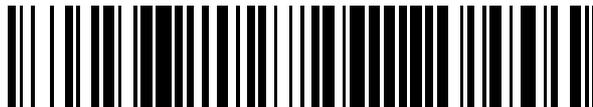


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 137**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2005 E 10001626 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2206511**

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

30 Prioridad:

15.09.2004 US 941636

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

26.04.2017

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

Observaciones:

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

ES 2 610 137 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de proteína A y procedimientos de utilización.

5 **Campo técnico**

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. En términos generales, la invención se refiere a la modulación de la respuesta inmunitaria y al tratamiento de trastornos y patologías inmunitarios asociados o causados por trastornos inmunitarios.

10

Antecedentes

La proteína A es una glucoproteína de 40.000 Da extraída de la pared celular de diversas bacterias. Las bacterias utilizan la PA como sitio diana y sitio de unión para la unión a tejidos. La proteína A presenta una elevada afinidad para la parte Fc de determinadas clases de inmunoglobulina y una afinidad todavía más elevada para aquellas inmunoglobulinas que ya se han unido a un antígeno. Esta propiedad bioquímica de la PA ha sido utilizada en un gran número de aplicaciones. Estas aplicaciones de la PA reflejan una utilización de las propiedades de unión de Fc de la molécula o la capacidad de la PA de estimular la inmunidad humoral en ausencia de inducción específica de antígeno (aplicaciones de superantígeno). El documento nº WO 2003/086317 describe la utilización de PA para el tratamiento de una disfunción inmunitaria en ratones a dosis comprendidas en el intervalo de entre 1 µg y 0,0000001 µg.

20

Sumario

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. Con mayor detalle, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad de proteína A (PA) para la utilización en el tratamiento de una disfunción inmunitaria en un sujeto humano que presenta o está en riesgo de presentar una disfunción inmunitaria, en la que la cantidad de proteína A es una dosis comprendida en el intervalo de entre 0,5 y 5 µg/kg o de entre 5,0 y 25 µg/kg. La presente invención se refiere además a una composición que comprende una cantidad de proteína A (PA) para la utilización en la reducción de una respuesta inflamatoria en un sujeto humano que presenta o está en riesgo de presentar una respuesta inflamatoria, en la que la cantidad de proteína A es una dosis comprendida en el intervalo de entre 0,5 y 5 µg/kg o de entre 5,0 y 25 µg/kg. La presente invención se refiere además a una composición que comprende una cantidad de proteína A (PA) para la utilización en el tratamiento de la inflamación en un sujeto que presenta o está en riesgo de presentar inflamación, en la que la cantidad de proteína A es una dosis comprendida en el intervalo de entre 0,5 y 5 µg/kg o de entre 5,0 y 25 µg/kg. La presente invención se refiere finalmente a una composición que comprende una forma de dosificación unitaria de PA suficiente para reducir una respuesta inflamatoria o la inflamación en un sujeto humano, en la que la forma de dosificación unitaria es de entre 0,5 y 5 µg/kg o de entre 5,0 y 25 µg/kg de PA.

35

La invención se basa por lo menos en parte en una o más características de la PA que son diferentes de las características de unión de su Fc y de las propiedades de superantígeno. Esta característica confiere una o más de las actividades siguientes en los animales: una capacidad de regular uno o más procesos aberrantes y de inhibir el daño tisular o revertir por lo menos una parte de los daños tisulares existentes causados por el proceso o procesos no regulados; una capacidad de regular uno o más procesos inmunitarios aberrantes o no deseables.

45

En la presente memoria también se describen procedimientos para modular una respuesta inmunitaria en un sujeto. Un procedimiento puede incluir la administración en el sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de un factor de diferenciación linfocitaria suficiente para modular la respuesta inmunitaria. El factor de diferenciación de los linfocitos puede comprender proteína A (PA).

50

En la presente memoria también se describen procedimientos para el tratamiento de una disfunción inmunitaria en un sujeto que presenta o está en riesgo de presentar una disfunción inmunitaria. Un procedimiento puede incluir la administración en el sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar la disfunción inmunitaria. La disfunción inmunitaria puede comprender un trastorno autoinmunitario (por ejemplo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis sorriática, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, encefalomiелitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis atópica, dermatitis eczematosa, soriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, escleroderma, vaginitis, proctitis, eritema nodoso leproso, uveítis autoinmunitaria, encefalomiелitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida auditiva sensorineural progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos pura, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, celiaquía idiopática, líquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, tiroiditis de Hashimoto, síndrome poliglandular autoinmunitario, diabetes mellitus insulino-dependiente, diabetes mellitus insulino-resistente, infertilidad mediada inmunitariamente, enfermedad de Addison autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, dermatitis herpetiforme, alopecia autoinmunitaria, vitiligo, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria,

60

65

- anemia perniciosa, síndrome de Guillain-Barre, síndrome de la persona rígida, fiebre reumática aguda, oftalmia simpática, síndrome de Goodpasture, vasculitis necrotizante sistémica, síndrome antifosfolípido o una alergia). En otro aspecto, la disfunción inmunitaria comprende una inmunodeficiencia (por ejemplo inmunodeficiencia combinada severa (IDCS), tal como la deficiencia del gen activador de recombinasa (GAR 1/2), la deficiencia de adenosina desaminasa (ADA), deficiencia de la cadena γ (γ c) de receptor de interleucina, deficiencia de cinasa 3 asociada a Janus (JAK3) y disgénesis reticular, inmunodeficiencia de células T primarias, tal como el síndrome de DiGeorge, síndrome del desnudo, deficiencia de receptores de células T, deficiencia del CMH de clase II, deficiencia de TAP-2 (deficiencia de CMH de clase I), deficiencia de tirosina cinasa ZAP70 y deficiencia de purina nucleótido fosforilasa (PNP), predominantemente deficiencias de anticuerpos, tales como agammaglobulinemia ligada a X (deficiencia de tirosina cinasa de Bruton), agammaglobulinemia recesiva autosómica, tal como deficiencia de cadena pesada Mu; deficiencia de cadena ligera sustitutiva (γ 5/14.1); síndrome de hiper-IgM ligado a X (deficiencia de ligando de CD40) y otros; eliminación del gen de cadena pesada de Ig; deficiencia de IgA; deficiencia de subclases de Ig (con o sin deficiencia de IgA); inmunodeficiencia variable común (IDVC), deficiencia de anticuerpos con inmunoglobulinas normales, hipogammaglobulinemia transitoria infantil, deficiencia de receptor de interferón γ (IFNGR1, IFNGR2); interleucina 12 y deficiencia de receptor de interleucina 12, inmunodeficiencia con timoma, síndrome de Wiskott-Aldrich (deficiencia de proteína WAS), ataxia-telangiectasia (deficiencia de ATM), síndrome linfoproliferativo ligado a X (deficiencia de SH2D1A/SAP) y síndrome de hiper-IgE). En todavía otro aspecto, la disfunción inmunitaria comprende una inmunodeficiencia asociada o secundaria a otra enfermedad (por ejemplo inestabilidad cromosómica o reparación de defectos, tal como el síndrome de Bloom, xerodermia pigmentosa, anemia de Fanconi, síndrome de ICF, síndrome de la rotura de Nijmegen y síndrome de Seckel, defectos cromosómicos tales como el síndrome de Down (trisomía 21), síndrome de Turner y deleciones o anillos de cromosoma 18 (18p- y 18q-); anomalías esqueléticas, tales como la displasia esquelética de miembros cortos (enanismo de miembros cortos) e hipoplasia de cartílago-pelo (condroplasia metafisaria); inmunodeficiencia asociada a retardo generalizado del crecimiento, tal como la displasia inmuno-ósea de Schimke, síndrome de Dubowitz, displasia cifomélica con SCID, nanismo de Mulibrey, retardo del crecimiento, anomalías faciales con defectos dermatológicos, tales como el síndrome ectrodactilia-displasia ectodérmica-hendidura, inmunodeficiencia con ausencia de pulgares, anosmia y ictiosis, albinismo parcial, disqueratosis congénita, síndrome de Netherton, displasia ectodérmica anhidrótica, síndrome de Papillon-Lefevre e ictiosis congénita; defectos metabólicos hereditarios, tales como la enteropatía acrodermatitis, deficiencia de transcobalamina 2, aciduria orótica hereditaria de tipo 1, diarrea intratable, facies anormal, tricornexis e inmunodeficiencia, acidemia metilmalónica, deficiencia de carboxilasa dependiente de biotina, mannosidosis, enfermedad del almacenamiento del glucógeno, tipo 1b, síndrome de Chediak-Higashi, hipercatabolismo de inmunoglobulinas, tal como el hipercatabolismo familiar, la linfagiectasia intestinal, la candidiasis mucocutánea crónica, la hiposplenía o asplenia congénita o hereditaria y el síndrome de Ivermark).
- Se describen además en la presente memoria procedimientos para reducir una respuesta inflamatoria en un sujeto que presenta o está en riesgo de una respuesta inflamatoria. Un procedimiento puede incluir administrar en el sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para reducir una respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria puede ser crónica o aguda. La respuesta inflamatoria puede encontrarse por lo menos en parte mediada por un anticuerpo (por ejemplo uno o más autoanticuerpos) o por lo menos en parte mediada por inmunidad celular.
- Se describen además en la presente memoria procedimientos para reducir la inflamación en un sujeto. Un procedimiento puede incluir administrar en el sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para reducir la inflamación. La inflamación puede ser crónica o aguda. La inflamación puede encontrarse por lo menos en parte mediada por anticuerpos o células. El tratamiento puede resultar en una reducción de la severidad de un síntoma de inflamación (por ejemplo hinchazón, dolor, cefalea, fiebre, náusea, rigidez articular esquelética o daños a tejidos o células). El tratamiento puede resultar en la inhibición de la producción de anticuerpos o en la proliferación de células linfoides.
- En la presente memoria se describen además procedimientos para inhibir los daños a tejidos o células en un sujeto causados por una respuesta inflamatoria o inflamación. Un procedimiento puede incluir administrar en el sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar mediante inhibición los daños tisulares o celulares causados por una respuesta inflamatoria o inflamación. Los daños tisulares o celulares pueden estar causados por una respuesta inflamatoria o inflamación crónica o aguda. La respuesta inflamatoria o inflamación puede estar mediada por lo menos en parte por anticuerpos o células. Los daños tisulares o celulares pueden encontrarse presentes en timo, hígado, riñón, bazo, piel o una articulación esquelética (por ejemplo rodilla, tobillo, cadera, hombro, muñeca, dedo de la mano, dedo del pie o codo). El tratamiento puede resultar en la inhibición o la prevención de daños tisulares o celulares adicionales.
- En la presente memoria se describen además procedimientos para tratar los daños existentes a tejidos o células en un sujeto causados por una respuesta inflamatoria o inflamación. Un procedimiento puede incluir administrar en el sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar un daño tisular o celular existente causado por una respuesta inflamatoria o inflamación. El daño tisular o celular existente puede estar causado por una respuesta inflamatoria o inflamación crónica o aguda. La respuesta inflamatoria o inflamación puede estar mediada por lo menos en parte por anticuerpos o células. El daño tisular o celular existente puede encontrarse presente en timo, hígado, riñón, bazo, piel o una articulación esquelética (por ejemplo rodilla, tobillo,

cadera, hombro, muñeca, dedo de la mano, dedo del pie o codo). El tratamiento resulta en la reversión del daño tisular o celular o resulta en la inhibición o prevención de daños tisulares o celulares adicionales.

5 Los procedimientos para tratar la esplenomegalia en un sujeto también se describen en la presente memoria. Un procedimiento puede incluir la administración en el sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar la esplenomegalia.

10 En la presente memoria también se describen adicionalmente procedimientos para inhibir la proliferación o supervivencia de un esplenocitos en un sujeto que presenta o que está en riesgo de presentar una proliferación o supervivencia de los esplenocitos no deseable. Un procedimiento puede incluir administrarse en el sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para inhibir la proliferación o supervivencia del esplenocito.

15 En la presente memoria también se describen procedimientos para estimular la diferenciación o la apoptosis de un esplenocito en un sujeto que presenta o que está en riesgo de presentar una proliferación o apoptosis de los esplenocitos no deseable. Un procedimiento puede incluir administrar en el sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para reducir la producción de anticuerpos (por ejemplo autoanticuerpos) por parte de un esplenocito.

20 En la presente memoria también se describen procedimientos para reducir el número de esplenocitos productores de anticuerpos en un sujeto que presenta o está en riesgo de presentar un número no deseable de esplenocitos. Un procedimiento puede incluir administrar en el sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para reducir el número de esplenocitos productores de anticuerpos (por ejemplo autoanticuerpos).

25 En la presente memoria también se describen procedimientos para reducir la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) en un sujeto que presenta o está en riesgo de presentar una citotoxicidad de las células NK no deseable. Un procedimiento puede incluir la administración en el sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para reducir la citotoxicidad de las células NK no deseable.

30 Se describen adicionalmente en la presente memoria procedimientos para inhibir el rechazo de células, tejidos u órganos trasplantados en un sujeto. Un procedimiento puede incluir administrar en el sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para inhibir el rechazo de una célula, tejido u órgano trasplantado (por ejemplo un aloinjerto o xenoinjerto). La PA puede administrarse antes, de manera sustancialmente contemporánea o
35 después del trasplante de las células, tejido u órgano.

40 En la presente memoria también se describen procedimientos para estimular la diferenciación de las células linfoides. Un procedimiento puede incluir poner en contacto una o más células linfoides *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* con una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para estimular la diferenciación de una o más células linfoides. La célula linfoide puede ser una célula T o B.

45 La invención se basa además por lo menos en parte en las bajas cantidades de PA necesarias para alcanzar las actividades. En particular, PA presenta las actividades anteriormente indicadas a concentraciones bajas, típicamente inferiores a las cantidades utilizadas para aplicaciones de superantígeno.

50 Por lo tanto, los procedimientos que también se describen en la presente memoria pueden ponerse en práctica con PA en cantidades eficaces para inducir una o más de las actividades dadas a conocer en la presente memoria, aunque sin actividad sustancial de superantígeno, actividad de unión a Fc o que estimulan sustancialmente la inmunidad humoral. Una cantidad en un ratón puede ser una dosis de entre aproximadamente 1 picogramo de PA (equivalente a una cantidad de entre aproximadamente 50 picogramos/kg y aproximadamente 50 µg/kg). Una cantidad en un ratón puede ser una única dosis de aproximadamente 1 picogramo y aproximadamente 1 microgramo de PA (equivalente a una cantidad de entre aproximadamente 50 pg/kg y aproximadamente 50 µg/kg) administrada intermitentemente durante un periodo de entre 1 y 15 semanas. Una cantidad puede ser una única
55 dosis de entre aproximadamente 1 picogramos y aproximadamente 1 microgramo de PA (equivalente a una cantidad de entre aproximadamente 50 picogramos/kg y aproximadamente 50 µg/kg) administrada en días alternativos durante un periodo de entre aproximadamente 7 y 21 días.

60 En la presente memoria se describen además composiciones que inducen una o más de las actividades dadas a conocer en la presente memoria en una forma de dosificación unitaria. Una composición puede comprender una forma de dosificación unitaria de PA para un ratón de aproximadamente 0,5 a 5, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 50 o 50 a 100, 100 a 500 o 100 a 1.000 picogramos. Una composición puede comprender una forma de dosificación unitaria de PA para un ratón de aproximadamente 1 a 10, 10 a 100, 100 a 500 o aproximadamente 500 a 1.000 nanogramos. Son formas de dosificación unitaria equivalentes de PA, aproximadamente 25 a 250, 250 a 500, 500 a 1.000, 1.000 a 2.500 o 2.500 a 5.000, 5.000 a 25.000, 5.000 a 50.000 pg/kg, y de aproximadamente 50 a 500, 500 a 5.000, 5.000 a 25.000 o 25.000 a 50.000 ng/kg. Una composición puede comprender una forma de dosificación unitaria de PA
65

suficiente para reducir una respuesta inflamatoria o inflamación en un sujeto.

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen una forma de dosificación unitaria de PA (por ejemplo para un ratón, de 0,5 a 5, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 50 o 50 a 100, 100 a 500, 100 a 1.000 picogramos, 1 a 10, 10 a 100, 100 a 500 o aproximadamente 500 a 1.000 nanogramos, que es equivalente a 25 a 250, 250 a 500, 500 a 1.000, 1.000 a 2.500 o 2.500 a 5.000, 5.000 a 25.000, 5.000 a 50.000 pg/kg, y 50 a 500, 500 a 5.000, 5.000 a 25.000 o 25.000 a 50.000 ng/kg). Se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen una forma de dosificación unitaria de PA que induce una o más de las actividades dadas a conocer en la presente memoria (por ejemplo reduce una respuesta inflamatoria o la inflamación en un sujeto).

También se proporcionan kits que incluyen una forma de dosificación unitaria de PA (o composiciones farmacéuticas), incluyendo además opcionalmente dichos kits instrucciones de utilización en un procedimiento descrito en la presente memoria (por ejemplo para reducir una respuesta inflamatoria, la inflamación o los daños tisulares o celulares causados 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 la inflamación).

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la ganancia de peso y cinética de crecimiento de A) ratones normales no tratados de control (C57BL/6J), B) ratones BXSB no tratados, y C) ratones BXSB con tratamiento de PA.

Descripción detallada

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. La invención se basa por lo menos en parte en la caracterización de una o más actividades de proteína A (PA) que aparentemente son diferentes de sus propiedades de superantígeno, actividad de unión a Fc o su capacidad de estimular la inmunidad humoral. Se cree que estas actividades de PA diferentes son en parte atribuibles a la capacidad de la PA de rerregular o normalizar uno o más procesos fisiológicos no deseables o aberrantes, tales como una disfunción inmunitaria. La capacidad de la PA de rerregular o normalizar uno o más procesos fisiológicos resulta en muchas actividades beneficiosas diferentes, incluyendo, por ejemplo, la modulación de una respuesta inmunitaria aberrante o no deseable (por ejemplo la rerregulación o normalización), la mejora o la reducción de la autoinmunidad, la reducción de la inflamación o de una respuesta inflamatoria, la inhibición o la reversión de por lo menos una parte de los daños tisulares causados por uno o más procesos no regulados, tal como una respuesta inmunitaria no deseable o aberrante.

Más particularmente, se demuestra la eficacia de la PA mediante la utilización de un modelo murino de inflamación de artritis inducida por colágeno (AIC). La respuesta inmunitaria inducida al colágeno de tipo II está mediada por anticuerpos, causando una respuesta inflamatoria de rápida progresión que puede evaluarse mediante la medición de la inflamación en articulaciones afectadas y también mediante la aplicación de una evaluación clínica estandarizada para las articulaciones afectadas (denominada "índice clínico" o "IC"). La evaluación de IC incluye medidas tanto de hinchazón como de movilidad. Tal como se muestra en el ejemplo 1, la PA a concentraciones bajas inhibe una respuesta inflamatoria aguda en el modelo murino de AIC. El examen histológico de las articulaciones de la rodilla y del tobillo revelaron una reducción de los daños tisulares, así como de la infiltración de células inmunitarias del sinovio.

La eficacia de la PA también se ha demostrado en un modelo animal BXSB, que representa una enfermedad de deficiencia autoinmunitaria combinada que presenta una base genética que resulta en la muerte precoz de los animales macho. Tal como se muestra en los ejemplos 3 a 8, la PA a concentraciones bajas modifica muchas características de la enfermedad en el animal BXSB, en muchos casos rerregulando las diversas manifestaciones de la enfermedad (celulares e histológicas) hacia niveles de línea base (es decir, hacia la normalización). Por ejemplo, la PA inhibe o evita la aparición precoz de la emaciación (pérdida de peso), regula la expansión del comportamiento esplénico, inhibe la sobreexpresión o la actividad de la inmunidad humoral, inhibe la sobreexpresión o la actividad de la inmunidad celular, modula la diferenciación de las células del linaje celular linfoide, y mejora, reduce o revierte el daño tisular causado o asociado a procesos de enfermedad. Los datos indican además que la PA presenta el mismo patrón de respuesta a dosis que en el modelo de AIC.

De esta manera, entre las actividades de la PA a bajas concentraciones se incluyen, por ejemplo, una o más de entre la expansión reguladora del compartimiento esplénico (modulación de la proliferación, la apoptosis o la diferenciación), la regulación de la inmunidad humoral aberrante o no deseable (inhibición de la producción de autoanticuerpos o la inhibición de las células que producen autoanticuerpos), la regulación de la inmunidad celular aberrante o no deseable (normalización del equilibrio TH₁/TH₂, inhibición de las respuestas de citotoxicidad), modulación de la proliferación, apoptosis o diferenciación de las células en el linaje celular linfoide (por ejemplo normalización de las poblaciones de células T, tales como un número creciente de células T maduras, por ejemplo CD69-CD4+), la inhibición o la reversión del daño celular o tisular causado por una respuesta inmunitaria no deseable o aberrante (la inhibición o la prevención de progresión de la enfermedad, la estimulación o la potenciación de la reversión de la enfermedad o la regeneración de tejido) y la normalización de los números de esplenocitos T o

B o la respuesta de los mismos a uno o más mitógenos.

Por lo tanto, la PA resulta útil en el tratamiento de un sujeto que necesita uno o más de entre las actividades anteriormente indicadas asociadas a la PA. Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan además, entre otros, procedimientos para modular una respuesta inmunitaria (celular o humoral), procedimientos para tratar una respuesta inmunitaria no deseable o aberrante (por ejemplo una disfunción inmunitaria) y procedimientos para inhibir, evitar o revertir un efecto fisiológico causado o asociado a una respuesta inmunitaria en un sujeto. Un procedimiento puede incluir la administración en un sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de un factor de diferenciación de linfocitos suficiente para modular la respuesta inmunitaria. Un procedimiento puede incluir administrar en 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" se refiere a un cambio detectable de actividad o función o efecto al que se refiere el término. La modulación puede referirse a cualquier incremento, disminución, reducción, inhibición, prevención, estimulación, fomento o potenciación de la actividad o función o efecto al que se refiere el término. Por ejemplo, modular una respuesta inmunitaria se refiere a que la actividad o función o efecto de la respuesta inmunitaria se modifica detectablemente, por ejemplo se produce un incremento, disminución, reducción, inhibición, prevención, estimulación, fomento o potenciación de la inmunidad humoral o mediada por células. Los cambios en una respuesta inmunitaria indicativos de modulación, incluyendo, por ejemplo, el número de células T y B, la proliferación, la apoptosis, la diferenciación, la citotoxicidad, la producción de anticuerpos o el número de células productoras de anticuerpos (por ejemplo autoanticuerpos), la sensibilidad a mitógenos, la inflamación, el daño celular o tisular, o los síntomas de los mismos, pueden medirse mediante una diversidad de procedimientos dados a conocer en la presente memoria o conocidos de la técnica. Una "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" se refiere a una cantidad necesaria para conseguir la actividad o el efecto.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "re-regular", "normalizar" y variaciones gramaticales de los mismos se refieren a un desplazamiento hacia los niveles de línea base. Un desplazamiento hacia los niveles de línea base puede incluir, por ejemplo, cambios en el número de células, estado de diferenciación, producción de anticuerpos o cantidades de anticuerpos (por ejemplo autoanticuerpos en circulación), citotoxicidad o respuesta a un mitógeno. De esta manera, la rerregulación o normalización del número de esplenocitos en el bazo de BXSB, por ejemplo, se refiere al retorno hacia el número de esplenocitos típicamente observado en un bazo animal normal (por ejemplo libre de enfermedad), por ejemplo C57BL/6. De manera similar, la rerregulación o normalización de autoanticuerpos se refiere a la reducción de la cantidad de dichos anticuerpos hasta los más típicamente observados en un animal normal (por ejemplo libre de enfermedad). La re-regularización o la normalización de las poblaciones de células T en BXSB se refiere, por ejemplo, al desplazamiento de la población de células T a lo observado típicamente en C57BL/6, por ejemplo un cambio de una población de células T inmaduras a maduras.

El nivel de rerregulación o normalización que puede producirse puede ser un retorno a niveles de línea base o a niveles próximos a los mismos, típicos para un animal normal (a menos de 5-25% de la línea base), aunque puede ser menor, por ejemplo un desplazamiento detectable hacia los niveles de línea base, aunque el desplazamiento no retorna los niveles a la línea base o a un nivel próximo a la misma (por ejemplo a menos de 25-100% o a menos de 25-200% de la línea base). El desplazamiento dependerá del grado de desvío respecto a la línea base en el estado no tratado, la cantidad de PA administrada y qué variable retorna a la línea base. Por ejemplo, el número de esplenocitos para BXSB era 5 a 6 veces superior que para C57BL/6. Por lo tanto, una re-regularización o una normalización del número de esplenocitos para BXSB se referiría a la reducción del número de esplenocitos en BXSB tras el tratamiento. Por ejemplo, una reducción de entre 5 a 6 veces mayor que en ratones C57BL/6 y 1 a 3 veces mayor que en ratones C57BL/6, o superior, tal como de a menos de aproximadamente 10-50% del número de esplenocitos observado típicamente en los ratones C57BL/6. De manera similar, en BXSB se produce un incremento de 200% de ANA a las 5 semanas y un incremento de 1.000% de ANA a las 11 semanas. Por lo tanto, una re-regularización o una normalización de los autoanticuerpos para BXSB se referiría a que el número de autoanticuerpos (por ejemplo ANA) se reduciría tras el tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento con 0,01 µg de PA retornó dichos valores hasta un nivel de línea base o próximo al mismo (por ejemplo a menos de 25% de la línea base). De esta manera, el número de autoanticuerpos puede reducirse de 10 veces superior al de los ratones C57BL/6 a 5 a 8 veces superior al de los ratones C57BL/6 o a 1 a 5 veces superior a los ratones C57BL/6, o superior, tal como a menos de aproximadamente 10-50% del número de autoanticuerpos en ratones C57BL/6.

En la presente memoria se describen además, entre otros, procedimientos para tratar una disfunción inmunitaria en un sujeto que presenta o está en riesgo de presentar una disfunción inmunitaria. Un procedimiento puede incluir la administración en un sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar la disfunción inmunitaria. La disfunción inmunitaria puede comprender un trastorno autoinmunitario.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "disfunción inmunitaria" o "trastorno inmunitario" se refiere a una respuesta, función o actividad inmunitaria no deseable, que es superior (por ejemplo autoinmunidad) o inferior (por ejemplo inmunodeficiencia) a la deseada. Una respuesta inmunitaria, función o actividad no deseable puede ser una respuesta, función o actividad normal. De esta manera, las respuestas inmunitarias normales que no se consideran aberrantes con la condición de que no sean no deseables se encuentran incluidas dentro del significado

de dichas expresiones. Una respuesta, función o actividad inmunitaria no deseable también puede ser una respuesta, función o actividad anormal. Una respuesta, función o actividad inmunitaria anormal o aberrante se aparta de la normalidad. Una disfunción o trastorno inmunitario puede ser de naturaleza principalmente humoral o celular, o ambas, crónico o agudo.

5 Entre las disfunciones o trastornos inmunitarios se incluyen trastornos caracterizados por muchos síntomas o anomalías fisiológicas diferentes. Tal como se da a conocer en la presente memoria, el modelo de ratón BXSB es un trastorno inmunitario caracterizado por un amplio abanico de síntomas y anomalías fisiológicas que pueden tratarse de acuerdo con la exposición (ver, por ejemplo, los ejemplos 4 a 9). Por lo tanto, la exposición resulta útil en el tratamiento de cualquier disfunción o trastorno inmunitario caracterizado por muchos síntomas y anomalías fisiológicas diferentes, incluyendo trastornos que presentan uno o más síntomas o anomalías fisiológicas similares al modelo de ratón BXSB, o trastornos equivalentes en otras especies. Por ejemplo, el ratón BXSB se caracteriza por la proliferación, apoptosis o diferenciación aberrante de los esplenocitos que conduce a la expansión del compartimiento esplénico y un consecuente incremento del número de esplenocitos inmaduros. De esta manera, aunque los tipos particulares de esplenocitos los números de los cuales se incrementan en el ratón BXSB puede ser diferente de los de otras especies con un trastorno inmunitario (por ejemplo con respecto a los marcadores CD de los mismos), la exposición resulta aplicable a cualquier trastorno caracterizado por presentar un número no deseable de esplenocitos inmaduros (causado por un exceso de la proliferación celular, la supervivencia o el fallo de la apoptosis) o un número reducido de esplenocitos maduros en el sujeto.

De esta manera, debido a que la exposición resulta útil para re-regular o normalizar muchos aspectos de una respuesta inmunitaria, que conduce a mejorar o reducir uno o más de los muchos síntomas o anomalías diferentes del trastorno inmunitario, la exposición es ampliamente aplicable a trastornos que son diferentes de los que se producen en el ratón BXSB. Evidentemente, entre los trastornos tratables según la exposición se incluyen los caracterizados por presentar una o más características, síntomas o anomalías de BXSB, aunque sean menos severos que los presentes en el ratón BXSB.

Entre los ejemplos particulares de trastornos inmunitarios a los que se refiere la exposición se incluyen los trastornos autoinmunitarios y las inmunodeficiencias. Los trastornos autoinmunitarios se caracterizan generalmente por una respuesta, actividad o función no deseable o aberrante del sistema inmunitario. Las inmunodeficiencias se caracterizan generalmente por una sensibilidad o memoria inmunitaria humoral o mediada por células reducida o insuficiente, o por una tolerancia incrementada o no deseable. Entre dichos trastornos que pueden tratarse de acuerdo con la exposición se incluyen, aunque sin limitación, los trastornos que causan daños celulares/tisulares en el sujeto.

De esta manera, la exposición proporciona adicionalmente, entre otros, procedimientos para tratar un trastorno autoinmunitario en un sujeto que presenta o está en riesgo de presentar un trastorno autoinmunitario. Un procedimiento puede incluir la administración en el sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar el trastorno autoinmunitario. El trastorno autoinmunitario puede comprender artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis sorriática, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, encefalomiелitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis atópica, dermatitis eccematosa, soriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, escleroderma, vaginitis, proctitis, eritema nodoso leproso, uveítis autoinmunitaria, encefalomiелitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida auditiva sensorineural progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia pura de glóbulos rojos, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, celiacía idiopática, líquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, tiroiditis de Hashimoto, síndrome poliglandular autoinmunitario, diabetes mellitus insulino-dependiente, diabetes mellitus insulino-resistente, infertilidad mediada inmunitariamente, enfermedad de Addison autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, dermatitis herpetiforme, alopecia autoinmunitaria, vitiligo, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, anemia perniciosa, síndrome de Guillain-Barre, síndrome de la persona rígida, fiebre reumática aguda, oftalmia simpática, síndrome de Goodpasture, vasculitis necrotizante sistémica, síndrome antifosfolípido o una alergia.

En la presente memoria se describen además, entre otros, procedimientos para tratar inmunodeficiencias en un sujeto que presenta o está en riesgo de presentar una inmunodeficiencia. Un procedimiento puede incluir la administración en un sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar la inmunodeficiencia. La inmunodeficiencia puede comprender inmunodeficiencia combinada severa (IDCS), tal como deficiencia del gen activador de recombinasa (GAR 1/2), deficiencia de adenosina desaminasa (ADA), deficiencia de cadena γ y de receptor de interleucina (γ c), deficiencia de cinasa 3 asociada a Janus (JAK3) y disgénesis reticular; inmunodeficiencia primaria de células T, tal como el síndrome de DiGeorge, el síndrome del desnudo, la deficiencia de receptor de células T, la deficiencia de CMH de clase II, deficiencia de TAP-2 (deficiencia de CMH de tipo I), deficiencia de tirosina cinasa ZAP70 y deficiencia de nucleótido de purina fosforilasa (NPF); predominantemente deficiencias de anticuerpos, tales como la agammaglobulinemia ligada al X (deficiencia de tirosina cinasa de Bruton), agammaglobulinemia recesiva autosómica, tal como la deficiencia de cadena pesada μ , deficiencia de la cadena ligera sustitutiva (γ 5/14.1), síndrome hiper-IgM ligado al X (deficiencia de ligando de CD40)

y otros, delección del gen de cadena pesada de Ig, deficiencia de IgA, deficiencia de subclases de IgG (con o sin deficiencia de IgA), inmunodeficiencia variable común (IDVC), deficiencia de anticuerpos con inmunoglobulinas normales, hipogamaglobulinemia transitoria de la infancia, deficiencia de receptor de interferón γ (IFNGR1, INGR2), deficiencia de interleucina-12 y de receptor de interleucina-12, inmunodeficiencia con timoma, síndrome de Wiskott-Aldrich (deficiencia de proteína WAS), ataxia telangiectasa (deficiencia de ATM), síndrome linfoproliferativo ligado al X (deficiencia de SH2D1A/SAP) y síndrome de hiper-IgE). La disfunción inmunitaria puede comprender una inmunodeficiencia asociada o secundaria a otra enfermedad (por ejemplo inestabilidad cromosómica o reparación defectuosa, tal como el síndrome de Bloom, xeroderma pigmentosa, anemia de Fanconi, síndrome de ICF, síndrome de rotura de Nijmegen y síndrome de Seckel; defectos cromosómicos tales como el síndrome de Down (trisomía 21), síndrome de Turner y delecciones o anillos en el cromosoma 18 (18p- y 18q-); anomalías esqueléticas, tales como la displasia esquelética de extremidades cortas (enanismo de extremidades cortas) y la hipoplasia de cartílago-pelo (condroplasia metafisaria); inmunodeficiencia asociada a un retardo del crecimiento generalizado, tal como la displasia inmunoósea de Schimke, el síndrome de Dubowitz, la displasia cifomélica con IDCS, enanismo de Mulibrey, retardo del crecimiento, anomalías faciales e inmunodeficiencia y progeria (síndrome de Hutchinson-Gilford); inmunodeficiencia con defectos dermatológicos, tales como el síndrome ectrodactilia-displasia ectodérmica-hendidura, la inmunodeficiencia con ausencia de pulgares, la anosmia y la ictiosis, el albinismo parcial, disqueratosis congénita, síndrome de Netherton, displasia ectodérmica anhidrótica, síndrome de Papillon-Lefevre e ictiosis congénita; defectos metabólicos hereditarios, tales como la acrodermatitis enteropática, la deficiencia de transcobalamina-2, la aciduria orótica hereditaria de tipo 1, la diarrea intratable, facies anormal, tricurris e inmunodeficiencia, acidemia metilmalónica, deficiencia de carboxilasa dependiente de biotina, mannosidosis, enfermedad de almacenamiento del glucógeno, tipo 1b, síndrome de Chediak-Higashi, hipercatabolismo de inmunoglobulinas, tal como el hipercatabolismo familiar, la linfangiectasia intestinal, la candidiasis mucocutánea crónica, la hiposplenía o asplenía hereditaria o congénita o el síndrome de Ivermark.

Entre los ejemplos particulares adicionales de disfunción o trastorno inmunitario a los que se refiere la exposición se incluyen una respuesta inflamatoria o inflamación aberrante o no deseable. Dichos trastornos pueden estar mediados por inmunidad celular o humoral, o una combinación de ambos.

En la presente memoria se describen además, entre otros, procedimientos para reducir o inhibir una respuesta inflamatoria o inflamación (crónica o aguda) en un sujeto que presenta o está en riesgo de presentar una respuesta inflamatoria o inflamación. Un procedimiento puede incluir la administración en el sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para reducir o inhibir una respuesta inflamatoria. Un procedimiento puede incluir la administración en el sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para reducir o inhibir la inflamación. La respuesta inflamatoria o inflamación puede estar mediada por lo menos en parte por inmunidad celular. Un procedimiento (por ejemplo el tratamiento) puede resultar en una reducción de la severidad o frecuencia de un síntoma de una respuesta inflamatoria o inflamación. El síntoma puede incluir uno o más de entre hinchazón, dolor, cefalea, fiebre, náusea, rigidez de las articulaciones esqueléticas o daños tisulares o celulares. Un procedimiento (por ejemplo el tratamiento) también puede resultar en la inhibición de la producción de anticuerpos o en la proliferación de las células linfoides.

La disfunción inmunitaria, por ejemplo la inflamación o una respuesta inflamatoria aberrante o no deseable puede causar, directa o indirectamente, daños en células o tejidos/órganos, en múltiples células, tejidos u órganos, o específicamente en un único tipo celular, órgano o tipo de tejido individual. Por ejemplo, tal como se da a conocer en los ejemplos, los modelos de CIA y BXSB mostraban daños en múltiples tejidos, tal como ponen de manifiesto los cambios histológicos. Entre los tejidos que mostraban daños se incluían la rodilla, el tobillo, el timo, el riñón y el hígado. El tratamiento de acuerdo con la exposición resultó en una reversión por lo menos parcial del daño tisular existente o una regeneración del tejido normal (ver, por ejemplo, las tablas 9 y 10).

Por lo tanto, en la presente memoria se describen además, entre otros, procedimientos para tratar, inhibir y revertir los daños tisulares o celulares, y de estimular o potenciar la regeneración tisular o celular en un sujeto, causado por una disfunción inmunitaria (por ejemplo una respuesta inflamatoria o inflamación aberrante o no deseable). Un procedimiento puede incluir la administración en el sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar daños tisulares o celulares existentes causados por una disfunción inmunitaria (por ejemplo una respuesta inflamatoria o inflamación aberrante o no deseable). Un procedimiento puede incluir la administración en un sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para inhibir los daños tisulares o celulares (existentes o profilácticamente) causados por una disfunción inmunitaria (por ejemplo una respuesta inflamatoria o inflamación aberrante o no deseable crónica o aguda). Un procedimiento puede incluir la administración en un sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para revertir daños tisulares o celulares existentes causados por una disfunción inmunitaria (por ejemplo una respuesta inflamatoria o inflamación aberrante o no deseable). Un procedimiento puede incluir la administración en un sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para estimular o potenciar la regeneración tisular o celular causada por una disfunción inmunitaria (por ejemplo una respuesta inflamatoria o inflamación aberrante o no deseable). La respuesta inflamatoria o inflamación puede estar mediada por lo menos en parte por un anticuerpo (por ejemplo uno o más autoanticuerpos). La respuesta inflamatoria o inflamación puede estar mediada por lo menos en parte por inmunidad celular. El daño tisular puede estar presente en el timo, hígado, riñón, bazo, piel o una articulación esquelética. El daño tisular en una

articulación esquelética puede estar presente en rodilla, tobillo, cadera, hombro, muñeca, dedo de la mano, dedo del pie o codo.

5 En la presente memoria se describen además procedimientos de tratamiento que inhiben o evitan daños tisulares o celulares adicionales. De esta manera, en la presente memoria se describen además procedimientos para tratar
 10 daños tisulares o celulares existentes en un sujeto causados por una disfunción inmunitaria (por ejemplo una respuesta inflamatoria o inflamación aberrante o no deseable), así como para inhibir o prevenir daños tisulares o celulares adicionales. Un procedimiento puede incluir la administración en el sujeto de una composición que
 15 comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para inhibir o prevenir daños tisulares o celulares adicionales causados por una disfunción inmunitaria (por ejemplo una respuesta inflamatoria o inflamación aberrante o no deseable). Entre los ejemplos de daños existentes tratables de acuerdo con la exposición se incluyen, por
 20 ejemplo, daños tisulares u orgánicos. El daño ejemplar tal como se da a conocer en la presente memoria se encuentra presente en timo, hígado, riñón, bazo, piel o una articulación esquelética (por ejemplo la rodilla o el tobillo).

15 Se desean procedimientos descritos en la presente memoria que incluyen el tratamiento de una respuesta inflamatoria o inflamación, para reducir un síntoma o característica de una respuesta inflamatoria o inflamación. Al nivel del cuerpo completo, una respuesta inflamatoria o inflamación generalmente se caracteriza por hinchazón,
 20 dolor, cefalea, fiebre, náusea, rigidez de las articulaciones esqueléticas o falta de movilidad, enrojecimiento u otra decoloración. Al nivel celular, una respuesta inflamatoria o inflamación se caracteriza por uno o más de entre infiltración celular de la región, producción de anticuerpos (por ejemplo autoanticuerpos), producción de citocinas,
 25 linfocinas, quimocinas, interferones e interleucinas, crecimiento y maduración (por ejemplo factores de diferenciación), proliferación celular, diferenciación, acumulación o migración y daños celulares, tisulares u orgánicos. De esta manera, el tratamiento reducirá, inhibirá o evitará uno o más síntomas (severidad o frecuencia de aparición) o características de una respuesta inflamatoria o inflamación.

Entre los procedimientos descritos en la presente memoria pueden incluirse el tratamiento de la esplenomegalia (es decir, el agrandamiento del bazo) en un sujeto. Entre dichos procedimientos se incluyen la administración en el
 30 sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para tratar la esplenomegalia. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, el tratamiento de la esplenomegalia típicamente estimula, incrementa o fomenta la proliferación o la supervivencia de los linfocitos maduros (por ejemplo los esplenocitos T o B) o la diferenciación de células inmaduras a maduras, o inhibe o reduce la proliferación o la
 35 supervivencia de las células inmaduras hasta un estado fisiológico más típico de un animal normal, es decir, un animal que no muestra esplenomegalia. De acuerdo con lo anterior, también se describen en la presente memoria procedimientos para estimular, incrementar o fomentar la proliferación o supervivencia de los linfocitos maduros (por ejemplo esplenocitos T o B) o la diferenciación de linfocitos inmaduros a maduros (por ejemplo esplenocitos T o B) y la inhibición o reducción de la proliferación o la supervivencia de los linfocitos inmaduros (por ejemplo esplenocitos T o B).

40 Entre los procedimientos descritos en la presente memoria pueden incluirse además la inhibición, reducción o prevención de la producción de anticuerpos en un sujeto. Un procedimiento puede incluir la administración en un sujeto que presenta un anticuerpo no deseable o un anticuerpo aberrante, de una composición que comprende una
 45 cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para reducir la producción de anticuerpos. Los autoanticuerpos son un ejemplo de un anticuerpo en el que podría desearse la inhibición, reducción o prevención de su producción. La producción de anticuerpos puede inhibirse, reducirse o prevenirse directamente, al causar que la célula (por ejemplo el esplenocito) que produce el anticuerpo que reduzca la producción de anticuerpos, o indirectamente, mediante la
 50 reducción del número de células (por ejemplo esplenocitos) que producen el anticuerpo.

Entre los procedimientos descritos en la presente memoria pueden incluirse adicionalmente la inhibición, reducción o
 55 prevención de la citotoxicidad celular de células asesinas naturales (NK) en un sujeto que presenta o que está en riesgo de presentar citotoxicidad de células NK no deseable. Un procedimiento puede incluir la administración en un sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para inhibir, reducir o prevenir la citotoxicidad de células NK no deseable.

Entre los procedimientos descritos en la presente memoria pueden incluirse además la estimulación, fomento o
 60 potenciación de la diferenciación de una célula linfoide. Un procedimiento puede incluir poner en contacto una célula linfoide *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* con una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para estimular, fomentar o potenciar la diferenciación de una célula linfoide.

60 La expresión "poner en contacto" se refiere a la unión o interacción directa o indirecta entre dos o más entidades (por ejemplo entre PA y una célula o molécula). La puesta en contacto tal como se utiliza en la presente memoria incluye una solución, en fase sólida, *in vitro*, en una célula e *in vivo*.

65 Entre los ensayos para la detección de una actividad de PA se incluyen cambios celulares en el número de linfocitos, la proliferación, apoptosis o supervivencia y diferenciación incluyen la exclusión de azul tripán (viabilidad), los cambios en los marcadores CD celulares u otras moléculas (diferenciación), las cantidades de anticuerpos (por

ejemplo los autoanticuerpos circulantes pueden medirse utilizando ELISA u otros ensayos de detección de anticuerpos), la mejora de tejidos u órganos, incluyendo la inhibición de daños adicionales o la reversión de daños tisulares existentes (histología, función tisular u orgánica, o los niveles enzimáticos indicativos de función mejorada), efectos de cuerpo completo (ganancia de peso o una reducción de la pérdida de peso o emaciación, mejora de la motilidad) y la expansión del bazo (histología, número de linfocitos y el estado de diferenciación de los mismos), tal como se da a conocer en la presente memoria y se conoce adicionalmente en la técnica.

Debido a que la exposición puede utilizarse para inhibir, reducir o prevenir una respuesta inmunitaria no deseable en un sujeto, se proporcionan además procedimientos para inhibir, reducir o prevenir el rechazo de una célula, tejido u órgano trasplantado en un sujeto (es decir, la enfermedad del injerto contra el huésped). Un procedimiento también descrito en la presente memoria puede incluir la administración en un sujeto de una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína A (PA) suficiente para inhibir, reducir o prevenir el rechazo de una célula, tejido u órgano trasplantado. Entre las células ejemplares se incluyen células neurales. Entre los tejidos ejemplares se incluyen piel, vasos sanguíneos, ojo y médula ósea. Entre los órganos ejemplares se incluyen corazón, pulmón, hígado y riñón. La PA puede administrarse antes, de manera sustancialmente contemporánea o después del trasplante de la célula, tejido u órgano. La célula, tejido u órgano trasplantado puede ser un aloinjerto o xenoinjerto.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "trasplante" y variaciones gramaticales del mismo se refieren al injerto, implantación o trasplante de una célula, tejido u órgano de una parte del cuerpo en otra parte, o de un individuo/animal en otro individuo/animal. El término incluye además células, tejido y órganos modificados genéticamente, por ejemplo mediante terapia génica *ex vivo* en la que las células, tejido y órganos transformados se obtienen o se derivan de la persona que seguidamente recibe el trasplante o de una persona/animal diferente.

Los procedimientos y composiciones indicados en la presente memoria pueden utilizarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Las composiciones pueden administrarse como forma de dosificación individual o múltiple, en días consecutivos o alternativos, o intermitentemente. Por ejemplo, puede administrarse una única forma de dosificación o múltiples en días alternativos o intermitentemente, durante aproximadamente 7 a 45 días o durante aproximadamente 1 a 15 semanas. Una composición puede administrarse como una única dosis en días alternativos durante 3 a 5 semanas.

El tratamiento habitualmente resulta en una mejora de estado del sujeto, que es un cambio beneficioso para el sujeto, tejido o célula o población celular en el sujeto, que es detectable. De esta manera, el tratamiento puede resultar en la inhibición, reducción o prevención de la progresión o agravamiento de la afección o trastorno o síntomas, o el deterioro posterior o aparición de uno o más síntomas adicionales de la afección o trastorno. De esta manera, un resultado del tratamiento exitoso conduce a un "efecto terapéutico", o la inhibición, reducción o prevención de la severidad o frecuencia de los síntomas o causas subyacentes de un trastorno o condición en el sujeto. La estabilización de un trastorno o condición también es un resultado de tratamiento exitoso. Por lo tanto, el tratamiento puede reducir o prevenir la severidad o frecuencia de uno o más síntomas de la afección o trastorno, inhibir la progresión o agravamiento de la afección o trastorno, y en algunos casos, revertir la afección o trastorno. De esta manera, en el caso de un trastorno inmunitario, por ejemplo, el tratamiento puede conducir a una mejora de un cambio histopatológico causado por el trastorno inmunitario o asociado al mismo, por ejemplo, evitando el curso adicional o reduciendo o regenerando la infiltración en articulaciones esqueléticas o la destrucción de tejido, o la infiltración en tejido del timo, riñón, hígado, bazo o piel o la destrucción de tejido.

El tratamiento incluye además alcanzar un efecto sobre las causas subyacentes de la afección o trastorno o síntomas del mismo. De esta manera, en el caso de un trastorno inmunitario, por ejemplo, la rerregulación o normalización del número absoluto de linfocitos (por ejemplo esplenocitos) o el número de linfocitos maduros hacia la línea de base normal se considera un resultado de tratamiento exitoso. De manera similar, una reducción de los anticuerpos circulantes (por ejemplo autoanticuerpos) hacia la línea base normal se considera un resultado de tratamiento exitoso.

El término "mejorar" se refiere a una mejora detectable del estado global del sujeto. Una mejora detectable incluye una reducción subjetiva de la severidad o frecuencia de los síntomas causados o asociados al trastorno o afección, una mejora de las causas subyacentes del trastorno o condición, o una reversión del trastorno o afección, que resulta detectable utilizando un ensayo.

Los procedimientos descritos en la presente memoria pueden ponerse en práctica antes (es decir, profilácticamente) o después de iniciarse los síntomas, o antes o después de que los síntomas o el trastorno se desarrolle (por ejemplo antes del trasplante de células, tejido u órgano). La administración de una composición antes o inmediatamente después del desarrollo de los síntomas puede reducir la severidad o la frecuencia de los síntomas en el sujeto. Además, la administración de una composición antes o inmediatamente después del desarrollo de los síntomas puede reducir o evitar los daños a células, tejidos y órganos que se produce, por ejemplo, durante una disfunción inmunitaria (por ejemplo la autoinmunidad).

El término "sujeto" se refiere a animales, típicamente a animales mamíferos, tales como un primate no humano (gorilas, chimpancés, orangutanes, macacos y gibones), un animal doméstico (perros y gatos), un animal de granja (caballos, vacas, cabras, ovejas y cerdos), un animal experimental (ratón, rata, conejo o cobaya) y seres humanos.

entre los sujetos humanos se incluyen adultos y niños. Entre los sujetos humanos se incluyen los que presentan o están en riesgo de presentar una disfunción inmunitaria. Los sujetos en riesgo pueden identificarse mediante cribado genético. Entre los ejemplos particulares de trastornos inmunitarios ligados genéticamente que pueden identificarse se incluyen la inmunodeficiencia combinada severa ligada al X, la deficiencia de adenosina desaminasa, la anomalía de DiGeorge, la ataxia-telangiectasia, el síndrome de Wiscott-Aldrich, la deficiencia de adhesión de los leucocitos y la distrofia miotónica. Dichos trastornos y otros son detectables a través de las células de sangre fetal o amnióticas, o a través de muestras de tejido adulto, tal como se indica en Samter's Immunologic Diseases, M.M. Frank, K.F. Austen, H.N. Claman y E.R. Unanue, editores; Little, Brown and Company. Puede utilizarse la revisión del historial familiar para detectar patrones hereditarios o un riesgo incrementado (predisposición) de desarrollar el trastorno (por ejemplo autoinmunidad o inmunodeficiencia). Los sujetos en riesgo también pueden identificarse mediante el cribado para una característica específica, tal como la presencia de poblaciones no deseables o aberrantes de linfocitos (por ejemplo esplenocitos) o autoanticuerpos. Entre los sujetos en riesgo se incluyen los que necesitan de un trasplante celular, de tejido o de órgano. Entre los sujetos se incluyen además animales de modelo de enfermedad (por ejemplo tales como ratones y primates no humanos) para el ensayo de la eficacia *in vivo* de las composiciones indicadas en la presente memoria (por ejemplo los modelos murinos CIA, BXSB, EAE y SCID).

La exposición se pone en práctica con compuestos conocidos como "factores de diferenciación de linfocitos", que son moléculas capaces de regular o modular la señalización celular o la respuesta a la señalización celular, que a su vez puede re-regular, normalizar o modular el comportamiento celular de la célula misma, otras células o procesos en los que participan las células (por ejemplo la función del sistema inmunitario). Tal como se indica en la presente memoria, un ejemplo específico de un factor de diferenciación de linfocitos es la PA. Los factores de diferenciación de linfocitos pueden utilizarse de acuerdo con la exposición en cantidades reducidas, tal como se indica en la presente memoria para la PA.

La invención se basa por lo menos en parte en las cantidades reducidas de PA que pueden producir una o más de las actividades dadas a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, la PA a 1×10^{-5} μg (1×10^{-11} g) por dosis administrada en ratones en días alternativos (L/M/V) desde el tiempo de expresión y/o progresión regulada por la inducción secundaria de antígeno reguló la expresión y/o progresión de la respuesta inflamatoria resultante y reguló la expresión y/o revertió el daño tisular causado por la respuesta inflamatoria (ejemplos 1 y 3). Sin embargo, con dicha cantidad de PA, no se produjo actividad o estimulación de superantígeno sustancial de la inmunidad humoral.

Evidentemente el experto en la materia conocerá que las cantidades de PA pueden incrementarse o reducirse según el peso del sujeto, sin estimular una actividad sustancial de superantígeno o una inmunidad humoral sustancial. Por ejemplo, para un sujeto humano, se incrementarán las cantidades de PA según el peso del ser humano basándose en las cantidades de PA que presentan la actividad deseada en ratones sin producir una actividad de superantígeno o estimulación sustanciales de la inmunidad humoral.

Por lo tanto, en la presente memoria se indican además composiciones, incluyendo la PA, en una cantidad que es capaz de producir una o más de las actividades asociadas a la PA, sin producir una actividad de superantígeno sustancial, una estimulación sustancial de la inmunidad humoral o es sustancialmente independiente de la unión de Fc. Entre las actividades de la PA en dichas cantidades se incluyen, por ejemplo, re-regular o normalizar la respuesta inmunitaria humoral o celular aberrante o no deseable (modular la proliferación, apoptosis o diferenciación de los linfocitos), inhibir, revertir, mejorar o reducir la autoinmunidad, la inflamación o una respuesta inflamatoria, o por lo menos una parte de los daños tisulares causados por una respuesta inmunitaria no deseable o aberrante (inhibir o evitar la progresión de la enfermedad, estimular o potenciar la reversión de la enfermedad o la regeneración tisular) y normalizar el número de esplenocitos T o B o el patrón de respuesta de los mismos a uno o más mitógenos.

De esta manera, una composición puede incluir PA en cantidad suficiente para modular la proliferación, apoptosis o diferenciación de los linfocitos. Una composición puede incluir una cantidad de PA en cantidad suficiente para inhibir, revertir, mejorar o reducir la autoinmunidad, la inflamación o una respuesta inflamatoria. Una composición puede incluir una cantidad de PA en cantidad suficiente para inhibir, revertir, mejorar o reducir por lo menos una parte de los daños celulares, tisulares u orgánicos causados por una respuesta inmunitaria no deseable o aberrante. Una composición puede incluir una cantidad de PA en cantidad suficiente para re-regular o normalizar el número de esplenocitos T o B o la respuesta de los mismos a uno o más mitógenos. Para un ratón, la cantidad de PA puede ser inferior a 1 μg . La cantidad de PA también puede ser inferior a 1 μg aunque superior a 0,01 picogramos (pg). La cantidad de PA puede ser de entre inferior a 0,5 y de 0,1 μg aunque superior a 0,1 pg. La cantidad de PA puede ser de entre inferior a 0,1 y de 0,01 μg aunque superior a 1 pg. La cantidad de PA puede ser de entre inferior a 1 y de 0,1 μg pero superior a 1 pg, de entre inferior a 0,1 y de 0,01 μg aunque superior a 1 pg; de entre inferior a 0,01 y de 0,001 μg aunque superior a 1 pg; de entre inferior a 1 y de 0,5 ng aunque superior a 1 pg; de entre inferior a 500 y de 250 pg aunque superior a 1 pg; de entre inferior a 250 y de 50 pg aunque superior a 5 pg, y de entre inferior a 50 y de 25 pg aunque superior a 5 pg, por ejemplo de 20, 15, o de aproximadamente 10 pg. La cantidad de PA puede no producir una actividad de superantígeno sustancial, una estimulación sustancial de inmunidad humoral o es sustancialmente independiente de la unión de Fc. Las cantidades de PA equivalentes, respecto a las cantidades de PA que proporcionan actividad en el ratón, sin producir una actividad sustancial de superantígeno una inmunidad humoral sustancial, se encuentran comprendidas en el intervalo de entre aproximadamente 25 y 250, de entre 250 y

500, de entre 500 y 1.000, de entre 1.000 y 2.500 o de entre 2.500 y 5.000, de entre 5.000 y 25.000, de entre 5.000 y 50.000 pg/kg, y de entre aproximadamente 50 y 500, de entre 500 y 5.000, de entre 5.000 y 25.000 o de entre 25.000 y 50.000 ng/kg.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "sin sustancial" o "sustancialmente independiente" utilizadas en referencia a la actividad de superantígeno, la estimulación de la inmunidad humoral o la unión a Fc de la PA, se refiere a que la característica a la que se hace referencia no contribuye significativamente a la actividad observada de la PA en dicha cantidad. De esta manera, una cantidad de PA que no produce actividad sustancial de superantígeno se refiere a que la actividad de superantígeno de PA no contribuye significativamente a la actividad de dicha cantidad de PA. De manera similar, una cantidad de PA que no produce una estimulación sustancial de inmunidad humoral puede producir un nivel reducido de actividad humoral aunque nuevamente la inmunidad producida no contribuye significativamente a la actividad de la PA a la cantidad de PA utilizada. De manera similar, una cantidad de PA que es sustancialmente independiente de unión de Fc se refiere a que la unión de Fc no contribuye significativamente a la actividad de la PA a la cantidad de PA utilizada. En otras palabras, la eliminación o interferencia con la función de Fc de la PA no destruiría la actividad de la PA a la cantidad utilizada. En general, con las reducidas cantidades de PA utilizadas, la actividad de superantígeno, la estimulación de la inmunidad humoral o la unión de Fc de la PA no contribuye significativamente a la actividad de la PA.

20 La actividad de superantígeno se caracteriza típicamente mediante la estimulación de la proliferación de subgrupos no específicos de células T. Es decir, la proliferación de las células T es en gran medida independiente de la especificidad de los epítomos. La actividad de superantígeno típicamente estimula la proliferación de aproximadamente 5% a 10% de las células T, mientras que un antígeno convencional puede estimular aproximadamente 1 a 10^6 células en un individuo. Por lo tanto, la actividad de superantígeno puede someterse a ensayo determinando el número de células T la proliferación de las cuales resulta estimulada. Los ejemplos de dichos ensayos se describen en, por ejemplo, Johnson *et al.*, Scientific American, abril de 1992, páginas 92 a 101, y Kotzin *et al.*, Adv. Immunol. 54:99, 193. Los ensayos de superantígeno y de unión de Fc se describen en, por ejemplo, Romagnani *et al.*, J. Immunol. 129:596, 1982. Los ensayos de unión de Fc se describen en, por ejemplo, Langonee J.J., Adv. Immunol. 32:157, 1982. La estimulación de los ensayos de inmunidad humoral se describe en, por ejemplo, Leonetti *et al.*, J. Exp. Med. 189:1217, 1999.

30 Por lo tanto, los procedimientos indicados en la presente memoria pueden ponerse en práctica utilizando las composiciones indicadas en la presente memoria. Por ejemplo, en un ratón una cantidad eficaz de PA es una dosis de entre aproximadamente 0,1 picogramos y aproximadamente 1 microgramo. Una cantidad eficaz de PA puede ser una dosis de entre aproximadamente 1 picogramo y aproximadamente 1 microgramo. Una cantidad eficaz de PA puede ser una dosis de entre aproximadamente 10 picogramos y aproximadamente 1 microgramo. Una cantidad eficaz de PA puede ser una dosis de entre aproximadamente 10 picogramos y aproximadamente 0,1 microgramo. Una cantidad eficaz de PA puede ser una única dosis de entre aproximadamente 10 picogramos y aproximadamente 0,1 microgramos. Se describen además en la presente memoria cantidad de PA equivalentes según el peso. Por ejemplo, una cantidad equivalente de PA se encuentra comprendida en el intervalo de aproximadamente 25 a 250, de 250 a 500, de 500 a 1.000, de 1.000 a 2.500 o de 2.500 a 5.000, de 5.000 a 25.000, de 5.000 a 50.000 pg/kg, y en el intervalo de aproximadamente 50 a 500, de 500 a 5.000, de 5.000 a 25.000 o de 25.000 a 50.000 ng/kg.

45 Las composiciones pueden administrarse sistémicamente o localmente por cualquier vía. Por ejemplo, la PA puede administrarse por vía intravenosa, oral (por ejemplo por ingestión o inhalación), intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intracavitaria, intracraneal, transdérmica (tópica), parenteral, por ejemplo transmucosal y rectal. Las composiciones indicadas en la presente memoria, incluyendo las formulaciones farmacéuticas, pueden administrarse mediante un sistema de administración microencapsulada o empaquetarse en un implante para la administración.

50 Las composiciones incluyen además formulaciones farmacéuticas que contienen PA en una cantidad que presenta una o más de las actividades dadas a conocer en la presente memoria. Una formulación farmacéutica puede incluir PA en una cantidad suficiente para re-regular o normalizar la respuesta inmunitaria humoral o celular aberrante o no deseable (modulación de la proliferación, apoptosis o diferenciación de los linfocitos), inhibir, revertir, mejorar o reducir la autoinmunidad, la inflamación o una respuesta inflamatoria, o por lo menos una parte de los daños tisulares causados por una respuesta inmunitaria no deseable o aberrante (inhibir o prevenir la progresión de la enfermedad, estimular o potenciar la reversión de la enfermedad o la regeneración del tejido), normalizar el número de esplenocitos T o B o la respuesta de los mismos a uno o más mitógenos, sin actividad sustancial de superantígeno, sin estimulación sustancial de la inmunidad humoral o de manera sustancialmente independiente de la unión de Fc y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" se refieren a portadores, excipientes, diluyentes y similares que pueden administrarse en un sujeto, preferentemente sin producir efectos secundarios adversos excesivos (por ejemplo náuseas, dolor abdominal, cefaleas, etc.). Entre dichas preparaciones para la administración se incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles.

65

- 5 Pueden prepararse formulaciones farmacéuticas a partir de portadores, diluyentes, excipientes, solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración en el sujeto. Dichas formulaciones pueden encontrarse contenidas en una tableta (recubierta o no recubierta), cápsula (dura o blanda), microperlas, emulsión, polvos, gránulos, cristales, suspensión, jarabe o elixir. También pueden encontrarse presentes compuestos y conservantes activos complementarios, entre otros aditivos, por ejemplo antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares.
- 10 Puede formularse una formulación farmacéutica para que resulte compatible con su vía de administración deseada. De esta manera, entre las formulaciones farmacéuticas se incluyen portadores, diluyentes o excipientes adecuados para la administración por vías entre las que se incluyen intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo ingestión o inhalación), intravenosa, intracavitaria, intracraneal, transdérmica (tópica), parenteral, por ejemplo transmucosal, y rectal.
- 15 Entre las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluirse los siguientes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilén-diamina-tetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácido o bases, tales como el ácido clorhídrico o el hidróxido sódico. La preparación parenteral puede envasarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple realizados en vidrio o plástico.
- 20 Entre las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la inyección se incluyen soluciones acuosas (en caso de ser solubles en agua) o dispersiones estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, entre los portadores adecuados se incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). El portador puede ser un solvente 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 una dispersión y mediante la utilización de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Pueden incluirse en la composición agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico. Puede conseguirse la absorción prolongada de las formulaciones inyectables mediante la inclusión de un agente que retarde la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio o gelatina.
- 25 Para la administración oral, puede incorporarse una composición con excipientes en forma de tabletas, trociscos o cápsulas, por ejemplo cápsulas de gelatina. Los agentes ligantes y/o materiales adyuvantes compatibles farmacéuticamente pueden incluirse en formulaciones orales. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los ingredientes siguientes, o compuestos de una naturaleza similar: un ligante, tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina, un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal, un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina, o un agente saborizante, tal como menta, salicilato de metilo o saborizante.
- 30 Las formulaciones pueden incluir además portadores para proteger la composición frente a la degradación rápida o eliminación por el cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo materiales que se degradan lentamente en el cuerpo y a su vez liberan el principio o los principios activos. Por ejemplo, puede utilizarse un material de retardo temporal, tal como el monoestearato de glicerol o el estearato de glicerol solo, o en combinación con una cera.
- 35 Entre las formulaciones adicionales se incluyen partículas biodegradables o biocompatibles o una sustancia polimérica, tal como poliésteres, ácidos poliamina, hidrogel, polivinil-pirrolidona, polianhídridos, ácido poliglicólico, etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina, o copolímeros de láctido/glicólico, copolímeros de poliláctido/glicólico, o copolímeros de etileno-acetato de vinilo con el fin de controlar la administración de una composición administrada. Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones resultarán evidentes para el experto en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y de Nova Pharmaceuticals, Inc., por ejemplo.
- 40 La tasa de liberación de una composición puede controlarse mediante la alteración de la concentración o composición de dichas macromoléculas. Por ejemplo, la composición puede atraparse en microcápsulas preparadas mediante técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, mediante la utilización de microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina o poli (metilmetacrolato) microcápsulas, respectivamente, o en un sistema de administración de fármaco coloidal. Entre los sistemas de dispersión coloidal se incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, microperlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de

aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Estos sistemas pueden prepararse según procedimientos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo tal como se indica en la patente US n° 4.522.811.

5 Las formulaciones farmacéuticas adicionales que resultan apropiadas para la administración son conocidas de la técnica y son aplicables en procedimientos y composiciones indicadas en la presente memoria (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; The Merck Index, 12a ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ, 1996, y Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., 1993).

10 Entre las composiciones indicadas en la presente memoria se incluyen combinaciones de otras composiciones y pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas indicadas en la presente memoria. Por ejemplo, un fármaco que reduce una respuesta inflamatoria o la inflamación o que estimula la diferenciación de una célula puede incluirse con una cantidad baja de PA. Entre los fármacos ejemplares se incluyen los antiinflamatorios esteroideos (AIE) y no esteroideos (AINE), por ejemplo un corticoesteroide, un inhibidor de Cox-2, o fármacos que afectan al sistema inmunitario, tal como quimocinas y citocinas, tales como interleucinas e interferones.

15 Las composiciones indicadas en la presente memoria, incluyendo formulaciones farmacéuticas, pueden envasarse en kits, que opcionalmente pueden contener instrucciones de utilización, por ejemplo para la puesta en práctica del procedimiento descrito en la presente memoria. Por lo tanto, también se describen kits en la presente memoria. Un kit puede incluir una o más de las composiciones indicadas en la presente memoria (por ejemplo PA), incluyendo formulaciones farmacéuticas, envasadas en material de envasado adecuado. Un kit puede incluir una etiqueta o impreso en el envase para la puesta en práctica del procedimiento descrito en la presente memoria. De esta manera, un kit puede incluir instrucciones para el tratamiento de un sujeto que presenta o está en riesgo de presentar un trastorno o disfunción inmunitaria, *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Un kit puede incluir una etiqueta o impreso en el envase que incluye instrucciones para el tratamiento de un sujeto que presenta un trastorno autoinmunitario con cantidades bajas de PA *in vivo* o *ex vivo*.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "material de envasado" se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de envasado puede conservar la esterilidad de los componentes y pueden realizarse en un material de utilización habitual para dichos fines (por ejemplo papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, hoja de aluminio, ampollas, etc.). La etiqueta o impreso en el envase puede incluir instrucciones escritas apropiadas, por ejemplo para la práctica de un procedimiento indicado en la presente memoria. Por lo tanto, los kits indicados en la presente memoria pueden incluir adicionalmente instrucciones para la utilización de los componentes del kit en un procedimiento indicado en la presente memoria.

25 Las instrucciones pueden incluir instrucciones para la práctica de cualquiera de los procedimientos indicados en la presente memoria. De esta manera, las composiciones farmacéuticas indicadas en la presente memoria pueden incluirse en un envase, paquete o dispensador conjuntamente con instrucciones para la administración en un sujeto. Las instrucciones pueden incluir adicionalmente indicaciones, un criterio de valoración clínica satisfactoria, cualesquiera síntomas adversos que podrían aparecer o la información adicional requerida por la Food and Drug Administration para la utilización en un sujeto humano.

30 Las instrucciones pueden encontrarse en "material impreso", por ejemplo en papel o cartón dentro del kit, sobre una etiqueta adherida al kit o material del envase, o adherido a un vial o tubo que contiene un componente del kit. Las instrucciones pueden comprender una cinta de audio o vídeo que opcionalmente puede incluirse en un medio legible por ordenador, tal como un disco (disco extraíble o disco duro), CD óptico, tal como CD- o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medio de almacenamiento electrónico, tal como RAM y ROM, e híbridos de los mismos, tal como medios de almacenamiento magnético/óptico.

35 Los kits indicados en la presente memoria 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 la inflamación. Entre los fármacos ejemplares se incluyen los antiinflamatorios esteroideos (AIE) y los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), por ejemplo un corticoesteroide, o un inhibidor de Cox-2. Los kits indicados en la presente memoria pueden incluir adicionalmente un agente tamponador, 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 alojarse dentro de un recipiente individual separado. Por ejemplo, un kit puede incluir una única dosis unitaria de una cantidad reducida de PA tal como se indica en la presente memoria (por ejemplo de entre inferior a 1 µg y de 1 pg para un ratón, o una dosis equivalente de entre 50 µg/kg y 50 pg/kg). Alternativamente, un kit puede incluir múltiples formas de dosificación unitaria de una cantidad reducida de PA. Por ejemplo, cada una de las múltiples formas de dosificación unitaria contendría una cantidad reducida de PA en un recipiente individual separado (por ejemplo, cada dosis unitaria de PA sería de entre inferior a 1 µg y de 1 pg por cada dosis para un ratón o una dosis equivalente de entre 50 µg/kg y 50 pg/kg). Los componentes de un kit pueden encontrarse en una mezcla de uno o más recipientes y la totalidad de los diversos recipientes pueden encontrarse dentro de envases individuales o múltiples.

65 A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria

presentan el mismo significado entendido comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se indican en la presente memoria los procedimientos y materiales adecuados.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares "un" o "una", y "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un linfocito" incluye una pluralidad de dichas células.

10 Los ejemplos a continuación pretenden ilustrar, aunque sin limitación, el alcance de la invención según las reivindicaciones.

Ejemplo 1

15 El presente ejemplo describe un modelo de inflamación (artritis) animal y datos histológicos que indican que la PA administrada a concentraciones muy bajas puede reducir la inflamación e inhibir o revertir los daños en los tejidos causados por la inflamación.

20 Se llevaron a cabo tres estudios independientes con tres grupos de cinco animales cada uno (un total de 15 animales por cada grupo de tratamiento). El primer grupo era de control, con inyección de portador de solución salina tamponada con fosfato (PBS). El segundo grupo recibió 100 µg de Enbrel por cada ratón y día. Ésta era la dosis óptima de Enbrel tal como indica el fabricante (Immunex, Corp., Seattle, WA). El tercer grupo recibió la inyección de 10 picogramos (pg, que es equivalente a 500 picogramos/kg) de PA en portador de PBS el lunes, el miércoles y el viernes durante el periodo de tratamiento (Amersham/Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La PA también puede obtenerse Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Pierce Chemical Co., Pittsburgh, PA, y Calbiochem, San Diego, CA.

25 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 susceptibles. La respuesta no alcanza un máximo o un nivel de saturación dentro de los límites temporales utilizados y los animales de control fueron sacrificados al llegar la respuesta a poner en riesgo su estado de salud.

Tabla 1: lecturas de índice clínico de control: modelo CIA

Media	S.D.	S.E.M.	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

35 Tabla 1: datos en bruto de medias de las mediciones de índice clínico de 15 animales de control tratados siguiendo el protocolo CIA. Estos datos son datos agrupados de 3 estudios independientes.

40 La tabla 2 muestra datos similares para las mediciones con calibrador de las patas de los animales del grupo de control durante el mismo periodo de tiempo. Estos datos son similares a los datos de índice clínico, con la excepción de que aparece un nivel de saturación de la respuesta tras el día 10. Este nivel de saturación de la respuesta corresponde a la cinética de las respuestas inflamatorias inducidas por anticuerpos típicas.

Tabla 2: mediciones de patas de control: modelo CIA

Media	S.D.	S.E.M.	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

5 Tabla 2: datos en bruto de medias de mediciones de pata con calibrador de 15 animales de control tratados siguiendo el protocolo CIA. Estos datos son datos agrupados de 3 estudios independientes.

10 El análisis histológico de rodillas y tobillos de un animal de control obtenido el día 15 de la respuesta inflamatoria indicó una infiltración inmunitaria y destrucción de los tejidos extensivos. Los inmunocitos se acumulaban en el sinovio de los animales de control. Los animales tratados con Enbrel el día 35 mostraron una infiltración inmunitaria continua en el sinovio de las rodillas y tobillos y pruebas de una destrucción continua de los tejidos.

15 La tabla 3 resume los resultados del examen histológico de las articulaciones de rodilla y de tobillo de animales DBA/1 no tratados de control. Estas valoraciones fueron asignadas al azar (estudio ciego) por el histólogo en una escala continua de 1 a 10, en la que 1 representa una apariencia histológica "normal" y 10, un grado de daño elevado. Las articulaciones de rodilla y tobillo de los animales de control tras la inducción con colágeno mostraron el máximo daño en los tejidos ("10"). Esto correlaciona tanto con el índice clínico (Tabla 1) como con los datos de mediciones físicas (Tabla 2).

20 Tabla 3: evaluación histológica del modelo CIA: animales de control

Tejido	Evaluación histológica	N
Tobillo	10	15
Rodilla	10	15

25 Los animales tratados con PA el día 35 de la respuesta inflamatoria mostraron muchas menos pruebas de infiltración inmunitaria y sólo pruebas débiles de la destrucción de tejido. Sólo se encontraron unos cuantos inmunocitos del huésped en el sinovio y no se encontraron pruebas de fragmentos de tejido o de destrucción de tejido. Por lo tanto, estos datos demuestran que la PA reduce la inflamación aguda en el modelo CIA. Además, estos datos demuestran que la PA reduce el daño en los tejidos o estimula la reparación de los tejidos más que el Enbrel.

30 Las tablas 4 y 5 muestran los resultados de 3 estudios independientes que someten a ensayo el efecto de la PA (10 pg/inyección por cada ratón (500 pg/kg), L/M/V). Se sometió a ensayo Enbrel para la comparación; los resultados obtenidos eran comparables con los resultados publicados. El tratamiento de PA resultó muy eficaz, alcanzando la significación a aproximadamente 10% del número de animales requeridos para el estándar de Enbrel. Los resultados para el índice clínico total (Tabla 4) y las mediciones físicas (Tabla 5) eran comparables.

35 Tabla 4: tratamiento de PA en el modelo CIA (índice clínico total)

Datos agrupados:			I.C.	
Tratamiento	Día	Media	N	P[1-cola]
Control	15	3,52	25	
	17	3,88	25	
	19	2,25	20	
Proteína A	15	1,92	25	<u>0,03</u>
	17	1,95	24	<u>0,02</u>

	19	1,40	20	<u>0,04</u>
Enbrel	15	2,79	24	0,17
	17	3,41	24	0,30
	19	2,85	20	0,11

Tabla 5: tratamiento de PA en el modelo CIA (mediciones)

Datos agrupados:			Medic.	
Tratamiento	Día	Media	N	P[1-cola]
Control	15	212,3	40	
	17	218,1	40	
	19	217,4	20	
Proteína A	15	195,4	36	<u>0,02</u>
	17	191,4	36	<u>0,001</u>
	19	197,2	20	<u>0,05</u>
Enbrel	15	204,2	36	0,18
	17	209,1	36	0,18
	19	230,3	20	0,19

5 La tabla 6 muestra los resultados de una evaluación histológica de ratones DBA/1 sacrificados a la 1, 2 y 3 semanas durante su régimen de tratamiento. Tanto el tratamiento de PA como de Enbrel mostraron daños significativos al nivel de los tejidos. Estos datos demuestran que a pesar de las reducciones significativas del índice clínico total y las mediciones de patas (Tablas 4 y 5) todavía se observan daños al nivel de los tejidos. El tratamiento de la PA aparentemente retrasa el daño en los tejidos (semana de tratamiento uno frente al control) pero no lo evita por completo.

Tabla 6: tratamiento de PA y daños histológicos

	Control	PA	Enbrel
1 semana	Tobilla: 10 Rodilla: 10	Tobilla: 8 Rodilla: 0-5	Tobilla: 1-5 Rodilla: 0-10
2 semanas	Tobilla: 10 Rodilla: 10	Tobilla: 10 Rodilla: 10	Tobilla: 10 Rodilla: 10
3 semanas	Tobilla: 10 Rodilla: 10	Tobilla: 10 Rodilla: 10	Tobilla: 10 Rodilla: 10

15 Los ratones DBA/1 inducidos con colágeno de tipo II siguiendo el protocolo del modelo CIA se trataron inmediatamente después de la segunda inyección de antígeno: portador solvente (PBS) para el control, PA (10 pg en cada inyección (500 pg/kg) en cada ratón L/M/V) y Enbrel (100 µg/inyección o 5 mg/kg cada día).

20 La tabla 7 muestra los resultados histológicos tras la extensión del tratamiento a 35 días. Los ratones de control se sacrificaron a los 18 días por motivos humanitarios y se incluyeron los datos de día 18 de los mismos a título comparativo. El tratamiento de Enbrel no mostró mejora del daño histológico. En contraste, el tratamiento de PA revertió el daño histológico a los 14-21 días. Estos datos histológicos se correlacionan con el índice clínico total de estos animales. De esta manera, el tratamiento de PA redujo significativamente la severidad de la respuesta inflamatoria aguda y la continuación del tratamiento revertió los daños tisulares existentes causados por la respuesta.

Tabla 7: tratamiento extendido de PA y evaluación histológica

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

30 La evaluación histológica de dichos tejidos incluyó una evaluación a magnificación baja, intermedia y alta. Tanto en el grupo de control (a los 18 días, tiempo del sacrificio) como en el grupo de tratamiento de Enbrel, el sinovio presentaba un gran número de linfocitos activados, mientras que el grupo de PA en el día 35 de tratamiento presentaba un número reducido de células linfoides en número y morfología similares a los observados en los animales DBA/1 antes de la inducción de antígeno colágeno de tipo II.

35 En resumen, dichos datos demuestran que las mediciones de patas y las evaluaciones de índice clínico documentan

la respuesta inflamatoria inducida en el modelo animal CIA; que la PA reduce la respuesta inflamatoria durante la fase aguda (valores de P frente al control <0,05) y revierte el daño histológico causado por la respuesta llegado al día 35 de tratamiento; que la PA presenta su efecto de mejora a concentraciones y programas de administración predichos por el modelo animal BXSB y las evaluaciones de cultivo de tejidos (comentadas en mayor detalle posteriormente), y que el Enbrel sí redujo la inflamación llegado el día 14 (no significativamente con N=15) pero no redujo los daños inflamatorios según las observaciones realizadas el día 35, indicando que la PA resulta más eficaz que el Enbrel.

Ejemplo 2

El presente ejemplo describe datos que indican que el mecanismo de acción (MDA) de la PA aparentemente es diferente del de Enbrel.

El MDA aceptado para el modelo animal CIA es la inhibición competitiva de la expresión del FNT- α . El Enbrel es un conocido inhibidor de FNT- α . El análisis de regresión de los datos de Enbrel indican un retraso en la aparición de la respuesta inflamatoria. En contraste, el análisis de regresión de los datos de PA sugiere una alteración del proceso inflamatorio mismo. Por lo tanto, el MDA de la PA aparentemente no se produce principalmente a través de la inhibición del FNT- α . Además, la PA no sólo resulta más eficaz que el Enbrel en la reducción de la respuesta inflamatoria inducida en animales tratados sino que también es capaz de revertir los daños tisulares preexistentes causados por dicha respuesta.

Aunque sin restringirse a ninguna teoría en particular, la PA puede, por lo tanto, "modular" un mecanismo de control basal responsable de integrar las respuestas inmunodependientes. Este MDA comprendería la inhibición del FNT- α aunque desde una perspectiva autorreguladora en lugar de una simple inhibición competitiva de la molécula diana. Se predice que dicho MDA presentaría las propiedades siguientes:

- 1) necesidad de cantidades reducidas: un efecto regulador sobre un mecanismo de control primitivo que "se ramifica" para influir sobre mecanismos adicionales,
- 2) autorregulador: en el caso de que la PA actúe en un punto de control más temprano, el sistema presentará la capacidad de regular la intensidad y la dirección del mecanismo, resultando en pocos o ningún efecto secundario,
- 3) diana pleiotrópica, es decir, no específico de linaje celular, en el caso de que el punto de control de la PA sea temprano, el control posterior debería ser diversos y la concentración de la PA y el programa de administración deberían ser constantes, y
- 4) la estructura de la molécula efectora PA debería observarse asociada a varias estructuras más complejas.

Ejemplo 3

El presente ejemplo describe datos que indican que la PA presenta múltiples actividades moduladoras en un modelo animal caracterizado por una enfermedad de deficiencia autoinmunitaria combinada que presenta una base genética que resulta en la muerte temprana. En particular, la PA evita la aparición temprana de la emaciación, la expansión del compartimiento esplénico, regula la inmunidad humoral (autoanticuerpos), la inmunidad celular (equilibrio TH₁/TH₂) y la diferenciación de las células linfoides, así como la mejora de los daños tisulares causados por los procesos de enfermedad.

El modelo murino BXSB es un modelo animal basado en un gen (Yaa) que se manifiesta con la muerte precoz en varones, típicamente por insuficiencia renal. Este modelo se considera en la literatura como un análogo del lupus sistémico humano. El defecto génico se expresa como una serie de enfermedades autoinmunitarias sistémicas progresivas interrelacionadas que presentan el patrón siguiente: atrofia tímica, anticuerpos antinucleares, enfermedad hepática, enfermedad artrítica, enfermedad renal y muerte precoz.

Debido a que el anterior es un modelo genético con múltiples resultados, los estudios anteriores por otros investigadores se han concentrado en aspectos individuales de la enfermedad. El efecto de la PA sobre múltiples aspectos del proceso de enfermedad estudiado en la presente memoria incluye:

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 esplénico y
- b. recuento celular
- 5 3. dinámica de los linfocitos
 - a. respuestas T/B a los estímulos mitogénicos
- 10 4. función de los linfocitos
 - a. inmunidad humoral
 - i. producción de Ig-CFP
 - 15 ii. autoanticuerpos: ANA, anticardiolipina
 - b. inmunidad celular
 - i. asesinas naturales
 - 20 c. marcadores de superficie celular
 - d. citocinas celulares

25 **Diseño del estudio:**

- 30 1. Tratamiento crónico, anormal: se trataron grupos de 25 BXSB macho (control + 4 grupos de tratamiento) con PA el L/M/V durante un periodo de 15 semanas con sacrificios periódicos de parte de cada grupo (habitualmente cada 3 semanas de tratamiento).
- 35 2. Tratamiento crónico, normal: se trataron grupos de 15 C57BL/6J macho con PA el L/M/V durante un periodo de 15 semanas con sacrificios periódicos de parte de cada grupo (habitualmente cada 3 semanas de tratamiento).
- 40 3. Tratamiento agudo, anormal: se trataron grupos de 15 BXSB macho durante 3 semanas con las cantidades de PA determinadas anteriormente y después se sacrificaron los animales 3, 6 y 9 semanas después del tratamiento.
- 45 4. Tratamiento agudo, normal: se trataron grupos de 15 C57BL/6J macho durante 3 semanas con las cantidades de PA determinadas anteriormente y después se sacrificaron los animales 3, 6 y 9 semanas después del tratamiento.

Determinación de la concentración de PA:

45 Se administraron cantidades de PA en BXSB en ocho logarítmicos de concentración, entre 1 µg/inyección y 10^{-7} µg/inyección (entre 50 µg/kg y 5 pg/kg). Los resultados indican dos óptimos de PA, uno en 0,01 µg/inyección (5 µg/kg) y otro en 10^{-5} µg/inyección (50 pg/kg). La forma de las curvas de dosis-respuesta son gaussianas. En aras de la claridad los datos se presentan para 10^{-5} µg/inyección (50 pg/kg, figura 1).

50 La figura 1 muestra la ganancia de peso de BXSB macho tras la administración de PA. Los pesos se obtuvieron en cada ocasión en que se inyectó en los animales portador o PA. El panel A es la curva de ganancia de peso para una cepa de ratones C57BL/6J normales y se presenta para mostrar la forma típica de una curva de ganancia de peso normal. El panel B muestra la suma acumulada de datos de ganancia de peso de 25 ratones BXSB macho de control. Esta curva muestra un pico de peso en aproximadamente 4 meses de edad seguida de una reducción del peso corporal, que corresponde al inicio informado de enfermedad autoinmunitaria en BSXB. La reducción del peso corporal conduce al síndrome de "emaciación" ligada a la deposición de complejo inmunitario en el riñón.

60 El panel C muestra el efecto de la administración crónica de PA a las dos concentraciones óptimas (8 concentraciones estudiadas). Tanto el caso de 0,01 µg/inyección (0,5 µg/kg) como el caso de 0,00001 µg/inyección (0,0005 µg/kg) mostraron cambios significativos de la forma de la curva de ganancia de peso, ajustándose mejor a la forma logística normal que al BXSB de control y el peso medio de ambos grupos de animales tratados era significativamente superior al del control ($X=24,16$, $P=0,0002$ para la dosis de 10^{-5} µg (0,0005 µg/kg)).

65 Con el fin de analizar dichas curvas de crecimiento y compararlas al tratar los grupos de animales BXSB con PA, se llevó a cabo un análisis de regresión con los datos. Los datos de crecimiento de C57BL/6J presentados anteriormente se representan mejor con la ecuación cúbica siguiente:

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

5 El valor de R cuadrado indica un ajuste extremadamente bueno entre los datos reales y la ecuación de la línea. La ecuación misma es una extracción relativamente simple de una curva de forma "logística", que es típica de las curvas de crecimiento normales (figura 1).

Existen cuatro conjuntos de datos separados para la curva de crecimiento de BXSB de control. Todos los grupos de datos concuerdan internamente y la ecuación global para los datos agrupados es la siguiente:

10 BXSB agrupados -- $y = -0,0001x^3 + 0,0034x^2 + 0,1851x + 18,746$ [$R^2=0,9384$]

15 Dicha ecuación es una representación cuantitativa de las diferencias de forma de la curva observadas en la figura 1, paneles A y B. Las funciones cúbica y cuadrática definen la forma global y los valores muy bajos definen la tasa de incremento del peso y la etapa de "emaciación", en las que se observa la reducción de los pesos como función del tiempo. En el presente estudio el objetivo no era producir una curva de crecimiento de BXSB "similar" a la curva de C57BL/6J, ya que cada cepa presenta sus propias características de crecimiento específicas, sino incrementar la tasa de crecimiento inicialmente y reducir o eliminar la "etapa de emaciación" evidente en la figura 1, panel D.

20 La tabla 8 muestra las ecuaciones ajustadas para los diversos grupos de tratamiento de PA de animales BXSB. La pendiente de la curva de crecimiento inicial, que indica la tasa de crecimiento, se encuentra severamente restringida en los animales BXSB de control. El punto de inflexión en los animales BXSB de control indica el efecto letal del proceso de la enfermedad. Los resultados indican que el tratamiento de PA presenta un efecto positivo tanto sobre la tasa de crecimiento como la letalidad de una manera dependiente de la dosis.

25

Tabla 8: efecto de PA sobre la cinética del crecimiento de BXSB ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)

Tratamiento	Ecuación de crecimiento
BXSB agrupados	$y = -0,0001x^3 + 0,0034x^2 + 0,1851x + 18,746$ $R^2 = 0,9384$
Rx 1,0 PA	$y = 4E-06x^3 - 0,4942x^2 + 18171x - 2E+08$ $R^2 = 0,9087$
Rx 0,1 PA	$y = -1E-04x^3 + 10,697x^2 - 392306x + 5E+09$ $R^2 = 0,9463$
Rx 0,01 PA	$y = 3E-05x^3 - 2,8056x^2 + 102980x - 1E+09$ $R^2 = 0,918$
Rx 0,001 PA	$y = 1E-05x^3 - 1,3946x^2 + 51161x - 6E+08$ $R^2 = 0,9773$
Rx 0,0001 PA	$y = -4E-05x^3 + 4,2053x^2 - 154454x + 2E+09$ $R^2 = 0,9487$
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	$y = -5E-06x^3 + 0,5628x^2 - 20666x + 3E+08$ $R^2 = 0,9474$

30 Análisis histológico:

El deterioro histológico de diversos órganos del modelo de ratón BXSB es distintivo de una enfermedad de deficiencia autoinmunitaria combinada. Este síndrome es multifacético e implica varios órganos. El daño orgánico es progresivo y el daño individual puede variar según el tipo de tejido.

35 La tabla 9 muestra los resultados del análisis histológico de cantidades más altas de PA (1 a 0,001 $\mu\text{g}/\text{inyección}$, o 50 a 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e indica que la PA modificó la aparición y/o severidad de los cambios histológicos de una manera dependiente de la dosis. La tabla 10 muestra datos similares para cantidades más bajas de PA (0,00001 a 0,0000001 $\mu\text{g}/\text{inyección}/\text{ratón}$ o 0,0005 a 0,000005 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Ambas dosis de PA mostraron la mayor mejora de la histología orgánica.

40

Tablas 9 y 10: histología de BXSB

Tejido	BXSB de control	Rx 1 µg PA	Rx 0,1 µg PA	Rx 0,01 µg PA	Rx 0,001 µg PA
Timo	4+ (10-20 sem.)	4+ (16-20 sem.)	4+ (10-20 sem.)	4+ (16-20 sem.)	4+ (12-13 sem.)
Hígado (doble núcleo)	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	Desintegración de fibras 20 sem.	Inflamación 19 sem.	Inflamación 10 sem.	Inflamación 16 sem.	normal

Tejido	BXSB de control	Rx 0,0001 µg PA	Rx 0,00001 µg PA	Rx 0,000001 µg PA	Rx 0,0000001 µg PA
Timo	4+ (11-22 sem.)	normal	4+ (11-22 sem.)	4+ (22 sem.)	4+ (22 sem.)
Hígado (doble núcleo)	Inflamación local 20 sem.	N/A	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

5 Los resultados en las tablas 9 y 10 indican que el tratamiento de PA de los ratones BXSB fue capaz de reducir el daño autoinmunitario de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento retrasó la aparición de la atrofia tímica y redujo la severidad de la inflamación del hígado y articulaciones. Los riñones se mantuvieron en un intervalo normal. Los tejidos de los animales tratados con PA mostraron una reversión del daño presente en los tejidos de control de BXSB, aunque no eran completamente normales en comparación con los animales C57BL/6J. La dosis de PA óptima era de 0,0001 µg (0,005 µg/kg), que era consistente con los otros sistemas de ensayo (por ejemplo producción de Ig-CFP, actividad de NK, patrón de respuesta de mitógenos, producción de citocinas, producción de autoanticuerpos, tamaño del bazo y mejoras histológicas).

10 En resumen, los estudios indican que la PA evita la aparición temprana de la emaciación y mejora o revierte los daños causados por los procesos de enfermedad autoinmunitarios en los tejidos, incluyendo el timo, el hígado, el riñón, la rodilla y el tobillo.

Ejemplo 4

20 El presente ejemplo describe datos que indican que la PA presenta actividad inmunomoduladora (por ejemplo la proliferación, apoptosis o diferenciación) en el bazo, reflejada en la inhibición de la expansión esplénica y el número de células esplenocitos.

25 Se extirparon los bazos de los animales durante los estudios. El bazo de C57BL/6J normal era un punto de referencia. Los bazos de animales BXSB no tratados se encontraban significativamente agrandados. En contraste, los animales BXSB tratados con PA presentaban un tamaño similar al del bazo de C57BL/6J normal.

30 El bazo agrandado en animales BXSB no tratados se conoce como esplenomegalia y es el resultado de un proceso infeccioso sistémico masivo o de la apoptosis o proliferación celular aberrante. Debido a que dichos animales fueron mantenidos en un medio estéril, el bazo agrandado probablemente es el resultado de un control defectuoso del crecimiento/muerte celular. Otra explicación para un bazo agrandado sería que las células habrían incrementado su tamaño individual, un proceso conocido como blastosis. El examen de los datos de separación celular activada por fluorescencia (FACS) para medir el tamaño celular descartó dicha posibilidad. El análisis de FACS reveló que, aunque se observaba una tendencia a células ligeramente más grandes en los BXSB de control, no se observaba un incremento estadísticamente significativo del tamaño celular. Es consistente con dichos resultados que el número de esplenocitos de BXSB era cinco veces superior que en animales normales (Tabla 11, parte superior).

Tabla 11: efecto de la PA sobre la esplenomegalia
FED

	BXSB de control	C57BL/6J	DBA/2J
MEDIA	5×10^8	9×10^7	1×10^8
SEM	4×10^7	7×10^6	6×10^6
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	1×10^8	$8,68 \times 10^{-3}$	1×10^8	$7,32 \times 10^{-4}$	7×10^7	$1,02 \times 10^{-6}$	1×10^8	$8,92 \times 10^{-6}$
SEM	7×10^7		5×10^7		4×10^7		4×10^7	
N	3		3		5		4	
	Rx 10^{-4} PA	Valor de P	Rx 10^{-5} PA	Valor de P	Rx 10^{-6} PA	Valor de P	Rx 10^{-7} PA	Valor de P
MEDIA	3×10^8	$1,73 \times 10^{-2}$	1×10^8	$6,7 \times 10^{-5}$	3×10^8	$9,54 \times 10^{-2}$	2×10^8	$7,26 \times 10^{-5}$
SEM	6×10^7		3×10^7		1×10^8		4×10^7	
N	4		3		4		5	

5 La tabla 11 (parte superior) muestra el contenido de los bazo de ambas cepas de ratón de control, CD57BL/6J y DBA/2J y BXSB macho. El número de células esplenocitos de BXSB era más de 5 veces el observado para cualquiera de las cepas normales. El tratamiento de PA redujo significativamente el número de esplenocitos en BXSB (Tabla 11, parte inferior).

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

15 **Ejemplo 5**

El presente ejemplo describe datos que indican que los animales BXSB mostraban una diferenciación o proliferación o apoptosis de los esplenocitos aberrante. Por lo tanto, dichos datos indican que la actividad de PA en el bazo de BXSB incluye la re-regulación de la diferenciación de esplenocitos aberrante/deficiente o de la proliferación/apoptosis de los esplenocitos (es decir, restauraba la proliferación o apoptosis de las células normales).

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

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

Brevemente, se sacrificaron periódicamente ratones BXSB y de control durante el régimen de tratamiento y se extrajeron los bazo de los mismos. Se dispensaron suspensiones de células esplenocitos a una densidad de 1 a 2×10^6 /ml en placas de 96 pocillos. Se añadieron mitógenos (entre $10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ y $0,01 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) por triplicado a los pocillos y los cultivos se recolectaron a intervalos de 24 horas entre las 24 y las 96 horas de cultivo. Todos los cultivos se trataron con timidina tritjada durante 16 horas antes de la recolección. El ADN, incluyendo el ADN marcado radioactivamente nuevamente sintetizado, se extrajo sobre filtros de fibra de vidrio y se determinó la radioactividad mediante recuento de centelleo líquido.

Tabla 12: respuestas de mitógenos normales (C57BL/6) (índice de estimulación, I.E.)

PHA: I.E.	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
S.D.	11,39	13,47	14,00	11,47	3,40	1,69	0,57
S.E.M.	2,15	2,55	2,65	2,17	0,64	0,32	0,11
Recuento	27	27	27	27	27	27	27

Con-A: I.E.	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
S.D.	0,27	1,50	32,63	15,80	1,94	1,08	2,99
S.E.M.	0,05	0,28	6,17	2,99	0,37	0,20	0,56
Recuento	27	27	27	27	27	27	27

SEB: I.E.	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
S.D.	11,49	8,69	6,14	5,57	4,57	2,47	0,55
S.E.M.	2,17	1,64	1,16	1,05	0,86	0,47	0,10
Recuento	27	27	27	27	27	27	27

LPS: I.E.	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
S.D.	46,55	46,89	46,30	52,67	41,29	36,17	29,92
S.E.M.	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

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

10 Tabla 13: respuestas de mitógenos de ratones BXSB

PHA: I.E.	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
S.D.	6,29	1,40	1,56	2,11	1,76	0,81	0,88
S.E.M.	0,87	0,19	0,22	0,29	0,24	0,11	0,12
N	39	39	39	39	39	39	39

Con-A: I.E.	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
S.D.	1,02	2,07	4,32	3,69	3,46	0,97	0,93
S.E.M.	0,14	0,29	0,60	0,51	0,48	0,14	0,13
N	39	39	39	39	39	39	39

SEB: I.E.	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
S.D.	3,77	3,18	2,69	3,48	1,66	1,85	1,04
S.E.M.	0,52	0,44	0,37	0,48	0,23	0,26	0,14
N	39	39	39	39	39	39	39

LPS: I.E.	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
S.D.	18,99	20,58	20,78	14,66	5,50	3,76	1,64
S.E.M.	2,63	2,85	2,88	2,03	0,76	0,52	0,23
N	39	39	39	39	39	39	39

15 La tabla 13 muestra los resultados del estudio de mitógenos de ratones BXSB de control. Los análisis estadísticos indican que todas las respuestas de mitógenos eran significativamente inferior a las de los ratones C57BL/6J de control. Además, la forma de las curvas de respuesta de PHA y de Con-A para BXSB de control eran diferentes del control de C57BL/6J normal. Para ambos se produjo un desplazamiento a concentraciones de mitógenos más bajas para alcanzar una respuesta máxima. Estos cambios en la forma de la curva de respuesta se han asociado a cambios en el estado de diferenciación.

20

Tabla 14: comparación estadística entre las respuestas de mitógenos de BXSB y control

	10,00	5,00	1,00	0,50	0,10	0,05	0,01
PHA	1×10^{-10}	2×10^{-11}	2×10^{-11}	5×10^{-7}	5×10^{-2}	N.S.	N.S.
Con-A	N.S.	N.S.	6×10^{-7}	6×10^{-2}	N.S.	N.S.	N.S.
SEB	2×10^{-5}	4×10^{-6}	4×10^{-5}	2×10^{-4}	6×10^{-4}	1×10^{-3}	N.S.

LPS	5x10 ⁻⁹	2x10 ⁻⁸	5x10 ⁻⁷	5x10 ⁻⁶	6x10 ⁻⁵	8x10 ⁻⁵	N.S.
-----	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	------

La tabla 14 muestra una comparación estadística de las respuestas de mitógenos de los ratones BXSB de control y las de los ratones C57BL/6 de control. En prácticamente todos los casos, la amplitud de las respuestas de mitógenos en BXSB resultó suprimida, indicando una disminución de la población celular madura y un desplazamiento en la concentración de respuesta óptima a un valor más bajo. Por lo tanto, estos datos indican una diferenciación aberrante en los esplenocitos de BXSB de control que conduce a una sobreproliferación o a una apoptosis reducida de los esplenocitos.

Tabla 15: respuesta a PHA como función del tratamiento de PA

PHA: I.E.	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
10 ⁻⁴ PA	5,71	2,98	15,14	6,82	6,22	2,73	1,66
10 ⁻⁵ PA	7,73	7,00	8,34	9,80	7,26	3,47	1,89
10 ⁻⁶ PA	2,70	3,13	4,47	4,82	3,84	3,29	2,20
10 ⁻⁷ PA	5,08	5,84	3,41	4,22	3,90	2,37	2,00

Tabla 16: respuesta a Con-A como función del tratamiento de PA

Con-A: I.E.	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
10 ⁻⁴ PA	0,56	1,31	7,29	15,26	6,87	14,56	1,79
10 ⁻⁵ PA	0,76	3,10	5,31	14,29	7,69	12,25	1,34
10 ⁻⁶ PA	1,01	2,34	5,04	15,98	8,03	2,85	2,52
10 ⁻⁷ PA	1,65	2,90	9,05	22,83	8,10	2,17	2,05

Tabla 17: respuesta a SEB como función del tratamiento de PA

SEB: I.E.	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	17,54	10,06	7,37	5,76	5,28	13,82
0,0001 PA	14,60	12,60	9,55	5,72	4,66	4,21	2,05
10 ⁻⁴ PA	8,01	5,15	6,48	4,55	5,12	2,97	1,34
10 ⁻⁵ PA	6,92	8,02	7,94	5,28	4,13	3,54	3,40
10 ⁻⁶ PA	9,34	8,01	9,74	5,82	4,33	5,73	4,20
10 ⁻⁷ PA	5,92	5,67	5,88	6,90	2,33	2,35	2,33

Tabla 18: respuesta a LPS como función del tratamiento de PA

LPS: I.E.	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	13,45
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
10 ⁻⁴ PA	23,10	37,92	32,05	27,29	13,38	20,52	7,49
10 ⁻⁵ PA	27,43	27,18	27,90	28,69	17,44	16,69	8,88
10 ⁻⁶ PA	22,67	21,88	17,14	17,60	12,40	9,27	6,30
10 ⁻⁷ PA	14,49	16,56	17,95	18,56	10,99	7,20	3,40

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

En resumen, los estudios indican que el número de linfocitos esplénicos de BXSB aberrante, así como las respuestas de mitógenos de T y B típicas, pueden corregirse, por lo menos en parte, con el tratamiento de PA.

Ejemplo 6

El presente ejemplo describe datos que indican que la PA reduce la cantidad de autoanticuerpos que probablemente son responsables de la destrucción de los tejidos en los 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 de los pacientes de AR. Se han observado anticuerpos anormales en el sinovio de algunos pacientes. En el modelo de BXSB, se producen anticuerpos anormales.

Se estudiaron células de bazo obtenidas de animales BXSB de control y tratados con PA, en un ensayo de células formadoras de placa (CFP). En este ensayo, se marcan los glóbulos rojos diana con proteína A, que se unirá a cualquier inmunoglobulina secretada con independencia de la especificidad antigénica, proporcionando de esta manera una amplia visión de la inmunidad humoral.

Tabla 19: células productoras de anticuerpos no específicos de BXSB

	BXSB	C57BL/6J
Media	60.333	611,80
S.D.	33.915	658,67
N	45	75,00
SEM	5.056	120,26

La tabla 19 muestra las respuestas de Ig-CFP de esplenocitos de BXSB de control, que son 100X mayores que los esplenocitos de C57BL/6 de control, indicando una producción de anticuerpos aberrante en los animales BXSB.

Tabla 20: tratamiento de PA y producción de Ig-CFP en animales BXSB

	Control de BXSB	Rx 1 PA	Rx 0,1 PA	Rx 0,01 PA	Rx 0,001 PA
Media	60.333	20.741	35.808	27.909	30.533
N	45	11	12	11	15
S.E.M.	5.056	6.603	12.010	2.959	9.581
Valores de P		4,22x10 ⁻⁵	0,04	5,16x10 ⁻⁷	0,01
		Rx 0,0001 PA	Rx 0,00001 PA	Rx 0,000001 PA	Rx 0,0000001 PA
Media		3.850	12.310	16.278	11.042
N		5	10	9	12
S.E.M.		696	2.040	4.068	1.751
Valores de P		7,33x10 ⁻¹⁵	2,92x10 ⁻¹²	3,11x10 ⁻⁸	8,16x10 ⁻¹³

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

Los esplenocitos de BXSB de control producen y segregan anticuerpos a niveles enormes (61.400 ± 6.435 CFP/10⁶). Lo anterior equivale a aproximadamente 100 veces los valores observados en C57BL/6J normales de control. El tratamiento de PA redujo 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 (el número más alto indica cantidades mayores de autoanticuerpos circulantes). El tratamiento de PA reduce los niveles de autoanticuerpos en todos los puntos temporales medidos.

5 Tabla 22: 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
S.E.M	0,14	0,03	0,09	0,03	0,10
Valor de P		0,16	0,07	0,02	0,25

	Control	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
SEM		0,04	0,06	0,03	0,03
Valor de P		0,02	0,02	0,08	0,02

10 La tabla 22 muestra que la reducción mediada por la PA de los autoanticuerpos es dependiente de la dosis. La mayor reducción se produjo con 0,00001 µg.

15 En resumen, la PA regula el número de anticuerpos no específicos, reduciendo la cantidad de autoanticuerpos dañinos. El hecho de que la PA también reduce las células productoras de anticuerpos en bazo de BXSB se correlaciona con estos datos. De esta manera, el tratamiento de PA restaura, por lo menos parcialmente, la inmunidad humoral.

Ejemplo 7

20 El presente ejemplo describe datos que indican que la PA reduce la respuesta de citotoxicidad de los ratones BXSB, re-regulando dicha respuesta en los niveles de línea base o en niveles próximos a los mismos.

25 El componente celular del sistema inmunitario es el integrador de función principal de todo el sistema inmunitario, suministrando las células T y las células B en sus diversas formas diferenciadas para la función tanto de reconocimiento como efectora. En el modelo animal BXSB han aparecido informes de que el sistema inmunitario mediado por células (IMC) se encuentra intacto. Sin embargo, al contrario que dichos informes, los datos indicados posteriormente indican que el sistema IMC resulta afectado en el ratón BXSB.

30 Los ratones BXSB, tanto los de control como los tratados con PA, se estudiaron para su capacidad de reconocer y lisar las dianas no específicas marcadas con cromo radioactivo. Brevemente, se sembraron en una placa de microtitulación aproximadamente 200 µl de células de bazo ($1 \times 10^7/ml$) de ratones BXSB de control y tratados, en medio RPMI y se realizaron cinco diluciones en serie de dos veces en medio RPMI. Las células P815 se marcaron radioactivamente 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 a 4 horas a 37°C. Se recentrifugaron las células y se realizó la medición de Cr^{51} de una muestra de 110 µl. Se encuentra 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

Proporción E/D	BXSB de control		C57BL/6J		BXSB Rx 3 semanas(agudo)	
	% de lisis específica	S.D.	% de lisis específica	S.D.	% de lisis específica	S.D.
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		

40 La tabla 23 muestra que los ratones normales (columna intermedia) presentan un nivel de línea base típico de actividad asesina natural contra la diana P-815 marcada con Cr^{51} ; el nivel es de entre 0% y 3% de citotoxicidad a una proporción de efector: diana de 100:1. La columna izquierda muestra la respuesta de citotoxicidad de ratones BXSB a la misma diana; el nivel de citotoxicidad es extremadamente elevado, superior a 50% a una proporción de efector:diana de 6:1. El tratamiento de PA de BXSB durante un periodo de 3 a 15 semanas (columna derecha)

redujo la citotoxicidad a niveles de línea base, es decir, 0-3% con una proporción E/D de 100:1 sin análisis de regresión posible.

- 5 En resumen, los estudios indican que el tratamiento de PA reduce las respuestas de citotoxicidad de BXSB no reguladas en un factor de 20, hasta niveles de línea base de control o niveles próximos a los mismos. De esta manera, el tratamiento de PA restaura, por lo menos parcialmente, la inmunidad celular.

Ejemplo 8

- 10 El presente ejemplo describe datos que indican que la PA regula la expresión de los marcadores CD, reflejando la regulación de la diferenciación, proliferación o apoptosis de células del linaje linfóide.

La expresión de determinantes agrupados (marcadores CD) indica el estado de diferenciación de las células linfoides. La PA regula específicamente dichos marcadores. Esta regulación presenta correlaciones directas con los datos indicados 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+
BL6 control	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
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 una cola	0,009	0,017	0,006	0,002	0,34	0,0008	0,11	0,07	0,25
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 una cola	$2,5 \times 10^{-12}$	$4,8 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-9}$	$1,7 \times 10^{-12}$	0,002	$3,3 \times 10^{-14}$	0,03	$1,7 \times 10^{-6}$	0,3

- 20 La tabla 24A muestra datos de varios marcadores CD de células T. Aproximadamente 80% de los esplenocitos normales (control BL6) son células T no activadas (CD69-) (CD69-, CD4+). Dicha población se reduce en animales BXSB tanto jóvenes (2 a 10 semanas experimentales y 10 a 18 semanas de edad cronológica) como viejos (11 a 15 semanas experimentales, y 19 a 23 semanas de edad cronológica). También se produjo un efecto cinético: los animales BXSB de 11 a 15 semanas se encontraban comprometidos mucho más severamente en términos de sus marcadores de células T que los animales BXSB más jóvenes. Lo anterior se correlaciona con una función celular reducida y una tasa global de muerte incrementada.

Tabla 24B: perfiles de marcadores CD (continuación)

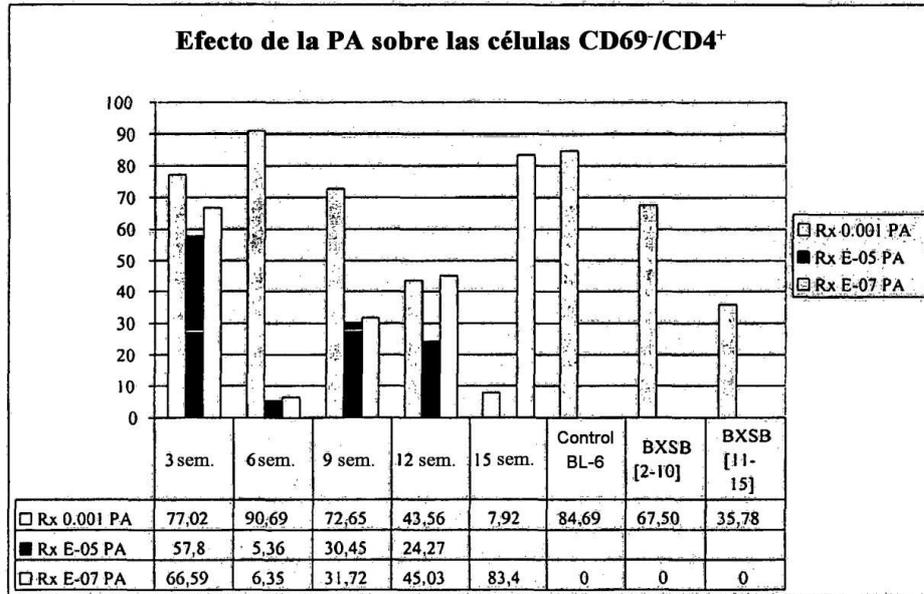
	19+45-	19+45+	19-45+	80+25-	80+25+	80-25+
C57BL/6J	3±0,6	80±2	18±3	70±3	13±1	18±1
BXSB 2-10 SEM.	8±4	60±12	35±11	65±7	17±2	18±5
P [UNA COLA]	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
BXSB 11-15 SEM.	14±7	64±22	22±15	61±6	18±2	21±8
P [UNA COLA]	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

- 30 La tabla 24B muestra datos de varios marcadores CD de células B. El primer conjunto de tres marcadores es indicativo 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 refractaria frente a tanto la cepa como el estadio del proceso de enfermedad en los ratones BXSB. De esta manera, aparentemente el componente inmunitario celular principal del proceso de enfermedad de inmunodeficiencia combinada de BXSB implica células T.

El gráfico 1 representa los datos del efecto del tratamiento crónico (entre 3 y 15 semanas) de ratones BXSB con diferentes concentraciones de PA (10^{-3} a 10^{-7} µg de PA/inyección). La primera característica significativa de dichos datos es que el tratamiento de los 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 que debe esperarse ya que una población celular actúa sobre otras en la serie (y otras series celulares) en mecanismos tanto de retroalimentación como de prealimentación. También se produce un efecto de respuesta a la dosis de PA sobre las poblaciones celulares, con la respuesta indicada anteriormente en los ensayos funcionales; también se produce una respuesta cinética de dosis-tiempo. Estos datos indican que el tratamiento de PA de hecho sí regula la diferenciación de las células T.

El gráfico 1 representa además datos que indican que la dosis de 10^{-3} (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de PA rectifica la reducción de CD69- CD4+ observada en los controles de BXSB en puntos temporales tempranos, aunque posteriormente se pierde dicho efecto en puntos temporales posteriores del tratamiento crónico. En contraste, la dosis de 10^{-7} (50 pg/kg) aparentemente resulta eficaz en puntos temporales tanto anteriores como posteriores. Estos datos son consistentes con las 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 a proceso en lugar de una diana más tradicional de efector único.

10 Gráfico 1



La tabla 25 muestra el efecto de la PA crónica (10^{-5} $\mu\text{g}/\text{dosis}$) administrada tres veces a la semana durante un periodo de 6 y de 9 semanas en comparación con el tratamiento agudo con la misma cantidad tres veces a la semana durante un único periodo de 3 semanas, seguido de 6 y 9 semanas adicionales sin tratamiento. El tratamiento agudo resultó eficaz para modular la expresión de marcadores CD. Aunque los datos son complejos, demuestran la interrelación entre los diversos marcadores; nuevamente la serie CD8 aparentemente resulta menos sensible a la PA que la serie CD4 o de células B.

15

20

Tabla 25

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

La tabla 26 muestra un perfil temporal de una única dosis de PA (10^{-5} μg) en la serie de nueve marcadores de células T utilizada en los presentes estudios. Nuevamente, las células doblemente positivas (destinadas a apoptosis), así como la serie de activación con CD8, eran relativamente resistentes al tratamiento. El tratamiento de PA modulaba la activación de la serie CD4 y de las células T citotóxicas maduras (CD8⁺CD4⁺).

25

Tabla 26

Tratamiento con 0,00001 µg 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		57,06
BL 6 no tratados	7,58	7,63	84,68	73,8	7,6	18,41	29,61	5,01	65,55
BXSB no tratados	44,34	19,69	35,78	15,92	13,91	70,16	22,54	13,69	63,76

5 En resumen, los estudios indican que el tratamiento de PA agudo o crónico regula los marcadores CD de células T en los ratones BXSB de una manera dependiente de la dosis y de la cinética, correlacionándose con los cambios funcionales indicados anteriormente, entre los que se incluyen la restauración parcial de las respuestas mitógenas normales (ejemplo 5), la reducción de la producción de autoanticuerpos (ejemplo 6) y la reducción de la respuesta de citotoxicidad (ejemplo 7). De esta manera, la PA regula la secuencia de diferenciación de las células del linaje linfóide.

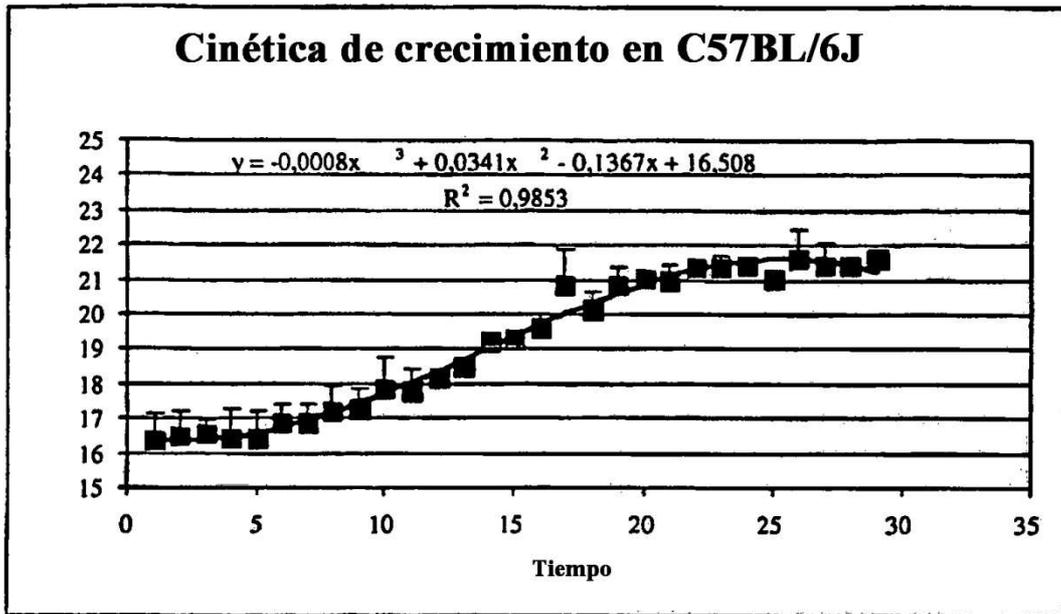
10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una cantidad de proteína A (PA) para la utilización en el tratamiento de una disfunción inmunitaria en un sujeto humano que presenta o en riesgo de una disfunción inmunitaria, en la que la cantidad de proteína A es una dosis en un intervalo desde 0,5 a 5 µg/kg o desde 5,0 a 25 µg/kg.
- 10 2. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la disfunción inmunitaria comprende un trastorno autoinmunitario.
- 15 3. Composición para la utilización según la reivindicación 2, en la que el trastorno autoinmunitario comprende artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis soriática, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, encefalomiелitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis atópica, dermatitis eccematosa, soriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, escleroderma, proctitis, uveítis autoinmunitaria, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, anemia aplásica, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, celiacía idiopática, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, tiroiditis de Hashimoto, diabetes mellitus dependiente de la insulina, diabetes mellitus resistente a la insulina, enfermedad de Addison autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, dermatitis herpetiforme, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, síndrome de Guillain-Barre, fiebre reumática aguda, síndrome de Goodpasture, vasculitis necrotizante sistémica o síndrome antifosfolípido.
- 20 4. Composición que comprende una cantidad de proteína A (PA) para la utilización en la reducción de una respuesta inflamatoria en un sujeto humano que presenta o en riesgo de una respuesta inflamatoria, en la que la cantidad de proteína A es una dosis en un intervalo desde 0,5 a 5 µg/kg o desde 5,0 a 25 µg/kg.
- 25 5. Composición que comprende una cantidad de proteína A (PA) para la utilización en el tratamiento de la inflamación en un sujeto que presenta o en riesgo de inflamación, en la que la cantidad de proteína A es una dosis en el intervalo desde 0,5 a 5 µg/kg o 5,0 a 25 µg/kg.
- 30 6. Composición para la utilización según la reivindicación 5, en la que el tratamiento resulta en una reducción de la intensidad de un síntoma de inflamación.
- 35 7. Composición para la utilización según la reivindicación 6, en la que el síntoma comprende hinchazón, dolor, cefalea, fiebre, náusea, rigidez articular esquelética o daño tisular o celular.
- 40 8. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la disfunción inmunitaria, el trastorno autoinmunitario, la respuesta inflamatoria, o la inflamación es crónica/o o aguda/o.
- 45 9. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la disfunción inmunitaria, el trastorno autoinmunitario, la respuesta inflamatoria, o la inflamación se encuentra por lo menos en parte mediada por un anticuerpo.
- 50 10. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la disfunción inmunitaria, el trastorno autoinmunitario, la respuesta inflamatoria, o la inflamación se encuentra por lo menos en parte mediada por la inmunidad celular.
- 55 11. Composición que comprende una forma de dosificación unitaria de PA suficiente para reducir una respuesta inflamatoria o inflamación en un sujeto humano, en la que la forma de dosificación unitaria es desde 0,5 a 5 µg/kg o 5,0 a 25 µg/kg de PA.
- 60 12. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o composición según la reivindicación 11, en la que el tratamiento es una forma de dosificación única o múltiple en días consecutivos o alternos o intermitentemente.
- 65 13. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o composición según la reivindicación 11, en la que el tratamiento es una dosis administrada intermitentemente durante 1 a 15 semanas.
14. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o composición según la reivindicación 11, en la que el tratamiento es una forma de dosificación múltiple en días alternos o intermitentemente, durante 7 a 45 días o durante 1 a 15 semanas.
15. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o composición según la reivindicación 11, en la que la cantidad de proteína A es una dosis en el intervalo desde 5,0 a 25 µg/kg.

Figura 1

A.



B.

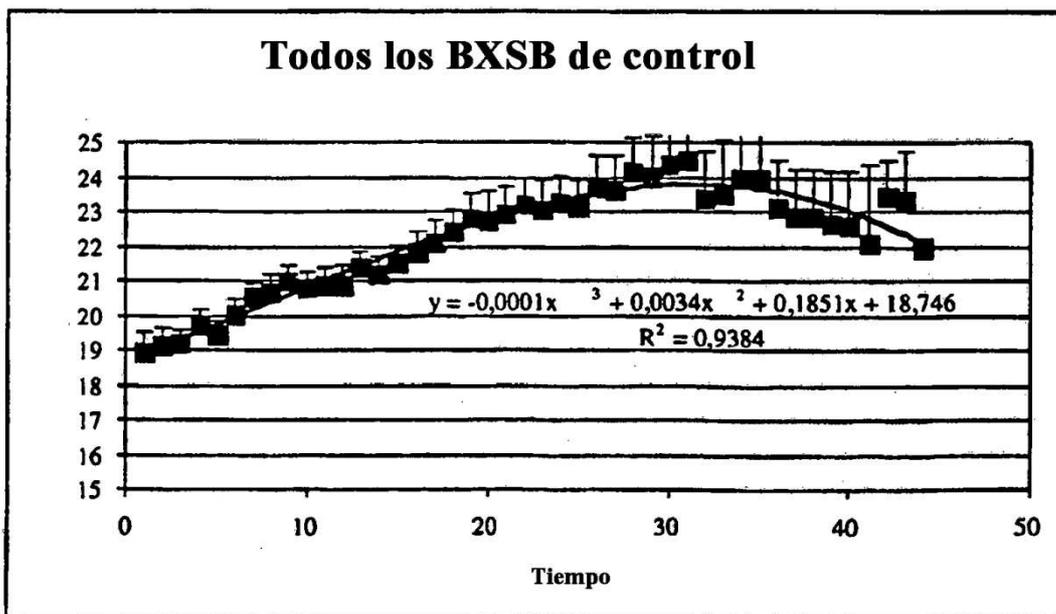


Figura 1C

Pesos con Rx 0,01 PA

