(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 586 120**

(51) Int. CI.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/38 (2006.01)
A61K 35/26 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2003 E 12177657 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2570136**

(54) Título: **Composiciones de proteína A y procedimientos de utilización**

(30) Prioridad:

10.04.2002 US 121481

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2016

(73) Titular/es:

PROTALEX, INC. (100.0%)
131 Columbia Turnpike, Suite 1
Florham Park, NJ 07932, US

(72) Inventor/es:

MANN, PAUL

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

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 de proteína A y procedimientos de utilización.

Campo técnico

La invención se refiere al tratamiento de trastornos inmunitarios y patologías asociadas con o provocadas por trastornos inmunitarios tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes

La proteína A es una glicoproteína de 40.000 Da extraída de la pared celular de diversas bacterias. Las bacterias utilizan PA como sitio de direccionamiento y unión para la fijación a tejido. La proteína A presenta una alta afinidad por la parte Fc de determinadas clases de inmunoglobulinas y una afinidad incluso superior por esas inmunoglobulinas una vez que se han unido a antígeno. Esta propiedad bioquímica de PA se ha utilizado en un gran número de aplicaciones. Estas aplicaciones de PA reflejan una utilización de las propiedades de unión a Fc de la molécula o la capacidad de la PA para estimular la inmunidad humoral en ausencia de inducción de antígeno específico (aplicaciones de superantígeno).

Por ejemplo, se ha descrito que puede utilizarse la proteína A en el control terapéutico y profiláctico de infección por *Leishmania donovani* en animales para experimentación. El efecto antileishmaniásico de PA se atribuyó a la activación de macrófagos que conducen a una potenciación de sus actividades fagocitarias y leishmaniacida (Ghose *et al.*, 1999; Immunology Letters vol. 56, n.º 3, pág. 175-181). Además, se notificó que las composiciones que comprenden formas reticuladas de proteína A pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o neoplásicas (documento WO 97/36614).

Sumario

La invención se basa por lo menos en parte en una(s) característica(s) de PA que es/son distinta(s) de sus características de unión a Fc y propiedades de superantígeno. Esta característica confiere una o más de las siguientes actividades en animales: una capacidad para regular proceso(s) aberrante(s) e inhibir el daño tisular o revertir por lo menos una parte de daño tisular existente provocado por el/los proceso(s) sin regular; una capacidad para volver a regular proceso(s) inmunitario(s) aberrante(s) o indeseado(s).

La presente invención se define por las reivindicaciones. En más detalle, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A monomérica (PA) suficiente para tratar un trastorno autoinmunitario para su utilización en el tratamiento del trastorno autoinmunitario en un sujeto con o con riesgo del trastorno autoinmunitario.

También se describen en la presente memoria procedimientos para modular una respuesta inmunitaria en un sujeto. Un procedimiento puede incluir administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un factor de diferenciación de linfocitos suficiente para modular la respuesta inmunitaria. El factor de diferenciación de linfocitos comprende proteína A (PA).

La presente invención proporciona composiciones para su utilización en el tratamiento de una disfunción inmunitaria en un sujeto con o con riesgo de una disfunción inmunitaria tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas. Según la invención, la composición comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar la disfunción inmunitaria. Según la presente invención, la disfunción inmunitaria es un trastorno autoinmunitario (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, encefalomielitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis atópica, dermatitis eccematosa, psoriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, vaginitis, proctitis, eritema nudoso leproso, uveítis autoinmunitaria, encefalomielitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida de audición neurosensorial progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprúe idiopático, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, fibrosis pulmonar intersticial , tiroiditis de Hashimoto, síndrome poliglandular autoinmunitario, diabetes mellitus insulinodependiente, diabetes mellitus resistente a insulina, esterilidad mediada por el sistema inmunitario, enfermedad de Addison autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, dermatitis herpetiforme, alopecia autoinmunitaria, vitíligo, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, anemia perniciosa, síndrome de Guillain-Barre, síndrome del hombre rígido, fiebre reumática aguda, oftalmia simpática, síndrome de Goodpasture, vasculitis necrotizante sistémica, síndrome antifosfolipídico o una alergia).

La invención también se basa por lo menos en parte en las bajas cantidades de PA requeridas para lograr las actividades. En particular, PA presenta las actividades mencionadas anteriormente a bajas concentraciones, normalmente inferiores a las cantidades utilizadas para aplicaciones de superantígeno.

Por tanto, los procedimientos descritos en la presente memoria pueden ponerse en práctica con PA en cantidades eficaces para provocar una o más de las actividades dadas a conocer en la presente memoria, pero sin actividad de superantígeno sustancial, actividad de unión a Fc o estimulación sustancial de la inmunidad humoral. Una cantidad puede ser una dosis de aproximadamente 1 picogramo a aproximadamente 1 microgramo de PA. Una cantidad puede ser una dosis individual de aproximadamente 1 picogramo a aproximadamente 1 microgramo de PA administrada de manera intermitente a lo largo de aproximadamente 1 a 15 semanas. Una cantidad puede ser una dosis individual de aproximadamente 1 picogramo a aproximadamente 1 microgramo de PA administrada en días alternos a lo largo de aproximadamente 7 a 21 días.

Además, en la presente memoria se describen composiciones que provocan una o más de las actividades dadas a conocer en la presente memoria en forma de dosificación unitaria. Una composición puede comprender una forma de dosificación unitaria de PA de desde aproximadamente 0,5-5, 5-10, 10-20, 20-50 o 50-100, 100-500, 100-1000 picogramos. Una composición puede comprender una forma de dosificación unitaria de PA de desde aproximadamente 1-10, 10-100, 100-500 o aproximadamente 500-1000 nanogramos. Una composición puede comprender una forma de dosificación unitaria de PA suficiente para reducir una respuesta inflamatoria o inflamación en un sujeto.

En la presente memoria se describen composiciones farmacéuticas que incluyen una forma de dosificación unitaria de PA (por ejemplo, 0,5-5, 5-10, 10-20, 20-50 o 50-100, 100-500, 100-1000 picogramos; 1-10, 10-100, 100-500 o aproximadamente 500-1000 nanogramos). En la presente memoria se describen composiciones farmacéuticas que incluyen una forma de dosificación unitaria de PA que provoca una o más de las actividades dadas a conocer en la presente memoria (por ejemplo, reduce una respuesta inflamatoria o inflamación en un sujeto).

En la presente memoria también se describen kits que incluyen una forma de dosificación unitaria de PA (o composiciones farmacéuticas), incluyendo opcionalmente además tales kits instrucciones de utilización en un procedimiento descrito en la presente memoria (por ejemplo, reducción de una respuesta inflamatoria, inflamación o daño tisular o celular provocado por una respuesta inflamatoria o inflamación en un sujeto). Un kit puede incluir una pluralidad de formas de dosificación unitaria de PA. Un kit puede incluir además un fármaco (por ejemplo, que reduce una respuesta inflamatoria o inflamación).

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el aumento de peso y la cinética de crecimiento de A) ratones normales de control sin tratar (C57BL/6J); B) ratones BXSB sin tratar; y C) ratones BXSB con tratamiento con PA.

Descripción detallada

La presente invención se define por las reivindicaciones. La invención se basa por lo menos en parte en la caracterización de una o más actividades de proteína A (PA) que parecen ser distintas de sus propiedades de superantígeno, actividad de unión a Fc o su capacidad para estimular la inmunidad humoral. Se cree que estas actividades de PA distintas pueden atribuirse por lo menos en parte a la capacidad de las PA para volver a regular o normalizar proceso(s) fisiológico(s) indeseado(s) o aberrante(s) tales como disfunción inmunitaria. La capacidad de la PA para volver a regular o normalizar proceso(s) fisiológico(s) da como resultado muchas actividades beneficiosas diferentes incluyendo, por ejemplo, modular la respuesta inmunitaria aberrante o indeseada (por ejemplo, volver a regularla o normalizarla), mejorar o reducir la autoinmunidad, reducir la inflamación o una respuesta inflamatoria, inhibir o revertir por lo menos una parte de daño tisular provocado por un(os) proceso(s) no regulado(s) tales como una respuesta inmunitaria indeseada o aberrante.

Más particularmente, la eficacia de PA se demuestra mediante la utilización de un modelo de inflamación murino de artritis inducida por colágeno (CIA). La respuesta inmunitaria inducida frente a colágeno tipo II está mediada por anticuerpos, provocando una respuesta inflamatoria que progresa rápidamente que puede evaluarse midiendo la inflamación en articulaciones afectadas y también aplicando una evaluación clínica normalizada para las articulaciones afectadas (denominada “índice clínico” o “CI”). La evaluación mediante CI implica medidas tanto del hinchamiento como de la movilidad. Tal como se muestra en el ejemplo 1, la PA a bajas concentraciones inhibe una respuesta inflamatoria aguda en el modelo murino de CIA. La exploración histológica de articulaciones de rodilla y tobillo reveló una reducción del daño tisular así como de la infiltración de células inmunitarias de la cápsula sinovial.

La eficacia de PA también se demuestra en un modelo animal BXSB, que representa una enfermedad de deficiencia autoinmunitaria combinada que presenta una base genética que da como resultado la muerte temprana de los animales machos. Tal como se muestra en los ejemplos 3 a 8, la PA a bajas concentraciones modifica muchas características de la enfermedad en el animal BXSB, en muchos casos volviendo a regular las diversas manifestaciones de la enfermedad (celulares e histológicas) hacia niveles de niveles iniciales (es decir, hacia la normalización). Por ejemplo, la PA inhibe o previene la aparición temprana de la demacración (pérdida de peso); regula la expansión del compartimento esplénico; inhibe la sobreexpresión o sobreactividad de inmunidad humoral; inhibe la sobreexpresión o sobreactividad de inmunidad celular; modula la diferenciación de células de linaje celular

linfoide; y mejora, reduce o revierte el daño tisular provocado por, o asociado con, los procesos patológicos. Los datos indican además que la PA presenta el mismo patrón de respuesta a la dosis que en el modelo de CIA.

Por tanto, las actividades de PA a bajas concentraciones incluyen, por ejemplo, una o más de regular la expansión del compartimento esplénico (modular la proliferación, apoptosis o diferenciación), regular la inmunidad humoral aberrante o indeseada (inhibir la producción de autoanticuerpos o inhibir células que producen autoanticuerpos), regular la inmunidad celular aberrante o indeseada (normalizar el equilibrio TH_1/TH_2, inhibir las respuestas de citotoxicidad), modular la proliferación, apoptosis o diferenciación de células dentro del linaje celular linfoide (por ejemplo, normalizar poblaciones de células T tal como aumentar los números de células T maduras, por ejemplo, CD69-CD4+), inhibir o revertir el daño celular o tisular provocado por la respuesta inmunitaria indeseada o aberrante (inhibir o prevenir la progresión de la enfermedad, fomentar o potenciar la reversión de la enfermedad o regeneración tisular), y normalizar los números de esplenocitos T o B o su respuesta frente a uno o más mitógenos.

Por tanto, la PA es útil en el tratamiento de un sujeto que necesita una o más de las actividades anteriormente mencionadas asociadas con PA. En la presente memoria también se describen, entre otras cosas, procedimientos para modular una respuesta inmunitaria (celular o humoral), procedimientos para tratar una respuesta inmunitaria indeseada o aberrante (por ejemplo, disfunción inmunitaria) y procedimientos para inhibir, prevenir o revertir un efecto fisiológico provocado por, o asociado con, una respuesta inmunitaria en un sujeto. El procedimiento puede incluir administrar a un sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un factor de diferenciación de linfocitos suficiente para modular la respuesta inmunitaria. El procedimiento puede incluir administrar a un sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de PA suficiente para modular la respuesta inmunitaria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “modular” significa un cambio detectable en una actividad o función o efecto al que se refiere el término. Modular puede significar cualquier aumento, disminución, reducción, inhibición, prevención, estimulación, fomento, potenciación en la actividad o función o efecto al que se refiere el término. Por ejemplo, modular una respuesta inmunitaria significa que se cambia de manera detectable una actividad o función o efecto de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, un aumento, disminución, reducción, inhibición, prevención, estimulación, fomento o potenciación de inmunidad humoral o mediada por células. Los cambios en una respuesta inmunitaria que indican modulación, incluyendo, por ejemplo, números de células T y B, proliferación, apoptosis, diferenciación, citotoxicidad, producción de anticuerpos o números de células productoras de anticuerpos (por ejemplo, autoanticuerpos), reactividad frente a mitógenos, inflamación, daño celular o tisular, o síntomas de los mismos, pueden medirse mediante una variedad de procedimientos dados a conocer en la presente memoria o conocidos en la materia. Una “cantidad eficaz” o “cantidad suficiente” significa una cantidad necesaria para lograr la actividad o el efecto.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos “volver a regular”, “normalizar” y variaciones gramaticales de los mismos significan un desplazamiento hacia niveles iniciales. Un desplazamiento hacia niveles iniciales puede incluir, por ejemplo, cambios en números de células, estado de diferenciación, producción de anticuerpos o cantidades de anticuerpo (por ejemplo, autoanticuerpos en circulación), citotoxicidad o respuesta frente a un mitógeno. Por tanto, volver a regular o normalizar números de esplenocitos en el bazo de ratones BXSB, por ejemplo, significa un retorno hacia el número de esplenocitos normalmente encontrado en un bazo de animal normal (por ejemplo, libre de enfermedad), por ejemplo, C57BL/6. Asimismo, volver a regular o normalizar autoanticuerpos significa reducir la cantidad de tales anticuerpos a aquella más normalmente encontrada en un animal normal (por ejemplo, libre de enfermedad). Volver a regular o normalizar poblaciones de células T en ratones BXSB significa, por ejemplo, desplazar la población de células T hacia la observada normalmente en ratones C57BL/6, por ejemplo, un cambio de una población de células T inmaduras a maduras.

La cantidad de nueva regulación o normalización que puede producirse puede ser un retorno a o casi a niveles iniciales típicos para un animal normal (dentro del 5-25% del nivel inicial), pero puede ser menor, por ejemplo, un desplazamiento detectable hacia niveles iniciales aunque el desplazamiento no regrese a los niveles a o cerca del nivel inicial (por ejemplo, dentro del 25-100% o el 25-200% del nivel inicial). El desplazamiento dependerá del grado de desviación con respecto al nivel inicial en el estado sin tratar, la cantidad de PA administrada y lo que está devolviéndose al nivel inicial. Por ejemplo, los números de esplenocitos para ratones BXSB son de 5 a 6 veces mayores que en ratones C57BL/6. Una nueva regulación o normalización de los números de esplenocitos para ratones BXSB significará por tanto que los números de esplenocitos se redujeron en ratones BXSB tras el tratamiento. Por ejemplo, una reducción desde de 5 a 6 veces mayor que en ratones C57BL/6 hasta de 1 a 3 veces mayor que en ratones C57BL/6, o más, tal como dentro de aproximadamente el 10-50% de los números de esplenocitos normalmente observados en ratones C57BL/6. De manera similar, en ratones BXSB hay un aumento del 200% de ANA a las 5 semanas y un aumento del 1000% de ANA a las 11 semanas. Una nueva regulación o normalización de autoanticuerpos para ratones BXSB significará por tanto que los números de autoanticuerpos (por ejemplo, ANA) se redujeron tras el tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento con 0,01 μg de PA devolvió esos valores a o cerca del nivel inicial (por ejemplo, dentro del 25% del nivel inicial). Por tanto, los números de autoanticuerpos pueden disminuir desde 10 veces mayores que en ratones C57BL/6 hasta de 5 a 8 veces mayores que en ratones C57BL/6 o hasta de 1 a 5 veces mayores que en ratones C57BL/6, o más, tal como dentro de aproximadamente el 10-50% de los números de autoanticuerpos en ratones C57BL/6.

La invención proporciona composiciones para su utilización en el tratamiento de una disfunción inmunitaria en un sujeto con o con riesgo de una disfunción inmunitaria tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas. Según la invención, se utiliza una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar la disfunción inmunitaria. Según la presente invención, la disfunción inmunitaria es un trastorno autoinmunitario.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "disfunción inmunitaria" o "trastorno inmunitario" significa una respuesta inmunitaria, función o actividad indeseada, que es mayor (por ejemplo, autoinmunidad) o menor (por ejemplo, inmunodeficiencia) que la deseada. Una respuesta inmunitaria, función o actividad indeseada puede ser una respuesta, función o actividad normal. Por tanto, dentro del significado de estos términos se incluyen respuestas inmunitarias normales que no se consideran aberrantes siempre que sean indeseadas. Una respuesta inmunitaria, función o actividad indeseada también puede ser una respuesta, función o actividad anómala. Una respuesta inmunitaria, función o actividad anómala o aberrante se desvía de la normal. La disfunción o el trastorno inmunitario puede ser principalmente de naturaleza humoral o celular, o ambos, o bien crónico o bien agudo.

La disfunción o los trastornos inmunitarios incluyen trastornos caracterizados por muchas anomalías o síntomas fisiológicos diferentes. Tal como se da a conocer en la presente memoria, el modelo de ratón BXSB es un trastorno inmunitario caracterizado por una amplia variedad de anomalías y síntomas fisiológicos que pueden tratarse según la invención (véanse, por ejemplo, los ejemplos 4 a 9). Por tanto, la invención es útil en el tratamiento de cualquier disfunción o trastorno inmunitario caracterizado por muchas anomalías o síntomas fisiológicos diferentes incluyendo trastornos que tienen una o más anomalías o síntomas fisiológicos similares al modelo de ratón BXSB, o trastornos equivalentes en diferentes especies. Por ejemplo, el ratón BXSB se caracteriza por proliferación, apoptosis o diferenciación de esplenocitos aberrantes que conducen a la expansión del compartimento esplénico y un consiguiente aumento en los números de esplenocitos inmaduros. Por tanto, aunque los tipos particulares de esplenocitos cuyos números aumentan en el ratón BXSB pueden ser diferentes de los de otras especies con un trastorno inmunitario (por ejemplo, con respecto a sus marcadores CD), la invención es aplicable a cualquier trastorno caracterizado por tener números indeseados de esplenocitos inmaduros (provocados por un exceso de proliferación, supervivencia o fallo de apoptosis de células) o números reducidos de esplenocitos maduros en un sujeto.

Por tanto, dado que la invención es útil para volver a regular o normalizar muchas facetas de una respuesta inmunitaria, lo que conduce a mejorar o reducir una o más de las muchas anomalías y síntomas diferentes del trastorno inmunitario, la invención puede aplicarse ampliamente a trastornos que son diferentes de lo que se produce en el ratón BXSB tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas. Evidentemente, los trastornos que pueden tratarse según la invención incluyen aquellos caracterizados por tener una o más características, síntomas o anomalías del ratón BXSB aunque sean menos intensas que las presentes en el ratón BXSB.

Tal como resulta evidente a partir de las reivindicaciones adjuntas, los trastornos inmunitarios a los que se aplica la invención son trastornos autoinmunitarios. Los trastornos autoinmunitarios se caracterizan generalmente como una respuesta, actividad o función indeseada o aberrante del sistema inmunitario. Las inmunodeficiencias se caracterizan generalmente por memoria o capacidad de respuesta inmunitaria humoral o mediada por células reducida o insuficiente, o una tolerancia aumentada o indeseada. Tales trastornos que pueden tratarse según la invención incluyen, pero no se limitan a, trastornos que provocan daño celular o tisular/de órganos en el sujeto.

Por tanto, la invención proporciona composiciones tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas para su utilización en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario en un sujeto con o con riesgo de un trastorno autoinmunitario. La composición que va a administrarse a un sujeto según la invención comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar el trastorno autoinmunitario. En diversos aspectos, el trastorno autoinmunitario comprende artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, encefalomielitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis atópica, dermatitis eccematosa, psoriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, vaginitis, proctitis, eritema nudoso leproso, uveítis autoinmunitaria, encefalomielitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida de audición neurosensorial progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprúe idiopático, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, tiroiditis de Hashimoto, síndrome poliglandular autoinmunitario, diabetes mellitus insulinodependiente, diabetes mellitus resistente a insulina, esterilidad mediada por el sistema inmunitario, enfermedad de Addison autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, dermatitis herpetiforme, alopecia autoinmunitaria, vitíligo, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, anemia perniciosa, síndrome de Guillain-Barre, síndrome del hombre rígido, fiebre reumática aguda, oftalmia simpática, síndrome de Goodpasture, vasculitis necrotizante sistémica, síndrome antifosfolipídico o una alergia.

El término “poner en contacto” significa la unión o interacción directa o indirecta entre dos o más entidades (por ejemplo, entre PA y una célula o molécula). Poner en contacto tal como se utiliza en la presente memoria incluye en disolución, en fase sólida, *in vitro,* en una célula e *in vivo.*

Los ensayos para detectar una actividad de PA incluyen; cambios celulares en los números, proliferación, apoptosis o supervivencia y diferenciación de linfocitos e incluyen exclusión con azul de tripano (viabilidad); cambios en marcadores CD celulares u otras moléculas (diferenciación); cantidades de anticuerpo (por ejemplo, autoanticuerpos circulantes que pueden medirse utilizando ELISA u otros ensayos de detección de anticuerpos); mejora de tejidos u órganos incluyendo inhibición de daño adicional o reversión de daño tisular existente (histología, función de tejidos u órganos, o niveles de enzimas indicativos de una función mejorada); efectos sobre todo el organismo (aumento de peso o una disminución en la pérdida de peso o demacración, movilidad mejorada); y expansión del bazo (histología, números de linfocitos y su estado de diferenciación) tal como se da a conocer en la presente memoria y se conoce adicionalmente en la materia.

Tal como se utilizan en la presente memoria, el término “trasplante” y variaciones gramaticales del mismo significan injertar, implantar o trasplantar una célula, tejido u órgano de una parte del organismo a otra parte, o de un individuo/animal a otro individuo/animal. El término también incluye células, tejidos y órganos genéticamente modificados, por ejemplo, mediante terapia génica *ex vivo* en la que las células, tejidos y órganos transformados se obtienen o derivan de la persona que después recibe el trasplante, o de una persona/animal diferente.

Los procedimientos y las composiciones descritos en la presente memoria pueden utilizarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo.* Las composiciones pueden administrarse como una forma de dosificación individual o múltiple, en días consecutivos o alternos o de manera intermitente. Por ejemplo, pueden administrarse formas de dosificación individuales o múltiples en días alternos o de manera intermitente, a lo largo de aproximadamente 7 a 45 días o a lo largo de aproximadamente 1 a 15 semanas. Una composición puede administrarse como una dosis individual en días alternos durante entre 3 y 5 semanas.

El tratamiento da habitualmente como resultado una mejora en el estado del sujeto, que es un cambio beneficioso para el sujeto, tejido o célula o población celular en el sujeto que es detectable. Por tanto, el tratamiento puede dar como resultado la inhibición, reducción o prevención de una progresión o empeoramiento del estado o trastorno o síntomas, o deterioro adicional o aparición de uno o más síntomas adicionales del estado o trastorno. Por tanto, un desenlace de tratamiento satisfactorio conduce a un “efecto terapéutico”, o la inhibición, reducción o prevención de la intensidad o frecuencia de síntomas o causas subyacentes de un trastorno o estado en el sujeto. La estabilización de un trastorno o estado también es un desenlace de tratamiento satisfactorio. Por tanto, el tratamiento puede reducir o prevenir la intensidad o frecuencia de uno o más síntomas del estado o trastorno, inhibir la progresión o empeoramiento del estado o trastorno, y en algunos casos, revertir el estado o trastorno. Por tanto, en el caso de un trastorno inmunitario, por ejemplo, el tratamiento puede conducir a una mejora de un cambio histopatológico provocado por, o asociado con, el trastorno inmunitario, por ejemplo, prevenir el aumento o reducir o regenerar la destrucción de tejido o la infiltración en articulaciones del esqueleto, o la destrucción de tejido o la infiltración en tejido del timo, riñón, hígado, bazo o piel.

El tratamiento también incluye afectar a las causas subyacentes del estado o trastorno o síntomas de los mismos. Por tanto, en el caso de un trastorno inmunitario, por ejemplo, se considera que volver a regular o normalizar los números de linfocitos absolutos (por ejemplo, esplenocitos) o números de linfocitos maduros hacia el nivel inicial normal es un desenlace de tratamiento satisfactorio. De manera similar, se considera que una reducción de anticuerpos circulantes (por ejemplo, autoanticuerpos) hacia el nivel inicial normal es un desenlace de tratamiento satisfactorio.

El término “mejorar” significa una mejora detectable en el estado global del sujeto. Una mejora detectable incluye una reducción subjetiva en la intensidad o frecuencia de los síntomas provocados por, o asociados con, el trastorno o estado, una mejora en las causas subyacentes del trastorno o estado, o una reversión del trastorno o estado, que puede detectarse utilizando un ensayo.

Los procedimientos descritos en la presente memoria pueden ponerse en práctica antes (es decir profilaxis) o después de que comiencen los síntomas, antes o después de que se desarrollen los síntomas o el trastorno (por ejemplo, antes del trasplante de células, tejido u órgano). Administrar una composición antes o inmediatamente después del desarrollo de síntomas puede disminuir la intensidad o frecuencia de los síntomas en el sujeto. Además, administrar una composición antes o inmediatamente después del desarrollo de los síntomas puede disminuir o prevenir el daño a células, tejidos y órganos que se produce, por ejemplo, durante la disfunción inmunitaria (por ejemplo, autoinmunidad).

El término “sujeto” se refiere a animales, normalmente animales mamíferos, tales como un primate no humano (gorilas, chimpancés, orangutanes, macacos, gibones), un animal doméstico (perros y gatos), un animal de granja (caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos), animal para experimentación (ratón, rata, conejo, cobaya) y seres humanos. Los sujetos humanos incluyen adultos y niños. Los sujetos humanos incluyen aquellos que tienen o con riesgo de tener disfunción inmunitaria. Los sujetos con riesgo pueden identificarse mediante examen genético. Los

ejemplos particulares de trastornos inmunitarios con asociación genética que pueden identificarse incluyen inmunodeficiencia combinada intensa asociada con el cromosoma X, deficiencia de adenosina desaminasa, anomalía de DiGeorge, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiscott-Aldrich, deficiencia de adhesión de leucocitos y distrofia miotónica. Estos y otros trastornos pueden detectarse mediante sangre fetal o células amnióticas, o mediante muestras de tejido de adulto tal como se describe en Samter's Immunologic Diseases; MM Frank, KF Austen, HN Claman, and ER Unanue editors; Little, Brown and Company. Puede utilizarse la revisión de la historia familiar para detectar patrones de herencia o un riesgo aumentado (predisposición) de desarrollar el trastorno (por ejemplo, autoinmunidad o inmunodeficiencia). También pueden identificarse sujetos con riesgo examinando para detectar una característica específica, tal como la presencia de poblaciones indeseadas o aberrantes de linfocitos (por ejemplo, esplenocitos) o autoanticuerpos. Los sujetos con riesgo incluyen aquellos que necesitan un trasplante de células, tejido u órgano. Los sujetos incluyen además animales de modelo de enfermedad (por ejemplo, tales como ratones y primates no humanos) para someter a prueba la eficacia *in vivo* de las composiciones de la invención (por ejemplo, modelos murinos CIA, BXSB, EAE y SCID).

La divulgación se pone en práctica con compuestos conocidos como "factores de diferenciación de linfocitos", que son moléculas que pueden regular o modular la señalización celular o respuesta frente a la señalización, que a su vez pueden volver a regular, normalizar o modular el comportamiento celular de la propia célula, de otras células o procesos en los que participan las células (por ejemplo, función del sistema inmunitario). Tal como se expone en la presente memoria, un ejemplo específico de un factor de diferenciación de linfocitos es PA. Los factores de diferenciación de linfocitos pueden utilizarse según la divulgación en bajas cantidades tal como se expone en la presente memoria para PA.

La invención también se basa por lo menos en parte en las bajas cantidades de PA que pueden producir una o más de las actividades dadas a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, PA a $1x10^{-5}$ μg ($1x10^{-11}$ g) por dosis administrada en días alternos (M/W/F) comenzando en el momento de la inducción de antígeno secundario reguló la expresión y/o progresión de la respuesta inflamatoria resultante y reguló la expresión y/o revirtió el daño tisular provocado por la respuesta inflamatoria. Sin embargo, a esta cantidad de PA, no hubo ninguna actividad de superantígeno sustancial o estimulación de la inmunidad humoral.

En la presente memoria también se describen composiciones, que incluyen PA en una cantidad que puede producir una o más de las actividades asociadas con PA, sin producir actividad de superantígeno sustancial, estimulación sustancial de inmunidad humoral o es sustancialmente independiente de la unión a Fc. Las actividades de PA en tales cantidades incluyen, por ejemplo, volver a regular o normalizar la respuesta inmunitaria humoral o celular aberrante o indeseada (modular la proliferación, apoptosis o diferenciación de linfocitos), inhibir, revertir, mejorar o reducir la autoinmunidad, inflamación o una respuesta inflamatoria, o por lo menos una parte de daño tisular provocado por una respuesta inmunitaria indeseada o aberrante (inhibir o prevenir la progresión de la enfermedad, fomentar o potenciar la reversión de la enfermedad o regeneración tisular), y normalizar los números de esplenocitos T o B o su patrón de respuesta rente a uno o más mitógenos.

Una composición puede incluir PA en una cantidad suficiente para modular la proliferación, apoptosis o diferenciación de linfocitos. Una composición puede incluir una cantidad de PA en una cantidad suficiente para inhibir, revertir, mejorar o reducir la autoinmunidad, inflamación o una respuesta inflamatoria. Una composición puede incluir una cantidad de PA en una cantidad suficiente para inhibir, revertir, mejorar o reducir por lo menos una parte del daño celular, tisular o a órganos provocado por una respuesta inmunitaria indeseada o aberrante. Una composición puede incluir una cantidad de PA en una cantidad suficiente para volver a regular o normalizar los números de esplenocitos T o B o su respuesta frente a uno o más mitógenos. La cantidad de PA puede ser inferior a 1 μg. La cantidad de PA puede ser inferior a 1 μg pero superior a 0,01 picogramos (pg). La cantidad de PA puede ser inferior a de 0,5 a 0,1 μg pero superior a 0,1 pg. La cantidad de PA puede ser inferior a de 0,1 a 0,01 μg pero superior a 1 pg. La cantidad de PA puede ser inferior a de 1 a 0,1 μg pero superior a 1 pg; inferior a de 0,1 a 0,01 μg pero superior a 1 pg; inferior a de 0,01 a 0,001 μg pero superior a 1 pg; inferior a de 1 a 0,5 ng pero superior a 1 pg; inferior a de 500 a 250 pg pero superior a 1 pg; inferior a de 250 a 50 pg pero superior a 5 pg; e inferior a de 50 a 25 pg pero superior a 5 pg, por ejemplo, 20, 15 o aproximadamente 10 pg. La cantidad de PA puede no producir actividad de superantígeno sustancial, estimulación sustancial de inmunidad humoral o es sustancialmente independiente de la unión a Fc.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las frases "sin sustancial" o "sustancialmente independiente", cuando se utilizan en referencia a la actividad de superantígeno, estimulación de la inmunidad humoral o unión a Fc de PA, significan que la característica a la que se hace referencia no contribuye significativamente a la actividad observada de PA a esa cantidad. Por tanto, una cantidad de PA que no produce actividad de superantígeno sustancial significa que la actividad de superantígeno de PA no contribuye significativamente a la actividad de la cantidad de PA. De manera similar, una cantidad de PA que no produce estimulación sustancial de inmunidad humoral puede producir una pequeña cantidad de actividad humoral, pero de nuevo la inmunidad producida no contribuye significativamente a la actividad de la PA a la cantidad de PA utilizada. Asimismo, una cantidad de PA que es sustancialmente independiente de la unión a Fc significa que la unión a Fc no contribuye significativamente a la actividad de PA a la cantidad de PA utilizada. En otras palabras, eliminar o alterar la función con respecto a Fc de la PA no destruirá la

actividad de la PA a la cantidad utilizada. En general, a las bajas cantidades de PA utilizadas, la actividad de superantígeno, estimulación de la inmunidad humoral o unión a Fc de PA no contribuyen significativamente a la actividad de la PA.

La actividad de superantígeno se caracteriza normalmente por la estimulación de subconjuntos no específicos de células T para que proliferen. Es decir, la proliferación de células T es en gran medida independiente de la especificidad de epítopo. Normalmente la actividad de superantígeno estimula aproximadamente el 5-10% de las células T para que proliferen, mientras que un antígeno convencional puede estimular aproximadamente 1 de cada 10^6 células en un individuo. Por tanto, la actividad de superantígeno puede someterse a ensayo determinando los números de células T que se estimulan para que proliferen. Se describen ejemplos de tales ensayos, por ejemplo, en Johnson *et al.*, Scientific American, abril de 1992. págs. 92-101; y Kotzin *et al.*, Adv. Immunol. 54:99 (1993). Se describen ensayos de superantígeno y unión a FC, por ejemplo, en Romagnani *et al.*, J. Immunol. 129:596 (1982). Se describen ensayos de unión a FC, por ejemplo, en Langone JJ, Adv. Immunol. 32:157 (1982). Se describen ensayos de estimulación de la inmunidad humoral, por ejemplo, en Leonetti *et al.*, J. Exp. Med. 189:1217 (1999).

Por tanto, los procedimientos descritos en la presente memoria pueden ponerse en práctica utilizando las composiciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, una cantidad eficaz de PA puede ser una dosis de aproximadamente 0,1 picogramos a aproximadamente 1 microgramo. Una cantidad eficaz de PA puede ser una dosis de aproximadamente 1 picogramo a aproximadamente 1 microgramo. Una cantidad eficaz de PA puede ser una dosis de aproximadamente 10 picogramos a aproximadamente 1 microgramo. Una cantidad eficaz de PA puede ser una dosis de aproximadamente 10 picogramos a aproximadamente 0,1 microgramos. Una cantidad eficaz de PA puede ser una dosis individual de aproximadamente 10 picogramos a aproximadamente 0,1 microgramos.

Las composiciones pueden administrarse de manera sistémica o local por cualquier vía. Por ejemplo, puede administrarse PA por vía intravenosa, oral (por ejemplo, ingestión o inhalación), intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intracavitaria, intracraneal, transdérmica (tópica), parenteral, por ejemplo transmucosa y rectal. Las composiciones de la invención que incluyen formulaciones farmacéuticas pueden administrarse por medio de un sistema de administración microencapsulado o acondicionadas en un implante para su administración.

Las composiciones incluyen además formulaciones farmacéuticas que contienen PA en una cantidad que tiene una o más de las actividades dadas a conocer en la presente memoria. Una formulación farmacéutica puede incluir PA en una cantidad suficiente para volver a regular o normalizar una respuesta inmunitaria humoral o celular aberrante o indeseada (modular la proliferación, apoptosis o diferenciación de linfocitos), inhibir, revertir, mejorar o reducir la autoinmunidad, inflamación o una respuesta inflamatoria, o por lo menos una parte de daño tisular provocado por una respuesta inmunitaria indeseada o aberrante (inhibir o prevenir la progresión de la enfermedad, fomentar o potenciar la reversión de la enfermedad o regeneración tisular), normalizar los números de esplenocitos T o B o su respuesta frente a uno o más mitógenos, sin actividad de superantígeno sustancial, sin estimulación sustancial de inmunidad humoral o sustancialmente independiente de la unión a Fc, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos “farmacéuticamente aceptable” y “fisiológicamente aceptable” se refieren a portadores, excipientes, diluyentes y similares que pueden administrarse a un sujeto, preferentemente sin producir efectos secundarios adversos excesivos (por ejemplo, náuseas, dolor abdominal, cefalea, etc.). Tales preparaciones para administración incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas.

Pueden prepararse formulaciones farmacéuticas a partir de portadores, diluyentes, excipientes, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, compatibles con la administración a un sujeto. Tales formulaciones pueden contenerse en un comprimido (recubierto o no recubierto), cápsula (dura o blanda), microperla, emulsión, polvo, gránulo, cristal, suspensión, jarabe o elixir. También pueden estar presentes compuestos activos complementarios y conservantes, entre otros aditivos, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Una formulación farmacéutica puede formularse para ser compatible con su vía de administración prevista. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas incluyen portadores, diluyentes o excipientes adecuadas para su administración por vías incluyendo intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, ingestión o inhalación), intravenosa, intracavitaria, intracraneal, transdérmica (tópica), parenteral, por ejemplo transmucosa y rectal.

Las disoluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir lo siguiente: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o

hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para preparación extemporánea de dispersión o disoluciones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante la utilización de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. Pueden incluirse agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de formulaciones inyectables puede lograrse incluyendo un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Para la administración oral, puede incorporarse una composición con excipientes en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Pueden incluirse agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles en las formulaciones orales. Los comprimidos, pastillas, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotex; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante.

Las formulaciones también pueden incluir portadores para proteger la composición frente a la rápida degradación o eliminación del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye materiales que ralentizan la degradación dentro del organismo y a su vez liberan el/los principio(s) activo(s). Por ejemplo, puede emplearse un material de retraso en el tiempo tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo solo, o en combinación con una cera.

Las formulaciones adicionales incluyen partículas biodegradables o biocompatibles o una sustancia polimérica tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogel, polivinilpirrolidona, polianhídridos, poli(ácido glicólico), etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina, o copolímeros de lactida/glicolida, copolímeros de poli(lactida/glicolida), o copolímeros de etileno-acetato de vinilo con el fin de controlar el suministro de una composición administrada. Procedimientos para la preparación de tales formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc., por ejemplo.

La velocidad de liberación de una composición puede controlarse alterando la concentración o composición de tales macromoléculas. Por ejemplo, la composición puede atraparse en microcápsulas preparadas mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, mediante la utilización de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina o microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, o en un sistema de administración de fármaco coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, microperlas y sistemas a base de lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Estos pueden prepararse según procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.522.811.

En la materia se conocen formulaciones farmacéuticas adicionales apropiadas para la administración y son aplicables en los procedimientos y las composiciones descritos en la presente memoria (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12ª ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; y Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)).

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden incluir combinaciones de otras composiciones, e incluirse en las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, un fármaco que reduce una respuesta inflamatoria o inflamación o que estimula la diferenciación de una célula puede incluirse con una baja cantidad de PA. Los fármacos a modo de ejemplo incluyen fármacos antiinflamatorios esteroideos (SAI) y no esteroideos (NSAI), por ejemplo, un corticosteroide, un inhibidor de cox-2 o fármacos que afectan al sistema inmunitario tales como quimiocinas y citocinas tales como interleucinas e interferones.

Las composiciones descritas en la presente memoria, incluyendo formulaciones farmacéuticas, pueden acondicionarse en kits, que opcionalmente pueden contener instrucciones de utilización, por ejemplo, que ponen en práctica un procedimiento descrito en la presente memoria. En la presente memoria también se describen kits. Un kit puede incluir una o más composiciones de la invención (por ejemplo, PA), incluyendo formulaciones farmacéuticas,

acondicionadas en un material de acondicionamiento adecuado. Un kit puede incluir una etiqueta o prospecto para poner en práctica un procedimiento descrito en la presente memoria. Por tanto, un kit puede incluir instrucciones para tratar a un sujeto que tiene o con riesgo de tener un trastorno inmunitario o disfunción, *in vitro, in vivo* o *ex vivo.* Un kit puede incluir una etiqueta o prospecto que incluye instrucciones para tratar a un sujeto que tiene un trastorno autoinmunitario con bajas cantidades de PA *in vivo* o *ex vivo.*

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “material de acondicionamiento” se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de acondicionamiento puede mantener los componentes de manera estéril, y puede fabricarse de material comúnmente utilizado para tales fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, lámina metálica, ampollas, etc.). La etiqueta o el prospecto pueden incluir instrucciones escritas apropiadas, por ejemplo, que ponen en práctica un procedimiento descrito en la presente memoria. Por tanto, los kits pueden incluir adicionalmente instrucciones para utilizar los componentes del kit en un procedimiento descrito en la presente memoria.

Las instrucciones pueden incluir instrucciones para poner en práctica cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria. Por tanto, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración a un sujeto. Las instrucciones pueden incluir adicionalmente indicaciones, un criterio de valoración clínico satisfactorio, cualquier síntoma adverso que pueda producirse o información adicional requerida por la Food and Drug Administration para su utilización con un sujeto humano.

Las instrucciones pueden estar en “material impreso”, por ejemplo, en papel o cartón dentro del kit, en una etiqueta adjuntada al kit o material de acondicionamiento, o unirse a un vial o tubo que contiene un componente del kit. Las instrucciones pueden comprender una cinta de voz o vídeo que puede incluirse opcionalmente en un medio legible por ordenador, tal como un disco (disco flexible o disco duro), CD óptico tal como CD- o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medio de almacenamiento eléctrico tal como RAM y ROM e híbridos de los mismos tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos.

Los kits también pueden incluir uno o más fármacos que proporcionan un efecto sinérgico o aditivo o que reducen o mejoran uno o más síntomas de un fármaco o trastorno. Por ejemplo, puede incluirse un fármaco que reduce una respuesta inflamatoria o inflamación. Los fármacos a modo de ejemplo incluyen fármacos antiinflamatorios esteroideos (SAI) y no esteroideos (NSAI), por ejemplo, un corticosteroide, o un inhibidor de cox-2. Los kits pueden incluir adicionalmente un agente tamponante, un conservante o un agente estabilizante. El kit puede incluir además componentes de control para someter a ensayo una actividad o efecto de tratamiento. Cada componente del kit puede encerrarse dentro de un recipiente individual separado. Por ejemplo, un kit puede incluir una dosificación unitaria individual de una baja cantidad de PA tal como se expone en la presente memoria (por ejemplo, desde menos de 1 μg hasta 1 pg). Alternativamente, un kit puede incluir múltiples formas de dosificación unitaria de una baja cantidad de PA. Por ejemplo, cada una de las múltiples formas de dosificación unitaria contendrá una baja cantidad de PA en un recipiente individual separado (por ejemplo, cada dosis unitaria de PA será de desde menos de 1 μg hasta 1 pg por dosis). Los componentes del kit pueden estar en una mezcla de uno o más recipientes y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de envases individuales o múltiples.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, regirá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un linfocito” incluye una pluralidad de tales células.

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren, pero no limiten, el alcance de invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe un modelo de inflamación (artritis) de animal y datos histológicos que indican que PA administrada a concentraciones muy bajas puede reducir la inflamación e inhibir o revertir el daño tisular provocado por la inflamación.

Tres estudios separados con tres grupos de cinco animales cada uno (un total de 15 animales por grupo de tratamiento). El primer grupo es el control, al que se le inyecta solución salina tamponada con fosfato, portador de PBS. El segundo grupo recibió 100 μg de Enbrel por ratón al día. Esto era la dosis óptima de Enbrel según lo describe el fabricante (Immunex, Corp., Seattle, WA). Al tercer grupo se le inyectaron 10 picogramos (pg) de PA en portador de PBS los lunes, miércoles y viernes durante el periodo de tratamiento (Amersham/Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). También puede obtenerse PA de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Pierce Chemical Co., Pittsburgh, PA; y Calbiochem, San Diego, CA.

La tabla 1 a continuación resume los datos de índice clínico para el grupo de control que indican una respuesta inflamatoria progresiva en estos animales sensibles. La respuesta no presenta ningún pico o meseta dentro de los límites de tiempo utilizados y los animales de control se sacrificaron cuando la respuesta puso en peligro su estado de salud.

Tabla 1: Lectura del índice clínico del control – modelo de CIA

Media	D.E.	EEM	N	Día
0	0	0	0	0
0	0	0	30	1
0,00	0,00	0,00	5,00	2
0,00	0,00	0,00	25,00	3
0,25	0,50	0,25	4,00	4
0,08	0,28	0,06	25,00	5
1,00	0,94	0,30	10,00	7
0,96	1,06	0,21	25,00	8
1,60	1,51	0,48	10,00	9
1,40	1,35	0,30	20,00	10
3,52	3,44	0,69	25,00	15
7,80	5,63	2,52	5,00	16
10,80	3,11	1,39	5,00	18
2,25	1,59	0,35	20,00	19
2,58	1,50	0,34	19,00	23

Tabla 1: Datos sin procesar de medidas de índice clínico medio para 15 animales de control tratados mediante el protocolo de CIA. Estos datos son datos combinados de 3 estudios separados.

La tabla 2 muestra datos similares para las medidas con calibre de las patas del grupo de animales de control durante el mismo periodo de tiempo. Estos datos reflejan los datos de índice clínico con la excepción de que aparece una meseta en la respuesta tras el día 10. Esta meseta de respuesta se corresponde con la cinética de respuestas inflamatorias inducidas por anticuerpos típicas.

Tabla 2: Medidas de patas de control - modelo de CIA

Media	D.E.	EEM	N	
165,80	9,31	2,08	20,00	0
164,95	11,91	1,52	61,00	1
168,50	6,13	1,37	20,00	2
168,50	8,90	1,41	40,00	3
172,30	4,75	1,06	20,00	4
171,38	7,26	1,15	40,00	5
167,00	16,12	2,55	40,00	7
182,35	19,06	3,01	40,00	8
176,44	19,56	3,05	41,00	9
207,45	36,93	8,26	20,00	10
212,28	38,03	6,01	40,00	15
204,30	31,25	6,99	20,00	16
212,95	36,18	8,09	20,00	18
217,40	44,90	10,04	20,00	19
224,30	44,01	9,84	20,00	23

Tabla 2: Datos sin procesar de medidas de patas con calibre medias para 15 animales de control tratados mediante el protocolo de CIA. Estos datos son datos combinados de 3 estudios separados.

El análisis histológico de rodilla y tobillo de un animal de control tomado en el día 15 de la respuesta inflamatoria indicó una extensa infiltración inmunitaria y destrucción tisular. Se acumularon inmunocitos en la cápsula sinovial del animal de control. Los animales tratados con Enbrel en el día 35 mostraron una infiltración inmunitaria continuada en la cápsula sinovial de rodilla y tobillo y evidencias de destrucción tisular continuada.

La tabla 3 resume los resultados de exploración histológica de las articulaciones de rodilla y tobillo de animales DBA/1 de control, sin tratar. Estas clasificaciones se asignan de manera enmascarada por el histólogo en una escala continua de desde 1 hasta 10, representando 1 un aspecto histológico “normal” y 10 un alto grado de daño. Las

articulaciones de rodilla y tobillo de los animales de control tras la inducción con colágeno muestran daño tisular máximo (“10”). Esto se correlaciona con los datos tanto de índice clínico (tabla 1) como de medida física (tabla 2).

Tabla 3: Clasificación de histología de modelo de CIA - Animales de control

Tejido	Clasificación de histología	N
Tobillo	10	15
Rodilla	10	15

Los animales tratados con PA en el día 35 de la respuesta inflamatoria mostraron muchas menos evidencias de infiltración inmunitaria y sólo una ligera evidencia de destrucción tisular. Sólo estaban presentes unos pocos inmunocitos del huésped en la cápsula sinovial y no había ninguna evidencia de fragmentos de tejido o destrucción tisular. Por tanto, estos datos demuestran que PA reduce la inflamación aguda en el modelo de CIA. Estos datos también demuestran que PA reduce el daño tisular o fomenta la reparación tisular más que Enbrel.

Las tablas 4 y 5 muestran los resultados de 3 estudios separados que sometieron a prueba el efecto de PA (10 pg/inyección, M/W/F). Se sometió a prueba Enbrel para comparación; los resultados obtenidos eran comparables con resultados publicados. El tratamiento con PA fue muy eficaz, alcanzando significación a aproximadamente el 10% del número de animales requeridos para el patrón de Enbrel. Los resultados para el índice clínico total (tabla 4) y las medidas físicas (tabla 5) son comparables.

Tabla 4: Tratamiento con PA en el modelo de CIA (índice clínico total)

Datos combinados: C.I.				
Tratamiento	Día	Media	N	P [unilateral]
Control	15	3,52	25	
	17	3,88	25	
	19	2,25	20	
Proteína A	15	1,92	25	0,03
	17	1,95	24	0,02
	19	1,40	20	0,04
Enbrel	15	2,79	24	0,17
	17	3,41	24	0,30
	19	2,85	20	0,11

Tabla 5: Tratamiento con PA en el modelo de CIA (medida)

Datos combinados: Medida				
Tratamiento	Día	Media	N	P [unilateral]
Control	15	212,3	40	
	17	218,1	40	
	19	217,4	20	
Proteína A	15	195,4	36	0,02
	17	191,4	36	0,001
	19	197,2	20	0,05
Enbrel	15	204,2	36	0,18
	17	209,1	36	0,18
	19	230,3	20	0,19

La tabla 6 muestra los resultados de una evaluación histológica de ratones DBA/1 sacrificados a las 1, 2 y 3 semanas durante su régimen de tratamiento. Los tratamientos tanto con PA como con Enbrel muestran daño significativo a nivel tisular. Estos datos demuestran que a pesar de las disminuciones significativas en el índice clínico total y las medidas de patas (tablas 4 y 5) todavía hay daño a nivel tisular. El tratamiento con PA parece retrasar el daño tisular (semana de tratamiento uno frente al control) pero no previene el daño.

Tabla 6: Tratamiento con PA y daño histológico

	Control	PA	Enbrel
1 sem.	Tobillo: 10 Rodilla: 10	Tobillo: 8 Rodilla: 0-5	Tobillo: 1-5 Rodilla: 0-10

2 sem.	Tobillo: 10 Rodilla: 10	Tobillo: 10 Rodilla: 10	Tobillo: 10 Rodilla: 10
3 sem.	Tobillo: 10 Rodilla: 10	Tobillo: 10 Rodilla: 10	Tobillo: 10 Rodilla: 10

Los ratones DBA/1 a los que se indujo con colágeno tipo II según el protocolo de modelo de CIA se trataron inmediatamente tras la segunda inyección de antígeno, portador de disolvente (PBS) para el control, PA (a 10 pg por inyección M/W/F) y Enbrel (100 ug/inyección cada día).

La tabla 7 muestra los resultados histológicos tras prolongar el tratamiento a 35 días. Se sacrificaron los ratones de control a los 18 días por motivos humanitarios y se incluyen sus datos a los 18 días para comparación. El tratamiento con Enbrel no mostró ninguna mejora del daño histológico. En cambio, el tratamiento con PA revirtió el daño histológico a los 14-21 días. Estos datos histológicos se correlacionan con el índice clínico total de estos animales. Por tanto, el tratamiento con PA redujo significativamente la intensidad de la respuesta inflamatoria aguda y continuar el tratamiento revirtió el daño tisular existente provocado por la respuesta.

Tabla 7: Tratamiento con PA prolongado y evaluación histológica

	Control a los 18 días	PA a los 35 días	Enbrel a los 35 días
clasificación	Tobillo: 10 Rodilla: 10	Tobillo: 0-1 Rodilla: 0-1	Tobillo: 10 Rodilla: 10

La evaluación histológica de estos tejidos incluyó una evaluación a bajo, medio y alto aumento. En los grupos tanto de control (a los 18 días, momento del sacrificio) como de tratamiento con Enbrel, la cápsula sinovial tenía grandes números de linfocitos activados, mientras que el grupo de PA en el día 35 de tratamiento tenía pocas células linfoides pequeñas que eran similares en cuanto al número y la morfología a las de los animales DBA/1 antes de la inducción con antígeno de colágeno tipo II.

En resumen, estos datos demuestran que las medidas de patas y las evaluaciones del índice clínico documentan la respuesta inflamatoria inducida en el modelo animal de CIA; que PA reduce la respuesta inflamatoria durante la fase aguda (valores de P frente al $< 0,05$) y revierte el daño histológico provocado por la respuesta en el día 35 del tratamiento; que PA tiene un efecto de mejora a concentraciones y calendarios de dosificación predichos por el modelo animal BXSB y las evaluaciones de cultivo tisular (comentadas a continuación); y que Enbrel reduce la inflamación en el día 14 (de manera no significativa con N=15) pero no reduce el daño inflamatorio observado en el día 35, lo que indica que PA es más eficaz que Enbrel.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe datos que indican que el mecanismo de acción (MOA) de PA parece ser distinto del de Enbrel.

El MOA aceptado para el modelo animal de CIA es la inhibición competitiva de la expresión de α-TNF. Enbrel es un inhibidor de α-TNF conocido. El análisis de regresión de los datos de Enbrel indicó un retraso en la aparición de la respuesta inflamatoria. En cambio, el análisis de regresión de los datos de PA sugirió una alteración en el propio proceso inflamatorio. Por tanto, el MOA de PA no parece ser principalmente mediante inhibición de α-TNF. Además, PA no sólo es más eficaz que Enbrel en la reducción de la respuesta inflamatoria inducida en animales tratados, sino que además puede revertir el daño tisular preexistente provocado por esa respuesta.

Por tanto, sin desear limitarse a ninguna teoría, PA puede “modular” un mecanismo de control basal responsable de integrar respuestas dependientes del sistema inmunitario. Este MOA abarcará la inhibición de α-TNF pero desde una perspectiva autorreguladora en lugar de una simple inhibición competitiva de molécula diana. Se predice que un MOA de este tipo tiene las siguientes propiedades:

1) se requieren pequeñas cantidades – un efecto regulador sobre un mecanismo de control primitivo que se “bifurca” para influir sobre mecanismos adicionales;

2) autorregulador - si PA actúa en un punto de control temprano en el sistema, tendrá la capacidad de regular la intensidad y dirección del mecanismo dando como resultado pocos efectos secundarios, si los hay;

3) diana pleiotrópica, es decir, no específica de linaje celular - si el punto de control de PA está en el inicio, entonces el control posterior debe ser diverso, y la concentración de PA y el calendario de dosificación deben ser constantes; y

4) debe encontrarse una estructura de molécula efectora de PA en asociación con varias estructuras más complejas.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe datos que indican que PA tiene múltiples actividades moduladoras en un modelo animal caracterizado por una enfermedad de deficiencia autoinmunitaria combinada que tiene una base genética que da como resultado muerte temprana. En particular, PA previene la aparición temprana de demacración, expansión del compartimento esplénico, regula la inmunidad humoral (autoanticuerpos), inmunidad celular (equilibrio TH_1/TH_2) y la diferenciación de células linfoides así como mejora el daño tisular provocado por los procesos patológicos.

El modelo murino BXSB es un modelo animal basado en genes (Yaa) que se manifiesta con muerte temprana en machos, normalmente debido a insuficiencia renal. Este modelo se considera en la bibliografía como un análogo para el lupus sistémico humano. El defecto génico expresa una serie de enfermedades autoinmunitarias sistémicas progresivas interrelacionadas que tienen el siguiente patrón: atrofia tímica, anticuerpo antinuclear, enfermedad hepática, enfermedad artrítica, enfermedad renal y muerte temprana.

Dado que es un modelo genético con múltiples desenlaces, estudios anteriores de otros investigadores se han centrado en aspectos individuales de la enfermedad. El efecto de PA sobre múltiples aspectos del proceso patológico estudiado en la presente memoria incluyen:

1. efecto global sobre la fisiología del animal

    a. curvas de crecimiento
    b. histología del timo, hígado, cerebro, riñón, tobillo y rodilla

2. regulación inmunitaria - proliferación/apoptosis celular

    a. tamaño del bazo, y
    b. recuento celular

3. dinámica de linfocitos

    a. respuestas T/B frente a estímulos mitogénicos

4. función de linfocitos

    a. Inmunidad humoral

        i. Producción de Ig-PFC
        ii. Autoanticuerpo: ANA, anticardiolipina

    b. Inmunidad celular

        i. Linfocito citolítico natural

    c. Marcadores de superficie celular
    d. Citocinas celulares

<u>Diseño del estudio:</u>

1. Tratamiento crónico, anómalo: se trataron grupos de 25 ratones BXSB macho (control + 4 grupos de tratamiento) con PA los M/W/F a lo largo de un periodo de 15 semanas con sacrificios para reducir el grupo periódicos (habitualmente cada 3 semanas de tratamiento)

2. Tratamiento crónico, normal: se trataron grupos de 15 ratones C57BL/6J macho con PA los M/W/F a lo largo de un periodo de 15 semanas con sacrificios periódicos para reducir el grupo (habitualmente cada 3 semanas de tratamiento)

3. Tratamiento agudo, anómalo: se trataron grupos de 15 ratones BXSB macho durante 3 semanas con cantidades de PA determinadas anteriormente, y después se sacrificaron los animales 3, 6 y 9 semanas tras el tratamiento.

4. Tratamiento agudo, normal: se trataron grupos de 15 ratones C57BL/6J macho durante 3 semanas con cantidades de PA determinadas anteriormente, y después se sacrificaron los animales 3, 6 y 9 semanas tras el tratamiento.

Determinación de la concentración de PA:

Se administraron cantidades de PA a ratones BXSB a lo largo de ocho logaritmos de concentración, desde 1 μg/inyección hasta 10^{-7} μg/inyección. Los resultados indican dos óptimos de PA, uno a 0,01 μg/inyección y otro a 10^{-5} μg/inyección. La forma de las curvas de dosis-respuesta es gaussiana. Por motivos de claridad, los datos presentados son para 10^{-5} μg/inyección (figura 1).

La figura 1 muestra el aumento de peso de ratones BXSB macho tras la administración de PA. Los pesos se tomaron cada ver que se les inyectó a los animales o bien portador o bien PA. El panel A es la curva de crecimiento de aumento de peso para una raza de ratón C57BL/6J normal, y se presenta para mostrar la forma típica de una curva de crecimiento de aumento de peso normal. El panel B muestra la suma acumulativa de datos de aumento de peso de 25 ratones BXSB macho de control. Esta curva muestra un pico de peso a aproximadamente 4 meses de edad, seguido por una disminución del peso corporal, que corresponde a la aparición notificada de la enfermedad autoinmunitaria de ratones BSXB. La disminución en el peso corporal conduce al síndrome de “demacración” asociado con la deposición de complejo inmunitario en el riñón.

El panel C muestra el efecto de la administración crónica de PA a las dos concentraciones óptimas (8 concentraciones estudiadas). Tanto 0,01 μg/inyección como 0,00001 μg/inyección muestran cambios significativos tanto en la forma de la curva de crecimiento de aumento de peso siendo mejores en comparación con la forma logística normal que con el control de ratones BXSB como en el peso promedio de ambos grupos de animales tratados que es significativamente superior al control (X = 24,16, P = 0,0002, para la dosis de 10^{-5} μg).

Con el fin de analizar estas curvas de crecimiento y compararlas cuando se tratan grupos de animales BXSB con PA se realizó un análisis de regresión con los datos. Los datos de crecimiento de ratones C57BL/6J presentados anteriormente se representan mejor mediante la siguiente ecuación cúbica:

$$\text{Control de ratones C57BL/6J -- } y = -0{,}0286x^3 + 0{,}4067x^2 - 0{,}8452x + 16{,}816 \; [R^2 = 0{,}9886]$$

El valor de R al cuadrado indica un ajuste extremadamente bueno entre los datos reales y la ecuación lineal. La propia ecuación es una extracción relativamente sencilla de una curva de forma “logística”, que es típica de curvas de crecimiento normales (figura 1).

Hay cuatro conjuntos de datos separados para la curva de crecimiento de ratones BXSB de control. Todos los conjuntos de datos concuerdan internamente y la ecuación global para los datos combinados es la siguiente:

$$\text{Ratones BXSB combinados -- } y = -0{,}0001x^3 + 0{,}0034x^2 + 0{,}1851x + 18{,}746 \; [R^2 = 0{,}9384]$$

Esta ecuación es una representación cuantitativa de las diferencias en la forma de la curva constatadas entre los paneles A y B de la figura 1. La función cúbica y cuadrática define la forma global y los valores muy bajos definen la velocidad de aumento de peso y la fase de “demacración” cuando se observa que los pesos disminuyen en función del tiempo. En este estudio el objetivo no es hacer que la curva de crecimiento de ratones BXSB “se parezca” a la curva de ratones C57BL/6J, ya que cada raza tiene sus propias características de crecimiento específicas, sino más bien aumentar la velocidad de crecimiento inicialmente y disminuir o eliminar la “fase de demacración” evidente en la figura 1, panel D.

La tabla 8 muestra las ecuaciones ajustadas para los diversos grupos de tratamiento con PA de animales BXSB. La pendiente de la curva de crecimiento inicial, que indica la velocidad de crecimiento, se ve gravemente limitada en animales BXSB de control. El punto de inflexión en animales BXSB de control indica el efecto letal del proceso patológico. Los resultados indican que el tratamiento con PA tiene un efecto positivo tanto sobre la velocidad de crecimiento como sobre la letalidad de una manera dependiente de la dosis.

Tabla 8: Efecto de PA sobre la cinética de crecimiento de ratones BXSB

Tratamiento	Ecuación de crecimiento
Ratones BXSB combinados	$y = -0{,}0001x^3 + 0{,}0034x^2 + 0{,}1851x + 18{,}746$ $R^2 = 0{,}9384$
Rx 1,0 PA	$y = 4E\text{-}06x^3 - 0{,}4942x^2 + 18171x - 2E+08$ $R^2 = 0{,}9087$
Rx 0,1 PA	$y = -1E\text{-}04x^3 + 10{,}697x^2 - 392306x + 5E+09$ $R^2 = 0{,}9463$
Rx 0,01 PA	$y = 3E\text{-}05x^3 - 2{,}8056x^2 + 102980x - 1E+09$ $R^2 = 0{,}918$
Rx 0,001 PA	$y= 1E\text{-}05x^3 - 1{,}3946x^2 + 51161x - 6E+08$ $R^2 = 0{,}9773$
Rx 0,0001 PA	$y = -4E\text{-}05x^3 + 4{,}2053x^2 - 154454x + 2E+09$

Tratamiento	Ecuación de crecimiento
	R^2 = 0,9487
Rx 0,00001 PA	$y = -1E-05x^3 + 1,4883x^2 - 54653x + 7E+08$ R^2 = 0,8665
Rx 0,000001 PA	$y = 3E-05x^3 - 2,9251x^2 + 107455x - 1E+09$ R^2 = 0,8682
Rx 0,0000001 PA	$y = -5E-06x^3 + 0,5628x^2 - 20666x + 3E+08$ R^2 = 0,9474

Análisis histológico:

El deterioro histológico de diversos órganos del modelo de ratón BXSB es el rasgo característico de una enfermedad de deficiencia autoinmunitaria combinada. Este síndrome presenta múltiples facetas e implica varios órganos. El daño a órganos es progresivo y el daño individual puede variar según el tipo de tejido.

La tabla 9 muestra los resultados del análisis histológico de cantidades mayores de PA (de 1 a 0,001 μg/inyección) e indica que PA cambió la aparición y/o intensidad de los cambios histológicos de una manera dependiente de la dosis. La tabla 10 muestra datos similares para cantidades menores de PA (de 0,00001 a 0,0000001 μg/inyección). Ambas dosis de PA mostraron la mayor mejora en la histología de órganos.

Tablas 9 y 10: Histología de ratones BXSB

Tejido	Control de ratones BXSB	Rx 1 μg de PA	Rx 0,1 μg de PA	Rx 0,01 μg de PA	Rx 0,001 μg de PA
Timo	4+ (10-20 sem)	4+ (16-20 sem)	4+ (10-20 sem)	4+ (16-20 sem)	4+ (12-13 sem)
Hígado (núcleos dobles)	inflamación local 20 sem	N/A	inflamación local 19 sem	inflamación local 10 sem	inflamación local 20 sem
Riñón	normal	normal	normal	normal	normal
Rodilla	normal	normal	normal	inflamación 16 sem	normal
Tobillo	fibras que se disgregan 20 sem	inflamación 19 sem	inflamación 10 sem	inflamación 16 sem	normal

Tejido	Control de ratones BXSB	Rx 0,0001 μg de PA	Rx 0,00001 μg de PA	Rx 0,000001 μg de PA	Rx 0,0000001 μg de PA
Timo	4+ (11-22 sem)	normal	4+ (11-22 sem)	4+ (22 sem)	4+ (22 sem)
Hígado (núcleos dobles)	inflamación local 20 sem	normal	inflamación local 19 sem	normal	inflamación local 11 sem
Riñón	normal	normal	normal	normal	normal
Rodilla	normal	normal	normal	normal	normal
Tobillo	normal	normal	normal	normal	normal

Los resultados en las tablas 9 y 10 indican que el tratamiento con PA de ratones BXSB pudo reducir el daño autoinmunitario de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento retrasó la aparición de atrofia tímica, y redujo la intensidad de la inflamación en el hígado y las articulaciones. Los riñones permanecieron dentro del intervalo normal. Los tejidos de animales tratados con PA mostraron una reversión del daño presente en tejidos de control de ratones BXSB, aunque no fueron completamente normales en comparación con animales C57BL/6J. La dosis de PA óptima fue de 0,0001 μg, lo cual concuerda con otros sistemas de ensayo (por ejemplo, producción de Ig-PFC, actividad de NK, patrón de respuesta frente a mitógeno, producción de citocinas, producción de autoanticuerpos, tamaño de bazo, mejoras histológicas).

En resumen, los estudios indican que PA previene la aparición temprana de demacración, y mejora o revierte el daño provocado por procesos patológicos autoinmunitarios en tejidos incluyendo timo, hígado, riñón, rodilla y tobillo.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe datos que indican que PA tiene actividad moduladora inmunitaria (por ejemplo, proliferación, apoptosis o diferenciación) en el bazo reflejado por la inhibición de la expansión en el bazo y el número de esplenocitos.

Se extirparon los bazos de animales durante los estudios. El bazo de ratones C57BL/6J normales fue un punto de referencia. Los bazos de animales BXSB no tratados estaban significativamente agrandados. En cambio, los bazos de animales BXSB tratados con PA se parecían al tamaño del bazo de animales C57BL/6J normales.

Los bazos agrandados en animales BXSB no tratados se conoce como esplenomegalia, y es el resultado o bien de un proceso infeccioso sistémico masivo o bien de apoptosis o proliferación celular aberrante. Dado que estos animales se mantienen en un entorno estéril, es probable que el bazo agrandado sea el resultado de un control defectuoso del crecimiento/muerte celular. Otra explicación para el bazo agrandado sería que las células habían aumentado su tamaño individual, un proceso conocido como blastosis. La exploración de los datos de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para medir el tamaño celular descartó esta posibilidad. El análisis mediante FACS reveló que aunque se observó una tendencia a células ligeramente más grandes en los controles de ratones BXSB, no se observó ningún aumento estadísticamente significativo del tamaño celular. De manera que concuerda con estos hallazgos, los números de esplenocitos de ratones BXSB son más de cinco veces los de animales normales (tabla 11, parte superior).

Tabla 11: Efecto de PA sobre la esplenomegalia

	Control de ratones BXSB	Ratones C57BL/6J	Ratones DBA/2J
Media	5E+08	9E+07	1E+08
EEM	4E+07	7E+06	6E+06
N	20	20	20

	Rx 1,0 PA	Valor de p	Rx 0,1 PA	Valor de p	Rx 0,01 PA	Valor de p	Rx 0,001 PA	Valor de p
Media	1E+08	8,68E-03	1E+08	7,32E-04	7E+07	1,02E-06	1E+08	8,92E-06
EEM	7E+07		5E+07		4E+07		4E+07	
N	3		3		5		4	
	RxE-04 PA	Valor de p	RxE-05 PA	Valor de p	RxE-06 PA	Valor de p	RxE-07 PA	Valor de p
Media	3E+08	1,73E-02	1E+08	6,70E-05	3E+08	9,54E-02	2E+08	7,26E-05
EEM	6E+07		3E+07		1E+08		4E+08	
N	4		3		4		5	

La tabla 11 (parte superior) muestra el contenido de los bazos de ambas razas de ratón de control, C57BL/6J y DBA/2J, y de ratones macho BXSB. Los números de esplenocitos de ratones BXSB son más de 5 veces los encontrados para cualquiera de las razas normal. El tratamiento con PA redujo significativamente los números de esplenocitos de ratones BXSB (tabla 11, parte inferior).

En resumen, los estudios indican que PA regula la expansión del compartimento esplénico (proliferación/apoptosis) provocada por la enfermedad autoinmunitaria y los números de esplenocitos. El tratamiento con PA redujo tanto el tamaño del bazo como los números de esplenocitos significativamente de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 5

Este ejemplo describe datos que indican que los animales BXSB muestran una diferenciación o proliferación o apoptosis de esplenocitos aberrante. Por tanto, estos datos indican que la actividad de PA en el bazo de ratones BXSB incluye volver a regular la diferenciación de esplenocitos o proliferación/apoptosis de esplenocitos aberrante/deficiente (es decir restaurar la proliferación o apoptosis celular normal).

Los mitógenos son lectinas que tienen la capacidad no específica de estimular la división celular en poblaciones de células generales (por ejemplo, linfocitos T y/o B). Las lectinas se encuentran en plantas y animales y se caracterizan mejor como precursores de las moléculas de anticuerpo modernas. Las lectinas se utilizan para la comunicación intracelular y otras formas de comunicación.

Para determinar si el compartimento de linfocitos T en ratones BXSB es aberrante, se utilizaron dos mitógenos específicos de células T y dos específicos de células B para estudiar la respuesta de esplenocitos aislados a partir de ratones BXSB. Se utilizaron 7 concentraciones de mitógeno diferentes y 4 puntos de tiempo cinéticos para someter a prueba la respuesta de esplenocitos de animales BXSB en cuanto a la amplitud de respuesta (una indicación del número de células presentes), y en segundo lugar, la concentración de estimulación óptima (una indicación del estado de diferenciación de las células).

En resumen, se sacrificaron ratones BXSB y de control periódicamente durante el régimen de tratamiento y se extirparon sus bazos. Se dispensaron suspensiones de esplenocitos a de 1 a $2x10^6$/ml en placas de 96 pocillos. Se añadieron mitógenos (de 10 μG/10 ul a 0,01 μg/10 ul) por triplicado en los pocillos y se recogieron los cultivos a

intervalos de 24 horas desde 24 hasta 96 horas de cultivo. Se trataron todos los cultivos con timidina tritiada durante 16 horas antes de la recogida. Se extrajo el ADN, incluyendo el ADN radiomarcado recién sintetizado, sobre filtros de fibra de vidrio y se determinó la radiactividad mediante por centelleo de líquido.

Tabla 12: Respuestas a mitógenos de ratones normales (C57BL/6) (índice de estimulación, S.I.)

PHA: SI	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
MEDIA	24,56	29,54	33,39	19,95	3,07	1,79	1,03
D.E.	11,39	13,47	14,00	11,47	3,40	1,69	0,57
EEM	2,15	2,55	2,65	2,17	0,64	0,32	0,11
Recuento	27	27	27	27	27	27	27

Con-A: SI	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
MEDIA	0,57	1,69	48,07	11,79	1,83	2,00	2,39
D.E.	0,27	1,50	32,63	15,80	1,94	1,08	2,99
EEM	0,05	0,28	6,17	2,99	0,37	0,20	0,56
Recuento	27	27	27	27	27	27	27

SEB: SI	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
MEDIA	18,70	15,79	10,61	7,87	5,23	3,41	1,47
D.E.	11,49	8,69	6,14	5,57	4,57	2,47	0,55
EEM	2,17	1,64	1,16	1,05	0,86	0,47	0,10
Recuento	27	27	27	27	27	27	27

LPS: SI	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
MEDIA	105,66	103,65	94,60	85,92	69,95	59,05	39,44
D.E.	46,55	46,89	46,30	52,67	41,29	36,17	29,92
EEM	8,80	8,86	8,75	9,95	7,80	6,84	5,66
Recuento	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00

La tabla 12 muestra las respuestas a mitógenos de ratones C57BL/6J frente a fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (Con-A), enterotoxina de estafilococos B (SEB) y lipopolisacárido (LPS). PHA y Con-A estimulan que proliferen poblaciones de linfocitos T básicos de una manera dependiente de la dosis, mientras que SEB y LPS estimulan la proliferación dependiente de la dosis de poblaciones de linfocitos B.

Tabla 13: Respuestas a mitógenos de ratones BXSB

PHA: SI	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
Media	4,63	2,17	3,64	4,29	3,77	2,55	1,95
D.E.	6,29	1,40	1,56	2,11	1,76	0,81	0,88
EEM	0,87	0,19	0,22	0,29	0,24	0,11	0,12
N	39	39	39	39	39	39	39

Con-A: SI	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
Media	0,99	2,42	6,34	7,08	3,93	1,88	1,67
D.E.	1,02	2,07	4,32	3,69	3,46	0,97	0,93
EEM	0,14	0,29	0,60	0,51	0,48	0,14	0,13
N	39	39	39	39	39	39	39

SEB: SI	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
Media	6,05	6,10	5,21	4,70	3,00	2,53	1,91
D.E.	3,77	3,18	2,69	3,48	1,66	1,85	1,04
EEM	0,52	0,44	0,37	0,48	0,23	0,26	0,14
N	39	39	39	39	39	39	39

LPS: SI	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
Media	26,40	27,76	29,58	24,83	10,85	7,08	3,97
D.E.	18,99	20,58	20,78	14,66	5,50	3,76	1,64
EEM	2,63	2,85	2,88	2,03	0,76	0,52	0,23
N	39	39	39	39	39	39	39

La tabla 13 muestra los resultados del estudio con mitógenos de ratones de control BXSB. Los análisis estadísticos indican que todas las respuestas a mitógenos son significativamente inferiores a las de ratones de control C57BL/6J.

Además, la forma de las curvas de respuesta a PHA y Con-A para ratones de control BXSB son diferentes de los ratones de control C57BL/6J normales. En ambos casos hubo un desplazamiento hacia concentraciones de mitógeno inferiores para lograr una respuesta pico. Estos cambios en la forma de la curva de respuesta se han asociado con cambios en el estado de diferenciación.

Tabla 14: Comparación estadística de respuesta a mitógenos de ratones BXSB con el control

	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
PHA	1E-10	2E-11	2E-11	5E-07	5E-02	N.S.	N.S.
Con-A	N.S.	N.S.	6E-07	6E-02	N.S.	N.S.	N.S.
SEB	2E-05	4E-06	4E-05	2E-04	6E-04	1E-03	N.S.
LPS	5E-09	2E-08	5E-07	5E-06	8E-08	8E-08	N.S.

La tabla 14 muestra una comparación estadística de las respuestas a mitógenos de ratones BXSB de control con respecto a ratones C57BL/6 de control. En casi todos los casos, la amplitud de la respuesta a mitógenos en ratones BXSB se suprime, lo que indica una disminución de la población de células maduras y un desplazamiento en la concentración de respuesta óptima hacia un valor inferior. Por tanto, estos datos indican una diferenciación aberrante en esplenocitos de ratones BXSB de control que conduce a una sobreproliferación o apoptosis reducida de esplenocitos.

Tabla 15: Respuesta a PHA en función del tratamiento con PA

PHA: S.I.	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
1 PA	2,23	3,27	8,64	11,52	10,91	4,63	1,86
0,1 PA	1,08	1,82	4,13	5,25	4,76	2,95	2,62
0,001 PA	1,52	1,21	2,70	4,41	3,90	2,57	1,94
0,0001 PA	5,53	4,03	9,65	15,41	10,91	3,91	1,95
1E-04 PA	5,71	2,98	5,14	6,82	6,22	2,73	1,66
1E-05 PA	7,73	7,00	8,34	9,80	7,26	3,47	1,89
1E-06 PA	2,70	3,13	4,47	4,82	3,84	3,29	2,20
1E-07 PA	5,08	5,84	3,41	4,22	3,90	2,37	2,00

Tabla 16: Respuesta a Con-A en función del tratamiento con PA

Con-A: S.I.	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
1 PA	1,42	4,88	23,61	36,83	6,57	2,70	2,07
0,1 PA	1,29	5,43	8,51	8,06	2,00	2,20	1,64
0,001 PA	1,34	3,31	8,26	17,4	9,14	3,33	1,92
0,0001 PA	1,92	2,05	27,27	51,59	10,40	2,10	2,02
1E-04 PA	0,56	1,31	7,29	15,26	6,87	4,56	1,79
1E-05 PA	0,76	3,10	5,31	14,29	7,69	2,25	1,34
1E-06 PA	1,01	2,34	5,04	15,98	8,03	2,85	2,52
1E-07 PA	1,65	2,90	9,05	22,83	8,10	2,17	2,05

Tabla 17: Respuesta a SEB en función del tratamiento con PA

SEB: S.I.	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
1 PA	13,39	11,88	12,41	8,39	6,42	4,73	3,76
0,1 PA	6,25	6,57	4,29	4,15	2,37	1,68	1,32
0,001 PA	7,51	7,54	10,06	7,37	5,76	5,28	3,82
0,0001 PA	14,60	12,60	9,55	5,72	4,66	4,21	2,05
1E-04 PA	8,01	5,15	6,48	4,55	5,12	2,97	1,34
1E-05 PA	6,92	8,02	7,94	5,28	4,13	3,54	3,40
1E-06 PA	9,34	8,01	9,74	5,82	4,33	5,73	4,20
1E-07 PA	5,92	5,67	5,88	6,90	2,33	2,35	2,33

Tabla 18: Respuesta a LPS en función del tratamiento con PA

LPS: S.I.	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
1 PA	52,36	52,74	56,61	49,82	22,00	18,14	8,47
0,1 PA	20,73	20,47	20,23	16,29	7,47	6,42	3,45
0,001 PA	13,85	15,86	16,57	12,71	8,52	6,46	4,76
0,0001 PA	37,85	42,85	41,46	37,76	19,10	15,78	6,41
1E-04 PA	23,10	37,92	32,05	27,29	13,38	20,52	7,49

LPS: S.I.	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
1E-05 PA	27,43	27,18	27,90	28,69	17,44	16,69	8,88
1E-06 PA	22,67	21,88	17,14	17,60	12,40	9,27	6,30
1E-07 PA	14,49	16,56	17,95	18,56	10,99	7,20	3,40

Las tablas 15 a 18 muestran los efectos de PA sobre las respuestas a mitógenos de esplenocitos de ratones BXSB. Aunque la cinética es compleja, pueden extraerse varias conclusiones. El hecho de que PA (0,5 μg) aumenta las respuestas a PHA y Con-A indica normalización de la dinámica de poblaciones de célula T y B. El hecho de que PA también restaura gran parte de la amplitud de las respuestas a mitógenos y la forma de las curvas de respuesta indica una restauración parcial o completa de la respuesta de células T y células B frente a mitógenos.

En resumen, los estudios indican que los números de linfocitos esplénicos de ratones BXSB aberrantes así como las respuestas a mitógenos de células T y B típicas pueden corregirse, por lo menos en parte, con tratamiento con PA.

Ejemplo 6

Este ejemplo describe datos que indican que PA reduce la cantidad de autoanticuerpos que es probable que sean responsables de la destrucción tisular en animales BXSB.

La inmunidad humoral es responsable de la producción de anticuerpos y es significativa ya que se encuentran anticuerpos reumatoides en un porcentaje significativo en pacientes con RA. Se han encontrado anticuerpos anómalos en la cápsula sinovial de algunos pacientes. En el modelo de ratones BXSB, se producen anticuerpos anómalos.

Se estudiaron células del bazo obtenidas a partir de animales BXSB de control y tratados con PA en un ensayo de células formadoras de placas (PFC). En este ensayo, se marcan los glóbulos rojos diana con proteína A que se unirá a cualquier inmunoglobulina secretada independientemente de la especificidad antigénica, proporcionando por tanto una vista amplia de la inmunidad humoral.

Tabla 19: Células productoras de anticuerpos no específicos de ratones BXSB

	Ratones BXSB	Ratones C57BL/6J
Media	60333	611,80
D.E.	33915	658,67
N	45	75,00
EEM	5056	120,26

La tabla 19 muestra las respuestas de Ig-PFC de esplenocitos de ratones BXSB de control, que es 100 veces mayor que los esplenocitos de ratones C57BL/6 de control, lo que indica una producción de anticuerpos aberrante en los animales BXSB.

Tabla 20: Tratamiento con PA y producción de Ig-PFC en animales BXSB

	Ratones de control BXSB	Rx 1 PA	RX 0,1 PA	Rx 0,01 PA	Rx 0,001 PA
Media	60333	20741	35808	27909	30533
N	45	11	12	11	15
EEM	5056	6603	12010	2959	9581
Valores de P		4,22E-05	0,04	5,16E-07	0,01
		Rx 0,0001 PA	Rx 0,00001 PA	Rx 0,000001 PA	Rx 0,0000001 PA
Media		3850	12310	16278	11042
N		5	10	9	12
EEM		696	2040	4068	1751
Valores de P		7,33E-15	2,92E-12	3,11E-08	8,16E-13

La tabla 20 muestra el efecto de PA relacionado con la dosis sobre la producción de Ig-PFC. Todas las cantidades de PA redujeron significativamente la sobreproducción de Ig-PFC, mostrando 0,0001 μg de PA la mayor reducción.

Los esplenocitos de ratones de control BXSB producen y secretan anticuerpos a niveles enormes (61400 +- 6435 PFC/1E06). Esto es aproximadamente 100 veces los valores observados en ratones de control normales C57BL/6J. El tratamiento con PA reduce significativamente los niveles de autoanticuerpos de una manera dependiente de la dosis y del tiempo.

Tabla 21: PA y el efecto sobre los autoanticuerpos circulantes en animales BXSB

	Control	Rx 0,01 PA
2 semanas	0,262	0,016
	0,318	0,000
5 semanas	0,272	0,029
	0,360	-0,032
11 semanas	1,317	0,103
	1,449	0,125
14 semanas	0,402	0,283
	0,357	0,206

La tabla 21 muestra el desarrollo de autoanticuerpos en animales BXSB (los números más altos indican mayores cantidades de autoanticuerpos circulantes). El tratamiento con PA reduce los niveles de autoanticuerpos en todos los puntos de tiempo medidos.

Tabla 22: El efecto de la concentración de PA sobre la producción de autoanticuerpos (ANA)

	Control	Rx 1 PA	Rx 0,1 PA	Rx 0,01 PA	Rx 0,001 PA
Media	0,475	0,306	0,176	0,091	0,341
N	11	7	7	9	11
EEM	0,14	0,03	0,09	0,03	0,10
Valor de P		0,16	0,07	0,02	0,25
		Rx 0,0001 PA	Rx 0,00001 PA	Rx 0,000001 PA	Rx 0,0000001 PA
Media		0,229	0,090	0,176	0,098
N		9	12	12	15
EEM		0,04	0,06	0,03	0,03
Valor de P		0,02	0,02	0,08	0,02

La tabla 22 muestra que la reducción mediada por PA de autoanticuerpos es dependiente de la dosis. La mayor reducción se produce a 0,00001 μg.

En resumen, PA regula el número de anticuerpos no específicos, reduciendo la cantidad de autoanticuerpos dañinos. El hecho de que PA también reduce las células productoras de anticuerpos en bazos de ratones BXSB se correlaciona con estos datos. Por tanto, el tratamiento con PA restaura, por lo menos en parte, la inmunidad humoral.

Ejemplo 7

Este ejemplo describe datos que indican que PA reduce la respuesta de citotoxicidad de ratones BXSB, volviendo a regular esta respuesta a o cerca de niveles iniciales.

El componente celular del sistema inmunitario es el principal factor de integración de la función para todo el sistema inmunitario, suministrando las células T y células B en sus diversas formas diferenciadas para la función tanto de reconocimiento como efectora. En el modelo de animal BXSB ha habido informes de que el sistema inmunitario mediado por células (CMI) está intacto. Sin embargo, en contra de estos informes, los datos descritos a continuación indican que el CMI está afectado en el ratón BXSB.

Se estudiaron ratones BXSB, tanto de control como tratados con PA, para determinar su capacidad para reconocer y someter a lisis dianas no específicas marcadas con cromo radiomarcado. En resumen, se sembraron en placas aproximadamente 200 μl de células del bazo ($1x10^7$/ml) a partir de ratones BXSB de control y tratados en una placa de microtitulación en medio RPMI y se realizaron cinco diluciones en serie dobles en medios RPMI. Se radiomarcaron células P815 con cromo (Cr^{51}) y se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, se centrifugaron durante 12 minutos y después se incubaron durante 3-4 horas a 37ºC. Volvieron a centrifugarse las células y se contó una muestra de 110 μl para determinar Cr^{51}. Se presenta un protocolo más detallado en Current Protocols in Immunology, 3.11, Assays for T cell Function.

Tabla 23: Respuesta de citotoxicidad de ratones BXSB y normales

	Ratones de control BXSBC		Ratones C57BL/6J		Ratones BXSB Rx 3 semanas (agudo)	
Razón E/F	% de lisis específica	D.E.	% de lisis específica	D.E.	% de lisis específica	D.E.
100:1	122,0	5,0	2,0	0,1	5,43	4,1
50:1	95,1	9,4	-1,2	0,5	4,94	4,4
25:1	93,8	10,3	-1,5	0,6	3,94	3,3
12,5:1	85,4	8,3	-1,3	0,5	3,04	3,1
6,25:1	50,5	35,1	-1,2	0,2	2,84	3,0
3,13:1	5,3	5,3	-2,5	0,3		

La tabla 23 muestra que los ratones normales (columna central) tienen un nivel inicial típico de actividad de linfocitos citolíticos naturales frente a la diana P-815 marcada con Cr^{51}; el nivel es de entre el 0 y el 3% de citotoxicidad a una razón de efector/diana de 100:1. La columna de la izquierda muestra la respuesta de citotoxicidad de ratones BXSB frente a la misma diana; el nivel de citotoxicidad es extremadamente alto, a más del 50% a una razón de efector/diana de 6:1. El tratamiento con PA de ratones BXSB a lo largo de un periodo de 3 a 15 semanas (columna de la derecha) redujo la citotoxicidad hasta niveles iniciales, es decir el 0-3% a una razón de E/T de 100:1 sin ningún análisis de regresión posible.

En resumen, los estudios indican que el tratamiento con PA reduce las respuestas de citotoxicidad de ratones BXSB no reguladas en un factor de 20, hasta o cerca de niveles iniciales de control. Por tanto, el tratamiento con PA restaura, por lo menos en parte, la inmunidad celular.

Ejemplo 8

Este ejemplo describe datos que indican que PA regula la expresión de marcadores CD que reflejan la regulación de la diferenciación, proliferación o apoptosis celular de células de linaje linfoide.

La expresión de cúmulos de determinantes (marcadores CD) indica el estado de diferenciación de células linfoides. PA regula específicamente estos marcadores. Esta regulación tiene correlaciones directas con los datos descritos anteriormente.

Tabla 24A: Perfiles de marcadores CD

	69+4-	69+4+	69-4+	4+8-	4+8+	4-8+	69+8-	69+8+	69-8+
Ratones de control BL6	7,6+-1,4	7,6+-1,6	85+-2,9	74+-4,4	7,6+-1,7	18+-3,2	30+-2,3	5,0+-0,9	66+-2,7
N	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Ratones BXSB 2-10	20+-4,1	13+-1,5	68+-5,1	42+-7,7	8,5+-1,3	49+-6,9	22+-5,7	7,8+-1,5	71+-6,9
p unilateral	0,009	0,017	0,006	0,002	0,34	0,0008	0,11	0,07	0,25
Ratones BXSB 11-15	44+-1,0	20+-1,3	36+-2,1	16+-1,3	14+-0,8	70+-1,1	23+-2,3	14+-0,7	64+-2,2
P unilateral	2,5E-12	4,8E-5	1,8E-9	1,7E-12	0,002	3,3E-14	0,03	1,7E-6	0,3

La tabla 24A muestra datos de varios marcadores CD de células T. Aproximadamente el 80% de los esplenocitos normales (ratones de control BL6) son células T no activadas (CD69-) células T (CD69-, CD4+). Esta población disminuye en animales BXSB tanto jóvenes (2-10 semanas de experimentación, y de 10 a 18 semanas de edad cronológica) como ancianos (11-15 semanas de experimentación, y de 19 a 23 semanas de edad cronológica). También hay un efecto cinético: los animales BXSB de 11-15 semanas están comprometidos de manera mucho más intensa en cuanto a sus marcadores de células T que animales BXSB más jóvenes. Esto se correlaciona con una función celular reducida y una tasa de muerte global aumentada.

Tabla 24B: Perfiles de marcadores CD, continuación

	19+45-	19+45+	19-45+	80+25-	80+25+	80-25+
Ratones C57BL/6J	3+-0,6	80+-2	18+-3	70+-3	13+-1	18+-1
Ratones BXSB de 2-10 sem	8+-4	60+-12	35+-11	65+-7	17+-2	18+-5
P [unilateral]	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Ratones BXSB de 11-15 sem	14+-7	64+-22	22+-15	61+-6	18+-2	21+-8
P [unilateral]	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

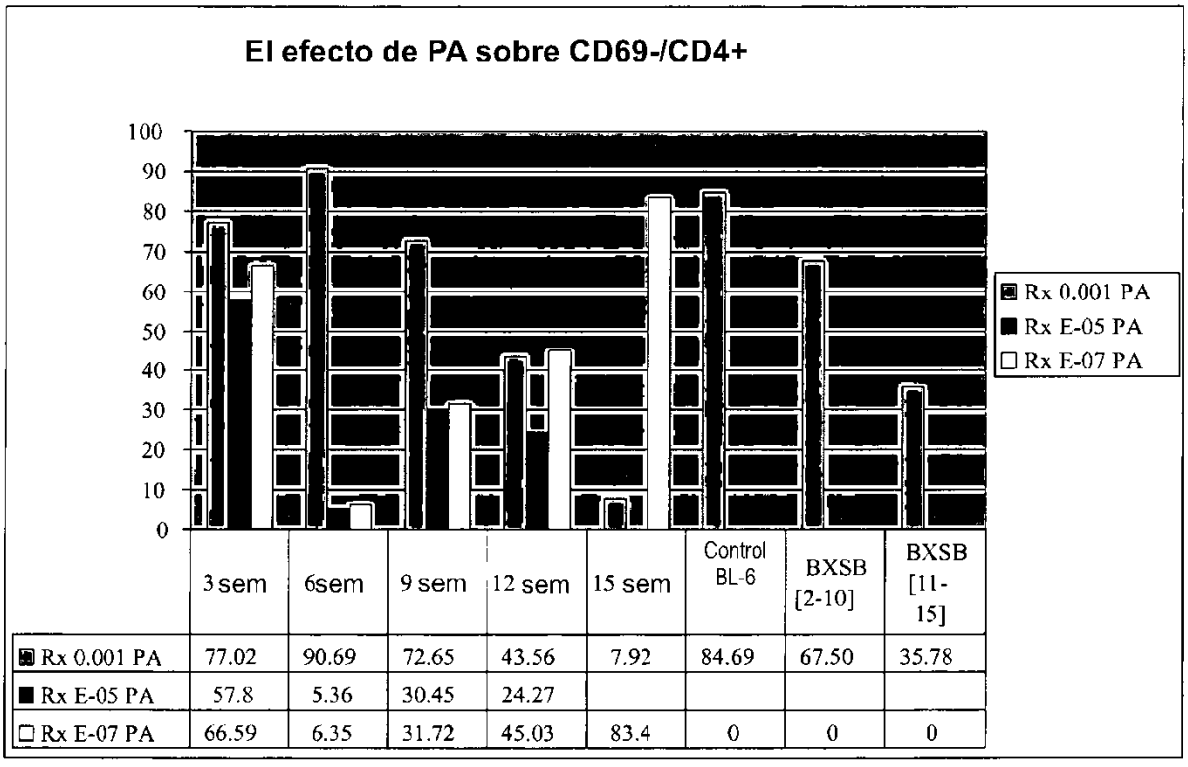
La tabla 24B muestra datos de varios marcadores CD de células B. El primer conjunto de tres marcadores son indicativos de células B en reposo (es decir no activadas) y los últimos tres representan células B activadas. Estos datos muestran que la población de células B es independiente tanto de la raza como del estadio del proceso

patológico en los ratones BXSB. Por tanto, parece que el componente inmunitario celular primario del proceso patológico de inmunodeficiencia combinada de ratones BXSB implica células T.

El gráfico 1 muestra datos del efecto del tratamiento crónico (desde 3 hasta 15 semanas) de ratones BXSB con concentraciones variables de PA (de 1E-03 a 1E-07 μg de PA/inyección). La primera característica significativa de estos datos es que el tratamiento de ratones BXSB con PA regula la población de células T CD69-/CD4+. La regulación está interrelacionada con la regulación de los otros marcadores de células T, lo cual es de esperar dado que una población celular actúa sobre las otras en la serie (y otras series de células) en mecanismos tanto de retroalimentación como de prealimentación. También hay un efecto de respuesta a la dosis de PA sobre poblaciones celulares, compatible con la respuesta descrita anteriormente en los ensayos funcionales; también hay una respuesta cinética al tiempo de dosis. Estos datos indican que el tratamiento con PA sí regula de hecho la diferenciación de células T.

El gráfico 1 también muestra datos que indican que la dosis de E-03 de PA rectifica la reducción de CD69-CD4+ observada en ratones de control BXSB en puntos de tiempo tempranos, aunque más tarde se pierde este efecto en puntos de tiempo más largos de tratamiento crónico. En cambio, la dosis de E-07 parece ser eficaz en puntos de tiempo tanto cortos como largos. Estos datos son compatibles con características del régimen biorregulador: 1) Las curvas de dosis-respuesta son gaussianas; y 2) las pequeñas cantidades de PA que producen los efectos sugieren una diana orientada al proceso en lugar de una diana efectora individual más tradicional.

Gráfico 1



	3 sem	6sem	9 sem	12 sem	15 sem	Control BL-6	BXSB [2-10]	BXSB [11-15]
Rx 0.001 PA	77.02	90.69	72.65	43.56	7.92	84.69	67.50	35.78
Rx E-05 PA	57.8	5.36	30.45	24.27				
Rx E-07 PA	66.59	6.35	31.72	45.03	83.4	0	0	0

La tabla 25 muestra el efecto de PA crónica (1E-05 μg/dosis) administrada tres veces por semana a lo largo de un periodo de 6 y 9 semanas en comparación con el tratamiento agudo a la misma cantidad tres veces por semana durante un periodo de 3 semanas individual seguido por 6 y 9 semanas adicionales sin tratamiento. El tratamiento agudo es eficaz en la modulación de la presentación de marcadores CD. Aunque son complejos, los datos demuestran la interrelación entre los diversos marcadores; de nuevo la serie de CD 8 parece ser menos sensible a PA que la serie CD4 o de células B.

Tabla 25

Tratamiento agudo frente a crónico, 0,00001 ug de PA									
Porcentaje	CD69+ CD4-	CD69+ CD4+	CD4+ CD69-	CD4+ CD8-	CD4+ CD8+	CD8+ CD4-	CD69+ CD8-	CD69+ CD8+	CD8+ CD69-
Ratones de control BXSB	19,73	12,45	67,50	41,85	8,48	49,24	21,53	7,80	70,67
6 sem, agudo	56,25	22,42	21,34	17,64	7,68	73,59	24,91	5,56	69,54

Tratamiento agudo frente a crónico, 0,00001 ug de PA									
Porcentaje	CD69+ CD4-	CD69+ CD4+	CD4+ CD69-	CD4+ CD8-	CD4+ CD8+	CD8+ CD4-	CD69+ CD8-	CD69+ CD8+	CD8+ CD69-
9 sem, agudo	63,37	18,82	17,81	24,38	12,81	61,90	42,74	7,16	50,10
Ratones de control BL6	7,58	7,63	84,69	73,81	7,60	18,41	29,61	5,01	65,56
Rx crónico, 6 sem	10,90	83,69	5,39	4,62	10,35	85,03	6,70	10,13	83,17
Rx crónico, 9 sem	46,20	23,09	30,45	16,64	10,40	72,96	23,02	12,74	64,23

La tabla 26 muestra un perfil en el tiempo de una única dosis de PA (1E-05 μg) sobre la serie de nueve marcadores de células T utilizada en estos estudios. De nuevo, las células doble positivas (destinadas a apoptosis) así como la serie de activación con CD8 son relativamente resistentes al tratamiento. El tratamiento con PA sí que modula la activación de la serie CD4 y las células T citotóxicas maduras (CD8+CD4-).

Tabla 26

Tratamiento con 0,00001 ug de PA									
Porcentaje	CD69+ CD4-	CD69+ CD4+	CD4+ CD69-	CD4+ CD8-	CD4+ CD8+	CD8+ CD4-	CD69+ CD8-	CD69+ CD8+	CD8+ CD69-
3 sem	29,79	12,41	57,8	42,57	7,22	50,21	24,98	4,78	70,24
6 sem	10,9	83,69	5,36	4,62	10,35	85,03	6,7	10,13	83,17
9 sem	46,2	23,09	30,45	16,64	10,4	72,96	23,02	12,74	64,23
12 sem	55,87	19,68	24,27	12,05	14,68	73,27	25,44	17,5	57,06
Ratones BL6 sin tratar	7,58	7,63	84,68	73,8	7,6	18,41	29,61	5,01	65,55
Ratones BXSB sin tratar	44,34	19,69	35,78	15,92	13,91	70,16	22,54	13,69	63,76

En resumen, los estudios indican que el tratamiento agudo o crónico con PA reguló los marcadores CD de células T en ratones BXSB de una manera dependiente de la dosis y la cinética, lo cual se correlaciona con los cambios funcionales descritos anteriormente que incluyen la restauración parcial de respuestas mitogénicas normales (ejemplo 5), la reducción de la producción de autoanticuerpos (ejemplo 6) y la reducción de respuesta de citotoxicidad (ejemplo 7). Por tanto, PA regula la secuencia de diferenciación de células de linaje linfoide.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A monomérica (PA) suficiente para tratar un trastorno autoinmunitario para su utilización en el tratamiento del trastorno autoinmunitario en un sujeto con o con riesgo del trastorno autoinmunitario.

2. Composición para su utilización en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario en un sujeto con o con riesgo del trastorno autoinmunitario según la reivindicación 1, en la que el trastorno autoinmunitario comprende artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, encefalomielitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis atópica, dermatitis eccematosa, psoriasis, síndrome de Sjogren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, vaginitis, proctitis, eritema nudoso leproso, uveítis autoinmunitaria, encefalomielitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida de audición neurosensorial progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprúe idiopático, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, tiroiditis de Hashimoto, síndrome poliglandular autoinmunitario, diabetes mellitus insulinodependiente, diabetes mellitus resistente a insulina, esterilidad mediada por el sistema inmunitario, enfermedad de Addison autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, dermatitis herpetiforme, alopecia autoinmunitaria, vitíligo, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, anemia perniciosa, Síndrome de Guillain-Barre, síndrome del hombre rígido, fiebre reumática aguda, oftalmia simpática, síndrome de Goodpasture, vasculitis necrotizante sistémica, síndrome antifosfolipídico o una alergia.

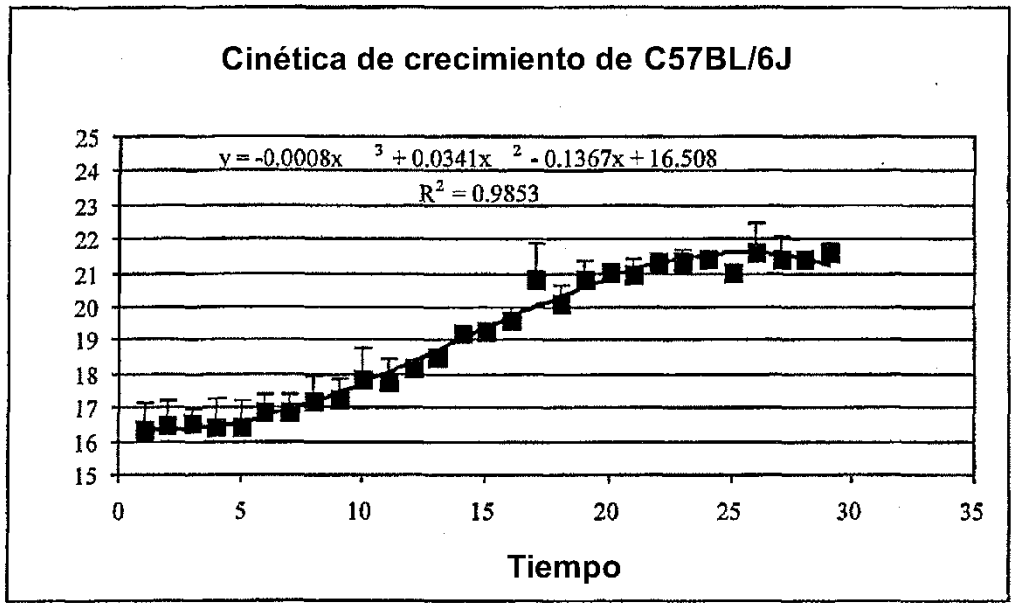
3. Composición para su utilización en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario en un sujeto con o con riesgo del trastorno autoinmunitario según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el sujeto es un ser humano.

4. Composición para su utilización en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario en un sujeto con o con riesgo del trastorno autoinmunitario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición debe ser administrada por vía intravenosa, oral, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intracavitaria, intracraneal, transdérmica o parenteral.

5. Composición para su utilización en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario en un sujeto con o con riesgo del trastorno autoinmunitario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición es una formulación farmacéutica.

Figura 1

A.


Cinética de crecimiento de C57BL/6J
y = -0.0008x 3 + 0.0341x 2 - 0.1367x + 16.508
R2 = 0.9853
25
24
23
22
21
20
19
18
17
16
15
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo

B.

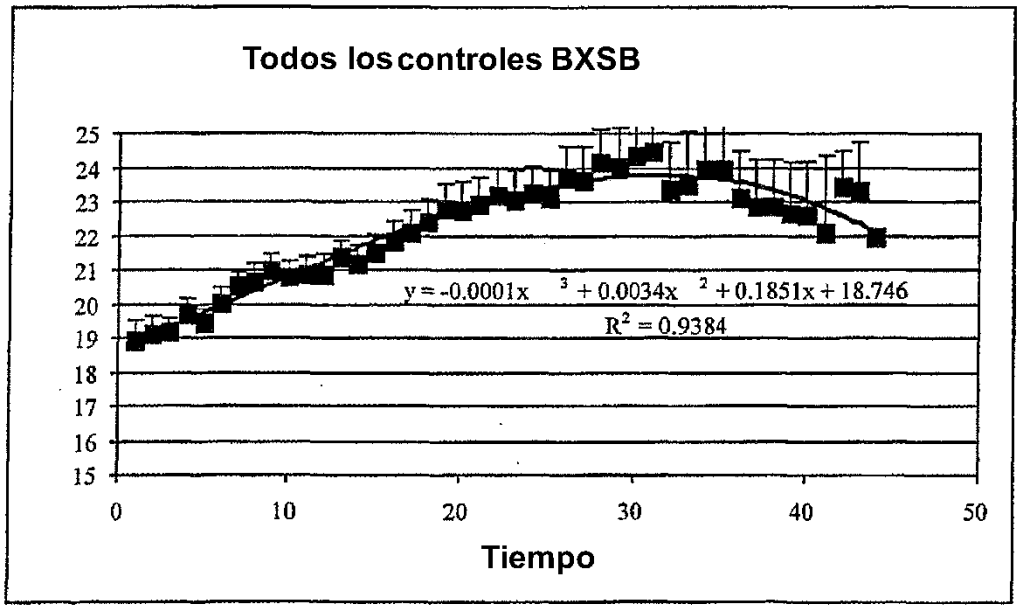
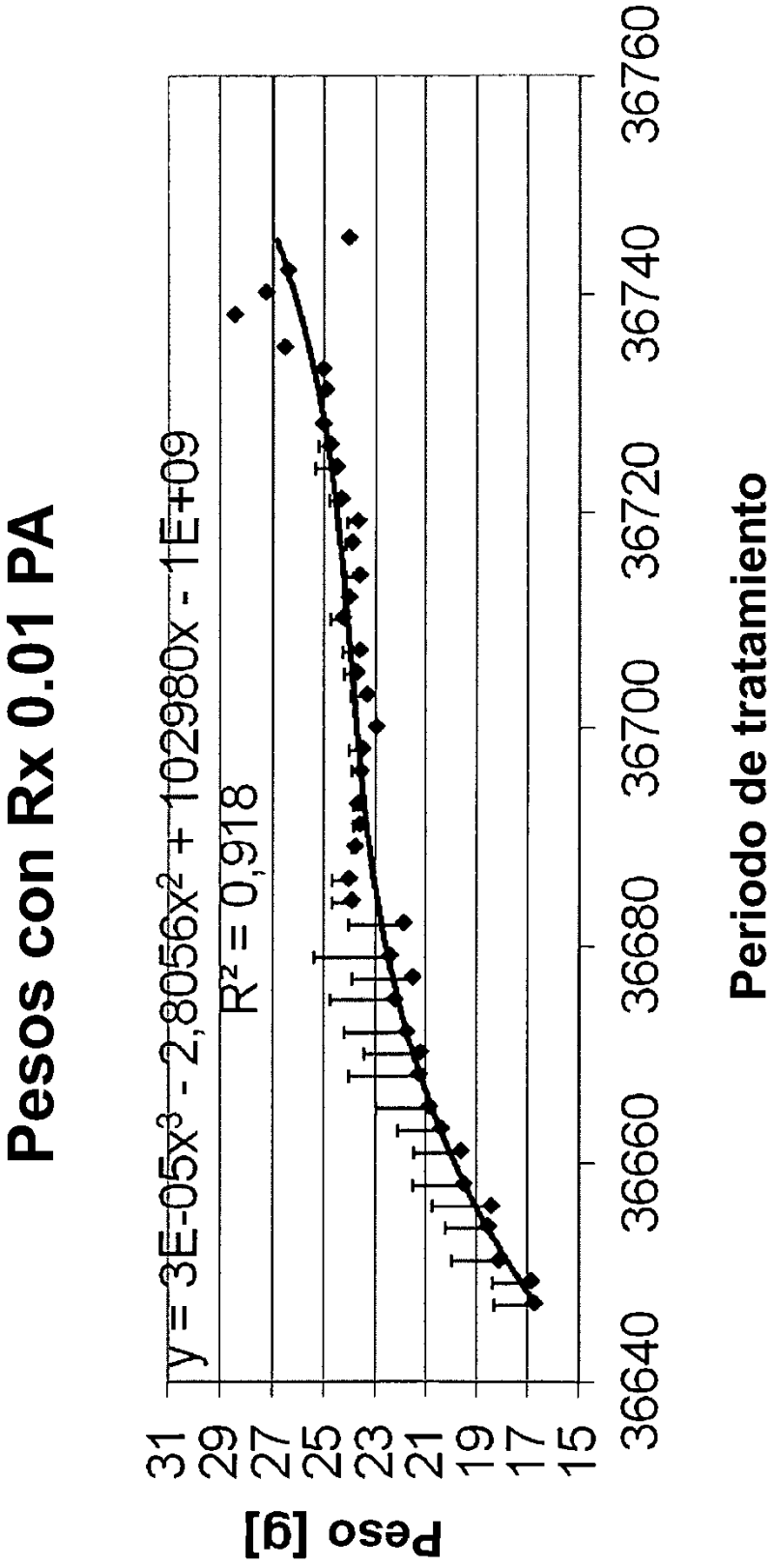

Todos los controles BXSB
y = -0.0001x 3 + 0.0034x 2 + 0.1851x + 18.746
R2 = 0.9384
25
24
23
22
21
20
19
18
17
16
15
0
10
20
30
40
50
Tiempo

Figura 1C


Pesos con Rx 0.01 PA
y = 3E-05x³ - 2,8056x² + 102980x - 1E+09
R² = 0,918
Peso [g]
31
29
27
25
23
21
19
17
15
36640
36660
36680
36700
36720
36740
36760
Periodo de tratamiento