el reconocimiento de la diana. El factor H regula la activación del complemento en células propias al poseer actividad tanto de cofactor para la escisión de C3b mediada por factor I como actividad aceleradora de la descomposición contra la convertasa C3 de la vía alternativa, C3bBb. El factor H protege a las células propias de la activación del complemento pero no a bacterias/virus, en tanto

que se une a glucosaminoglucanos que están presentes en células hospedadoras pero no en las superficies de células patógenas. Los polipéptidos de factor H adecuados para su uso incluyen, sin limitación,

- 5 - el factor H humano (correspondiente a los aminoácidos 19 a 1231 del polipéptido proporcionado en la base de datos SwissProt (versión del 31 de mayo de 2011) con el número de referencia P08603),
- el factor H bovino (correspondiente a los aminoácidos 19 a 1236 del polipéptido proporcionado en la base de datos SwissProt (versión del 31 de mayo de 2011) con el número de referencia Q28085),
- el factor H de rata (correspondiente a los aminoácidos 19 a 1236 del polipéptido proporcionado en la base de datos SwissProt (versión del 31 de mayo de 2011) con el número de referencia Q81YB6),
- 10 - el factor H de ratón (correspondiente a los aminoácidos 19 a 1234 del polipéptido proporcionado en la base de datos SwissProt (versión del 3 de mayo de 2011) con el número de referencia P06909),
- la proteína 1 relacionada con el factor H de complemento humano (correspondiente a los aminoácidos 18 a 330 del polipéptido proporcionado en la base de datos SwissProt (versión del 8 de febrero de 2011) con el número de referencia Q03591),
- 15 - la proteína 2 relacionada con el factor H de complemento humano (correspondiente a los aminoácidos 19 a 270 del polipéptido proporcionado en la base de datos SwissProt (versión del 5 de abril de 2011) con el número de referencia P36980),
- la proteína 3 relacionada con el factor H de complemento humano (correspondiente a los aminoácidos 19 a 330 del polipéptido proporcionado en la base de datos SwissProt (versión del 31 de mayo de 2011) con el número de referencia Q02985),
- 20 - la proteína 4 relacionada con el factor H de complemento humano (correspondiente a los aminoácidos 19 a 270 del polipéptido proporcionado en la base de datos SwissProt (versión del 3 de mayo de 2011) con el número de referencia Q92496),
- la proteína 5 relacionada con el factor H de complemento humano (correspondiente a los aminoácidos 19 a 569 del polipéptido proporcionado en la base de datos SwissProt (versión del 5 de abril de 2011) con el número de referencia Q9BXR6).

La expresión “variante funcionalmente equivalente”, cuando se refiere al factor H, se refiere aun polipéptido resultante de la inserción, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos del polipéptido de factor H tal como se ha definido anteriormente y que conserva sustancialmente la capacidad del factor H para inhibir la proliferación de células dendríticas. Las variantes de factor H adecuadas para su uso incluyen, sin limitación, polipéptidos que tienen una identidad de al menos el 99 %, al menos el 98 %, al menos el 97 %, al menos el 96 %, al menos el 95 %, al menos el 94 %, al menos el 93 %, al menos el 92 %, al menos el 91 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 65 %, al menos el 60 %, al menos el 55 %, al menos el 50 % respecto del factor H de origen natural tal como se ha definido anteriormente. Los métodos para determinar si un polipéptido es una variante funcionalmente equivalente del factor H incluyen, sin limitación, los métodos descritos en los ejemplos 9 a 15 de la presente invención basándose en:

- 40 - La determinación de la capacidad de la variante para regular negativamente la expresión de marcadores de activación de CD, tales como CD83, CD86, CD80, CD40, CD1a, CCR7, IDO, BIC.1 y/o SOD2.
- La determinación de la capacidad de la variante para inhibir la liberación de citocinas inflamatorias por las células dendríticas en respuesta a estimulación con LPS.
- La determinación de la capacidad del polipéptido variante para inhibir la adquisición de morfología de célula dendrítica de las células dendríticas inmaduras en respuesta a estimulación con LPS.
- 45 - La determinación de la capacidad de la variante para reducir el potencial endocítico de las células dendríticas inmaduras.
- La determinación de la capacidad del polipéptido variante para reducir la quimiotaxis de las células dendríticas hacia una señal quimiotáctica (por ejemplo, CCL21) y/o
- La determinación de la capacidad del polipéptido variante para reducir la proliferación de células T alogénicas en respuesta a estimulación por células dendríticas.

Por lo tanto, se considera que un polipéptido es funcionalmente equivalente al factor H si muestra al menos un 100 %, al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 65 %, al menos un 60 % o al menos un 50 % de la actividad del factor H tal como se ha mencionado anteriormente.

En otra realización, la variante funcionalmente equivalente del factor H es una proteína de fusión que comprende una primera región que comprende dominio de factor H y una segunda región que comprende un polipéptido que no forma parte del factor H. La proteína de fusión tal como se ha divulgado anteriormente puede comprender en dirección de amino terminal a carboxi terminal (a) la región que comprende el factor H y (b) la región que comprende un polipéptido que no forma parte del factor H. Como alternativa, la proteína de fusión puede comprender en dirección de amino terminal a carboxi terminal (a) la región que comprende un polipéptido que no forma parte del factor H y (b) la región que comprende el factor H.

65 Los polipéptidos adecuados que pueden usarse para formar una proteína de fusión tal como se ha divulgado anteriormente incluyen, sin limitación, una región Fc de inmunoglobulina, albúmina, ferritina o transferrina.

En una realización preferida, la región que comprende un polipéptido que no forma parte del factor H es una región Fc de inmunoglobulina.

5 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que “región Fc de inmunoglobulina” significa la porción carboxilo-terminal de una región constante de cadena de inmunoglobulina, preferentemente, región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma. Por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina puede comprender 1) un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3 o 5) una combinación de dos o más dominios CH y una región bisagra de inmunoglobulina. La región Fc de inmunoglobulina de la proteína de fusión tal como se ha divulgado anteriormente comprende preferentemente o consiste en un Fc o una porción de un Fc de una inmunoglobulina de isotipo seleccionado entre IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, más preferentemente, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, sIgA, más preferentemente, IgG2 o IgG4, lo más preferentemente IgG2.

15 También se divulgan usos terapéuticos de polinucleótidos que codifican el factor H o una variante del mismo así como vectores que comprenden dichos polinucleótidos. Los términos “polinucleótido” y “vector” se han definido en detalle anteriormente y se usan con el mismo significado en el contexto de la presente invención.

20 La expresión “enfermedad inmunológica” se ha descrito en detalle anteriormente y se usa con el mismo significado en el contexto de los métodos terapéuticos que implican el uso de factor H. En realizaciones preferidas, la enfermedad inmunológica se selecciona del grupo que consiste en enfermedades inmunoinflamatorias, septicemia, una enfermedad autoinmunitaria y rechazo de trasplante. Las expresiones “enfermedad inmunoinflamatoria”, “septicemia”, “enfermedad autoinmunitaria” y “rechazo de trasplante” se han descrito en detalle anteriormente y se usan con el mismo significado en la presente invención.

25 En otra realización preferida, la enfermedad inmunológica no es una enfermedad autoinmunitaria y se selecciona preferentemente entre septicemia, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped y enfermedades de hipersensibilidad.

30 La prevención y/o el tratamiento de una enfermedad inmunológica se consiguen mediante el aumento de la población de células dendríticas tolerogénicas y/o de células T reguladoras.

35 Se entiende que la expresión “aumento de la población de células dendríticas tolerogénicas” significa que la administración de la composición, tal como se ha divulgado anteriormente, produce un aumento en el número de células dendríticas tolerogénicas con respecto a un sujeto no tratado. La población de células dendríticas tolerogénicas se aumenta en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con un sujeto no tratado. La capacidad de la composición tal como se ha divulgado anteriormente para aumentar la población de células dendríticas tolerogénicas puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos 9 a 14.

40 La expresión “aumento de la población de células T reguladoras”, tal como se usa en el presente documento, significa que la composición tal como se ha divulgado anteriormente produce un aumento en el número de células T reguladoras con respecto a un sujeto no tratado. La población de células T reguladoras aumenta en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con un sujeto no tratado. La capacidad de la composición tal como se ha divulgado anteriormente para aumentar la población de células T reguladoras puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 17.

#### *Métodos para la generación de una población de células dendríticas tolerogénicas usando factor H*

50 Los autores de la presente invención han observado que el factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo, un polinucleótido que codifica el factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo o un vector que comprende dicho polinucleótido adquirido es capaz de promover la maduración de precursores de células dendríticas a células dendríticas tolerogénicas. Por lo tanto, en otro aspecto, se divulga un método para la generación de una población de células dendríticas tolerogénicas que comprende las etapas de

55 (i) incubar una población de precursores de células dendríticas en condiciones adecuadas para la formación de una población de células dendríticas inmaduras y  
(ii) incubar la población de células dendríticas inmaduras obtenidas en la etapa (i) en condiciones adecuadas para la formación de células dendríticas maduras

60 en el que las etapas (i) y/o (ii) se llevan a cabo en presencia de una composición de materia seleccionada del grupo que consiste en:

65 (i) Factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo,  
(ii) Un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo y  
(iii) Un vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

Las expresiones “células dendríticas tolerogénicas”, “precursores de células dendríticas”, “condiciones adecuadas para la formación de una población de células dendríticas inmaduras”, “células dendríticas inmaduras”, “condiciones adecuadas para la formación de células dendríticas maduras” se han descrito en detalle anteriormente y se usa en el contexto del presente método con el mismo significado.

5 Tal como se ha explicado anteriormente en el contexto del método para obtener una población de células dendríticas tolerogénicas usando isoformas de C4BP que carecen de la cadena  $\beta$ , puede ponerse en contacto el factor H, la variante funcionalmente equivalente del mismo, el polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo, el vector que comprende un polinucleótido que codifica un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo con las células durante la etapa de diferenciación (es decir, durante el tiempo en el que los precursores de células dendríticas se diferencian en células dendríticas inmaduras), durante la etapa de maduración (es decir, durante el tiempo en el que las células dendríticas inmaduras maduran en células dendríticas) o durante ambas etapas.

15 La etapa llevada a cabo en presencia de un factor H o del polinucleótido que codifica al factor H puede llevarse a cabo *in vivo* o *ex vivo*. En general, en estos métodos, puede exponerse a las células dendríticas inmaduras a factor H en un intervalo que tiene: un extremo inferior de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50 o 100 microgramos por ml de medio; y un extremo superior de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 50, 100 o 200 microgramos por ml de medio.

20 Más preferentemente, las CD se maduran en presencia de 1-10  $\mu\text{g/ml}$  de factor H y lo más preferentemente, a 2, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ .

25 Las expresiones “factor H”, “variante funcionalmente equivalente del factor H”, “polinucleótido que codifica el factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo”, “vector que comprende un polinucleótido que codifica el factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo”, “célula dendrítica” y “célula dendrítica tolerogénica” se han descrito en detalle anteriormente.

#### 30 *Células dendríticas tolerogénicas obtenidas usando factor H y usos terapéuticos de las mismas*

En otro aspecto, se divulga una población de células dendríticas tolerogénicas obtenidas usando factor H o la variante funcionalmente equivalente del mismo o el polinucleótido que codifica el factor H o la variante funcionalmente equivalente del mismo.

35 En otro aspecto, se divulgan células dendríticas tolerogénicas obtenidas mediante diferenciación y/o maduración de células dendríticas en presencia de un factor H o una variante funcionalmente equivalente del mismo, de un polinucleótido que codifica dichos polipéptidos o de un vector que comprende dicho polipéptido.

Las células dendríticas tolerogénicas se caracterizan por que muestran una o más de las siguientes características:

- 40
- Ser HLA-DR<sup>+</sup> y/o CD14<sup>+</sup>. El término “positivo”, cuando se aplica a un marcador dado, indica que el nivel de expresión de un marcador de la superficie celular particular en una CD tolerogénica producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente es sustancialmente la misma que en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa o una CD inmunoestimuladora madura obtenida mediante maduración *in vitro*).
  - 45 - Ser CD80<sup>-</sup>, CD83<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD1a<sup>-</sup>, CD40<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>, IDO<sup>-</sup>, BIC-1<sup>-</sup> y/o SOD2<sup>-</sup>. El término “negativo”, cuando se aplica a un marcador dado, indica que el nivel de expresión de un marcador de la superficie celular particular en una CD tolerogénica producida mediante un método tal como se ha descrito anteriormente está reducido en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable en comparación con el nivel de expresión del mismo marcador de la superficie celular en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura o una CD inmunoestimuladora madura obtenida mediante maduración *in vitro*).
  - 50 - No secretar o secretar cantidades reducidas de citocinas inflamatorias, tales como IL-12p70, IL-10, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  y/o IFN- $\gamma$  con respecto a células dendríticas maduras. La expresión “secretar cantidades reducidas”, cuando se aplica a una citocina dada, indica que el nivel de secreción de una citocina particular en una CD tolerogénica producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable en comparación con el nivel de secreción del mismo marcador de la superficie celular en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura o una CD inmunoestimuladora madura obtenida mediante maduración *in vitro*).
  - 55 - Mostrar una morfología redondeada. La expresión “morfología redondeada”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una morfología en la que las células muestran un número de proyecciones que sobresalen de la superficie celular que están reducidas en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o son indetectables en comparación con el número de proyecciones en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura o una CD inmunoestimuladora madura obtenida mediante maduración *in vitro*). La morfología de una célula puede
  - 60
  - 65

determinarse, por ejemplo, mediante microscopía electrónica de barrido, tal como se describe en el ejemplo 4 de la presente invención.

- Mostrar potencial endocítico reducido cuanto están inmaduras. La expresión “potencial endocítico reducido”, tal como se usa en el presente documento, indica que la actividad endocítica de la CD tolerogénica inmadura está reducido en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable, en comparación con el nivel de endocitosis en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora inmadura). La capacidad endocítica puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 13 de la presente invención.
- La célula permanece viable después del proceso de diferenciación/maduración, es decir, no sufren apoptosis. El término “viable”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a poblaciones en las que menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 % de las células sufren apoptosis después del tratamiento con un estímulo de maduración (por ejemplo, LPS). La apoptosis puede determinarse mediante cualquier método conocido comúnmente en la técnica, tal como tinción de anexina V/7-ADD, ensayo de activación de caspasa-3, ensayo TUNEL y de fragmentación de ADN, determinación del potencial de la membrana mitocondrial y similares.
- Mostrar un comportamiento quimiotáctico reducido hacia CCL21 con respecto a las células dendríticas maduras. La expresión “comportamiento quimiotáctico reducido”, tal como se usa en el presente documento, indica que el nivel de quimiotaxis de una célula producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente hacia CCL21 en una CD tolerogénica está reducido en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable en comparación con el nivel de quimiotaxis hacia la misma citocina en una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa, o una CD inmunoestimuladora madura obtenida mediante maduración *in vitro*). El comportamiento quimiotáctico de una célula dendrítica tolerogénica hacia CCL21 puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 5 de la presente invención.
- Mostrar una capacidad reducida para inhibir la proliferación de células T alogénicas con respecto a las células dendríticas maduras. La expresión “capacidad reducida para inhibir la proliferación de células T alogénicas”, tal como se usa en el presente documento, indica que el nivel de proliferación de las células T alogénicas puestas en contacto con una célula producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable en comparación con el nivel de proliferación observado en células T alogénicas puestas en contacto con una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa o una CD inmunoestimuladora madura obtenida mediante maduración *in vitro*). La capacidad de una célula dendrítica tolerogénica para inhibir la proliferación de células T alogénicas puede llevarse a cabo, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 6 de la presente invención.
- Muestra un fenotipo inmunomodulador que se conserva en presencia de señales proinflamatorias, en contraste con las CD inmaduras. La capacidad de una célula dendrítica tolerogénica para mostrar un fenotipo inmunomodulador estable puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 16 de la presente invención.
- Mostrar la capacidad de inhibir la diferenciación de Th1 en condiciones proinflamatorias con respecto a las células dendríticas maduras. La expresión “inhibir la diferenciación de Th1”, tal como se usa en el presente documento, indica que el nivel de células Th1 producidas por las células T puestas en contacto con una célula producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % o es indetectable en comparación con el nivel de diferenciación de Th1 observado en células T puestas en contacto con una célula de control adecuada (por ejemplo, CD inmunoestimuladoras maduras o una CD inmunoestimuladora madura obtenida mediante maduración *in vitro*). La capacidad de una célula dendrítica tolerogénica para inhibir la diferenciación de Th1 puede determinarse, por ejemplo, midiendo la producción de IFN-gamma, tal como se describe en el ejemplo 17 de la presente invención.

Mostrar una capacidad aumentada para generar células T reguladoras (Treg) con respecto a células dendríticas maduras. La expresión “capacidad aumentada para generar células T reguladoras”, tal como se usa en el presente documento, indica que el nivel de generación de células T reguladoras de células T puestas en contacto con una célula producida mediante un método tal como se ha divulgado anteriormente está aumentada en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con el nivel de generación de células T puestas en contacto con una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura o una CD inmunoestimuladora madura producida mediante maduración *in vitro*). La capacidad de una célula dendrítica tolerogénica para generar células T reguladoras (Treg) puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 17 de la presente invención. En una realización preferida, las células dendríticas tolerogénicas son HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD83<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD1a<sup>-</sup>, CD40<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>, IDO<sup>-</sup>, BIC-1<sup>-</sup> y/o SOD2<sup>-</sup>.

En una realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup>. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup> e IDO<sup>-</sup>. EN otra realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, IDO<sup>-</sup> y resistentes a la apoptosis. En una realización preferida, las células tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup> e IDO<sup>-</sup>. En otra realización preferida, las células

tolerogénicas son CD1a<sup>-</sup> y resistentes a la apoptosis. EN una realización preferida, las células tolerogénicas son CD86<sup>-</sup> e IDO<sup>-</sup>. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son CD86<sup>-</sup> y resistentes a la apoptosis. En otra realización preferida, las células tolerogénicas son IDO<sup>-</sup> y resistentes a la apoptosis.

- 5 En otra realización, las células dendríticas tolerogénicas son capaces de inducir tolerancia específica de Ag (o hiporreactividad) de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria humanas mediante las presentes CD tolerogénicas tratadas con C4BP(b<sup>-</sup>) o con factor H.

Las características de las células tolerogénicas se proporcionan en la tabla 3.

- 10 En otro aspecto, se divulga una población de células que comprende al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de células dendríticas tolerogénicas tal como se han divulgado anteriormente; preferentemente, la población celular comprende al menos un 80 % de células dendríticas tolerogénicas tal como se han divulgado anteriormente.

- 15 En otro aspecto más, se divulga una población de células tolerogénicas obtenidas usando el factor H o la variante funcionalmente equivalente del mismo o el polinucleótido que codifica el factor H o la variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica.

- 20 En otro aspecto, se divulga el uso de una célula tolerogénica obtenida usando el factor H o el polinucleótido que codifica el factor H para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica.

- 25 En otro aspecto, se divulga un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad inmunológica en un sujeto que lo necesite que comprende la administración a dicho sujeto de una célula tolerogénica obtenida usando el factor H o el polinucleótido que codifica al factor H.

- 30 En otro aspecto, se divulga un método para aumentar la población de células T reguladoras en un sujeto que lo necesite que comprende la administración a dicho sujeto de una población de células dendríticas tolerogénicas obtenidas usando el factor H o el polinucleótido que codifica al factor H.

- 35 La expresión "enfermedad inmunológica" se ha descrito en detalle anteriormente y se usa con el mismo significado en el contexto de los métodos terapéuticos que implican el uso de factor H. En realizaciones preferidas, la enfermedad inmunológica se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad inmunoinflamatoria, septicemia, una enfermedad autoinmunitaria y rechazo de trasplante. Las expresiones "enfermedad inmunoinflamatoria", "septicemia", "enfermedad autoinmunitaria" y "rechazo de trasplante" se han descrito con detalle anteriormente y se usan con el mismo significado en la presente invención.

- 40 La expresión "aumentar la población de células T reguladoras", tal como se usa en el presente documento, significa que la población de células dendríticas tolerogénicas produce un aumento en el número de células T reguladoras con respecto a un sujeto tratado con una célula de control adecuada (por ejemplo, una CD inmunoestimuladora madura nativa o una CD inmunoestimuladora madura obtenida mediante maduración *in vitro*). La población de células T reguladoras aumenta en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con un sujeto tratado con una célula de control. La capacidad de la población de células dendríticas tolerogénicas para aumentar la población de células T reguladoras puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 17.

- 50 La invención se describe en detalle mediante los siguientes ejemplos que deben considerarse como únicamente ilustrativos y no limitantes del alcance de la invención.

## Ejemplos

### MATERIALES Y MÉTODOS

- 55 **Medio de cultivo y proteínas**

Se complementó RPMI 1640 con 100 µg/ml de estreptomicina, 100 UI/ml de penicilina y L-glutamina 2 mM (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA) más/menos suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (Linus, Cultek, España).

- 60 Los presentes inventores usaron a lo largo del estudio tres isoformas de C4BP. Se purificaron C4BP α<sub>7</sub>β<sub>1</sub> (en complejo con proteína S) y C4BP α<sub>7</sub>β<sub>0</sub> a partir de plasma humano agrupado tal como se ha descrito previamente (Dahlbäck, B. et al., Biochem J. 1983. 209: 847-856). Se expresaron tanto la C4BP α<sub>6</sub>β<sub>0</sub> como los mutantes que carecían de CCP de cadena α individuales (ΔCCP1-8) en células eucariotas y se purificaron mediante cromatografía de afinidad (Blom, A.M., L. et al., 2001, J Biol Chem. 276: 27136-27144).

65



Los péptidos derivados de CCP6 de cadena  $\alpha$  de C4BP, PS6-01, PS6-02, PS6-03 y PS6-04 se sintetizaron por Caslo Laboratory Aps (Dinamarca).

El factor H purificado de suero humano se obtuvo en el comercio (10-15-1106, Biopur AG, Suiza).

5

### Cultivos celulares

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de preparaciones de capas leucocitarias que pertenecían a donantes sanos del Banco de Sangre y Tejidos (Barcelona, España) después de centrifugación de densidad de Ficoll-Paque™ (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suecia). Los monocitos se purificaron mediante dos métodos diferentes: 1) Las células se emplacaron a  $1 \times 10^6$  células/ml en placas de cultivo de 60 mm (Corning, España) en RPMI sin suero y se dejaron adherir durante 2 h a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células no adherentes se retiraron mediante lavado en PBS. La población final contenía > 80 % de monocitos, según se demostró mediante citometría de flujo de aislados teñidos con anti-CD14. 2) Las células se purificaron usando microperlas súper-paramagnéticas coloidales conjugadas con anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD14 humano (MACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA o cóctel de selección positiva EasySep®, StemCell Technologies, Grenoble, Francia). La pureza de las células CD14<sup>+</sup> se ensayó mediante tinción de CD14 y análisis de citometría de flujo (> 90 % de células CD14<sup>+</sup>). Se generaron CD derivadas de monocitos (Mo-CD) complementando los cultivos de monocitos con medio RPMI 1640 completo más GM-CSF (800 UI/ml) e IL-4 (500 UI/ml) (ambos de Gentaur, Kampenhout, Bélgica) en el día 0 y en el día 3 de cultivo. Para la maduración de las CD, se estimularon adicionalmente las iCD en el día 5 durante 48 h con 5  $\mu$ g/ml de LPS (055.B5 de *Escherichia coli*, Sigma L2880, Copenhague, Dinamarca).

Las células T CD3<sup>+</sup> se aislaron de PBMC mediante selección negativa usando el kit de enriquecimiento de células T humanas EasySep (StemCell Technologies, Grenoble, Francia). Las células T CD3<sup>+</sup> fueron > 90 % puras, según se evaluó mediante tinción de CD3 usando un dispositivo FACScanto (Becton-Dickinson, Basilea, Suiza).

25

### Anticuerpos y citometría de flujo

Los fenotipos de la superficie celular se analizaron usando los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-HLA-DR conjugado a FITC (Immu-357), anti-CD83 conjugado a FITC (HB15a), anti-CD14 conjugado a FITC (RMO52), anti-CD40 conjugado a PE (MAB89), anti-CD1a conjugado a PE (BL6), anti-CD80 conjugado a PE (MAB104), anti-CD86 conjugado a PE (HA5.2B7) (todos de Beckman Coulter), anti-CCR7 conjugado a Alexa Fluor 488 (TG8/CCR7, Biolegend, San Diego, CA), y los respectivos controles de isotipo de las mismas fuentes comerciales. Después de lavar con PBS, se tiñeron seguidamente las células con 3  $\mu$ l de AcM/10<sup>5</sup> células en 100  $\mu$ l de tampón de FACS (PBS que contiene BSA al 1 % y azida de sodio al 0,1 %) durante 20 min a temperatura ambiente. Las células teñidas se analizaron usando un dispositivo FACScalibur (Becton Dickinson). Las células dendríticas derivadas de monocitos, Mo-CD, se clasificaron de acuerdo con los parámetros de dispersión directa (FCS) y dispersión lateral (SSC). Los resultados se analizaron usando el programa informático CellQuestPro (Becton Dickinson).

30

35

### Tratamientos de C4BP y factor H

Se añadieron tanto las diferentes isoformas de C4BP ( $\alpha_7\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_0$  y  $\alpha_6\beta_0$ ) como el factor H a 2, 5 y 10  $\mu$ g/ml a lo largo de la diferenciación, maduración, o ambas cosas, de las Mo-CD. A saber, para los ensayos de diferenciación, se añadieron las proteínas en el día 0 y se repusieron en el día 3. Para los ensayos de maduración, las proteínas se añadieron en el día 5, bien solas o combinadas con LPS. Finalmente, para los ensayos de diferenciación más maduración, las proteínas se añadieron en los días 0, 3 y 5 (en el último punto, combinadas con LPS).

45

### Microscopía electrónica de barrido (MEB)

50

Se sembraron los monocitos sobre portaobjetos de vidrio recubiertos bien con poli-L-lisina (25  $\mu$ g/ml) o fibronectina (42  $\mu$ g/ml), se cultivaron durante 5 días en medio RPMI completo complementado con 800 U/ml de GM-CSF, 500 U/ml de IL-4 y las isoformas  $\alpha_7\beta_1$  y  $\alpha_7\beta_0$  de C4BP o factor H (10  $\mu$ g/ml) y se estimularon adicionalmente con LPS durante 48 horas en el mismo medio. Las CD resultantes se fijaron en paraformaldehído al 10 % y glutaraldehído al 1,25 % en tampón de cacodilato durante 2 h. Finalmente, se post-fijaron las células en OsO<sub>4</sub> al 1 % y se deshidrataron con una serie graduada de etanol seguido de acetona. Después de la deshidratación, se secaron las células en una secadora de punto crítico y se recubrieron con oro antes de la observación mediante microscopía electrónica de barrido (Zeiss DSM940A).

55

### Reacción de leucocitos mixtos

60

Se sembraron células T CD3<sup>+</sup> (10<sup>5</sup>/pocillo) y Mo-CD tratadas con C4BP ( $\alpha_7\beta_1$  y  $\alpha_7\beta_0$ ) o tratadas con factor H activadas con LPS en una placa de fondo redondo de 96 pocillos a varias proporciones celulares de DC:T (1:40, 1:80 y 1:160) y se cultivaron en medio X-VIVO 15 (Biowittaker, Walkersville, MD) complementado con 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina, 100 UI/ml de penicilina y L-glutamina 2 mM (todos de Invitrogen) más suero AB humano al 2 %. Se midió la proliferación aloespecífica después de 5 días de incubación. En el día 4, los cultivos conjuntos se irradiaron

65

a 5000 rad durante 5 min y después se añadió [<sup>3</sup>H]-timidina (1 µCi/pocillo, Perkin Elmer, Boston, MA), seguido de incubación durante otras 16 h. Las células marcadas se recogieron entonces sobre filtros de fibra de vidrio con un recolector Filtermate (Packard, Meriden, CT) y se determinó la tasa de proliferación de células T mediante la cantidad de incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, que se midió en un contador TopCount NXT (Packard). Los resultados se comunican como la media ± DT de incorporación de timidina en pocillos de cultivo cuadruplicados.

#### RT-PCR cuantitativa

Se recogieron Mo-CD (10<sup>6</sup>/condición) en el día 7 y se extrajo el ARNm usando el kit de aislamiento de ARN RNeasy (Qiagen) y se incubaron con DNasa I libre de RNasa (Ambion, Austin, TX) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usó una técnica de RT-PCR en tiempo real en dos etapas para determinar los niveles relativos de ARNm de CCR7, MIC-1, IDO y SOD2 humanos. Se llevaron a cabo reacciones de transcripción inversa con 500 ng de ARN total usando el kit Omniscript RT (Qiagen). La cuantificación de los niveles de ARNm se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con el uso de la tecnología LighCycler (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Se usaron los siguientes cebadores: CCR7-f (5'-TGGGCATCTGGACTAGC-3') (SEQ ID NO: 6), CCR7-r (5'-AAGAAAGGGTTGACGCAGC-3') (SEQ ID NO: 7); IDO-f (5'-GGTCATGGAGATGTCCGTAA-3') (SEQ ID NO: 8); IDO-r (5'-ACCAATAGAGAGACCAGGAAGAA-3') (SEQ ID NO: 9); BIC-1-f (5'-AACCTACCAGAGACCTTACC-3') (SEQ ID NO: 10), BIC-1-r (5'-ATGCTTCTTTGTCATCCTCC-3') (SEQ ID NO: 11); SOD2-f (5'-GACAAACCTCAGCCCTAAC-3') (SEQ ID NO: 12), SOD2-r (5'-ACACATCAATCCCAGCAGT-3') (SEQ ID NO: 13), proporcionando productos de 435, 227, 296 pb y 248 pb, respectivamente. Estos pares de cebadores específicos de genes se diseñaron usando los paquetes informáticos Oligo 4.0 y Primer 3 (MBI, Cascade, CO) y se seleccionaron para prevenir la formación de dímero de cebador.

Todas las muestras se normalizaron mediante el uso del siguiente conjunto de cebadores para el gen de ciclofilina humano expresado de manera constitutiva: CypA-f (5'-CTCCTTTGAGCTGTGCAG-3') (SEQ ID NO: 14) y CypA-r (5'-CACCACATGCTTGCCATCC-3') (SEQ ID NO: 15) (Pluvinet R. et al., 2004, Blood. 104: 3642-3646). Todos los cebadores fueron adquiridos de Bonsai Technologies (Copenhague, Dinamarca).

Las amplificaciones PCR se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl que contenía 2 µl de mezcla de reacción lista para usarse, DNA Master SYBR Green I 10x (Roche Molecular Biochemicals); MgCl<sub>2</sub> (3 mM para CCR7; 4 mM para BIC-1 y SOD2 y 5 mM para IDO); 0,15 mM de cada cebador; dimetil sulfoxido (DMSO) al 5 %; y 75 ng de ADNc como molde. El programa de amplificación usó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguido de 45 ciclos: 95 °C durante 1 s; 58 °C (CCR7/SOD2)/60 °C (BIC-1 e IDO) durante 5 s; 72 °C durante 10 s. Se verificó la reproducibilidad del ensayo y se demostró que la expresión de los cuatro genes se encontraba dentro del intervalo lineal a la concentración celular seleccionada.

#### Ensayos de quimiotaxis

Las Mo-CD diferenciadas y maduras (LPS durante 48 h) en presencia de las isoformas α<sub>7</sub>β<sub>1</sub> y α<sub>7</sub>β<sub>0</sub> de C4BP o factor H se ensayaron respecto de la migración hacia la quimiocina CCL21 usando ensayos transpocillo. En resumen, se rellenaron las cámaras inferiores de las placas transpocillo (filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 8,0 µm; Costar, Corning, NY) con 400 µl de RPMI completo con o sin CCL21 (200 ng/ml). Se añadieron un total de 1 x 10<sup>5</sup> CD en 100 µl de RPMI completo en la cámara superior y se incubaron las células a 37 °C durante 2 h. Las células migradas a la cámara inferior se recogieron y contaron con un citómetro de flujo FACScalibur adquiriendo eventos durante un periodo de tiempo fijo de 2 min usando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson). Los ensayos de migración para todas las condiciones de estimulación se llevaron a cabo en pocillos duplicados. Los valores se proporcionan como porcentaje de células migradas en relación a las mCD no tratadas (100 %).

#### 50 Secreción de citocinas de CD

Se determinaron las concentraciones de IL-12p70, TNF-α, IFN-γ, IL-10, IL-6 e IL-8 de sobrenadantes de CD tratados con las isoformas α<sub>7</sub>β<sub>1</sub> y α<sub>7</sub>β<sub>0</sub> de C4BP usando el kit Th1/Th2 Flow cytomic Multiplex (Bender-MedSystems, Viena, Austria) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Actividad endocítica

Para medir la actividad fagocítica de las iCD, se resuspendieron 2 x 10<sup>5</sup> células/ml en 100 µl de PBS y se incubaron con 4 µl de Ovoalbúmina DQ conjugada a BODIPY FL (1 mg/ml, DQ-OVA, Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) a 37 °C o a 0 °C durante 15 min. Las incubaciones se detuvieron añadiendo 1 ml de tampón de FACS frío. Las células se lavaron dos veces con tampón de FACS frío y se analizó su fluorescencia usando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson).

#### 65 Determinación de la apoptosis

Se empleó doble tinción con los colorantes fluorescentes anexina V (Kit I de detección de la apoptosis de anexina V-PE, BD Pharmigen, San Diego, CA) y 7-amino-actinomicina D (7-ADD) (BD Pharmigen) y análisis por citometría de flujo para evaluar el estado de viabilidad/apoptosis de las Mo-CD tratadas con C4BP  $\alpha_7\beta_1$ , C4BP $\alpha_7\beta_0$  y recC4BP  $\alpha_6\beta_0$  o con factor H y no tratadas.

5

### Tinción de citocinas intracelulares

Las células mononucleares aisladas de donantes sanos se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo y se estimularon con 50 ng/ml 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA, Sigma) más 500 ng/ml de ionomicina (Sigma) durante 5 h en presencia de 10  $\mu$ g/ml de brefeldina A (Sigma). Después de la estimulación se lavaron las células con PBS y se fijaron y permeabilizaron usando un kit IntraStain (Dako) y se incubaron durante 28 min a TA con AcM de CPA anti-IFN-gamma humano (eBioscience). Las células se lavaron y analizaron usando un citómetro de flujo FACScanto II (Becton Dickinson) equipado con el programa informático FACSDiva (Becton Dickinson).

10

15

### Determinación de células T CD4<sup>+</sup> CD127<sup>bajo/negativo</sup> CD25<sup>alto</sup> y Foxp3<sup>+</sup>

Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> se purificaron a partir de células mononucleares mediante selección negativa usando un kit de enriquecimiento de células T humanas EasySep<sup>®</sup> (StemCell Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante ( $10^5$  células/pocillo) en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Después de 5 días de cultivo conjunto (1CD:40T) los presentes inventores usaron citometría de flujo para determinar los porcentajes de Treg definidos como CD4<sup>+</sup>, CD127<sup>bajo/negativo</sup>, CD25<sup>alto</sup> y Foxp3<sup>+</sup> intracelular (kit de tinción de células T reguladoras humanas; eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.). Las células teñidas se analizaron usando el programa informático FlowJo (Tree Star, Inc, OR, EE.UU.).

20

25

### Análisis estadístico

Los resultados se presentan como medias +/- DT. Las variables de Mo-CD en diferentes condiciones experimentales respecto a una condición de referencia (normalmente mCD o iCD) se compararon usando la prueba de la t de Student no emparejada, considerando  $p < 0,05$  como significativo.

30

### EJEMPLO 1

#### Las isoformas de C4BP que carecen de cadena beta regulan negativamente el fenotipo de activación de las Mo-CD humanas

35

En primer lugar, los presentes inventores evaluaron las principales isoformas naturales de C4BP,  $\alpha_7\beta_1$  y  $\alpha_7\beta_0$  más C4BP  $\alpha_6\beta_0$  recombinante en la expresión de diferentes marcadores superficiales de monocitos y CD, incluyendo CD14, HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86 y CD1a.

40

Se analizaron los datos de ocho experimentos independientes usando la prueba de la t de Student no emparejada (figura 1). De manera interesante, la incubación conjunta de Mo-CD con C4BP a lo largo de su periodo de diferenciación y maduración de 7 días reveló diferencias fenotípicas significativas entre las diferentes isoformas de C4BP. Por lo tanto, aunque la isoforma principal C4BP  $\alpha_7\beta_1$  no tuvo efecto en la expresión de cualquiera de los marcadores anteriores en CD maduras con LPS, las isoformas  $\beta^-$  de C4BP ( $\alpha_7\beta_1$  y  $\alpha_6\beta_0$  recombinantes) regularon negativamente de manera significativa a CD83, CD86, CD80 y CD1a de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, la expresión de HLA-DR y de CD40 en las Mo-CD no se vio alterada por el tratamiento con isoformas  $\beta^-$  de C4BP. Conjuntamente, estos datos son la evidencia de que las isoformas  $\beta^-$  de C4BP tienen el potencial para modificar la diferenciación/maduración de Mo-CD proinflamatorias según se deduce mediante el patrón de expresión de diversos marcadores de la superficie celular. Además, las Mo-CD tratadas con diferentes isoformas de C4BP permanecieron altamente viables a lo largo del proceso de diferenciación/maduración, según se evaluó mediante tinción de anexina V/7-ADD, evidenciándose menos de un 10 % de células apoptóticas a las 48 h después de la maduración de CD mediada por LPS (Figura 2).

45

50

### EJEMPLO 2

#### Las Mo-CD expuestas a isoformas de C4BP que carecen de la cadena beta expresan menos CCR7 y los marcadores de maduración de CD IDO y BIC-1

60

Para evaluar adicionalmente el efecto de las isoformas de C4BP en los transcritos clave que conforman la firma molecular de las CD en maduración [Jin et al., 2010, J. Transl. Med. 8: 4], se analizaron la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, implicado en el tráfico de CD, la enzima inmunorreguladora IDO, implicada en el metabolismo de triptófano, y el gen BIC-1, que codifica miR-155, un miARN importante implicado en la función inmunitaria, mediante RT-qPCR. Todos estos biomarcadores moleculares se hallaron regulados positivamente tras la maduración de Mo-CD mediada por LPS. Sin embargo, las Mo-CD pretratadas con C4BP  $\alpha_7\beta_0$  y C4BP  $\alpha_6\beta_0$ , pero no con C4BP  $\alpha_7\beta_1$  regularon negativamente de manera significativa el perfil transcripcional anterior, alcanzando niveles de transcrito de

65

CCR7,IDO y BIC-1 equivalentes a aquellos de CD inmaduras (figura 3A). Además, el tratamiento con isoforma  $\beta^-$  de C4BP indujo una regulación negativa consistente del receptor de superficie CCR7 en Mo-CD (figura 3B).

### EJEMPLO 3

5 **Las isoformas de C4BP que carecen de cadena beta inhiben la liberación de citocinas inflamatorias por Mo-CD humanas maduras por LPS**

10 A continuación, los presentes inventores evaluaron si el efecto de las diferentes isoformas de C4BP en el fenotipo de Mo-CD estaba acompañado por cambios en su liberación de citocinas (IL-12p70, IL-10, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) (figura 4). En comparación con iCD no tratadas, la secreción de cada una de estas citocinas estaba regulada positivamente cuando las iCD se maduraron con LPS. Las Mo-CD pretratadas con C4BP  $\alpha_7\beta_1$  secretaron los mismos niveles de citocinas que las Mo-CD no tratadas tras la maduración. Por el contrario, el pretratamiento con cualquiera de las isoformas  $\beta^-$  de C4BP previno la liberación de IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , redujo la liberación de IL-8 e IL-6 y aumentó la producción de IL-10. Por lo tanto, la producción de citocinas proinflamatorias tras la estimulación de Mo-CD mediada por LPS se redujo significativamente en las CD tratadas con C4BP  $\beta^-$ .

### EJEMPLO 4

20 **Las isoformas de C4BP que carecen de cadena beta modifican la morfología de Mo-CD humanas**

25 Se empleó microscopía electrónica de barrido (MEB) para evaluar la morfología superficial detallada de Mo-CD (figura 5). Antes de la exposición a LPS, las iCD no tratadas fueron esencialmente redondeadas, mientras que tras 48 h de maduración con LPS, la morfología dendrítica se hizo evidente, con numerosas proyecciones alargadas que sobresalían de la superficie celular. De nuevo, las Mo-CD tratadas con C4BP  $\alpha_7\beta_1$  tenían una apariencia análoga a las Mo-CD no tratadas tras la estimulación con LPS. Por el contrario, el tratamiento de Mo-CD tanto con C4BP  $\alpha_7\beta_0$  (figura 5) como con C4BP  $\alpha_6\beta_0$  (no mostrada) revirtieron la morfología de CD "similar a un puercoespín" resultante tras la inducción con LPS.

### EJEMPLO 5

30 **Las isoformas de C4BP que carecen de cadena beta alteran la quimiotaxis de Mo-CD humanas**

35 Las señales de maduración determinan la expresión de distintas funciones de Mo-CD, tales como la migración hacia quimiocinas que dirigen al nódulo linfático. Tal como se ha demostrado anteriormente, el tratamiento con isoforma  $\beta^-$  de C4BP reguló negativamente al receptor de quimiocinas CCR7. La expresión reducida de CCR7 en la superficie, a su vez, detuvo la migración de Mo-CD maduras con LPS hacia la quimiocina CCL21 (figura 6). En contraste, la maduración con LPS de las Mo-CD tanto no tratadas como tratadas con C4BP  $\alpha_7\beta_1$  indujo una migración máxima en respuesta a CCL21.

40

### EJEMPLO 6

45 **Las Mo-CD expuestas a isoformas de C4BP que carecen de cadena beta inhiben la proliferación de células T alogénicas**

50 Dado que se observó que las isoformas  $\beta^-$  de C4BP tienen impacto en la maduración fenotípica y la cantidad de citocinas inflamatorias liberadas por Mo-CD, los presentes inventores examinaron a continuación la capacidad inmunoestimuladora de las Mo-CD expuestas a las principales isoformas de C4BP. Cuando se preincubaron las Mo-CD con la isoforma  $\alpha_7\beta_1$  de C4BP y se maduraron con LPS, se observó proliferación máxima de células T alogénicas, de manera similar a aquellas obtenidas usando Mo-CD no tratadas, maduras con LPS. En contraste, las Mo-CD maduras preincubadas con C4BP  $\alpha_7\beta_0$  indujeron una proliferación de células T significativamente menor, aproximándose a los niveles observados usando iCD (figura 7). Se obtuvo un resultado análogo usando células T vírgenes (datos no mostrados).

### EJEMPLO 7

55 **El dominio CCP6 de C4BPA es necesario para la actividad "tolerogénica" de C4BP sobre Mo-CD humanas.**

60 A continuación, los presentes inventores intentaron caracterizar los requisitos estructurales de las isoformas  $\beta^-$  de C4BP respecto de su actividad inmunomoduladora o "tolerogénica" sobre las Mo-CD. Por lo tanto, las isoformas de C4BP recombinantes ( $\alpha_6\beta_0$ ) que carecen de dominios CCP individuales se probaron respecto de su capacidad para regular negativamente el fenotipo de activación de Mo-CD. Tal como se muestra en la figura 8, todos los mutantes de delección individuales salvo uno,  $\Delta$ CCP6, fueron capaces de prevenir significativamente la regulación positiva del marcador de maduración CD83 tras la inducción con LPS. Por el contrario, las Mo-CD tratadas con  $\Delta$ CCP6 de C4BP se comportaron como Mo-CD no tratadas o tratadas con C4BP  $\alpha_7\beta_1$  tras la inducción de LPS, regulando positivamente la expresión de CD83 (figura 8) y tampoco previno la inducción de otros rasgos de maduración típicos,

65

tales como regulación positiva de biomarcadores moleculares (IDO), secreción de citocinas proinflamatorias o cambios en la morfología superficial (datos no mostrados). Por lo tanto, el dominio CCP6 de cadena  $\alpha$  de C4BP es necesario para la actividad inmunomoduladora de las isoformas  $\beta^-$  de C4BP en CD.

## 5 EJEMPLO 8

### El péptido PS6-04 basado en CCP6 previene el fenotipo de maduración de las Mo-CD humanas

Los presentes inventores generaron cuatro péptidos sintéticos (PS6-01, PS6-02, PS6-03 y PS6-04) que abarcan la secuencia completa del dominio CCP6, acetilada en el extremo N-terminal y amidada en el extremo C-terminal, en donde los aminoácidos de Cys se sustituyeron por Ser y los probaron para imitar la actividad inmunomoduladora o "tolerogénica" de las isoformas  $\beta^-$  de C4BP sobre Mo-CD estimuladas con LPS (figura 9). Dos de los péptidos, PS6-02 y PS6-03 parecieron prevenir la regulación positiva de CD83 en Mo-CD maduras con LPS. PS6-02 fue tóxico para las CD. Por lo tanto, el péptido 14-mero pequeño, PS6-04 a 100  $\mu$ M indujo un efecto comparable a su homólogo C4BP  $\alpha_6\beta_0$  sobre Mo-CD.

## EJEMPLO 9

### El factor H regula negativamente el fenotipo de activación de Mo-CD humanas

Los presentes inventores evaluaron en primer lugar si el factor H purificado de plasma humano tenía impacto en la expresión de diferentes marcadores superficiales de monocitos y CD, incluyendo CD14, HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86 y CD1a. Se analizaron los datos de cinco experimentos independientes usando la prueba de la t de Student no emparejada (figura 10). De manera interesante, la incubación conjunta de Mo-CD con factor H a lo largo de su proceso de diferenciación y maduración reveló diferencias fenotípicas significativas con respecto a Mo-CD no tratadas. Por lo tanto, el factor H reguló negativamente, de manera significativa, a CD83, CD86, CD80, CD40 y CD1a de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, la expresión de HLA-DR y CD14 experimentó un ligero aumento. En su conjunto, estos datos son pruebas de que el factor H tiene el potencial para modificar la diferenciación/maduración de Mo-CD proinflamatorias, tal como se determina por el patrón de expresión de diversos marcadores de la superficie celular. Además, las Mo-CD tratadas con factor H permanecieron altamente viables a lo largo del proceso de diferenciación/maduración, según se evalúa mediante tinción con anexina V/7-ADD, con menos de un 10 % de células apoptóticas evidenciadas a las 48 h después de la maduración de CD mediada por LPS (figura 11).

## 35 EJEMPLO 10

### Las Mo-CD humanas expuestas a factor H expresan menos CCR7 y los marcadores de maduración de CD IDO, BIC-1 y SOD2

Para evaluar adicionalmente el efecto del factor H en transcritos clave que conforman la firma genética de las CD en maduración (Jin et al., 2010, J. Trans. Med, 8:4), los presentes inventores analizaron mediante RT-qPCR la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, implicado en el tráfico de CD, la enzima inmunorreguladora IDO, implicada en el metabolismo del triptófano, el gen BIC-1, que codifica miR-155, un miARN importante implicado en la función inmunitaria y la enzima antioxidante SOD2. Todos estos biomarcadores moleculares se observaron regulados positivamente tras la maduración de Mo-CD mediada por LPS. Sin embargo, las Mo-CD pretratadas con factor H regularon negativamente de manera significativa el perfil transcripcional anterior, dirigiendo los niveles de transcrito de CCR7, IDO, BIC-1 y SOD2 incluso por debajo de aquellos de CD inmaduras (figura 12A). Además, el tratamiento con factor H indujo la regulación negativa consistente del receptor de superficie CCR7 en Mo-CD (figura 12B).

## 50 EJEMPLO 11

### El factor H inhibe la liberación de citocinas inflamatorias por Mo-CD humanas maduras por LPS

Los presentes inventores evaluaron a continuación si el efecto del factor H estaba acompañado por cambios en su liberación de citocinas (IL-12p70, IL-10, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) (figura 13). En comparación con iCD no tratadas, la secreción de cada una de estas citocinas estaba regulada positivamente cuando se maduraron iCD con LPS. El pretratamiento con factor H previno la liberación de todas las citocinas inflamatorias anteriormente mencionadas, cuyos niveles permanecieron próximos a aquellos de iCD no tratadas. Por lo tanto, la producción de citocinas proinflamatorias tras la estimulación de Mo-CD mediada por LPS se redujo significativamente en las CD tratadas con factor H.

## EJEMPLO 12

### 65 El factor H modifica la morfología de Mo-CD humanas

Se empleó microscopía electrónica de barrido (MEB) para evaluar la morfología superficial detallada de las Mo-CD (figura 14). Antes de la exposición a LPS, las iCD no tratadas eran esencialmente redondeadas, mientras que tras 48 h de maduración con LPS, se hizo evidente la morfología dendrítica, sobresaliendo numerosas proyecciones alargadas desde la superficie celular. De nuevo, el tratamiento de Mo-CD con factor H (figura 14) revirtió la morfología de CD “similar a un puercoespín” resultante tras la inducción con LPS.

### EJEMPLO 13

#### El factor H reduce el potencial endocítico de las iCD

A continuación, los presentes inventores examinaron si el factor H tenía impacto en la actividad endocítica de las Mo-CD inmaduras. Se incubaron Mo-CD con DQ-OVA fluorescente a 37 °C para medir la captación específica y a 4 °C para cuantificar la unión no específica. El factor H redujo significativamente la fagocitosis de las iCD (figura 15). Sorprendentemente, el factor H redujo la fagocitosis de las iCD al nivel de fagocitosis observado en mCD (datos no mostrados). A 4 °C, no se observó incorporación de DQ-OVA por Mo-CD inmaduras. Estos datos indican que el factor H reduce la capacidad endocítica de las iCD.

### EJEMPLO 14

#### El factor H altera la quimiotaxis de las Mo-CD humanas

Las señales de maduración determinan la expresión de distintas funciones de las Mo-CD, tales como la migración hacia las quimiocinas que dirigen a los nódulos linfáticos. Tal como se mostró anteriormente, el tratamiento con factor H reguló negativamente al receptor de quimiocinas CCR7. La expresión superficial reducida de CCR7, a su vez, detuvo la migración de Mo-CD maduras con LPS hacia la quimiocina CCL21 (figura 16). Por el contrario, la maduración con LPS de Mo-CD no tratadas indujo una migración máxima en respuesta a CCL21.

### EJEMPLO 15

#### Las Mo-CD humanas expuestas a factor H inhiben la proliferación de células T alogénicas

Dado que se observó que el factor H tiene impacto en el fenotipo de activación y en la cantidad de citocinas inflamatorias liberadas por las Mo-CD, los presentes inventores examinaron a continuación la capacidad inmunoestimuladora de las Mo-CD expuestas a factor H. Cuando se emplearon Mo-CD no tratadas, maduras con LPS en la reacción de linfocitos mixtos, se observó proliferación máxima de células T alogénicas. Por el contrario, las Mo-CD preincubadas con factor H indujeron una proliferación de células T significativamente menor, aproximándose a los niveles observados usando iCD (figura 17). Se obtuvo un resultado análogo usando células T vírgenes (datos no mostrados).

### EJEMPLO 16

#### C4BP ( $\beta$ ) y FH inducen un fenotipo estable en CD

Debido a su uso potencial en una configuración clínica, los presentes inventores trataron de estudiar si una activación posterior de CD tratadas con C4BP ( $\beta$ ) o tratadas con FH y maduras con LPS podrían modificar el fenotipo de estas CD tolerogénicas. Por lo tanto, se maduraron con LPS CD tanto no tratadas como tratadas con C4BP ( $\beta$ ) o tratadas con FH, tal como se ha mencionado anteriormente y después volvieron a estimularse con agentes inmunomoduladores (C4BP ( $\beta$ ) o FH) usando TNF-alfa + IFN-gamma durante 24 h. La re-estimulación usando TNF-alfa + IFN-gamma no indujo cambios significativos ni en la viabilidad de CD (no mostrada) ni en el fenotipo de CD relativo a los marcadores CD83 y CD86 (figura 18). Estas CD tolerogénicas tratadas con C4BP ( $\beta$ ) o tratadas con FH fueron por consiguiente fenotípicamente refractarias a la estimulación secundaria, lo que confirma su perfil no proinflamatorio estable.

**EJEMPLO 17**

**Las CD tratadas con C4BP ( $\beta$ ) o con FH y maduras con LPS previenen la polarización CD4+ de Th1 a la vez que inducen el fenotipo Treg en células T alogénicas.**

5 Después de confirmar que las CD tratadas con C4BP ( $\beta$ ) y tratadas con FH y maduras con LPS eran capaces de inhibir la proliferación de células T alogénicas, los presentes inventores trataron de hacerse una idea acerca de las citocinas secretadas por estas células T respondedoras, se volvieron a estimular linfocitos T aloproliferativos CFSE<sup>bajo</sup> con PMA + ionomicina y se midió la producción de IFN-gamma mediante tinción intracelular. Estos  
10 resultados confirmaron una reducción significativa de aproximadamente el 50-50 % en la producción de IFN-gamma en relación a las CD no tratadas maduras con LPS (figura 19).

Finalmente, se estimó la presencia de células Treg, definidas como CD4+CD127<sup>bajo</sup>CD25<sup>alto</sup> y Foxp3+ en estas condiciones de cultivo. Después de una ronda de estimulación durante 6 días, los presentes inventores analizaron la  
15 inducción de células CD4+Foxp3+ y CD25<sup>alto</sup>, CD127<sup>bajo/negativo</sup> tal como se muestra en la figura 20. Tanto las células T estimuladas con C4BP ( $\beta$ ) como las CD maduras con LPS y las células T estimuladas con CD tratadas con FH y maduras con LPS mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células CD4+Foxp3+ y CD25<sup>alto</sup>, CD127<sup>bajo/negativo</sup> y este aumento fue análogo al obtenido con CD inmaduras no tratadas.

**EJEMPLO 18**

**Las CD tratadas con C4BP ( $\beta$ ) o tratadas con factor H suprimen la aloinmunidad *in vivo***

Los presentes inventores evaluaron la capacidad tolerogénica o reguladora de las CD derivadas de monocitos  
25 tratadas con C4BP ( $\beta$ ) o tratadas con factor H en un modelo de enfermedad de injerto contra huésped humano (xeno-EiCH) (King et al. (2009) Clin. Exp. Immunol. 157: 104-118). La inyección intravenosa de células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC;  $10 \times 10^6$ /ratón) indujo xeno-EiCH en ratones NSG inmunodeficientes (The Jackson Laboratory) (8-12 semanas de edad) (mediana de tiempo de supervivencia 30-40 días). La transferencia conjunta (estudio preventivo) o la infusión tardía (a los 25 días después de la inyección de  
30 PBMC, o cuando se manifiestan los signos patológicos más tempranos en los animales inyectados con PBMC, por ejemplo, pérdida de peso, postura encorvada, pérdida de pelo, movilidad reducida, ...) (estudio terapéutico) de CD derivadas de monocitos tratadas con C4BP ( $\beta$ ) o tratadas con factor H ( $5 \times 10^5$ /ratón) con PBMC prolongó de manera significativa el tiempo de supervivencia, frente a los animales inyectados únicamente con PBMC, mientras que no se confirió una protección significativa mediante la transferencia de CD no tratadas o tratadas con C4BP ( $\beta$ ).

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundació Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

40 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA INMUNOMODULACIÓN

<130> P7297PC00

<150> EP 11382240

45 <151> 15-07-2011

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial

55

<220>

<223> región CCP6 de la cadena alfa de C4BP

60

<400> 1

ES 2 581 278 T3

Leu Cys Cys Pro Glu Pro Lys Leu Asn Asn Gly Glu Ile Thr Gln His  
 1 5 10 15

Arg Lys Cys Arg Pro Ala Asn His Cys Val Tyr Phe Tyr Gly Asp Glu  
 20 25 30

Ile Ser Phe Ser Cys His Glu Thr Cys Arg Phe Ser Ala Ile Cys Gln  
 35 40 45

Gly Asp Gly Thr Trp Ser Pro Arg Thr Pro Ser Cys Gly Asp  
 50 55 60

5 <210> 2  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> PS6-01  
 10 <400> 2

Leu Ser Ser Pro Glu Pro Lys Leu Asn Asn Gly Glu Ile Thr Gln His  
 1 5 10 15

Arg Lys Ser Arg Pro Ala Asn His Ser Val Tyr Phe Tyr Gly  
 20 25 30

15 <210> 3  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> PS6-02  
 <400> 3

His Arg Lys Ser Arg Pro Ala Asn His Ser Val Tyr Phe Tyr Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ile Ser Phe Ser Ser His Glu Thr Ser Arg Phe Ser Ala  
 20 25 30

25 <210> 4  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> PS6-03  
 35 <400> 4



ES 2 581 278 T3

Glu Ile Ser Phe Ser Ser His Glu Thr Ser Arg Phe Ser Ala Ile Ser  
 1 5 10 15

Gln Gly Asp Gly Thr Trp Ser Pro Arg Thr Pro Ser Ser Gly  
 20 25 30

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

10 <220>  
 <223> PS6-04  
 <400> 5

Ile Thr Gln His Arg Lys Ser Arg Pro Ala Asn His Ser Val  
 1 5 10

15 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Cebador CCR7-f

<400> 6  
 tgggcatctg gatactagc 19

25 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Cebador CCR7-r

<400> 7  
 aagaaagggt tgacgcagc 19

35 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Cebador IDO-f

45 <400> 8  
 ggtcatggag atgtccgtaa 20

50 <210> 9  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> IDO-r

55 <400> 9  
 accaatagag agaccaggaa gaa 23

<210> 10

ES 2 581 278 T3

	<211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> BIC-1-f	
	<400> 10 aacctaccag agacctacc	20
10	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> BIC-1-r	
20	<400> 11 atgctcttt gtcacctcc	20
	<210> 12 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador SOD2-f	
30	<400> 12 gacaaacctc agccctaac	19
	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador SOD2-r	
40	<400> 13 acacatcaat cccagcagt	20
45	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador CypA-f	
	<400> 14 ctccttgag ctgttgag	20
55	<210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador CypA-r	
	<400> 15 caccacatgc ttgcatcc	19
65		

## REIVINDICACIONES

1. Una isoforma de C4BP que carece de la cadena beta, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad inmunológica causada por una activación no deseada del sistema inmunitario, en la que si al menos una de las cadenas alfa que forman dicha isoforma es un mutante de delección que carece de al menos una de las regiones CCP, la región CCP6 se conserva en dicha cadena alfa; y en la que la enfermedad inmunológica se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) una enfermedad inmunoinflamatoria seleccionada del grupo que consiste en infarto o ictus, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda, asma, cáncer, preeclampsia y eclampsia;
  - (ii) septicemia;
  - (iii) una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en: enfermedades sanguíneas autoinmunitarias, enfermedades autoinmunitarias de la musculatura, enfermedades autoinmunitarias del oído, enfermedades oculares autoinmunitarias, enfermedades autoinmunitarias del riñón, enfermedades cutáneas autoinmunitarias, enfermedades autoinmunitarias cardiovasculares, enfermedades autoinmunitarias endocrinas, enfermedades gastroentéricas autoinmunitarias, enfermedades nerviosas autoinmunitarias y enfermedades autoinmunitarias sistémicas seleccionadas del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolipídico, enfermedad linfoproliferativa autoinmunitaria, poliendocrinopatía autoinmunitaria, enfermedad de Bechet, enfermedad de Goodpasture, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren y psoriasis;
  - (iv) rechazo de trasplante;
  - (v) enfermedad de injerto contra huésped; y
  - (vi) una enfermedad de hipersensibilidad.
2. La isoforma de C4BP para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la enfermedad sanguínea autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia aplásica, púrpura trombocitopénica idiopática y espondilitis anquilosante; la enfermedad autoinmunitaria de la musculatura se selecciona del grupo que consiste en polimiositis y dermatomiositis; la enfermedad autoinmunitaria del oído se selecciona del grupo que consiste en pérdida auditiva autoinmunitaria y síndrome de Meniere; la enfermedad ocular autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Mooren, síndrome de Reiter y enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada; la enfermedad autoinmunitaria del riñón se selecciona del grupo que consiste en glomerulonefritis y nefropatía por IgA; la enfermedad cutánea autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en pénfigo (enfermedades ampollas autoinmunitarias), pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo eritematoso, pénfigoide ampollar, vitiligo, epidermólisis ampollas adquirida, psoriasis y alopecia areata; la enfermedad autoinmunitaria cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en miocarditis autoinmunitaria, vasculitis, síndrome de Churg-Strauss, arteritis de células gigantes, enfermedad de Kawasaki, poliarteritis nodosa, arteritis de Takayasu y granulomatosis de Wegener; la enfermedad autoinmunitaria endocrina se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Addison, hipoparatiroidismo autoinmunitario, hipofisitis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, síndrome autoinmunitario poliglandular de tipo 1 (Pas-1), síndrome autoinmunitario poliglandular de tipo 2 (PAS-2) y síndrome autoinmunitario poliglandular de tipo 3 (PAS-3); la enfermedad gastroentérica autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad celiaca y enfermedad de Crohn; la enfermedad nerviosa autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Guillan-Barre y neuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.
3. La isoforma de C4BP para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad autoinmunitaria es lupus eritematoso sistémico.
4. La isoforma de C4BP para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad inmunológica es rechazo de trasplante.
5. La isoforma de C4BP para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad inmunológica es enfermedad de injerto contra huésped.
6. La isoforma de C4BP para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad autoinmunitaria del riñón.
7. La isoforma de C4BP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la isoforma de C4BP se selecciona del grupo que consiste en  $\alpha_7\beta_0$  y  $\alpha_6\beta_0$ .

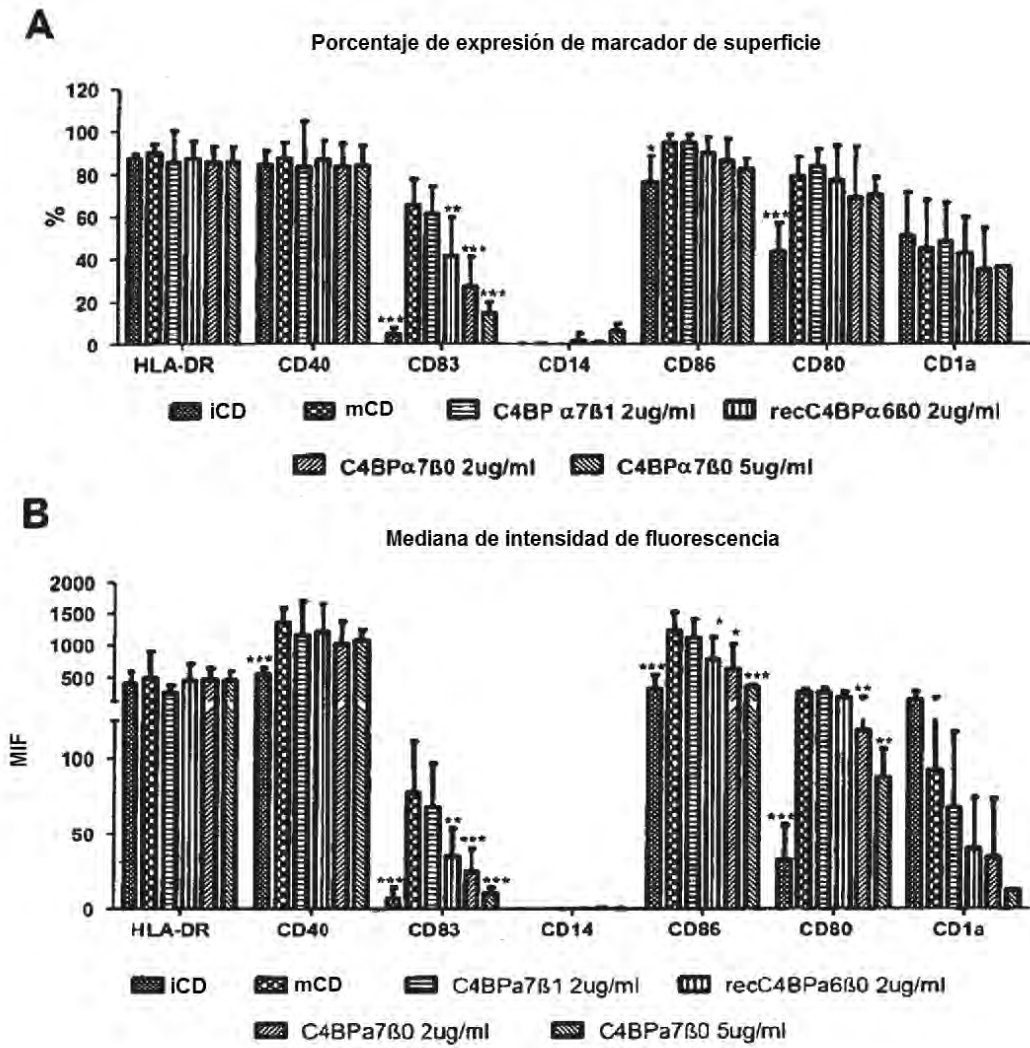


FIG. 1

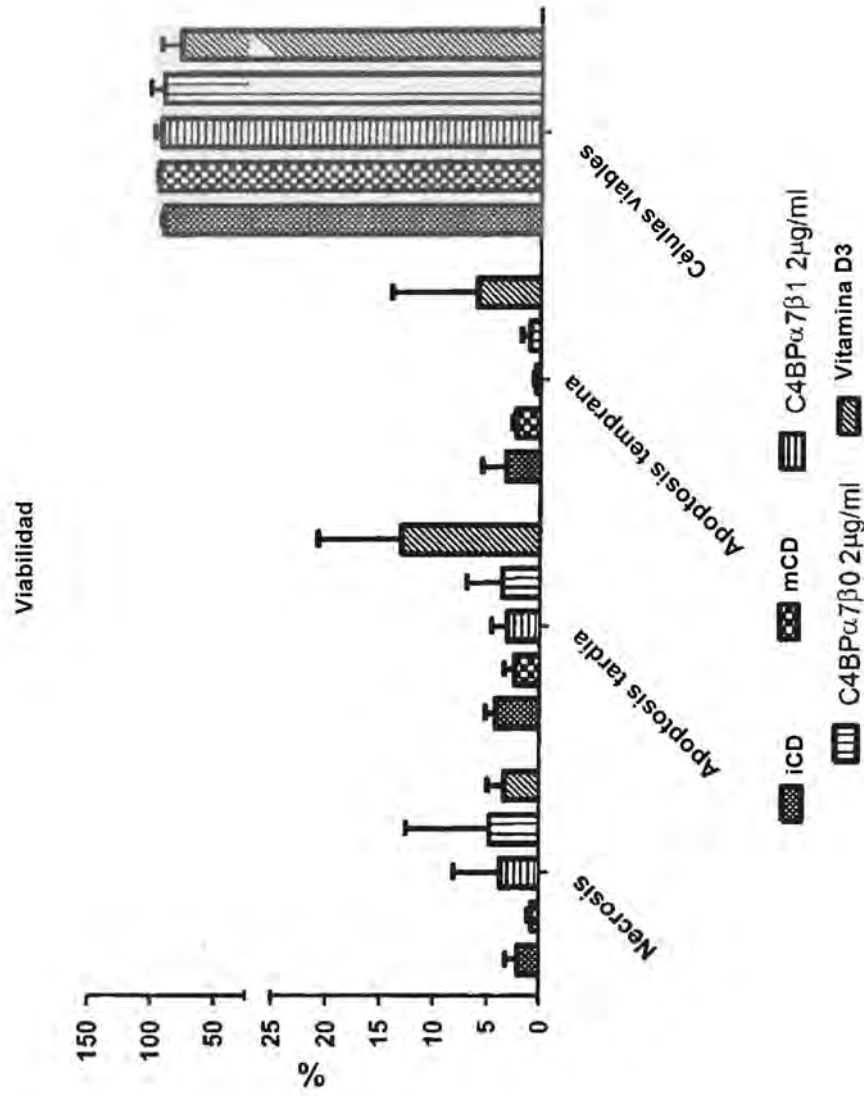


FIG. 2

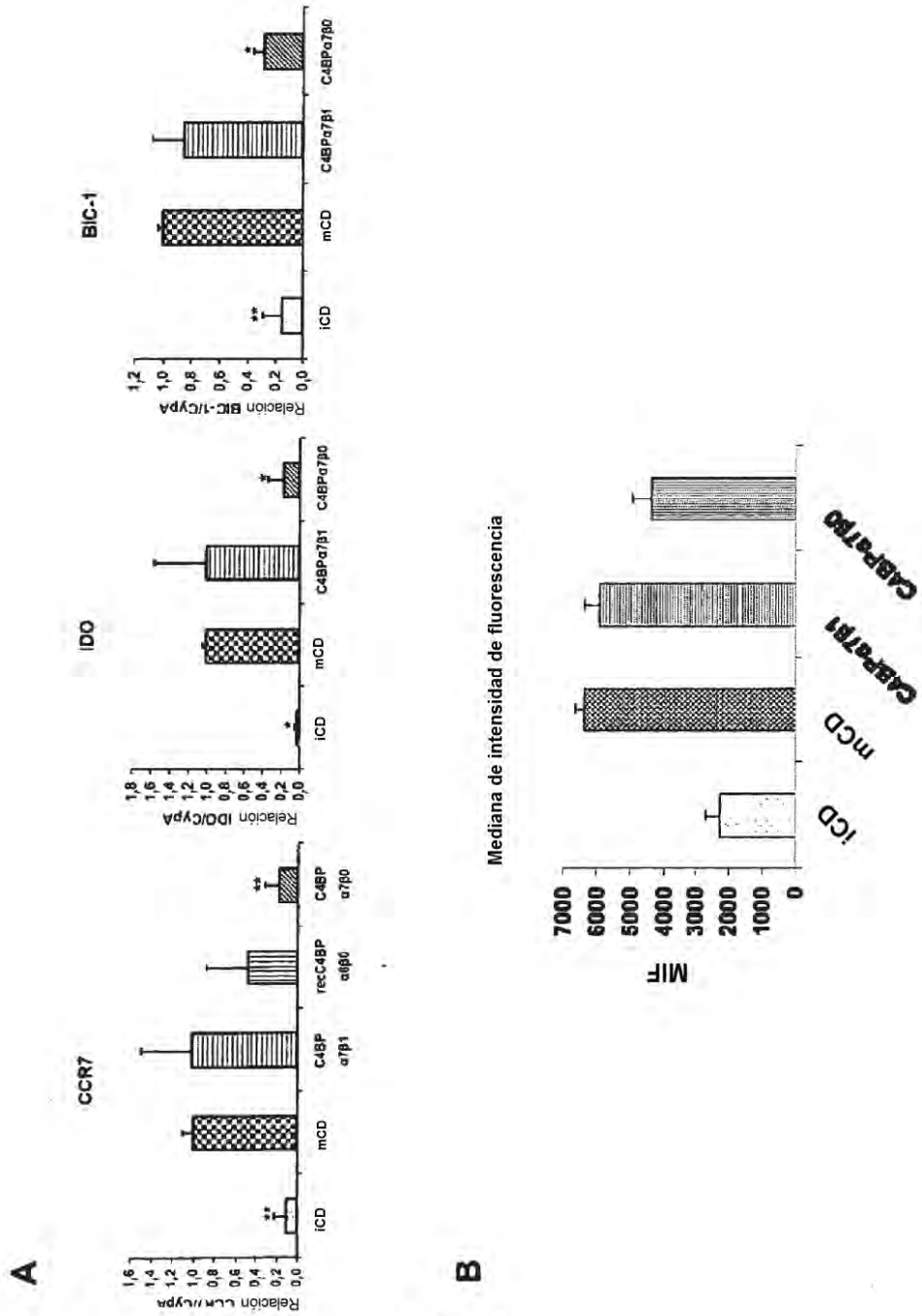


FIG. 3

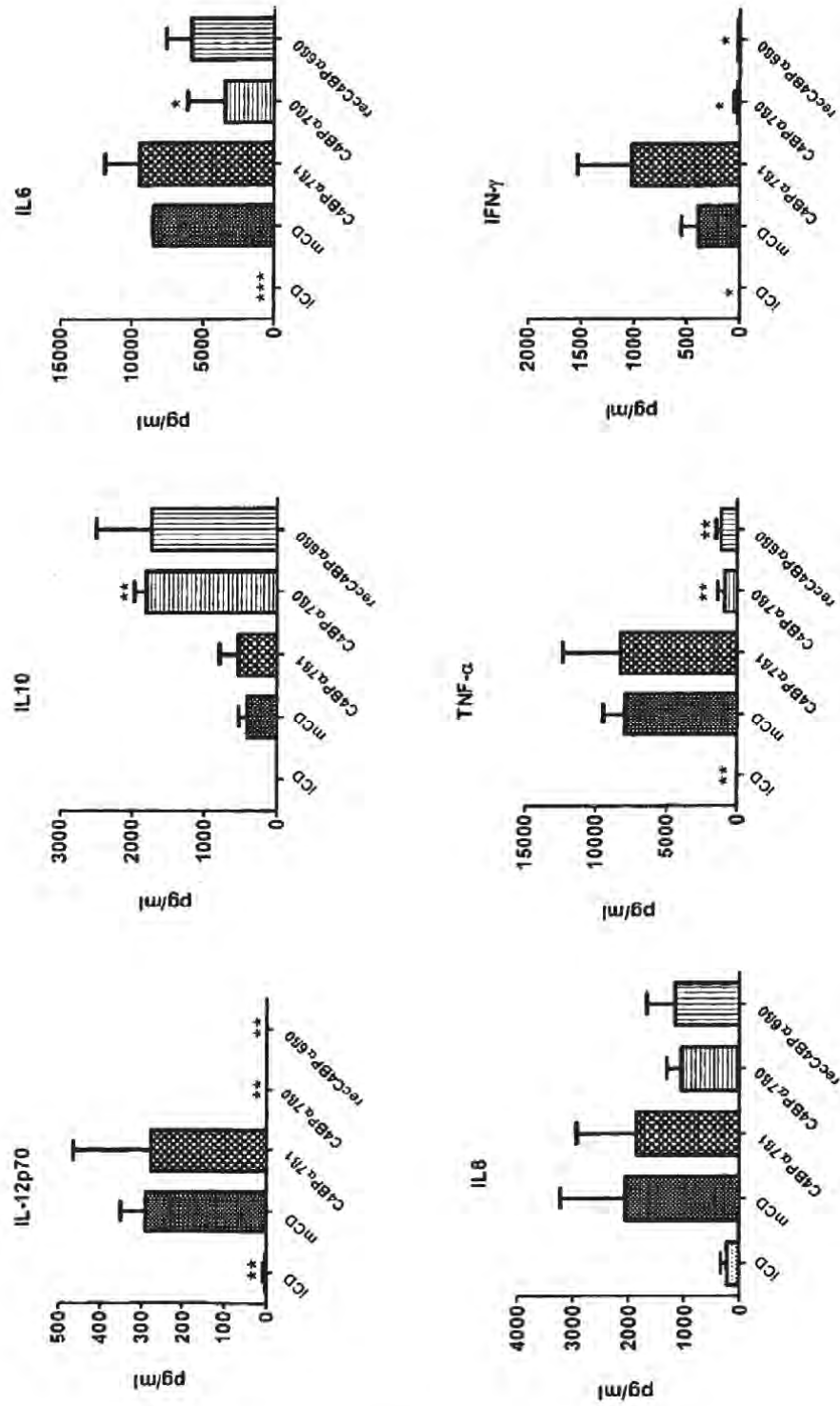


FIG. 4

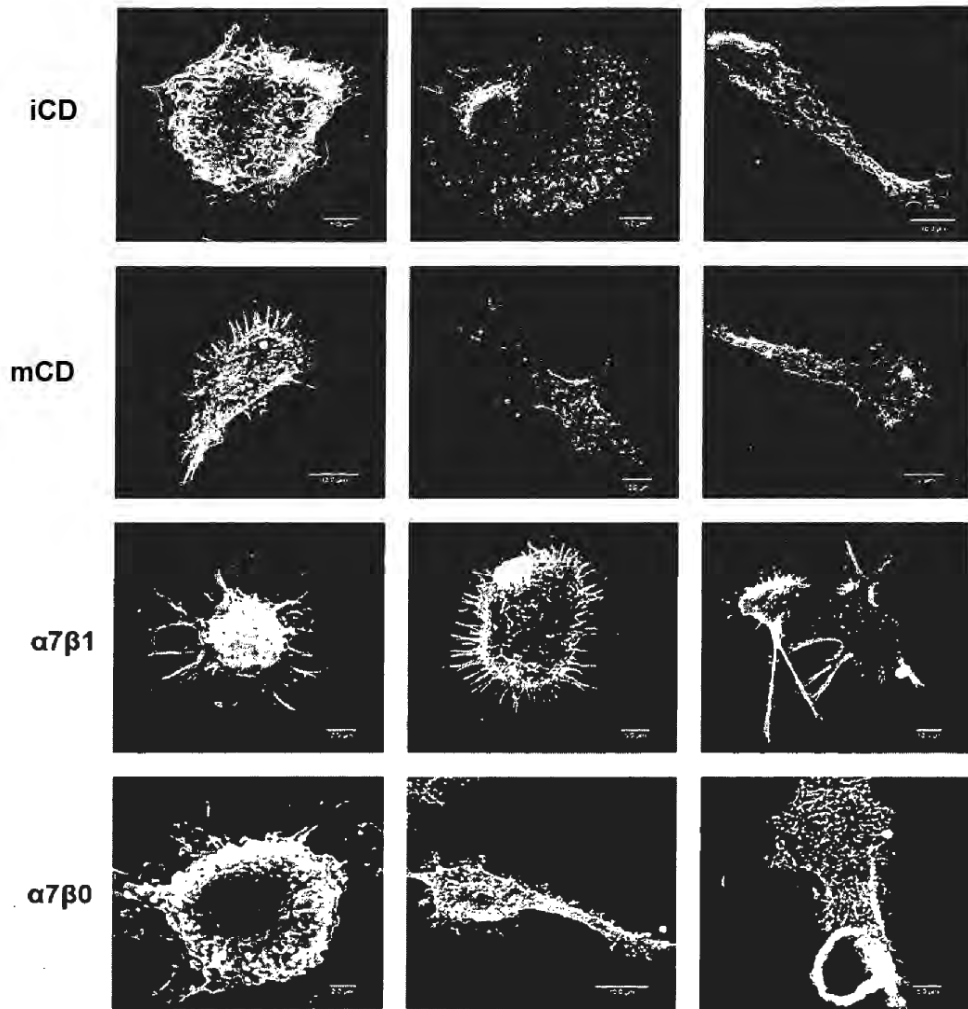


FIG. 5



### Porcentaje de migración

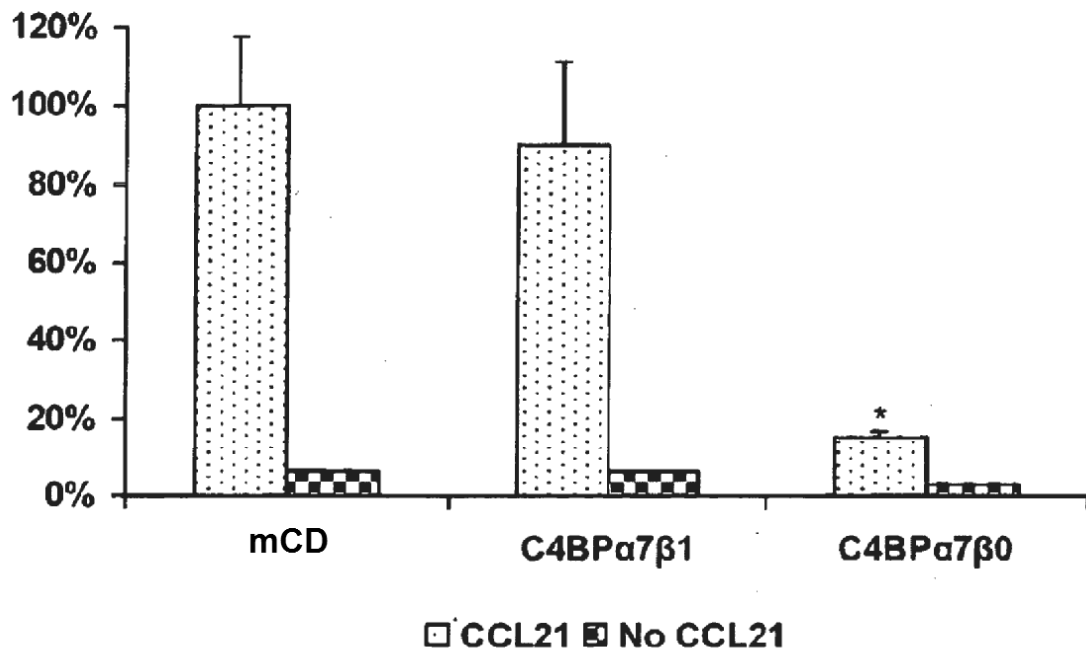


FIG. 6

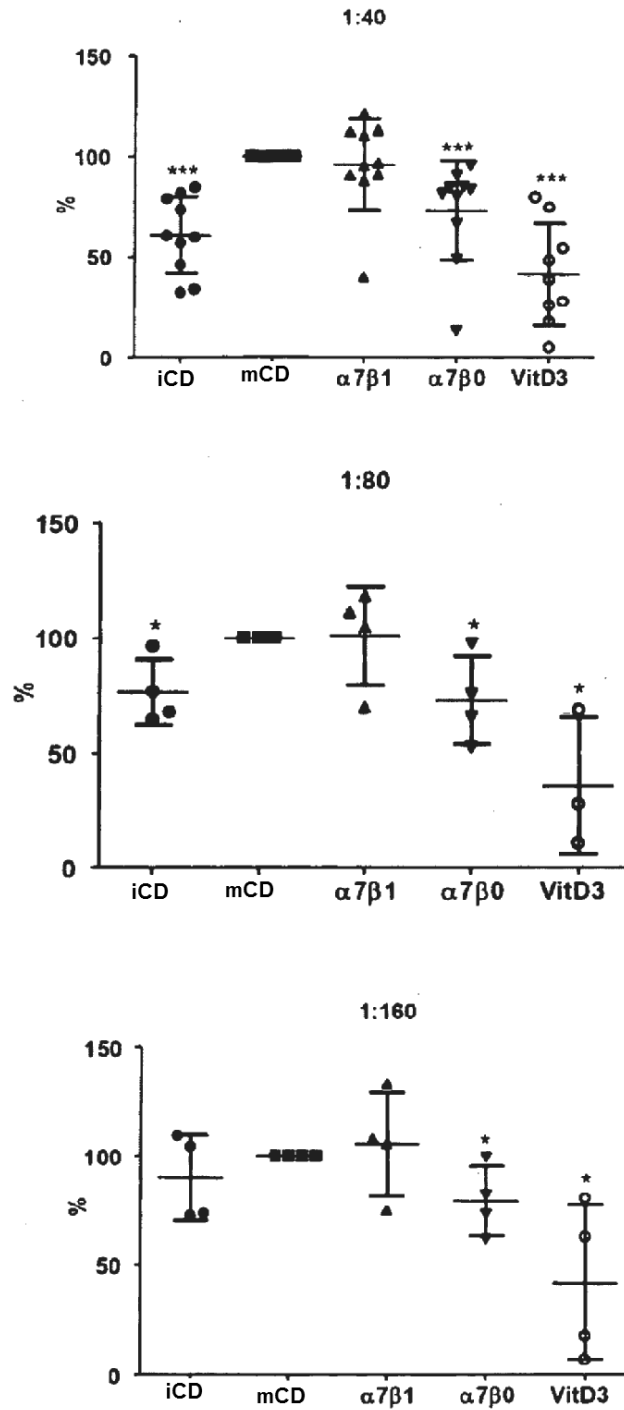
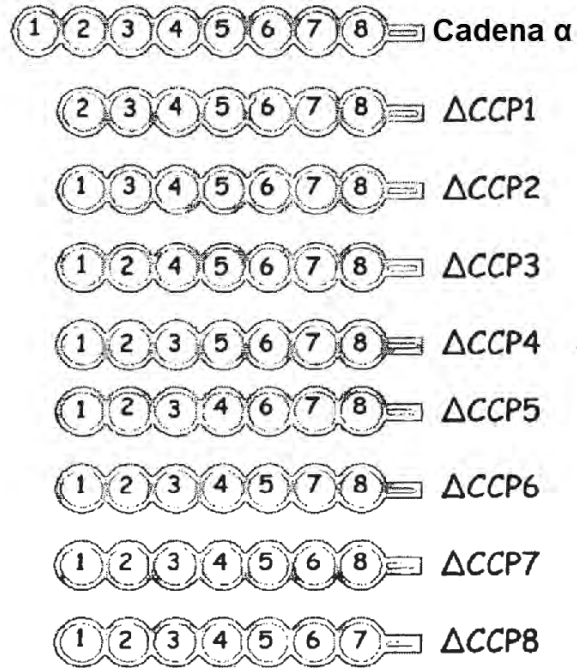


FIG. 7

**A**



**FIG. 8**

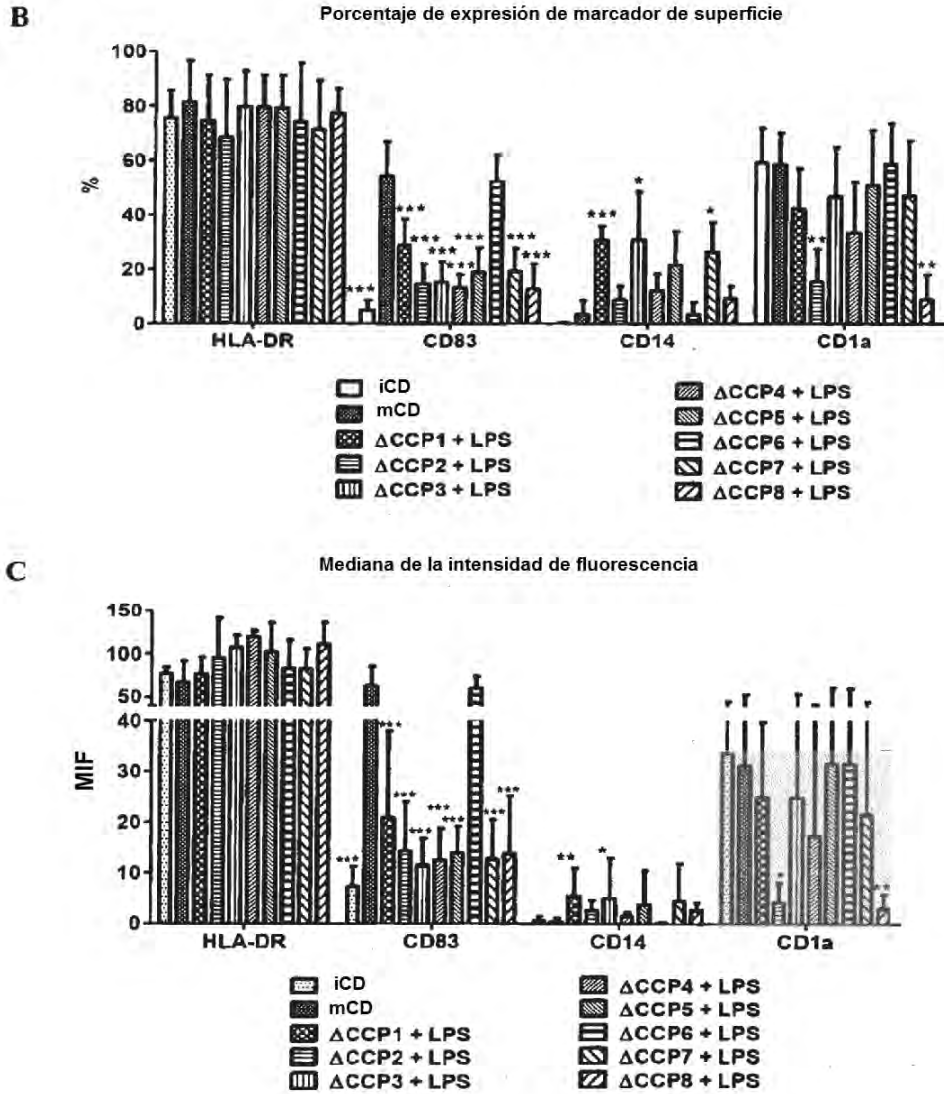


FIG. 8 (cont.)

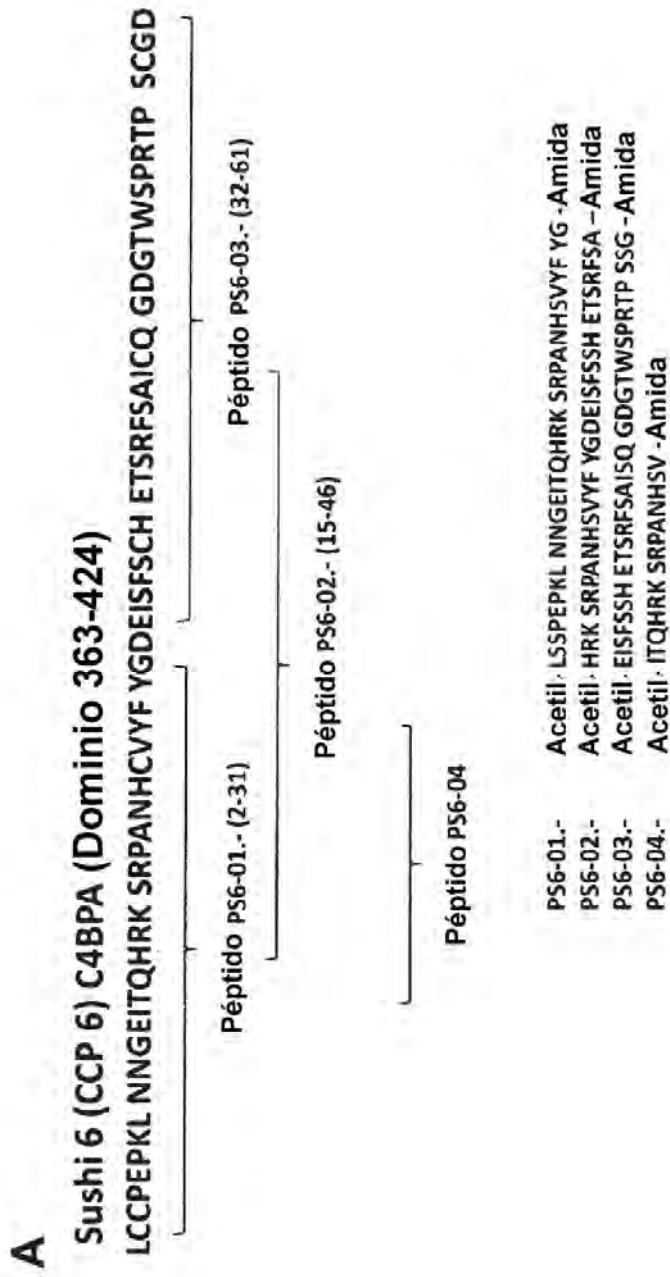


FIG. 9

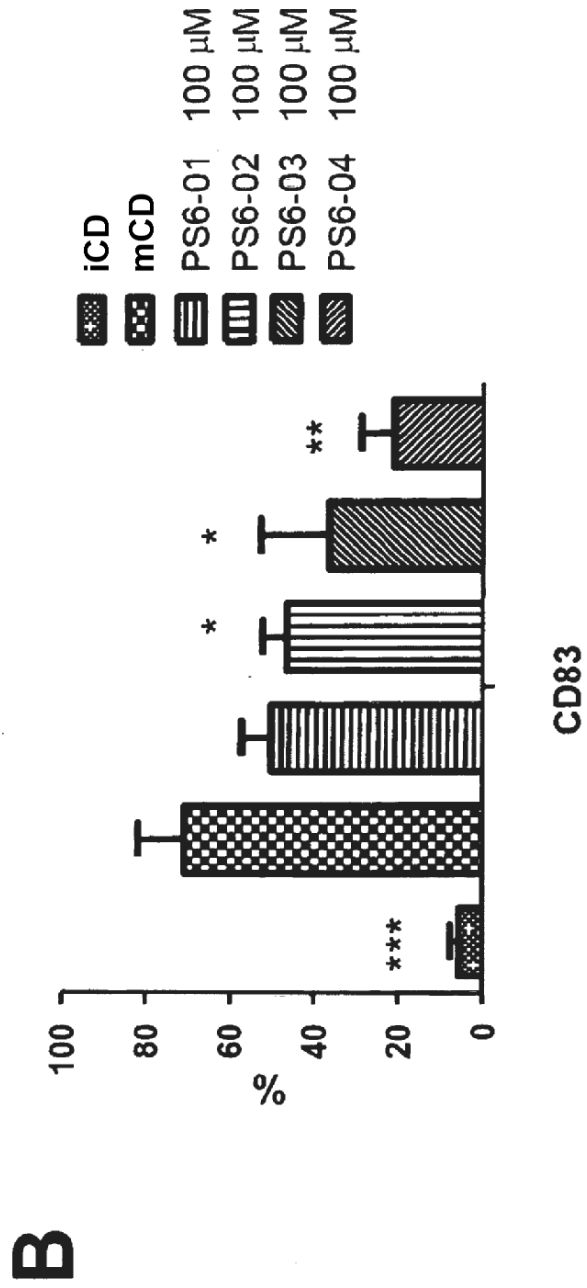


FIG. 9 (cont.)

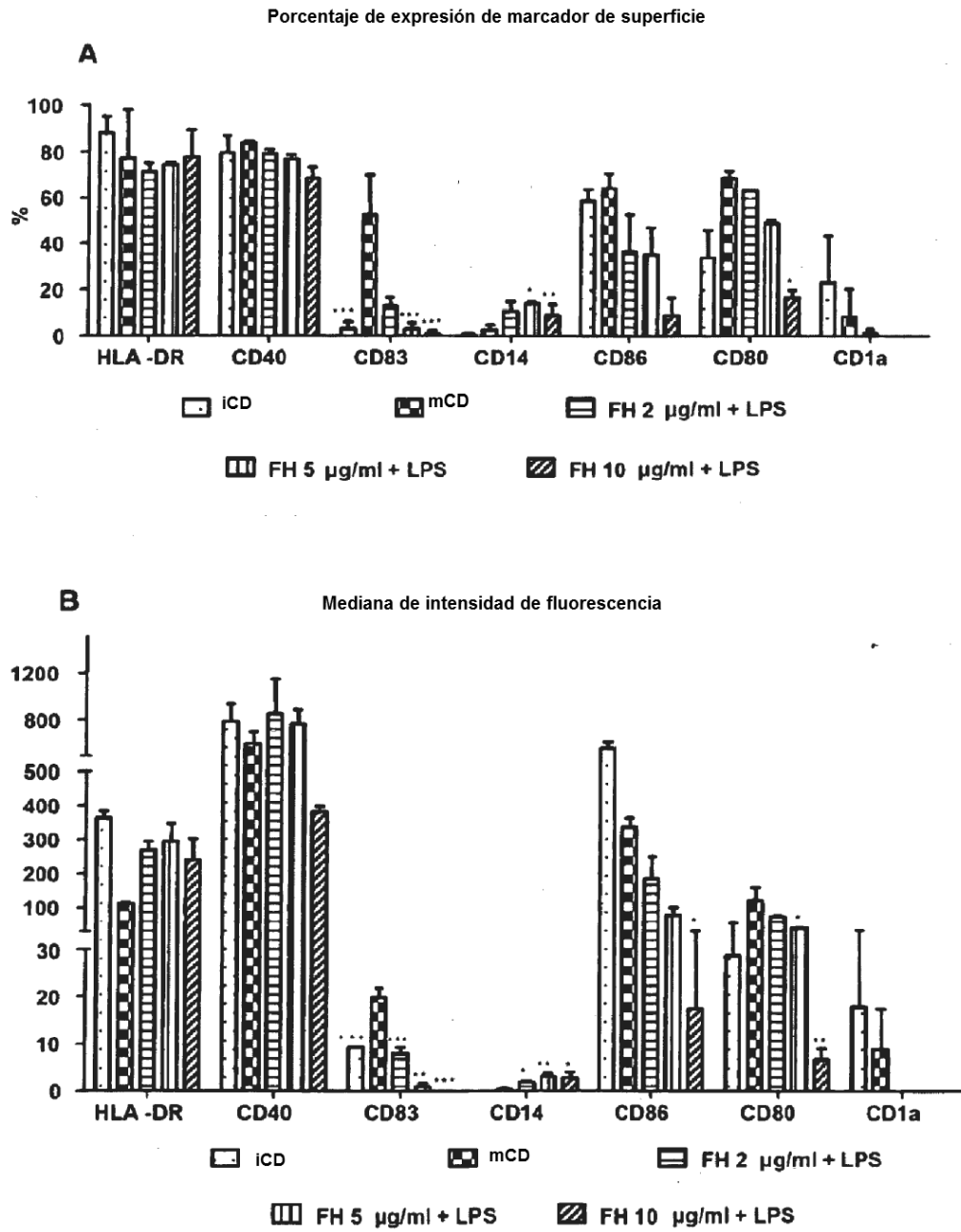


FIG. 10

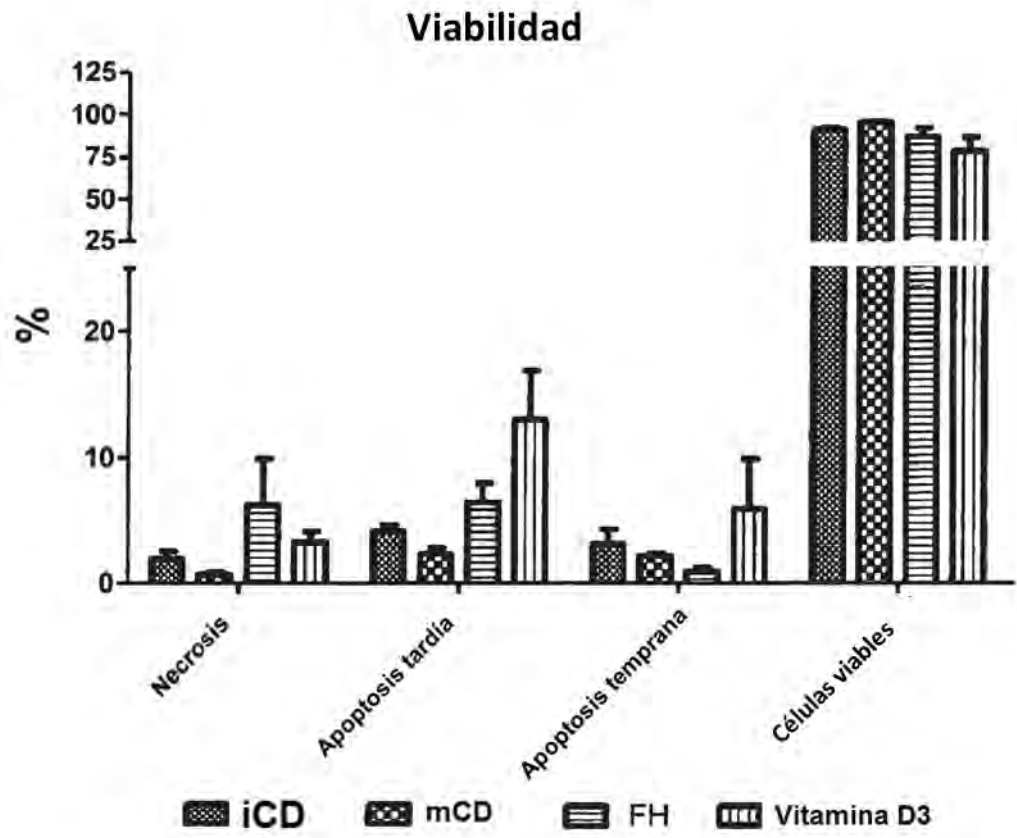


FIG. 11



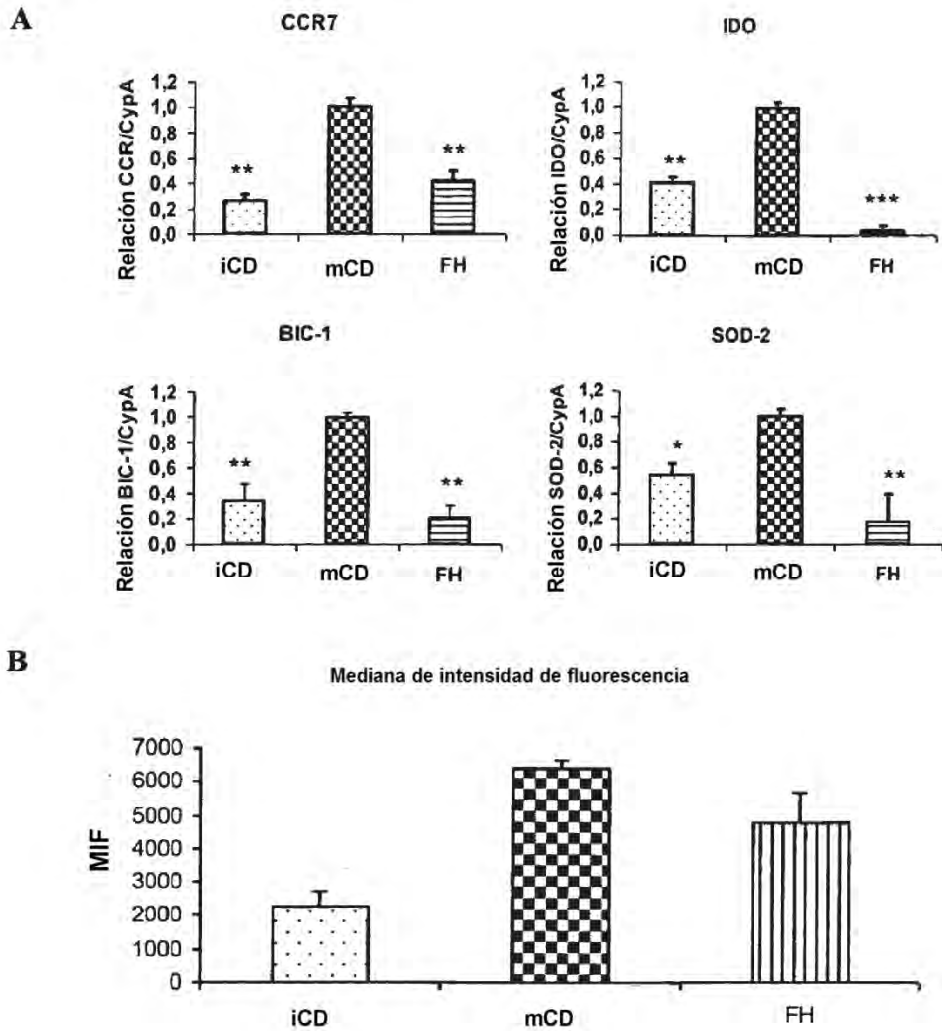


FIG. 12

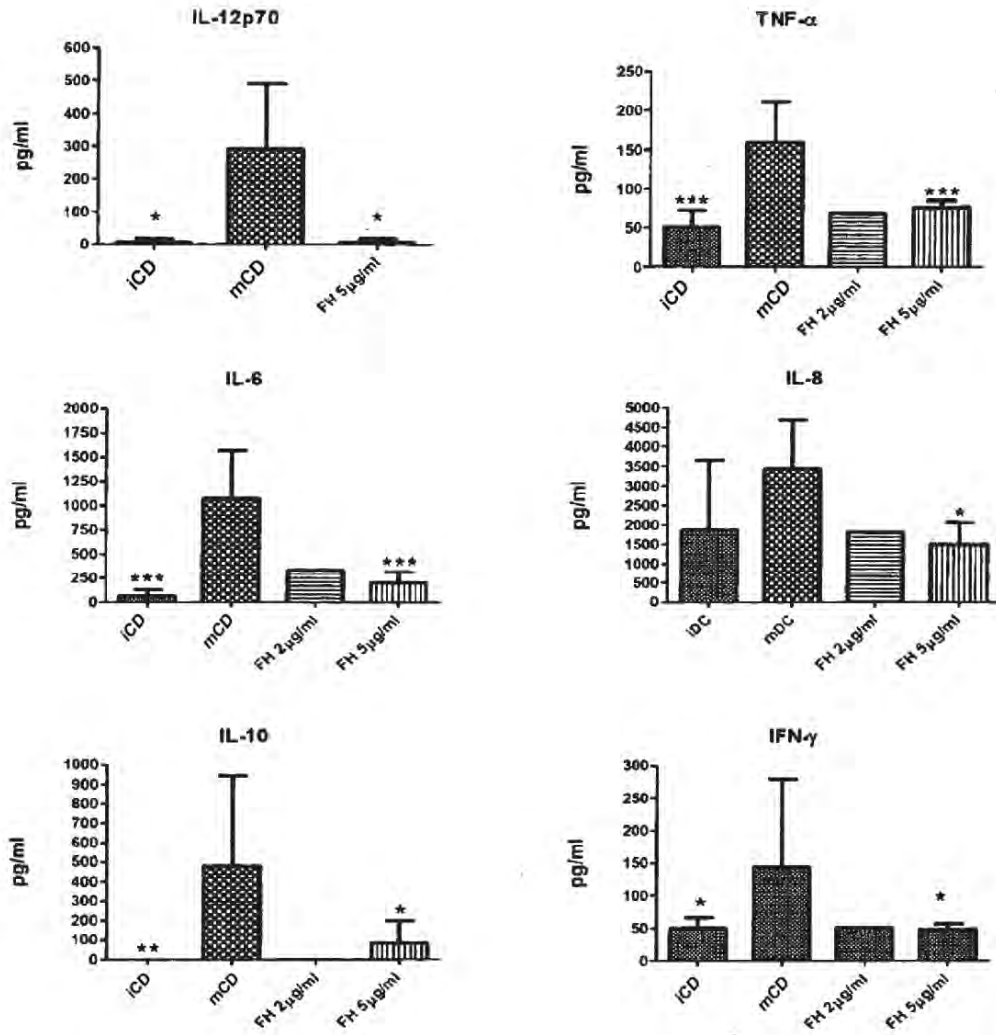
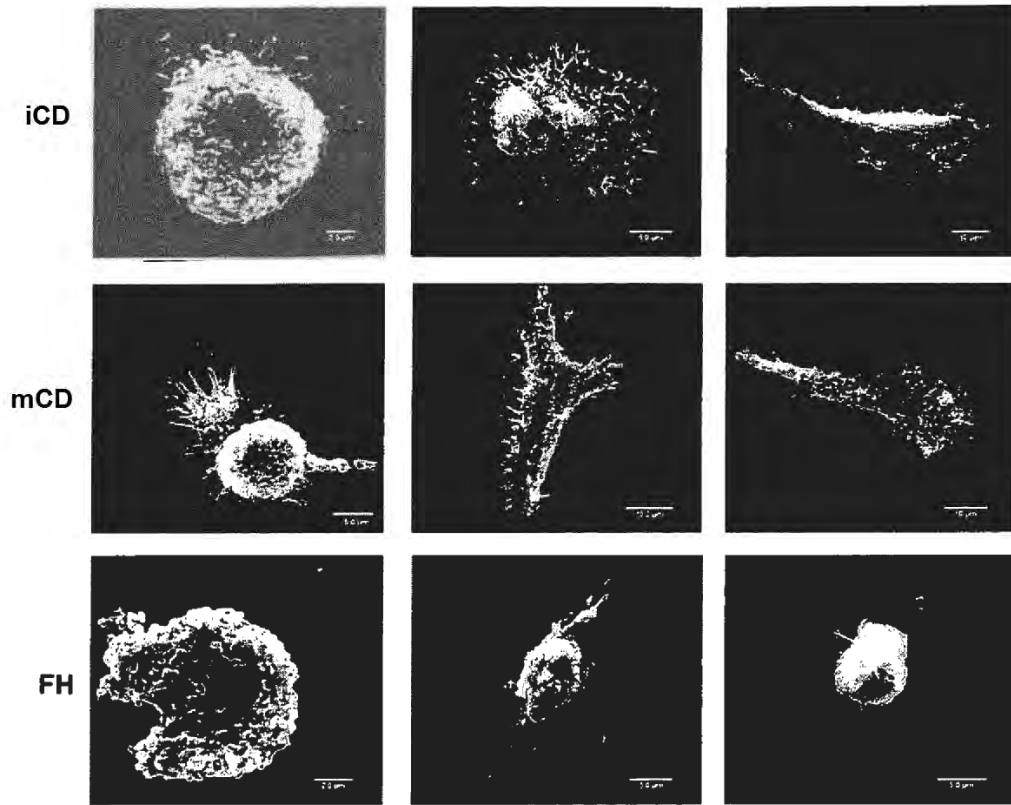


FIG. 13



**FIG. 14**

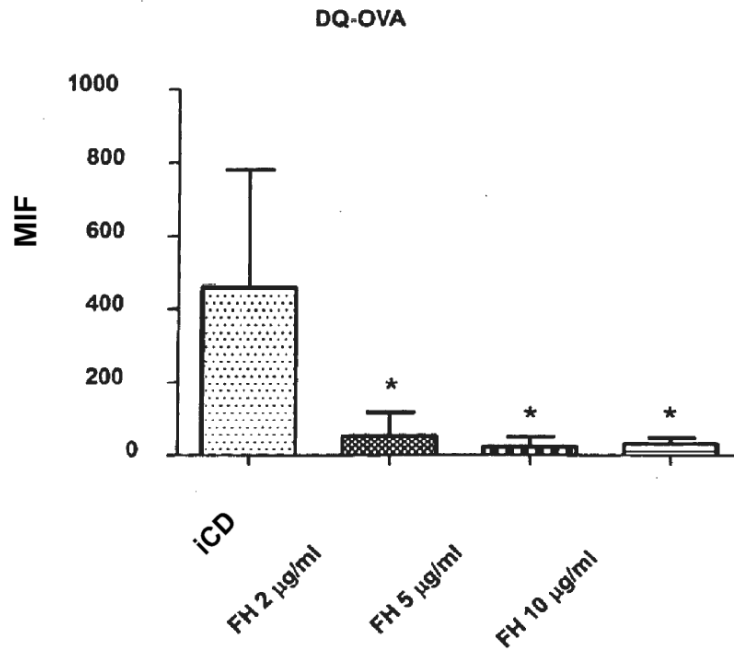


FIG. 15

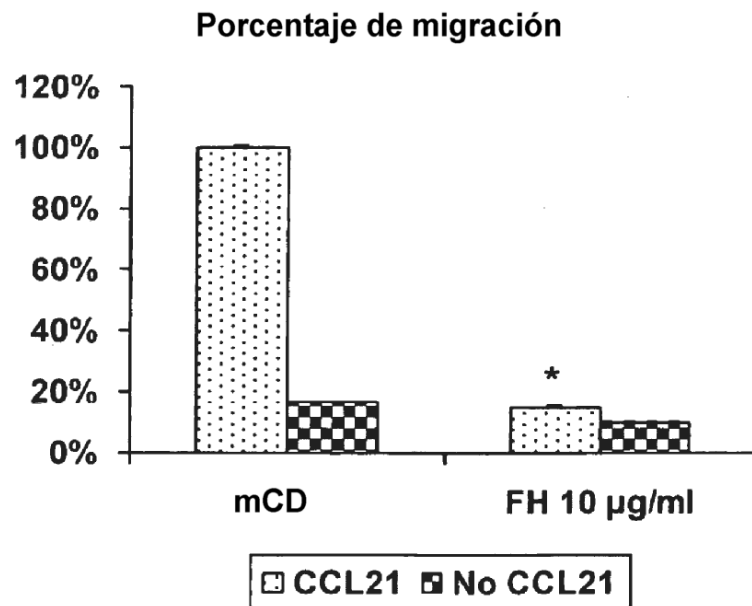


FIG. 16

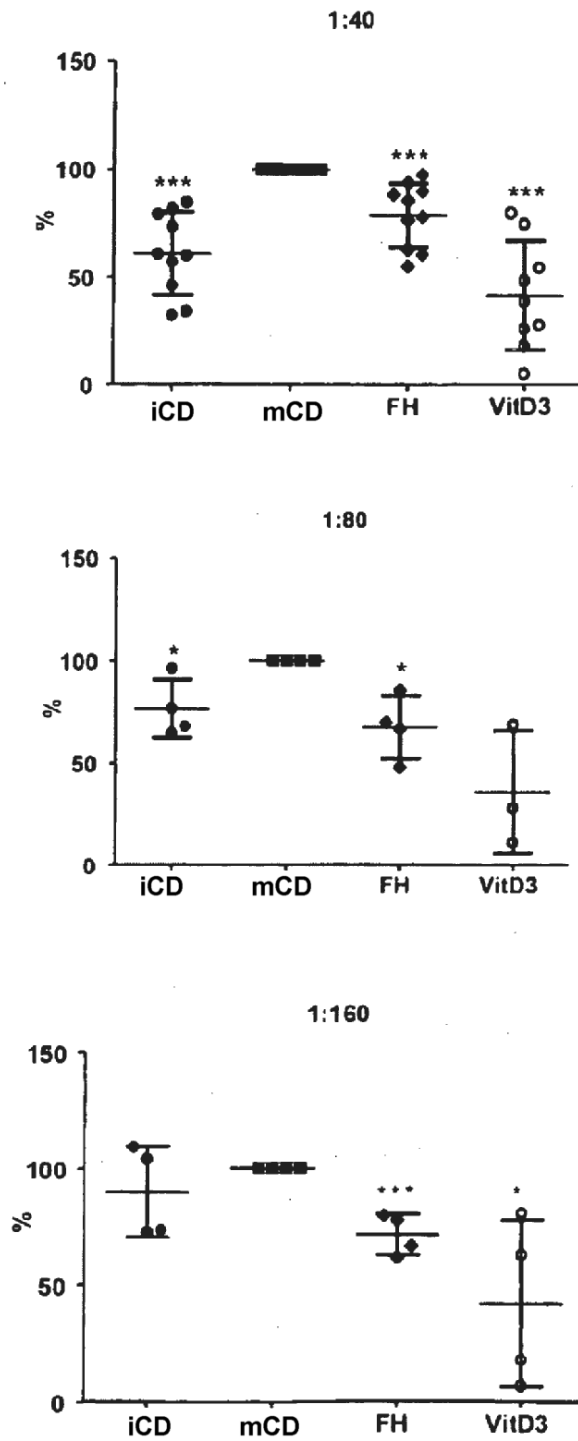
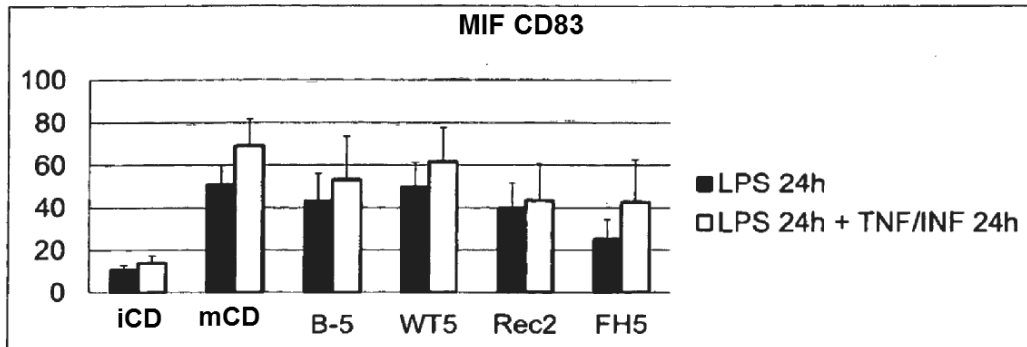


FIG. 17

A)



B)

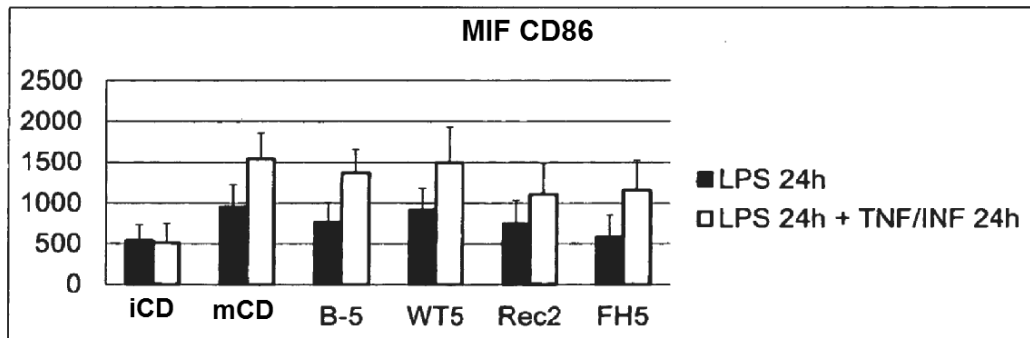
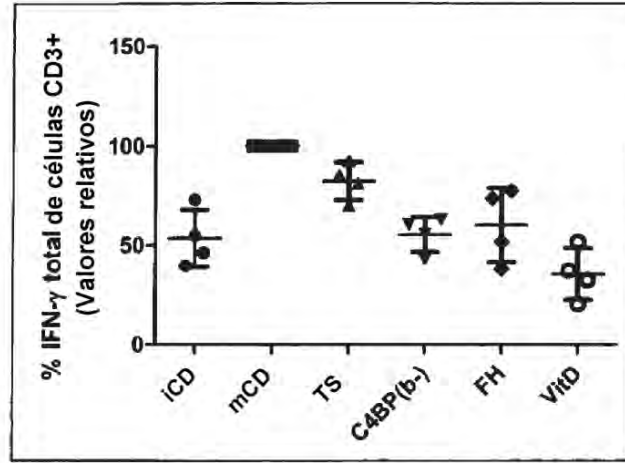


FIG. 18

A)



B)

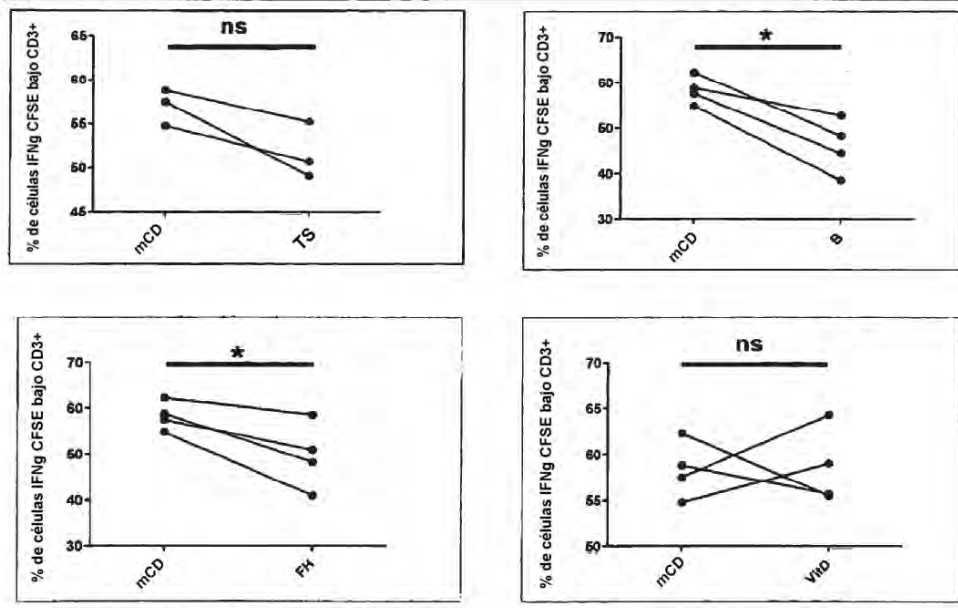


FIG. 19

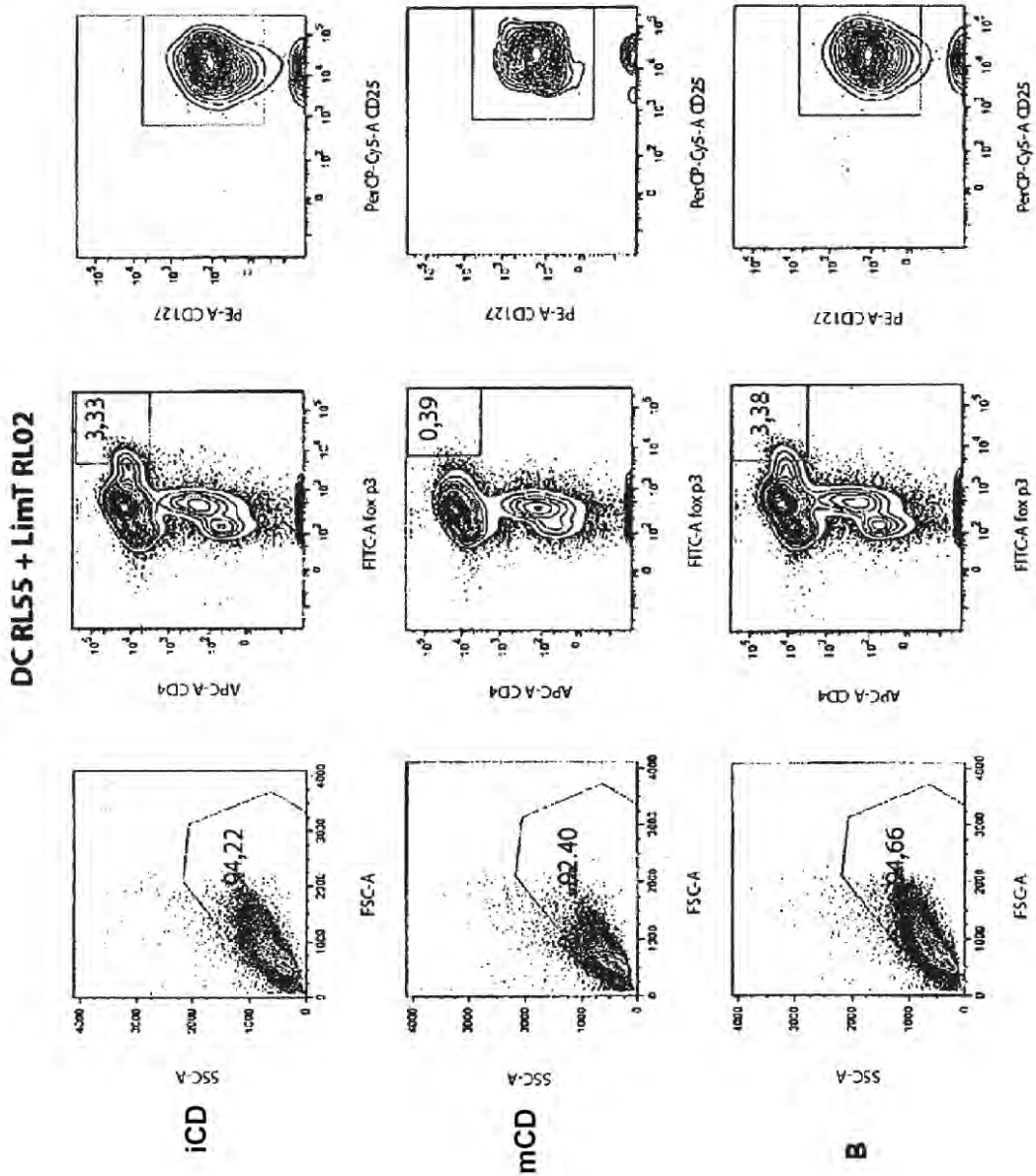


FIG. 20



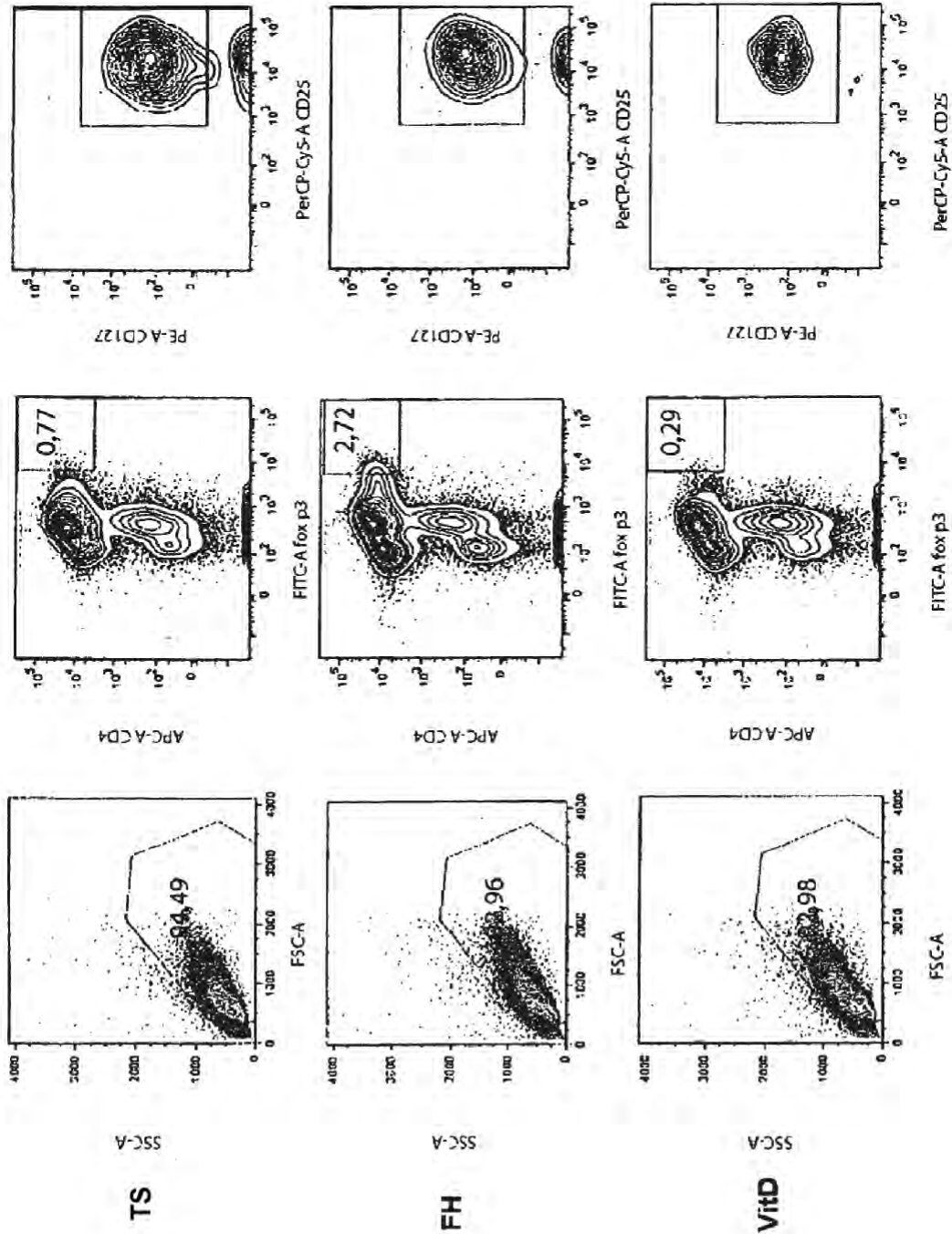


FIG. 20 (cont.)