

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 383**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2007 PCT/US2007/016329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2008 WO08011081**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2007 E 07836143 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2046809**

54 Título: **WSX-1/IL-27 como una diana para respuestas antiinflamatorias**

30 Prioridad:

19.07.2006 US 832213 P
11.08.2006 US 837450 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2017

73 Titular/es:

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)
Center for Technology Transfer, 3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia PA 19104-6283, US

72 Inventor/es:

HUNTER, CHRISTOPHER, A. y
STUMHOFER, JASON, SCOTT

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 612 383 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

WSX-1/IL-27 como una diana para respuestas antiinflamatorias

Campo de la invención

5 La invención se refiere a complejos aislados o recombinantes que incluyen WSX-1 soluble o proteínas de fusión de WSX-1 aisladas o recombinantes para el uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias.

Antecedentes de la invención

10 Un número de citocinas recombinantes se usa en una variedad de entornos clínicos. Estas incluyen interleucina-2 (IL-2), GM-CSF, IL-11, IL-12 e interferones (IFN) tipo I. Estas proteínas se están usando principalmente como estimuladores de células inmunitarias y para actuar como factores de crecimiento o para impulsar respuestas anticancerosas o virales. Pocas citocinas se han usado para inhibir el sistema inmunitario; por ejemplo, se ha intentado la inhibición con IL-10, que trabaja indirectamente sobre funciones celulares accesorias necesarias para las funciones de células T y que se estuvo desarrollando específicamente con la enfermedad de Crohn y la enteropatía inflamatoria como dianas, y TGF. El éxito con estos ha sido limitado.

15 Se han probado antagonistas de p 40 de IL-12 en exámenes clínicos para pacientes con enfermedad de Crohn con algún éxito.

20 Se han probado antagonistas de IL-15 en exámenes clínicos para artritis basándose en la observación de que esta citocina estaba implicada en el desarrollo de esta enfermedad.

El antagonista del receptor de IL-1 es un producto disponible comercialmente que se usa para tratar pacientes con artritis reumatoide. Este es un producto que bloquea la interacción de la citocina proinflamatoria IL-1 con su receptor.

25 Varias compañías han desarrollados anticuerpos/antagonistas específicos para la citocina TNF- α que actualmente se usan en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide. Este enfoque se basa en la neutralización de citocina endógena para prevenir la inflamación. Un enfoque similar se ha buscado con anticuerpos específicos para IL-1 e IL-6. Una cuestión de seguridad es que estos tratamientos están asociados con el desarrollo de infecciones oportunistas incluyendo TB y toxoplasmosis. Además, Villarino AV y cols. (J Immunol 2006; 176:237-247) se refiere al problema de tratar una enfermedad inflamatoria mediante la inhibición de mecanismos inmunopatológicos a través de la señalización de IL-27 y describe mecanismos celulares para los efectos antiinflamatorios de IL-27.

30

Sumario de la invención

35 WSX-1 es un receptor de citocina recientemente descrito que se une a la citocina heterodímera IL-27. Los estudios de los presentes inventores han sugerido que este par citocina/receptor está implicado en la regulación negativa de respuestas inflamatorias mediadas por células T. La identificación de un papel para WSX-1 en la supresión de la hiperactividad de células T tiene implicaciones clínicas para trastornos inflamatorios mediados por células T y representa una nueva diana para terapias basadas inmunitariamente. El trabajo de este laboratorio ha continuado para enfocarse a los efectos inhibidores de IL-27 en diferentes respuestas de células T, y los presentes inventores han hecho varias observaciones que han proporcionado nuevas perspectivas en la biología de este sistema receptor de citocina y han sugerida nuevos modos para usar esta información para desarrollar terapias antiinflamatorias.

40

Esta claro a partir de los estudios de los presentes inventores que WSX-1 tiene un efecto negativo sobre respuestas de células T. IL-27 puede inhibir respuestas de Th1 y Th2 y la capacidad de estas células para elaborar el factor de crecimiento de células T IL-2. Además, IL-27 inhibe un nuevo subgrupo de células T - T17 (células T que producen IL-17) – que se cree que es un subgrupo de células T patológico importante. Una proteína de fusión, WSX-1Fc, es capaz de impulsar la capacidad de IL-27 para inhibir la producción de células T de IL-2 e IFN γ . Esto implica que una versión liberada de este receptor puede facilitar que IL-27 o sus componentes individuales señalicen células T. Esto se basa en parte en la biología del componente de citocina/receptor estrechamente relacionado para la actividad de IL-6. Esta idea está apoyada por la observación de que p28 recombinante (suministrada por eBioscience, y también conocida como IL-30), aunque no es tan eficaz como IL-27, es capaz de antagonizar la producción de IL-2 e IL-17.

45

50 Estos datos implican para los presentes inventores que p28 sola, modificada o como parte de otra molécula o complejo que incluye WSX-1 representa un enfoque terapéutico útil para modular células del sistema inmunitario. De forma similar, los polipéptidos y complejos de WSX-1 soluble también representan un enfoque terapéutico útil. Puesto que IL-27 puede señalizar a través de un complejo receptor que incluye tanto WSX-1 como gp130, los polipéptidos y complejos de gp130 soluble representan otro enfoque terapéutico útil más.

55

Según esto, la presente invención proporciona una composición para el uso en el tratamiento de una afección inflamatoria que comprende un complejo de WSX-1 soluble/IL-27 aislado o recombinante, en donde la afección inflamatoria se selecciona de: un trastorno autoinmunitario; una infección; cáncer; una alergia; artritis; asma; enteropatía inflamatoria, enfermedad de Crohn; uveítis; psoriasis; lupus; esclerosis múltiple; una enfermedad infecciosa crónica; tuberculosis; espondilitis anquilosante; rechazo de trasplantes; sarcoidosis; hepatitis.

En un aspecto, la composición es antiinflamatoria. La composición incluye opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, en realizaciones en las que la composición se va a administrar a un sujeto. En una realización, la composición suprime el desarrollo de células IL-17 a partir de células T vírgenes inducidas por IL-6 y factor de crecimiento transformante beta.

La composición puede incluir una o más células, por ejemplo, una o más células T, células B, mastocitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, u otras células que expresen gp130 o WSX-1. El complejo puede afectar a una función o actividad de la célula. En una realización, la composición incluye una célula T, y la composición altera una función o actividad de la célula T. Por ejemplo, la célula T puede presentar una expresión alterada de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, IL-4, IL-13, IL-17, IL-25, IL-10, IL-5 o CD25, proliferación alterada o supervivencia alterada. La composición incluye opcionalmente factor de crecimiento transformante beta.

Una clase de realizaciones proporciona una proteína de fusión de WSX-1 recombinante o aislada para el uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, en donde la afección inflamatoria se selecciona de: un trastorno inmunitario; una infección; cáncer; una alergia; artritis; asma; enteropatía inflamatoria, enfermedad de Crohn; uveítis; psoriasis; lupus; esclerosis múltiple; una enfermedad infecciosa crónica; tuberculosis; espondilitis anquilosante; rechazo de trasplantes; sarcoidosis; hepatitis. La proteína de fusión incluye un polipéptido de WSX-1, que puede estar, p. ej., en el extremo N de la proteína de fusión, en el extremo C de la proteína de fusión, o ser interno a la proteína de fusión. El polipéptido de WSX-1 puede incluir un dominio extracelular, o una subsecuencia del mismo, de un WSX-1 natural (p. ej., WSX-1 humano) o una variante del mismo.

En una clase de realizaciones, la proteína de fusión comprende uno o más dominios que reconocen un marcador específico de una célula, por ejemplo, uno o más dominios de anticuerpo que reconocen el marcador. Marcadores ejemplares incluyen CD4, CD8, CD11c, CD11b y NK1.1. En una clase de realizaciones, la proteína de fusión comprende uno o más dominios polipeptídicos derivados de p28 o EBI3.

También se divulga en la presente una proteína de fusión de p28 recombinante o aislada. La proteína de fusión incluye un polipéptido de p28, que puede estar, p. ej., en el extremo N de la proteína de fusión, en el extremo C de la proteína de fusión, o ser interno a la proteína de fusión. El polipéptido de p28 se puede derivar de una p28 natural (p. ej., p28 humana) o una variante de la misma.

La proteína de fusión comprende opcionalmente uno o más dominios de anticuerpo. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir uno o más dominios de anticuerpo que reconocen un marcador específico de una célula, p. ej., CD4, CD8, CD11c, CD11b o NK1.1.

También se describen en la presente polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de WSX-1 y p28. Por ejemplo, se proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de WSX-1 recombinante o aislada, en donde la proteína de fusión comprende uno o más dominios que reconocen un marcador específico de una célula o uno o más dominios polipeptídicos derivados de p28 o EBI3. El ácido nucleico opcionalmente codifica uno o más dominios polipeptídicos seleccionados de: un dominio de anticuerpo, una región Fc, un dominio de p28 o un dominio de EBI3, así como codifica un polipéptido de WSX-1. Además, se proporciona un ácido nucleico que incluye una proteína de fusión de p28 recombinante o aislada.

También se proporcionan anticuerpos que se unen a polipéptidos y complejos de la invención. Así, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de WSX-1 soluble, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/p28 o a un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/IL-27. El anticuerpo potencia opcionalmente una actividad del polipéptido o el complejo polipeptídico.

Un aspecto de la invención proporciona composiciones para el uso en el tratamiento de una afección inflamatoria en un sujeto mamífero, p. ej., un sujeto humano. Afecciones inflamatorias a tratar pueden incluir un trastorno inmunitario (p. ej., una enfermedad autoinmunitaria); una infección; cáncer, tal como mieloma múltiple y leucemia mielógena y otras, así como metástasis tumorales; una alergia; artritis; asma; enteropatía inflamatoria, tal como colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn; uveítis; psoriasis; lupus; esclerosis múltiple; una enfermedad infecciosa crónica; tuberculosis; espondilitis anquilosante; rechazo de trasplantes; sarcoidosis; hepatitis. Enfermedades adicionales que se divulgan en este contexto son inflamación del sistema nervioso central; síndrome de inmunodeficiencia adquirida; pancreatitis aguda; enfermedad de Addison; lesión hepática inducida por el alcohol incluyendo cirrosis alcohólica; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica; asma y otras enfermedades pulmonares; aterosclerosis; vasculitis autoinmunitaria; lesión hepática inducida por hepatitis autoinmunitaria; cirrosis biliar; caquexia/anorexia, incluyendo caquexia inducida por sida; síndrome de fatiga crónica; dolencias asociadas con Clostridium, incluyendo diarrea asociada con Clostridium; afecciones e indicaciones coronarias, incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva,

reestenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción del miocardio e injerto de derivación de la arteria coronaria; diabetes, incluyendo diabetes mellitus tipo 1 de comienzo juvenil y resistencia a insulina; endometriosis, endometritis y afecciones relacionadas; epididimitis; resistencia a eritropoyetina; fiebre; fibromialgia o analgesia; glomerulonefritis; enfermedad del injerto contra el hospedador/rechazo de trasplantes; enfermedad de Graves; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad de Hashimoto; anemia hemolítica; choque hemorrágico; hiperalgesia; afecciones inflamatorias de una articulación y enfermedades reumáticas incluyendo osteoartritis, artritis reumatoide, artritis juvenil (reumatoide), poliartritis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, enfermedad de Still, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, escleroderma, esclerosis sistémica, vasculitis (p. ej., enfermedad de Kawasaki), vasculitis cerebral, enfermedad de Lyme, artritis inducida por estafilococos, síndrome de Sjogren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y arteritis de células gigantes; una enfermedad ocular inflamatoria, que puede estar asociada con, por ejemplo, trasplante corneal; enteropatía inflamatoria; isquemia, incluyendo isquemia cerebral; enfermedad de Kawasaki; deterioro del aprendizaje; enfermedades pulmonares; nefritis por lupus; esclerosis múltiple; miastenia grave; miopatías; enfermedades neuroinflamatorias; neurotoxicidad; enfermedades y afecciones oculares, incluyendo degeneración ocular y uveitis; osteoporosis; dolor, incluyendo dolor relacionado con el cáncer; enfermedad de Parkinson; péñfigo; enfermedad periodontal; pitiriasis roja pilosa; parto prematuro; prostatitis y afecciones relacionadas; psoriasis y afecciones relacionadas; artritis psoriásica; fibrosis pulmonar; lesión por reperfusión; fiebre reumática; artritis reumatoide; sarcoidosis; escleroderma; choque séptico; efectos secundarios de la radioterapia; síndrome de Sjogren; trastornos del sueño; espondiloartropatías; lupus eritematoso sistémico; enfermedad de la articulación mandibular temporal; tiroiditis; trasplante de tejido o una afección inflamatoria resultante de distensión muscular, esquinca, daño del cartílago, traumatismo y cirugía ortopédica; vasculitis; o una afección inflamatoria resultante de distensión muscular, esquinca, daño del cartílago, traumatismo, cirugía ortopédica, infección u otros procesos de enfermedad.

Métodos divulgados en la presente incluyen administrar al sujeto un resto aislado o recombinante seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido de WSX-1 soluble, un polipéptido de p28, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/p28, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/EBI3, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/IL-27, un complejo de gp130 soluble/IL-27, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/p28, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/EBI3, un polipéptido de p28 y un polipéptido de WSX-1 soluble, un polipéptido de EBI3 y un polipéptido de WSX-1 soluble, IL-27 y un polipéptido de WSX-1 soluble, un polipéptido de gp130 soluble y un polipéptido de p28, un polipéptido de gp130 soluble e IL-27, un polipéptido de gp130 soluble y un polipéptido de EBI3, y una variante de los mismos. En los casos en los que se administra una combinación de polipéptidos recombinantes o aislados (p. ej., un polipéptido de p28 y un polipéptido de WSX-1 soluble), los polipéptidos pueden pero no necesitan formar un complejo, y los polipéptidos se pueden coadministrar o administrar separadamente. Los métodos incluyen opcionalmente diagnosticar al paciente con la afección inflamatoria antes de dicha administración. El resto aislado o recombinante se administra opcionalmente al sujeto en combinación con un segundo compuesto, por ejemplo, factor de crecimiento transformante beta.

Tales métodos pueden incluir administrar al sujeto un resto que se une específicamente a o modula una actividad de un complejo de gp130/WSX-1/IL-27, o que modula la formación del complejo en una célula, tratando de ese modo la afección del sujeto. El resto puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un antagonista, un agonista y un modulador de la actividad.

Se divulgan además métodos para identificar un compuesto que se une a o modula una actividad de un polipéptido de WSX-1 soluble, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/p28, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/IL-27, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/EBI3, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/p28, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/IL-27 o un complejo polipeptídico de gp130 soluble/EBI3. En los métodos, una muestra biológica o bioquímica que comprende el polipéptido o complejo se pone en contacto con un compuesto de prueba. Se detecta la unión del compuesto de prueba al polipéptido o complejo o la modulación de la actividad del polipéptido o complejo por el compuesto de prueba, identificando de ese modo el compuesto que se une a o modula la actividad del polipéptido o complejo. Opcionalmente, el compuesto potencia la inhibición de una respuesta de células T por el polipéptido o complejo, potencia la actividad antagonista contra IL-2 o IL-17 o altera la proliferación, supervivencia o expresión de células T de IL-2, IFN- γ , TNF-alfa, IL-6, IL-4, IL-13, IL-17, IL-25, IL-10, IL-5 o CD25.

Breve descripción de los dibujos

Los Paneles A y B de la Figura 1 ilustran la expresión de IL-27 en el cerebro durante TE. El Panel A presenta gráficos de barras de resultados de PCR en tiempo real cuantitativa sobre ARN celular total aislado de los cerebros de ratones WT C57BL/6 no infectados e infectados crónicamente (Día 30 después de la infección) para detectar ARNm de *ebi3* e *il27* (p28). El Panel B presenta gráficos de barras de resultados de PCR en tiempo real cuantitativa de ARNm de *ebi3* e *il27* aislado de cultivos de astrocitos WT C57BL/6 primarios. Se sembraron 1×10^6 astrocitos/pocillo y se estimularon durante 18 h seguido por aislamiento del ARN. Los resultados de la PCR en tiempo real se normalizaron frente a ARNm para *Actb* (β -actina). Los datos son representativos de dos experimentos independientes. ND, no detectado.

Los Paneles A-H de la Figura 2 ilustran que se requiere IL-27 para la resistencia a TE crónico. El Panel A presenta un gráfico lineal que muestra la supervivencia de ratones *Il27ra*^{-/-} (n = 8) y WT C57BL/6 (n = 10) infectados intraperitonealmente con 20 quistes procedentes de la cepa Me49 de *T. gondii* y tratados con CTLA4-Ig. Las flechas indican días de tratamiento con CTLA4-Ig. El Panel B presenta un gráfico lineal que muestra la supervivencia de ratones *Il27ra*^{-/-} (n = 10) o WT (n = 10) tratados con sulfadiazina el día 5 después de la infección (flecha). El tratamiento se detuvo después de dos semanas. El Panel C presenta fotografías del análisis histopatológico del hígado y los pulmones el día 14 y 30 después de la infección de ratones *Il27ra*^{-/-} tratados con CTLA4-Ig. El Panel D presenta fotografía para el análisis de la patología en el cerebro de ratones WT y *Il27ra*^{-/-} crónicamente infectados el día 30 después de la infección con marcador específico de astrocitos GFAP. El Panel E presenta un gráfico de barras de ADN de parásito aislado de los cerebros de ratones WT y *Il27ra*^{-/-} crónicamente infectados medidos mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados son representativos de dos experimentos con 4-5 ratones por grupo. Los Paneles F-H presentan gráficos de barras que muestran la producción de NO (Panel F), IFN- γ (Panel G) e IL-12 (Panel H) a partir de BMNC aisladas de ratones WT o *Il27ra*^{-/-} reestimuladas in vitro en presencia de STAg; después de 48 h, los sobrenadantes se recogieron y se analizaron. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes con resultados similares y las barras de que indican la SEM.

Los Paneles A-E de la Figura 3 ilustran que el agotamiento de células T CD4⁺ rescata ratones *Il27ra*^{-/-} y reduce la inflamación en el cerebro. El Panel A presenta un gráfico de barras de BMNC totales recogidas de grupos de 4-5 ratones *Il27ra*^{-/-} y WT infectados crónicamente. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. El Panel B presenta un gráfico de barras de células T CD4⁺, células T CD8⁺, macrófagos y microglia. El porcentaje de células T CD4⁺, células T CD8⁺, macrófagos y microglia en cada preparación de BMNC, según se determina mediante citometría de flujo, se usó para calcular el número total de células en cada población. Las barras están coloreadas como en el Panel A. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes con grupos de 4-5 ratones. El Panel B presenta un gráfico lineal que muestra la supervivencia de ratones *Il27ra*^{-/-} infectados con 20 quistes de Me49 y, el día 5 después de la infección, tratados con sulfadiazina durante 2 semanas para controlar la replicación de parásitos; a las cuatro semanas se inició el agotamiento de células T CD4⁺. Los datos representan dos experimentos independientes con tres ratones por grupo. El Panel D ilustra la citometría de flujo sobre BMNC o esplenocitos aislados y teñidos con respecto a CD4 y CD8 para cuantificar el éxito del agotamiento de CD4 en el cerebro. El Panel E presenta fotografías de secciones del cerebro, tomadas el día 35 después de la infección para histología. * indica un valor de $P \leq 0,05$.

Los Paneles A-D de la Figura 4 ilustran que IL-27 inhibe la producción de IL-17 en el cerebro de ratones infectados crónicamente con *T. gondii*. El Panel A presenta gráficos de barras de PCR en tiempo real cuantitativa para ARNm para IL-17, IL-6 y TNF en el cerebro de ratones *Il27ra*^{-/-} y WT crónicamente infectados (Día 30 después de la infección). Los datos son representativos de dos experimentos independientes. El Panel B presenta gráficos de barras un ensayo ELISA sobre sobrenadantes procedentes de BMNC aisladas de ratones WT o *Il27ra*^{-/-} reestimulados in vitro en presencia de STAg durante 48 h y evaluadas con respecto a IL-17, IL-6 y TNF. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes con resultados similares y las barras de error que indican la SEM. El Panel C presenta un gráfico de barras de un ensayo ELISA sobre sobrenadantes procedentes de BMNC aisladas de ratones WT y reestimuladas con STAg en presencia o ausencia de IL-23, IL-27 o IL-23 y IL-27 durante 48 h. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes con resultados similares y las barras de error representan la SEM. El Panel D ilustra la citometría de flujo de BMNC procedentes de ratones WT y *Il27ra*^{-/-} estimuladas durante 2 h ex vivo con PMA e ionomicina en presencia de BFA y teñidas intracelularmente con respecto a IL-17. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes con resultados similares. ND, no detectado.

Los Paneles A-C de la Figura 5 ilustran que IL-27 inhibe la producción de IL-17 mediante células T_H-17 generadas in vitro. Los Paneles A-C ilustran la citometría de flujo sobre células T CD4⁺ (Paneles A y C) y CD8⁺ (Paneles B y C) aisladas de ratones C57BL/6 y activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones inductoras de T_H-17 en presencia o ausencia de IL-27 (Paneles A, B y C) o p28 (Panel C). Las células T CD4⁺ y CD8⁺ T cultivadas durante cuatro y tres días respectivamente se estimularon con PMA e ionomicina en presencia de BFA durante 4 h antes de teñir con respecto a IL-17 (Paneles A, B y C), TNF (Paneles A y B) o IFN- γ (Panel C) intracelulares. Los gráficos se limitan a células T CD4⁺ o CD8⁺ cuando se especifique; los números en los cuadrantes representan la frecuencia de células en cada uno. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Los Paneles A-F de la Figura 6 ilustran que la inhibición mediada por IL-27 de la producción de IL-17 por células T es independiente de SOCS3. Los Paneles A y B presentan gráficos de barras de un ensayo ELISA sobre sobrenadantes procedentes de células T CD4⁺ aisladas de ratones C57BL/6 bajo condiciones inductoras de T_H-17 con concentraciones crecientes de IL-27 en presencia o ausencia de anticuerpo anti-IL-6 para la producción de IL-17. El Panel C ilustra la citometría de flujo sobre células T CD4⁺ purificadas procedentes de ratones gp130Y757F o controles de compañeros de camada WT teñidos con respecto a P-STAT3 intracelular después de la estimulación con IL-6 (5 min., 60 min. o 24 h). El Panel D ilustra la citometría de flujo sobre células T CD4⁺ aisladas de ratones gp130Y757F o controles de compañeros de camada WT y estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones inductoras de T_H-17 en presencia o ausencia de IL-27 cuatro días antes de teñir con respecto a IL-17 e IFN- γ

intracelulares. El Panel E presenta un gráfico de barras de un ensayo ELISA sobre sobrenadantes procedentes de células T CD4⁺ de controles de compañeros de camada gp130Y757F o WT desarrollados bajo las condiciones inductoras de T_H-17 en presencia de cantidades crecientes de IL-27 para la producción de IL-17. El Panel F ilustra la citometría de flujo de células T CD4⁺ Socs3^{-/-} aisladas de ratones CreMMTVSocs3^{fl/fl} activadas para inducir la producción de IL-17 en presencia o ausencia de IL-27 antes de teñir con respecto a IL-17 intracelular. Los gráficos se limitan a células T CD4⁺; los números en los cuadrantes representan la frecuencia de células en cada uno. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la SEM.

Los Paneles A-B de la Figura 7 ilustran que la inhibición mediada por IL-27 de la producción de IL-17 por células T depende de STAT1 pero no de T-bet. El Panel A ilustra la citometría de flujo sobre células T CD4⁺ aisladas de ratones CD57BL/6, *Stat1*^{-/-} o *Tbx21*^{-/-} y activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones inductoras de T_H-17 en presencia o ausencia de IL-27 y a continuación teñidas con respecto a IL-17 y TNF intracelulares. Los datos representan tres experimentos independientes. El Panel B presenta un gráfico de barras de un ensayo ELISA sobre sobrenadantes de esplenocitos aislados de ratones C57BL/6 (n = 3) o *Stat1*^{-/-} (n=3) siete días después de la infección intraperitoneal con 20 quistes precedentes de la cepa Me49 de *T. gondii* y reestimulados durante 48 h en presencia o ausencia de STAg para la producción de IL-17. Los gráficos se limitan a células T CD4⁺; los números en los cuadrantes representan la frecuencia de células en cada uno. Las barras de error indican la SEM.

La Figura 8 presenta datos de citometría de flujo que ilustran que células T aisladas de los cerebros de ratones *Il27ra*^{-/-} y WT infectados crónicamente presentan un fenotipo activado. Las BMNC se aislaron de ratones *Il27ra*^{-/-} y WT infectados crónicamente. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ se teñieron con respecto a los marcadores de activación CD44 y CD62L. Los gráficos se limitan a células T CD4⁺ o CD8⁺ T cuando se indique. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La Figura 9 presenta datos de citometría de flujo que ilustran que IL-27 inhibe la producción de IL-17 por células T CD4⁺ sin la estimulación con PMA e ionomicina. Células T CD4⁺ aisladas de ratones C57BL/6 se activaron con α -CD3 y α -CD28 bajo condiciones no polarizantes (anti-IFN- γ , anti-IL-4). Se usaron TGF- β solo o en combinación con IL-6 o IL-6, IL-1- β , TNF se usaron para generar células T_H-17 en presencia o ausencia de IL-27. Las células se teñieron con respecto a IL-17 e IFN- γ intracelulares sin estimulación con PMA ni ionomicina el día cuatro. Los gráficos se limitan a células T CD4⁺; los números en los cuadrantes representan la frecuencia de células en cada uno. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La Figura 10 presenta datos de citometría de flujo que ilustran que la inhibición por IL-27 de la producción de IL-17 por células T es independiente de SOCS3. Células T CD4⁺ procedentes de ratones gp130Y757F o controles de compañeros de camada WT se desarrollaron bajo condiciones inductoras de T_H-17 en presencia o ausencia de IL-27. Sin embargo, en este experimento las células T se estimularon con PMA e ionomicina más BFA durante 4 h en día 4 antes de teñir con respecto a IL-17 y TNF intracelulares. Los gráficos se limitan a células T CD4⁺; los números en los cuadrantes representan la frecuencia de células en cada uno. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La Figura 11 presenta un gráfico de barras de niveles de IL-17, que muestra que la inhibición por IL-27 de IL-17 se produce independientemente de su capacidad para inhibir la producción de IL-2. Células T CD4⁺ aisladas de ratones DO11.10 transgénicos se activaron con péptido de ovoalbúmina bajo condiciones inductoras de T_H-17 en presencia o ausencia de IL-27. Las células se cultivaron durante cuatro días en presencia o ausencia IL-2 humana antes de analizar los sobrenadantes celulares con respecto a IL-17 mediante ELISA. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La Figura 12 presenta gráficos lineales de niveles de IL-2 e IFN γ , que ilustran que la inhibición de la producción de IL-2 e IFN γ por IL-27 está potenciada por un polipéptido de WSX-1 soluble en células T CD4⁺ procedentes de ratones inactivados en WSX-1.

Los Paneles A-C de la Figura 13 ilustran esquemáticamente estrategias para modular la respuesta inflamatoria al modular la señalización a través del receptor de IL-27 o sus componentes WSX-1 y gp130. El Panel A representa esquemáticamente la señalización a través del receptor de IL-27 mediante IL-27 (un heterodímero de EBI3 y p28). El Panel B ilustra esquemáticamente la señalización a través de gp130 mediante un complejo de WSX-1 soluble/p28 o un complejo de WSX-1 soluble/IL-27. El Panel C ilustra esquemáticamente la señalización a través de WSX-1 mediante un complejo de gp130 soluble/p28 o un complejo de gp130 soluble/IL-27.

Los Paneles A-C de la Figura 14 ilustran que IL-27 promueve la producción de IL-10 por células T CD4⁺ y CD8⁺. El Panel A presenta un gráfico de barras que muestra resultados del bioensayo RodentMAP™, que se expresan como el porcentaje de cambio entre células cultivadas bajo condiciones no polarizantes y las estimuladas con IL-27. Los Paneles B y C ilustran la producción de IL-10 por células T CD4⁺ (Panel B) y células T CD8⁺ (Panel C) según se mide mediante citometría de flujo y ELISA de sobrenadantes de cultivo de 72 h (barras de error, d. e.). Se aislaron

células T del bazo y los nódulos linfáticos de ratones C57BL/6 y se activaron con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones no polarizantes en presencia o ausencia de IL-27. Células T CD4+ y CD8+ T cultivadas durante 4 d y 3 d, respectivamente, se estimularon durante 4 h con PMA e ionomicina en presencia de brefeldina A antes de la tinción con respecto a IL-10 intracelular. Los números en las cajas indican porcentaje de células IL-10+. Los números en negrita representan la intensidad de fluorescencia media (MFI). Los resultados en los Paneles B y C son representativos de tres experimentos independientes con resultados similares.

Los Paneles A-C de la Figura 15 ilustran que la producción de IL-10 se reduce en ausencia de señalización de IL-27R. El Panel A presenta un gráfico de barras de ELISA de IL-10 en los sobrenadantes procedentes de células T CD4+ aisladas de ratones C57BL/6 silvestres (WT) o *IL-27ra*^{-/-}; las células se desarrollaron bajo condiciones no polarizantes en presencia o ausencia de IL-27. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con resultados similares (barras de error, d. e.). El Panel B ilustra la citometría de flujo de BMNC y bazos procedentes de ratones WT e *IL-27ra*^{-/-} crónicamente infectados con *T. gondii*; las células se estimularon 5 h ex vivo con PMA e ionomicina en presencia de brefeldina A y se tiñeron intracelularmente con respecto a IL-10. Los números en las cajas indican porcentaje de células IL-10+. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con resultados similares. El Panel C presenta un gráfico lineal de ELISA de IL-10 en sobrenadantes procedentes de BMNC WT (n = 4) reestimuladas durante 48 h in vitro con antígeno toxoplasmático soluble (STAg) en presencia o ausencia de IL-27. Barras de error, d. e. *, $P = 0.0275$.

Los Paneles A-B de la Figura 16 ilustran que las células T CD4+ elaboran IL-10 en respuesta a IL-27 bajo T_H1 y T_H2 pero no condiciones de T_H17. El Panel A muestra el análisis de dilución de CFSE de células T CD4+ aisladas de ratones C57BL/6 activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones no polarizantes en presencia o ausencia de IL-27 (tiempo, gráficos anteriores) antes de teñir con respecto a IL-10 intracelular. Los gráficos se limitan a células T CD4+. El Panel B ilustra la citometría de flujo de células T CD4+ aisladas de ratones C57BL/6 activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones polarizantes de T_H1, T_H2 o T_H17 en presencia o ausencia de IL-27 antes de la tinción intracelular de IL-10. Los números en negrita representan la MFI. Para los Paneles A y B, los números en cajas indican porcentaje de células IL-10+. Los datos son representativos de tres experimentos independientes con resultados similares.

Los Paneles A-B de la Figura 17 ilustran que IL-27 induce la generación de células T CD4+ IFN- γ +IL-10+ bajo condiciones de T_H1. El Panel A ilustra la citometría de flujo de células T CD4+ aisladas de ratones C57BL/6 y activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones polarizantes de T_H1, TH₂ o T_H17 en presencia o ausencia de IL-27 antes de teñir con respecto a IL-10 intracelular y citocinas asociadas a T_H firmadas IFN- γ , IL-13 o IL-17. El Panel B ilustra la citometría de flujo de células T CD4+ aisladas de ratones *IL-10*^{-/-} activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones inductoras de T_H17 en presencia o ausencia de IL-27 antes de teñir con respecto a IL-10 e IL-17 intracelulares. Los gráficos se limitan a células T CD4+; los números en los cuadrantes representan la frecuencia de células en cada uno. Los datos son representativos de tres (Panel A) o dos (Panel B) experimentos independientes.

Los Paneles A-C de la Figura 18 ilustran que TGF- β aumenta la producción de IL-10 conducida por IL-27 por células T CD4+. La producción de IL-10 por células T CD4+ se mide mediante citometría de flujo (Panel A) y ELISA (Panel B) de sobrenadantes de cultivo de 72 h. Células T CD4+ aisladas de ratones C7BL/6 se activaron con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones no polarizantes en presencia o ausencia de IL-27, TGF- β o la combinación de ambas citocinas. Células T CD4+ cultivadas durante 4 d se estimularon durante 4 h con PMA e ionomicina en presencia de brefeldina A antes de teñir con respecto a IL-10 intracelular. Los números en cajas indican porcentaje de células IL-10+; los números en negrita representan la MFI. Los datos son la media \pm d. e. de diez ratones. El Panel C ilustra la citometría de flujo de células T CD4+ aisladas de ratones indicadores Foxp3GFP activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones no polarizantes en presencia o ausencia de IL-27, TGF- β o la combinación de ambas citocinas. Células T CD4+ cultivadas durante 3 d se estimularon durante 4 h con PMA e ionomicina en presencia de brefeldina A antes de teñir con respecto a IL-10 y GFP intracelulares. Los gráficos se limitan a células T CD4+; los números en los cuadrantes representan la frecuencia de células en cada uno. Los datos son representativos de tres (a, b) o dos (c) experimentos independientes.

Los Paneles A-D de la Figura 19 ilustran que IL-6 se comporta sinérgicamente con TGF- β para promover la producción de IL-10. La producción de IL-10 por células T CD4+ se mide mediante citometría de flujo (Panel A) y ELISA (Panel B) de sobrenadantes de cultivo de 72 h. Células T CD4+ aisladas de ratones C7BL/6 se activaron con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones no polarizantes en presencia o ausencia de IL-6, TGF- β o la combinación de ambas citocinas. Células T CD4+ cultivadas durante 4 d se estimularon durante 4 h con PMA e ionomicina en presencia de brefeldina A antes de teñir con respecto a IL-10 intracelular. Los números en cajas indican el porcentaje de células IL-10+; los números en negrita representan la MFI. Los datos son la media \pm d. e. de triplicados. Los Paneles C y D ilustran la citometría de flujo de células T CD4+ purificadas procedentes de ratones C57BL/6; las células se dejaron sin estimular o se estimularon con IL-6 o IL-27 (tiempo, gráficos anteriores), a continuación se tiñeron con respecto a STAT1 (Panel C) (P-STAT1) o (Panel D) STAT3 (P-STAT3) fosforilados intracelulares. Los números en cajas representan el porcentaje de células T CD4+ (Panel C) P-STAT1+ o (Panel D)

P-STAT3+. Los datos son representativos de tres (Paneles A y B) o dos (Paneles C y D) experimentos independientes.

5 Los Paneles A-F de la Figura 20 ilustran la inducción de IL-10 dependiente de STAT. Citometría de flujo de células T CD4+ aisladas de ratones C7BL/6, *Stat1*^{-/-} (Panel A) *Tbx21*^{-/-} (Panel B) *Stat3CD4*^{-/-} (Panel C) o *Stat4*^{-/-} (Panel D) activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones no polarizantes en presencia o ausencia de IL-27 y a continuación teñidas con respecto a IL-10 intracelular. Citometría de flujo of células T CD4+ aisladas de ratones C7BL/6, *Stat1*^{-/-} (Panel E) o *Stat3CD4*^{-/-} (Panel F) activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones no polarizantes con IL-6 en presencia o ausencia de TGF-β y a continuación teñidas con respecto a IL-10 intracelular. Los números en cajas representan el porcentaje de células IL-10+. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

15 La Figura 21 presenta datos de citometría de flujo que ilustran que IL-6 induce la generación de células T CD4+ IL-10+ bajo condiciones de T_H2. Citometría de flujo de células T CD4+ aisladas de ratones C57BL/6 y activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones polarizantes de T_H1 o T_H2 en presencia o ausencia de IL-27 antes de teñir con respecto a IL-10 intracelular. Los números en cajas representan el porcentaje de células IL-10+; los números en negrita representan la MFI. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

20 La Figura 22 presenta datos de citometría de flujo que ilustran que la producción de IL-10 bajo condiciones T_H1 depende de STAT4. Citometría de flujo de células T CD4+ aisladas de ratones C7BL/6 y *Stat4*^{-/-} activadas con anti-CD3 y anti-CD28 bajo condiciones polarizantes de T_H1 en presencia o ausencia de IL-27 y a continuación teñidas con respecto a IL-10 intracelular. Los números en cajas representan el porcentaje de células IL-10+. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Definiciones

25 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por un experto normal en la especialidad de la que trata la invención. Las siguientes definiciones complementan las de la especialidad y se dirigen a la presente solicitud y no deben ser atribuidas a ningún caso relacionado o no relacionado, p. ej., a cualquier patente o solicitud de propietario común. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente se pueden usar en la práctica para las pruebas de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en la presente. Según esto, la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa.

30 Según se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" "uno(a)" y "el(la)" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una proteína" incluye una pluralidad de proteínas; la referencia a "una célula" incluye mezclas de células, y similares.

35 El término "aislado" se refiere a un material biológico, tal como un ácido nucleico o un polipéptido, que está sustancialmente libre de componentes que normalmente acompañan a o interactúan con él en su ambiente presente en la naturaleza. El material aislado comprende opcionalmente material no encontrado con el material en su ambiente natural, p. ej., una célula. Por ejemplo, si el material está en su ambiente natural, tal como una célula, el material se ha situado en una localización de la célula (p. ej., genoma o elemento genético) no natural para un material encontrado en ese ambiente. Por ejemplo, un ácido nucleico presente en la naturaleza (p. ej., una secuencia codificante, un promotor, un intensificador, etc.) se aísla si se introduce por medios no presentes en la naturaleza en un locus del genoma (p. ej., un vector, tal como un plásmido o un vector viral, o un amplicón) no natural para ese ácido nucleico. Tales ácidos nucleicos también se denominan ácidos nucleicos "heterólogos". Un polipéptido aislado, por ejemplo, está en un ambiente (p. ej., un sistema de cultivo celular, o purificado del cultivo celular) distinto al ambiente natural del polipéptido silvestre. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de proteína o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su ambiente natural que podrían interferir con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación u otro.

40 El término "recombinante" indica que el material (p. ej., un ácido nucleico o un polipéptido) ha sido alterado artificialmente o sintéticamente (no naturalmente) mediante intervención humana. La alteración se puede realizar sobre el material dentro de, o retirado de, su ambiente o estado natural. Por ejemplo, un "ácido nucleico recombinante" es uno que se elabora al recombinar ácidos nucleicos, p. ej., durante la clonación, barajado de ADN u otros procedimientos; un "polipéptido recombinante" o una "proteína recombinante" es, p. ej., un polipéptido o una proteína que se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

55 El término "ácido nucleico" abarca cualquier cadena física de unidades de monómero que se puede corresponder con un cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (p. ej., un polímeros de ADN o ARN típico), ANP, oligonucleótidos modificados (p. ej., oligonucleótidos que comprenden nucleótidos que no son típicos de ARN

o ADN biológico, tales como oligonucleótidos metilados en 2'-O), y similares. Un ácido nucleico puede ser, p. ej., de una sola hebra o de doble hebra. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular abarca secuencias complementarias, además de la secuencia indicada explícitamente.

5 Una "secuencia polinucleotídica" o "secuencia nucleotídica" es un polímero de nucleótidos (un oligonucleótido, un ADN, un ácido nucleico, etc.) o una cadena de caracteres que representa un polímero de nucleótidos, dependiendo del contexto. A partir de cualquier secuencia polinucleotídica especificada, se puede determinar bien el ácido nucleico dado o bien la secuencia polinucleotídica complementaria (p. ej., el ácido nucleico complementario).

10 "Expresión de un gen" o "expresión de un ácido nucleico" significa la transcripción de ADN en ARN (incluyendo opcionalmente la modificación del ARN, p. ej., el enlace), la traducción de ARN en un polipéptido (posiblemente incluyendo la modificación posterior del polipéptido, p. ej., modificación postraduccional), o tanto la transcripción como la traducción, según se indique por el contexto.

15 El término "gen" se usa ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Los genes incluyen típicamente secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras requeridas para la expresión de tales secuencias codificantes. El término "gen" se aplica a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o un ARNm codificado por esa secuencia genómica. Genes también incluyen segmentos de ácido nucleico no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Secuencias reguladoras no expresadas incluyen "promotores" e "intensificadores", a los que se unen proteínas reguladoras tales como factores de transcripción, dando como resultado la transcripción de secuencias adyacentes o próximas. Un promotor o intensificador "específico de un tejido" es uno que regula la transcripción en un tipo de tejido o tipo de célula, o tipos, específicos.

25 Un "vector de expresión" es un vector, tal como un plásmido, que es capaz de promover la expresión así como la replicación de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Típicamente, el ácido nucleico que se va a expresar está "ligado operativamente" a un promotor y/o intensificador, y está sometido a control regulador de la transcripción por el promotor y/o intensificador.

30 Según se usa en la presente, el término "codificar" se refiere a cualquier procedimiento por el que se usa la información en una macromolécula polimérica o cadena de secuencia para dirigir la producción de una segunda molécula o cadena de secuencia que es diferente de la primera molécula o cadena de secuencia. Según se usa en la presente, el término se usa ampliamente, y puede tener una variedad de aplicaciones. En un aspecto, el término codificar describe el proceso de replicación de ADN semiconservativa, donde una hebra de una molécula de ADN de doble hebra se usa como una plantilla para codificar una hebra hermana complementaria recientemente sintetizada mediante una ADN polimerasa dependiente de ADN. En otro aspecto, el término codificar se refiere a cualquier proceso por el que la información en una molécula se usa para dirigir la producción de una segunda molécula que tiene una naturaleza química diferente de la primera molécula. Por ejemplo, una molécula de ADN puede codificar una molécula de ARN (p. ej., mediante el proceso de transcripción que incorpora una enzima ARN polimerasa dependiente de ADN). Además, una molécula de ARN puede codificar un polipéptido, como en el proceso de traducción. En otro aspecto, una molécula de ADN puede codificar un polipéptido, donde se entiende que "codificar" según se usa en ese caso incorpora los procesos tanto de transcripción como de traducción.

45 Un "polipéptido" es un polímero que comprende dos o más residuos de aminoácido (p. ej., un péptido o una proteína). El polímero puede comprender adicionalmente elementos distintos a aminoácidos tales como etiquetas, desactivadores, grupos de bloqueo, o similares, y puede comprender opcionalmente modificaciones tales como glicosilación o similares. Los residuos de aminoácido del polipéptido pueden ser naturales o no naturales y pueden estar no sustituidos, no modificados, sustituidos o modificados.

50 Una "secuencia de aminoácidos" es un polímero de residuos de aminoácido (una proteína, un polipéptido, etc.) o una cadena de caracteres que representa un polímero de aminoácidos, dependiendo del contexto.

"Interleucina-27" o "IL-27" es una citocina heterodímera que incluye "EBI3" y "p28." Otros nombres para p28 en la bibliografía incluyen interleucina 30 o IL30. p28 se describe, por ejemplo, en la entrada 608273 en la base de datos Online Mendelian Inheritance in Man, en Internet en [www \(dot\) ncbi \(dot\) nlm \(dot\) nih \(dot\) gov/Omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim). Véanse además las id de secuencia proteínica NP_663634 y NP_663611.1, el número de registro de secuencia nucleotídica NM_145659 y NM_145636.1, y la ID génica 246778 y 246779, disponibles, p. ej., a través de navegadores de proteínas, nucleótidos y genes de the National Center for Biotechnology Information's Entrez en Internet en [www \(dot\) ncbi \(dot\) nlm \(dot\) nih \(dot\) gov/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez). EBI3 ("gen inducido por el virus de Epstein-Barr 3") se describe, por ejemplo, en la entrada 605816 en la base de datos Online Mendelian Inheritance in Man. Véanse además las id de secuencias proteínicas NP_005746 y NP_056581.1, el número de registro de secuencia nucleotídica NM_005755 y NM_015766 y la ID génica 10148 y 50498.

65 IL-27 señala a través de un complejo receptor que incluye los receptores de citocina de clase I "WSX-1" y "gp130." Otros nombres para WSX-1 en la bibliografía incluyen receptores de citocina de células T (TCCR), receptor de interleucina 27 alfa (IL27RA) y receptor de interleucina 27 (IL27R). WSX-1 se describe, por ejemplo, en la entrada

605350 en la base de datos Online Mendelian Inheritance in Man. Véanse además las id de secuencia proteínica NP_004834 y NP_057880.1, el número de registro de secuencia nucleotídica NM_004843 y NM_016671 y la ID génica 9466 y 50931. Otros nombres para gp130 en la bibliografía incluyen transductor de señales de interleucina 6 (IL6ST). gp130 se describe, por ejemplo, en la entrada 600694 en la base de datos Online Mendelian Inheritance in Man. Véanse además las id de secuencia proteínica NP_002175 y NP_034690, el número de registro de secuencia nucleotídica NM_002184 y NM_010560 y la ID génica ID 3572 y 16195.

Un "polipéptido de WSX-1" (o, análogamente, "polipéptido de gp130, "polipéptido de p28" o "polipéptido de EBI3") se refiere a un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de longitud completa de un WSX-1 (o gp130, p28 o EBI3) presente en la naturaleza o una secuencia o fragmento del mismo, o una variante del mismo (es decir, una variante de la secuencia de longitud completa o la subsecuencia). Polipéptidos de WSX-1, gp130, p28 y EBI3 ejemplares se presentan anteriormente; polipéptidos de WSX-1, gp130, p28 y EBI3 también incluyen polipéptidos homólogos o sustancialmente idénticos a los mismos, y subsecuencias o variantes de los mismos.

Una "subsecuencia" o "fragmento" es cualquier porción de una secuencia entera, hasta e incluyendo la secuencia completa. Típicamente, una subsecuencia o fragmento comprende menos de la secuencia de longitud completa. Opcionalmente, y dependiendo de la longitud de la secuencia completa, una subsecuencia puede incluir, p. ej., al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300 o al menos aproximadamente 500 aminoácidos contiguos de la secuencia completa.

El término "variante" (o "derivado") con respecto a un polipéptido indica que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia (p. ej., una secuencia presente en la naturaleza). La variante puede tener cambios "conservativos", en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, p. ej., sustitución de leucina por isoleucina. Alternativamente, una variante puede tener cambios "no conservativos", p. ej., sustitución de una glicina por un triptófano. Una variación menor análoga también puede incluir supresión o inserción de aminoácidos, o ambas. Directrices para determinar qué residuos de aminoácido se pueden sustituir, insertar o suprimir sin eliminar actividad biológica o inmunológica se pueden encontrar usando programas informáticos muy conocidos en la especialidad, por ejemplo, el software DNASTAR. Ejemplos de sustituciones conservativas también se describen posteriormente. Las variantes también incluyen proteínas de fusión y polipéptidos derivados de otro modo del polipéptido. Opcionalmente, la variante es al menos aproximadamente 60% idéntica a la secuencia de referencia (p. ej., una secuencia presente en la naturaleza, p. ej., una secuencia polipeptídica de WSX-1, gp130, p28 o EBI3 de ser humano o ratón) o una subsecuencia de la misma. Frecuentemente, tales secuencias son al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% o al menos aproximadamente 99,5% idénticas a la secuencia de referencia, por ejemplo, sobre una subsecuencia de la secuencia de referencia incluyendo, p. ej., al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300 o al menos aproximadamente 500 aminoácidos contiguos de la secuencia de referencia.

El término "derivado de" se refiere a un componente que se aísla de o se elabora usando una molécula especificada, o información procedente de la molécula especificada. Por ejemplo, un polipéptido que se deriva de un segundo polipéptido puede incluir una secuencia o subsecuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia o subsecuencia de aminoácidos del segundo polipéptido. En el caso de polipéptidos, la especie derivada se puede obtener, por ejemplo, mediante mutagénesis presente en la naturaleza, mutagénesis dirigida artificial, mutagénesis aleatoria artificial, u otras técnicas para producir polipéptidos recombinantes. La mutagénesis de un polipéptido implica típicamente la manipulación del polinucleótido que codifica el polipéptido.

El término "proteína de fusión" indica que la proteína incluye componentes polipeptídicos derivados de más de una proteína o un polipéptido parental. Típicamente, una proteína de fusión se expresa a partir de un gen de fusión en el que una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia polipeptídica procedente de una proteína se adjunta en el marco con, y opcionalmente separada por un ligador de, una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia polipeptídica procedente de una proteína diferente. El gen de fusión puede ser expresado a continuación por una célula (o en un sistema de expresión in vitro) como una sola proteína de fusión recombinante. Como otro ejemplo, una proteína de fusión se puede producir al conectar covalentemente (p. ej., in vitro) los componentes polipeptídicos después de que cada componente se produzca separadamente.

Un "polipéptido de WSX-1 soluble" o "WSX-1 soluble" comprende la totalidad o parte del dominio extracelular de un polipéptido de WSX-1 (p. ej., un WSX-1 presente en la naturaleza o una variante del mismo) pero no el dominio transmembranario o el dominio intracelular. El polipéptido (o un complejo que incluye el polipéptido) opcionalmente es soluble en solución acuosa en una concentración de al menos aproximadamente 10 µg/ml, al menos aproximadamente 100 µg/ml, al menos aproximadamente 1 mg/ml o al menos aproximadamente 10 mg/ml.

- 5 Un "polipéptido de gp130 soluble" o "gp130 soluble" comprende la totalidad o parte del dominio extracelular de un polipéptido de gp130 (p. ej., una gp130 presente en la naturaleza o una variante de la misma) pero no el dominio transmembranario o el dominio intracelular. El polipéptido (o un complejo que incluye el polipéptido) opcionalmente es soluble en solución acuosa en una concentración de al menos aproximadamente 10 µg/ml, al menos aproximadamente 100 µg/ml, al menos aproximadamente 1 mg/ml o al menos aproximadamente 10 mg/ml.
- 10 Un "dominio" de una proteína es cualquier porción de la proteína entera, hasta e incluyendo la proteína completa, pero típicamente comprendiendo menos de la proteína completa. Un dominio puede, pero no necesita, plegarse independientemente del resto de la cadena proteínica y/o correlacionarse con una función biológica o localización particular (p. ej., un dominio de unión a ligando o un dominio citosólico, transmembranario o extracelular).
- 15 El término "afección inflamatoria" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno u otra afección en los que esté presente inflamación. La inflamación puede ser, p. ej., aguda, crónica, localizada y/o sistémica y puede estar mediada por células de la respuesta inmunitaria innata y/o adaptiva.
- Una composición "antiinflamatoria" es una que mejora la inflamación. Por ejemplo, la composición puede provocar la resolución de o prevenir el empeoramiento adicional de una afección inflamatoria.
- 20 Un "sujeto" en la presente es típicamente un ser humano, pero puede ser un mamífero no humano. Mamíferos no humanos ejemplares incluyen animales de laboratorio, domésticos, de compañía, deportivos y de ganado, p. ej., ratones, gatos, perros, caballos y vacas. En un aspecto, tal sujeto es elegible para el tratamiento de una afección inflamatoria. Para los propósitos de la presente, tal sujeto elegible es un que esté experimentado o haya experimentado uno o más signos, síntomas u otras indicaciones de la afección inflamatoria. El diagnóstico de la afección (y la determinación de la elegibilidad para el tratamiento) se puede realizar según se establece en la especialidad.
- 25 "Tratamiento" de un sujeto en la presente se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen una afección inflamatoria así como aquellos en los que se ha de prevenir la inflamación. De ahí que el sujeto pueda haber sido diagnosticado con una afección inflamatoria o pueda estar predispuesto o ser sensible a la afección inflamatoria.
- 30 El término "mejorar" o "mejora" según se usa en la presente se refiere a una disminución, reducción o eliminación de una afección, enfermedad, trastorno o fenotipo, incluyendo una anomalía o un síntoma.
- 35 Un "síntoma" de una afección, enfermedad o trastorno es cualquier fenómeno mórbido o separación de lo normal en estructura, función o sensación, experimentado por un sujeto e indicativo de la afección, enfermedad o trastorno.
- 40 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz para prevenir, mejorar o tratar una afección, enfermedad o trastorno. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un polipéptido o complejo se refiere a una cantidad del polipéptido o complejo que es eficaz para prevenir, mejorar o tratar la afección inflamatoria especificada. De forma similar, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una combinación de un polipéptido o complejo y un segundo compuesto (p. ej., un anticuerpo, otro polipéptido o complejo o un fármaco) se refiere a una cantidad del polipéptido o complejo y una cantidad del segundo compuesto que, en combinación, son eficaces para prevenir, mejorar o tratar la afección especificada.
- 45 Se ha de entender que la terminología "una combinación de" dos compuestos no significa que los compuestos se tengan que administrar mezclados entre sí. Así, el tratamiento con o el uso de tal combinación abarca una mezcla de los compuestos o la administración separada de los compuestos, e incluye la administración el mismo día o en días diferentes. Así, la terminología "combinación" significa que se usan dos o más compuestos para el tratamiento, bien individualmente o bien mezclados entre sí. Cuando un polipéptido o complejo y un segundo compuesto, por ejemplo, se administran en combinación a un sujeto, el polipéptido o complejo está presente en el sujeto en un momento en el que el segundo compuesto también está presente en el sujeto, ya se administren el polipéptido o complejo y el segundo compuesto individualmente o mezclados al sujeto.
- 50 El término "anticuerpo" en la presente memoria se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej. anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo con tal de que exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como un gran número de genes de regiones variables de inmunoglobulina.
- 55 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente la región de unión a antígeno de la misma. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.
- 60
- 65

Un "anticuerpo intacto" es uno que comprende dominios variables pesados y ligeros así como una región Fc.

5 Los "anticuerpos naturales" son habitualmente glicoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras light (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tienen puentes de diisulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

15 El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren mucho en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones de marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada una cuatro FR, que adoptan principalmente una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y cols. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

30 La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El término "región Fc" se refiere a tal fragmento que no se une a antígeno resultante de la digestión de todo el anticuerpo, ya esté en forma monómera o multímera. El tratamiento con pepsina da un fragmento $F(ab)_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de reticular el antígeno.

35 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación intensa no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con menor afinidad que el sitio de unión entero.

45 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de nuevos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente para Fab' en la que el residuo o los residuos de cisteína de los dominios constantes soportan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab)_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo. Véase, p. ej., *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1999), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo.

55 Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpo en cuanto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos se pueden sintetizar de novo bien químicamente o bien al utilizar tecnología de ADN recombinante. Así, el término anticuerpo, según se usa en la presente, incluye anticuerpo o fragmentos de los mismos bien producidos mediante la modificación de anticuerpos enteros o bien sintetizados de novo usando tecnologías de ADN recombinante.

60 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) procedentes de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

65 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e

IgA2. Los dominios constantes de cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α (alfa), δ (delta), ϵ (épsilon), γ (gamma) y μ (mu), respectivamente. Las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

5 Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido de Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

10 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Al usar un ligador que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, las cadenas se fuerzan para aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más a fondo, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 1993/11161; y Hollinger y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

20 El término "anticuerpo monoclonal" según se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto para posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes generalmente tales variantes en cantidades secundarias. En contraste con preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe considerar que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar según la presente invención se pueden elaborar mediante el método del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y cols., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden elaborar mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la Pat. EE. UU. N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson y cols., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y cols., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

35 Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, con tal de que exhiban la actividad biológica deseada (Pat. EE. UU. N° 4.816.567; Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominios variables derivadas de un primate no humano (p. ej. monos del Viejo Mundo, tales como babuino, mono Rhesus o mono cynomolgus) y secuencias de región constante humanas (Pat. EE. UU. N° 5.693.780).

45 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., marinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos procedentes de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos procedentes de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de regiones de marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Por otra parte, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donantes. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las FR son las de una secuencia inmunoglobulínica humana, excepto por la sustitución o sustituciones de FR que se apuntan anteriormente. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante inmunoglobulínica, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse Jones y cols., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann y cols., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

65 El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido procedentes de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (véase, p. ej., Kabat y cols.

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los residuos procedentes de un "bucle hipervariable" (véase, p. ej., Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los residuos de "marco" o "FR" son los residuos de dominio variable distintos a los residuos de la región hipervariable según se define en la presente.

5 Un "receptor de Fc" y "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet (1991) Annu. Rev. Immunol 9:457-92; Capel y cols. (1994) Immunomethods 4:25-34; y de Haas y cols. (1995) J. Lab. Clin. Med. 126:330-41. Otros FcR, incluyendo los que se van a identificar en el futuro, son abarcados por el término "FcR" en la presente. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y cols. (1976) J. Immunol. 117:587 y Kim y cols. (1994) J. Immunol. 24:249).

15 Un "modulador de la actividad" modula (intensifica o inhibe) una actividad de un polipéptido o complejo (p. ej., un receptor o ligando de receptor), bien parcialmente o bien completamente. Un modulador puede ser, p. ej., una molécula pequeña, un polipéptido, un ácido nucleico, etc.

20 Un "agonista" es un compuesto (p. ej., una sustancia endógena o un fármaco) que se une a y activa un receptor, iniciando de ese modo una respuesta (p. ej., una respuesta fisiológica o farmacológica) característica de ese receptor. Los agonistas pueden ser, p. ej., agonistas totales o agonistas parciales.

25 Un "antagonista" es un compuesto (p. ej., un fármaco) que se puede unir a un receptor y evitar que un agonista se una a y active ese receptor. Típicamente, la unión de un antagonista a un receptor forma un complejo que no da lugar a ninguna respuesta, como si el receptor estuviera desocupado. Alternativamente, el antagonista puede ser un agonista parcial.

30 Merece la pena apuntar que ciertos compuestos se pueden clasificar como un agonista y como un antagonista. Por ejemplo, un "agonista-antagonista mixto" (también llamado un "agonista parcial") es un compuesto que posee afinidad para un receptor, pero que, a diferencia de un agonista total, provocará sólo un pequeño grado de la respuesta característica de ese receptor, aunque una alta proporción de receptores estén ocupados por el compuesto. Tal ocupación de los receptores por el agonista parcial puede evitar la unión de un agonista total (p. ej., un agonista endógeno) al receptor.

Una variedad de términos adicionales se define o se caracteriza de otro modo en la presente.

Descripción detallada

35 Existen numerosas afecciones inflamatorias en las que las células T son mediadores críticos de la enfermedad, y se ha enfocado mucho esfuerzo en el desarrollo de estrategias para inhibir específicamente respuestas de células T. Por ejemplo, la enteropatía inflamatoria, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple, la uveítis, la psoriasis, la artritis, el asma, el lupus y el rechazo de trasplantes son todas afecciones que implican a células T. La respuesta inmunitaria también se ha relacionado con una variedad de otras afecciones idiopáticas, tales como espondilitis anquilosante y sarcoidosis. Para todas estas afecciones, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos. El reconocimiento de que WSX-1 es importante en la inhibición de respuestas de células T significa que este receptor representa una diana viable para prevenir este tipo de respuestas inflamatorias. Alternativamente, el bloqueo de este receptor se podría usar para aumentar respuestas de células T, por ejemplo durante la vacunación o la terapia mediada inmunitariamente para el cáncer. Además, ciertos tipos de tumores que expresan WSX-1 pueden ser sensibles a la señalización inhibitoria a través de este receptor.

45 Otras células que expresan WSX-1 o su socio gp130 (incluyendo células que expresan ambos) se pueden elegir como diana de forma similar. Se pueden modular respuestas mediadas bien por células que expresan WSX-1 o bien por células que expresan gp130, por ejemplo, mediante un polipéptido o complejo de gp130 soluble o un polipéptido o complejo de WSX-1 soluble, respectivamente, o mediante p28. Así, las respuestas mediadas por células B, mastocitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y/o similares se pueden modular mediante la activación o el bloqueo del receptor o los receptores pertinentes.

Usos y aplicaciones comerciales potenciales

55 p28, sola o en combinación con una forma soluble de WSX-1, se pueden usar para suprimir muchas afecciones inflamatorias incluyendo, pero no limitadas a, alergias, artritis, enteropatía inflamatoria, uveítis, ciertos cánceres, psoriasis, lupus, esclerosis múltiple y enfermedades infecciosas crónicas tales como tuberculosis y hepatitis. A partir de estas observaciones, se sugieren enfoques similares como enfoques terapéuticos útiles. Así, una proteína de fusión de WSX-1 (p. ej., con una inmunoglobulina) es útil debido a que interactúa con IL-27 endógena y promueve su interacción con gp130 y promueve efectos negativos sobre las dianas. También se pueden construir moléculas terapéuticas para que tengan funciones dobles; por ejemplo, tal molécula se puede basar en una estructura de

anticuerpo en la que una cadena puede reconocer un marcador específico de una célula tal como, pero no limitado a, CD4, CD8, CD11c, etc. y la otra cadena contiene una fusión de WSX-1 o p28. Esto permite la elección como diana de tipos de células muy específicos. Adicionalmente, el reconocimiento de que la biología del receptor abarca elementos de señalización trans conduce a la idea de que las formas solubles de gp130 en complejos con IL-27 o p28 (o incluso EBI3) también pueden actuar para promover una señalización específica a través de WSX-1. Sin limitación a ningún mecanismo particular, en el modelo actual de los presentes inventores las diferentes cadenas receptoras del receptor de IL-27 tienen funciones de señalización únicas y pueden afectar a distintas funciones de las células T. Este concepto conduce al diseño de moléculas que afectan a la producción de células T de citocinas particulares muy específicamente. Basándose exclusivamente en el trabajo y los datos de los presentes inventores, estos sugieren que este enfoque se puede usar para elegir como diana, por ejemplo, IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, IL-4, IL-13, IL-17 e IL-25, así como IL-10, IL-5 y/o CD25. Todas estas representan dianas farmacológicas válidas para biotecnología y son importantes en muchas enfermedades inflamatorias mediadas por células T. Los Paneles A-C de la Figura 13 esbozan algunas posibles estrategias. Según se analiza con más detalle y con ejemplos adicionales en la presente, existen muchos enfoques adicionales que se pueden formular basándose en esta información que permite a los presentes inventores elegir como diana racionalmente funciones inmunitarias discretas.

Composiciones antiinflamatorias

Un aspecto de la invención proporciona composiciones que incluyen nuevos polipéptidos y complejos, que comprenden un complejo de WSX-1 soluble/IL-27 aislado o recombinante para el uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, en donde la afección inflamatoria se selecciona de: un trastorno inmunitario; una infección; cáncer; una alergia; artritis; asma; enteropatía inflamatoria, enfermedad de Crohn; uveítis; psoriasis; lupus; esclerosis múltiple; una enfermedad infecciosa crónica; tuberculosis; espondilitis anquilosante; rechazo de trasplantes; sarcoidosis; hepatitis. A modo de ejemplo, un "complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/p28" comprende un polipéptido de WSX-1 soluble en complejo con un polipéptido de p28, y una variante del complejo incluye un polipéptido de WSX-1 soluble variante y/o un polipéptido de p28 variante.

En un aspecto, la composición es antiinflamatoria. Opcionalmente, la composición disminuye la inflamación cuando se administra a un sujeto, p. ej., un ser humano o un animal que exhibe inflamación antes de tal administración. De forma similar, opcionalmente, la composición altera (p. ej., disminuye) una o más actividades celulares características de una respuesta inflamatoria, por ejemplo, la expresión de citocinas particulares, en células a las que se aplica la composición con relación a células no expuestas a la composición. Opcionalmente, la composición incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, en realizaciones en las que la composición se va a administrar a un sujeto. En una realización, la composición suprime el desarrollo de células que producen IL-17 (también llamadas células T_H17) a partir de células T vírgenes inducidas por IL-6 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Por ejemplo, la composición puede suprimir el desarrollo de células cooperadoras T (T_H17) CD4+ que producen IL17 a partir de células T vírgenes inducidas por IL-6 y factor de crecimiento transformante beta. De forma similar, opcionalmente la composición suprime una o más funciones de las células T_H17. En una realización, la composición incluye TGF- β .

La composición puede incluir una o más células, por ejemplo, una o más células T, células B, mastocitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas u otras células que expresan gp130 (p. ej., células endoteliales) o WSX-1. El complejo puede afectar a una función o actividad de la célula. En una realización, la composición incluye una célula T y la composición altera una función o actividad de la célula T, con relación a una célula T correspondiente no tratada con la composición. Por ejemplo, la célula T puede presentar una expresión alterada de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, IL-4, IL-13, IL-17, IL-25, IL-10, IL-5 o CD25, proliferación alterada o supervivencia alterada. La expresión de las diversas citocinas se puede detectar mediante cualquiera de una variedad de técnicas muy conocidas en la especialidad, p. ej., para detectar niveles de ARNm y/o proteína. Típicamente, la expresión de las citocinas (p. ej., IL-2 e IFN-gamma) es regulada a la baja por el complejo, aunque la producción de la citocina inhibidora IL-10 típicamente se incrementa. Típicamente, un complejo de WSX-1 se usa para modular la actividad de una célula que expresa gp130 (y opcionalmente también WSX-1), mientras que un complejo de gp130 se usa para modular la actividad de una célula que expresa WSX-1 (y opcionalmente también gp130).

Polipéptidos de WSX-1 y gp130 solubles adecuados incluyen, por ejemplo, el dominio extracelular de WSX-1 o gp130 o una porción (una subsecuencia) del mismo. El dominio extracelular opcionalmente es parte de una proteína de fusión, p. ej., una de las descritas en la presente o una fusión con una región Fc, p. ej., un dominio Fc de IgG. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 20040185049 de Hunter y Villarino titulada "Methods for modulating an inflammatory response" y Wirtz y cols. "Protection from lethal septic peritonitis by neutralizing the biological function of interleukin 27" J. Exp. Med. 10.1084/jem.20060471 para una descripción de polipéptidos de WSX-1 soluble ejemplares. Se construyen fácilmente polipéptidos de WSX-1 soluble adicionales, y algunos están disponibles comercialmente. Por ejemplo, quimeras de TCCR/WSX-1/Fc de ser humano y ratón están disponibles de R&D Systems (en Internet en [www\(dot\)rndsystems\(dot\)com](http://www(dot)rndsystems(dot)com)). Se pueden producir análogamente polipéptidos de Gp130 soluble; véase, p. ej., Jostock y cols. (2001) "Gp130 soluble is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses" Eur. J. Biochem. 268:160-167 y Lin y cols. (2006) "The functional

expression of a biologically active fragment of gp130 soluble as an ELP fusion protein in transgenic plants: purification via inverse-transition-cycling" *Biochem J.* 23 de mayo doi:10.1042/BJ20060544. De forma similar, polipéptidos de p28 y EBI3 adecuados incluyen, p. ej., p28 o EBI3 o una subsecuencia de los mismos. Los componentes del complejo opcionalmente están asociados no covalentemente en el complejo, u opcionalmente están conectados covalentemente por un reticulador químico o similares en el complejo.

Las proteínas de fusión son otra característica de la invención. Según esto, una clase general de realizaciones proporciona una proteína de fusión de WSX-1 recombinante o aislada para el uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, en donde la afección inflamatoria se selecciona de: un trastorno inmunitario; una infección; cáncer; una alergia; artritis; asma; enteropatía inflamatoria, enfermedad de Crohn; uveítis; psoriasis; lupus; esclerosis múltiple; una enfermedad infecciosa crónica; tuberculosis; espondilitis anquilosante; rechazo de trasplantes; sarcoidosis; hepatitis. La proteína de fusión incluye un polipéptido de WSX-1, que puede estar, p. ej., en el extremo N de la proteína de fusión, en el extremo C de la proteína de fusión, o ser interno a proteína de fusión. El polipéptido de WSX-1 puede incluir el dominio extracelular, o una subsecuencia del mismo, de un WSX-1 presente en la naturaleza (p. ej., WSX-1 humano) o una variante del mismo.

En una clase de realizaciones, la proteína de fusión comprende uno o más dominios que reconocen un marcador específico de una célula, por ejemplo, uno o más dominios de anticuerpo (p. ej., dominios V_H y V_L) que reconocen el marcador. El marcador específico para una célula puede ser esencialmente cualquier marcador específico para una célula, por ejemplo, un marcador para una población de linfocitos, una célula T, una célula de la respuesta inmunitaria innata tal como un neutrófilo, una célula dendrítica o un mastocito, o una célula cancerosa. Se conoce en la especialidad una variedad de tales marcadores para diversos tipos de células, y se pueden determinar más mediante técnica muy conocidas en la especialidad. En una clase de realizaciones, el marcador específico para una célula se selecciona de CD4, CD8, CD11c, CD11b y NK1.1.

En un caso, la proteína de fusión comprende uno o más dominios polipeptídicos derivados de p28 o EBI3. La proteína de fusión incluye opcionalmente dominios derivados tanto de p28 como de EBI3. El polipéptido de WSX-1 se puede enlazar al polipéptido de p28 o EBI3 a través de un ligador. Se conocen en la especialidad muchos ligadores adecuados (p. ej., ligadores que incluyen 4-6 residuos de Gly y/o Ala) y se diseñan fácilmente ligadores adicionales (véase, p. ej., Crasto y Feng (2000) "LINKER: A program to generate linker sequences for fusion proteins" *Protein Engineering* 13:309-312).

La proteína de fusión puede ser monómera, dímera (p. ej., homodímera o heterodímera) o multímera. Preferiblemente, la proteína de fusión es soluble. Opcionalmente, la proteína de fusión forma un complejo con p28, EBI3 o IL-27.

Esencialmente todas las características apuntadas para las realizaciones anteriores se aplican también a estas realizaciones, según sea pertinente. Por ejemplo, una composición que incluye la proteína de fusión incluye opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, una célula (p. ej., una célula T) y/o TGF- β .

También se divulga en la presente una proteína de fusión de p28 recombinante o aislada. La proteína de fusión incluye un polipéptido de p28, que puede estar, p. ej., en el extremo N de la proteína de fusión, en el extremo C de la proteína de fusión, o ser interno a la proteína de fusión. El polipéptido de p28 se puede derivar de una p28 presente en la naturaleza (p. ej., p28 humana) o una variante de la misma.

La proteína de fusión comprende opcionalmente uno o más dominios de anticuerpo. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir uno o más dominios de anticuerpo que reconocen un marcador específico de una célula.

Esencialmente todas las características apuntadas para las realizaciones anteriores se aplican también a estas realizaciones, según sea pertinente, por ejemplo, con respecto a marcadores específicos de células, solubilidad, estado monómero, dímero o multímero, formación de complejos, inclusión en composiciones (p. ej., con un excipiente farmacéuticamente aceptable, una célula y/o TGF- β) y/o similares.

Será evidente que se construyen análogamente proteínas de fusión de gp130 y EBI3.

Cribado de moduladores

Los compuestos que modulan la actividad de WSX-1, p28, EBI3 y/o gp130 pueden ser útiles, por ejemplo, para tratar la inflamación o modular de otro modo la respuesta inflamatoria. Se divulgan en la presente métodos para identificar un compuesto que se une a o modula una actividad de un polipéptido de WSX-1 soluble, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/p28, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/IL-27, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/EBI3, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/p28, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/IL-27 o un complejo polipeptídico de gp130 soluble/EBI3. En los métodos, una muestra biológica o bioquímica que comprende el polipéptido o complejo se pone en contacto con un compuesto de prueba. Se detecta la unión del compuesto de

prueba al polipéptido o complejo o la modulación de la actividad del polipéptido o complejo por el compuesto de prueba, identificando de ese modo el compuesto que se une a o modula la actividad del polipéptido o complejo.

5 En una clase de realizaciones, el compuesto potencia la inhibición de una respuesta de células T por el polipéptido o complejo, potencia la actividad antagonista contra IL-2 o IL-17, o altera la proliferación, la supervivencia o la expresión de células T de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, IL-4, IL-13, IL-17, IL-25, IL-10, IL-5 o CD25 con relación a una célula T correspondiente no tratada con el compuesto. El compuesto se une opcionalmente al receptor de IL-27, bloquea la interacción entre WSX-1 y gp130, potencia la interacción entre WSX-1 y gp130, potencia la interacción de p28 con WSX-1 o el receptor de IL-27, o similares. Compuestos ejemplares incluyen anticuerpos (p. 10 ej., anticuerpos contra polipéptidos de WSX-1, p28, EBI3 y/o gp130), agonistas, antagonistas y moduladores de la actividad, por ejemplo, moléculas pequeñas.

15 La muestra biológica o bioquímica puede incluir polipéptidos o complejos aislados o recombinantes, células (p. ej., células T), muestras de tejidos y/o similares. Respuestas de células T tales como proliferación, supervivencia y expresión de marcadores se pueden evaluar mediante técnicas conocidas en la especialidad.

Anticuerpos

20 Se divulgan en la presente anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de WSX-1 soluble, un polipéptido de p28, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/p28 aislado o recombinante, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/EBI3 aislado o recombinante, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/IL-27 aislado o recombinante, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/IL-27 aislado o recombinante, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/p28 aislado o recombinante, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/EBI3 aislado o recombinante, o una variante de los mismos. Opcionalmente, tal anticuerpo modula, p. ej., potencia, una actividad del polipéptido o complejo polipeptídico. En un caso, el anticuerpo se une a o modula una actividad de un complejo de gp130/WSX-1/IL-27 o modula la formación del complejo en una célula. Por ejemplo, el anticuerpo puede 25 incrementar la semivida del complejo. Tales anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, monocatenarios, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Tales anticuerpos encuentran uso, por ejemplo, en el tratamiento de afecciones inflamatorias. Se describirán aquí métodos para generar tales anticuerpos.

30 El antígeno que se va a usar para la producción de, o el cribado con respecto a, un anticuerpo o anticuerpos puede ser, p. ej., una forma soluble de WSX-1, p28, gp130 o EBI3 o una porción o complejo de la misma, que contiene el epítipo deseado. Alternativamente, o adicionalmente, células que expresan WSX-1 o gp130 en su superficie celular se pueden usar para generar, o cribar con respecto a, un anticuerpo o anticuerpos. Otras formas de polipéptidos de WSX-1, p28, gp130 o EBI3 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la especialidad. 35 Anticuerpos que facilitan la acción de IL2 e IL6 son conocidos en la especialidad; el cribado con respecto a anticuerpos que facilitan la acción de WSX-1, p28, gp130 y/o EBI3 se pueden obtener a través de métodos similares. Véase, p. ej., Boyman y cols. (2006) "Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes" *Science* 311:1924-1927 y Suzuki y cols. (1994) "Antibody against interleukin-6 reduces inflammation and numbers of cysts in brains of mice with toxoplasmic encephalitis" *Infect Immun.* 62: 2773-2778. Por ejemplo, anticuerpos producidos contra polipéptidos (incluyendo complejos) de WSX-1, p28, gp130 y/o EBI3 se pueden 40 ensayar con respecto a la unión a los polipéptidos o complejos de los mismos o ensayar para determinar si modulan la actividad de los polipéptidos o complejos usando técnicas conocidas en la especialidad. Un anticuerpo que se une a un complejo es opcionalmente un anticuerpo que se une a un componente polipeptídico del complejo independientemente de si ese polipéptido es parte del complejo o no, o es opcionalmente un anticuerpo que se une específicamente al complejo y no a ningún componente polipeptídico del complejo (p. ej., el anticuerpo se puede unir 45 al complejo con al menos 1.000 veces más afinidad que se une a un componente del complejo).

50 Numerosos métodos para producir anticuerpos son conocidos por los expertos en la especialidad, y se pueden adaptar para producir anticuerpos específicos para polipéptidos o complejos de la invención. Véanse las secciones posteriores, así como, p. ej., Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY; y Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, NY; Stites y cols. (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y la referencias citadas allí; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY; *Fundamental Immunology*, p. ej., 4ª Edición (o posterior), W.E. Paul (ed.), Raven Press, N.Y. (1998); y Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497. Otras técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos incluyen la selección de 55 bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores fágicos o similares. Véanse Huse y cols. (1989) *Science* 246: 1275-1281; y Ward, y cols. (1989) *Nature* 341: 544-546. Detalles adicionales sobre la producción de anticuerpos y las técnicas de manipulación se pueden encontrar en el documento USPN 5.482.856, Borrebaeck (ed) (1995) *Antibody Engineering*, 2ª Edición Freeman and Company, NY (Borrebaeck); McCafferty y cols. (1996) *Antibody Engineering, A Practical Approach* IRL at Oxford Press, Oxford, Inglaterra (McCafferty), Paul (1995) *Antibody Engineering Protocols* Humana Press, Towata, NJ (Paul), Ostberg y cols. (1983) *Hybridoma* 2: 361-367, Ostberg, el 60 documento USPN 4.634.664, y Engelman y cols. documento USPN 4.634.666. Anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonal y policlonales específicos) y antisueros específicos se unirán habitualmente con una K_D de al menos

aproximadamente 0,1 μM , preferiblemente al menos aproximadamente 0,01 μM o mejor, y lo más típicamente y preferiblemente, 0,001 μM o mejor. Como se apreciará, las características de unión de tal anticuerpo dependerán típicamente de la aplicación específica a la que se dedica el anticuerpo, incluyendo las características ambientales, p. ej., pH, concentración de sal y similares. En ciertos aspectos preferidos, las condiciones ambientales típicamente incluirán las de los sistemas biológicos, p. ej., pH entre aproximadamente 2 y aproximadamente 9 (p. ej., aproximadamente 7) y niveles de sal a una fuerza iónica bioquímicamente pertinente, p. ej., entre aproximadamente 0 mM y 100 mM.

Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se producen preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que es inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, p. ej., hemocianina de lapa de ojo de cerradura, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivación, por ejemplo, éster de maleimidobenzosulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R' son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizaron contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados al combinar, p. ej., 100 μg o 5 μg de la proteína o el conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectar la solución intradérmicamente en múltiples puntos. Un mes después se les administra a los animales una dosis de recuerdo con de 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples puntos. De 7 a 14 días más tarde se extrae sangre de los animales y el suero se ensaya con respecto al título de anticuerpo. Se les administran a los animales dosis de recuerdo hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, se le administra al la dosis de recuerdo con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden elaborar en cultivo celular recombinante como fusiones proteínicas. Además, agentes de agregación tales como alumbre se usan adecuadamente para intensificar la respuesta inmunitaria.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo excepto por posibles variantes que surgen durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes generalmente tales variante en cantidades pequeñas. Así, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos o policlonales.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden elaborar usando el método del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y cols., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden elaborar mediante métodos de ADN recombinante (Pat. EE. UU. Nº 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe anteriormente en la presente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Células de mieloma preferidas son las que se fusionan eficazmente, soportan la producción estable a alto nivel de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. EE. UU. de A., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de the American Type Culture Collection, Rockville, Md. EE. UU. de A. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-ser humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y cols., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

- El medio de cultivo en que se están desarrollando células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y cols., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).
- Después de que se identifique que las células de hibridoma producen anticuerpos de la especificidad, la afinidad y/o la actividad deseadas, los clones se pueden subclonar al limitar procedimientos de dilución y desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.
- Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, agarosa reticulada con proteína A-Sepharose[®], cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.
- El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y somete a secuenciación fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., al usar sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede introducir en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS simicas, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulínica, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y cols., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).
- Además, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpo generadas usando técnicas descritas en McCafferty y cols., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y cols., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y cols., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) mediante barajado de cadenas (Marks y cols., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección y recombinación *in vivo* combinatorias como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y cols., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables para técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.
- El DNA también se puede modificar, por ejemplo, al sustituir la secuencia codificante por dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Pat. EE. UU. N° 4.816.567; Morrison, y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o al enlazar covalentemente a la secuencia codificante inmunoglobulínica la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulínico.
- Opcionalmente, tales polipéptidos no inmunoglobulínicos sustituyen a los dominios es de un anticuerpo o sustituyen a los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.
- Anticuerpos humanizados
- Se han descrito en la especialidad métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan a menudo residuos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones y cols., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y cols., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y cols., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), al sustituir las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano por secuencias de la región hipervariable. Según esto, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Pat. de EE. UU. N° 4.816.567) en los que menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente procedentes de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar para elaborar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado método de "ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que está más cerca a la del roedor se acepta entonces como la región de marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims y cols., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia y cols., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa una región de marco particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y cols., *J. Immunol.*, 151:2623(1993)).

También es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están disponibles comúnmente modelos tridimensionales de inmunoglobulinas y son familiares para los expertos en la especialidad. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de posibles secuencias inmunoglobulínicas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la posible secuencia inmunoglobulínica, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la posible inmunoglobulina para unirse a su antígeno. De este modo, residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras e importadas de modo que se alcance la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad incrementada para el antígeno o los antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y lo más sustancialmente implicados en influir en la unión al antígeno.

Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (p. ej., ratones) que son capaces, al ser inmunizados, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de enlace a cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humanos en tales ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos al excitar al antígeno. Véanse, p. ej., Jakobovits y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y cols., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann y cols., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y las Pat. EE. UU. N° 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Alternativamente, la tecnología de despliegue en fagos (McCafferty y cols., *Nature* 348:552-553 (1990)) se puede usar para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpo humanos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) inmunoglobulínicos procedentes de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes de dominios V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de revestimiento bien principal o bien secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se despliegan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una sola copia de ADN de una sola hebra del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. El despliegue en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión, véanse, p. ej., Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Varias fuentes de segmentos de genes V se pueden usar para el despliegue en fagos. Clackson y cols., *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos antioxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V procedentes de donantes humanos no inmunizados y los anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) se pueden aislar siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y cols., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith y cols., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véanse, además, las Pat. EE. UU. N° 5.565.332 y 5.573.905.

También se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas in vitro (véanse las Pat. EE. UU. N° 5.567.610 y 5.229.275).

Fragmentos de anticuerpo

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, p. ej., Morimoto y cols., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan y cols., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células hospedadoras recombinantes.

Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Alternativamente, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y cols., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ de un cultivo de células hospedadoras recombinantes.

5 Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto. Alternativamente, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 1993/16185 y las Pat. EE. UU. N° 5.571.894 y 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", p. ej., como el descrito en la Pat. EE. UU. N° 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

10 Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes del antígeno de WSX-1, p28, gp130 o EBI3. Otros anticuerpos se pueden unir a uno de WSX-1, p28, gp130 o EBI3 y además unirse a otro de WSX-1, p28, gp130 o EBI3 o un marcador de la superficie de células T. Los anticuerpos biespecíficos también se

15 pueden usar para localizar fármacos o agentes citotóxicos en una célula que comprende el antígeno; estos anticuerpos poseen un brazo de unión a WSX-1, p28, gp130 o EBI3 y un brazo que se une al fármaco o agente citotóxico. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (p. ej. anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

20 Se conocen en la especialidad métodos para elaborar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y cols., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos

25 híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo mixture diferentes, de las cuales una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se divulgan en el documento WO 1993/08829 y en Trauneker y cols., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

30 Según un enfoque diferente, dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. ADN que

35 codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertaron en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las

40 tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no son particularmente significativas.

45 En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo de separación fácil. Este enfoque se divulga en el

50 documento WO 1994/04690. Para detalles adicionales de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh y cols., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Según otro enfoque descrito en la Pat. EE. UU. N° 5.731.168, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede manipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo celular recombinante. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C_{H3} de un dominio constante de anticuerpo. En este método, uno o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas procedentes de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales mayores (p. ej. tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes sobre la interfase de la segunda molécula de anticuerpo al reemplazar cadenas laterales de aminoácido grandes por unas más

60 pequeñas (p. ej. alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Pat. EE. UU. N° 4,676,980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 1991/00360, WO 1992/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden elaborar usando cualesquiera métodos de reticulación convenientes. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la especialidad y se divulgan, por ejemplo, en la Pat. EE. UU. N° 4.676.980, junto con un número de técnicas de reticulación.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando ligación química. Brennan y cols., Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se segmentan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito sódico para estabilizar ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se convierte a continuación en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

También se han descritos diversas técnicas para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente de un cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny y cols., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina procedentes de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y a continuación se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de los "diacuerpos" descrita por Hollinger y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Según esto, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber y cols., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpo triespecíficos. Tutt y cols. J. Immunol. 147: 60 (1991).

Será evidente que ciertas proteínas de fusión, p. ej., ciertas proteínas de fusión de WSX-1 o p28, se pueden preparar usando técnicas análogas a aquellas para la producción de anticuerpos biespecíficos. Una proteína de fusión de WSX-1 o p28 basada en un anticuerpo biespecífico puede poseer un brazo que se une a un marcador específico de una célula (p. ej., CD4, CD8, CD11c, CD11b y NK1.1) y un brazo en el que los dominios de unión a antígeno se reemplazan por un polipéptido de WSX-1 o p28.

Conjugados y otras modificaciones del anticuerpo

El anticuerpo usado en los métodos o incluidos en los artículos de fabricación en la presente está opcionalmente conjugado a un fármaco, p. ej., según se describe en el documento WO 2004/032828 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2006/0024295. Los anticuerpos divulgados en la presente también se pueden conjugar con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (p. ej. un agente quimioterapéutico peptidílico, véase el documento WO 1981/01145) en un fármaco anticanceroso u otro activo. Véanse, por ejemplo, el documento WO 1988/07378, la Pat. EE. UU. N° 4.975.278 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2006/0024295.

Se contemplan en la presente otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede ligar a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, p. ej., polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol.

Los anticuerpos divulgados en la presente también se pueden formular como liposomas. Liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la especialidad, tales como los descritos en Epstein y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); las Pat. EE. UU. N° 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO 1997/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Liposomas con tiempo en circulación intensificado se divulgan en la Pat. EE. UU. N° 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro

deseado. Fragmentos Fab' de un anticuerpo divulgado en la presente se pueden conjugar a los liposomas según se describe en Martin y cols. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon y cols. J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

5 Se contemplan una modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proteínicos o peptídicos. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo al introducir cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, con tal de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden procedimientos postraduccionales del anticuerpo, tales como un cambio del número o la posición de sitios de glicosilación.

15 Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" según se describe por Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (p. ej., residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación al introducir variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación de por sí no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se efectúa mutagénesis de barrido de alanina o aleatoria en el codón o la región diana y las variantes del anticuerpo expresadas se criban con respecto a la actividad deseada.

30 Inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácido individuales o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o al anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo de una enzima, o un polipéptido que incrementa la semivida sérica del anticuerpo.

35 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución de anticuerpos incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Tales sustituciones pueden ser conservativas o no conservativas.

40 Cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo también se puede sustituir, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. A la inversa, se pueden añadir un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

45 Un tipo de variante de sustitución implicar sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original. Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para una investigación adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo original a partir del que se generan. Un modo conveniente de generar tales variantes de sustitución es la maduración por afinidad usando despliegue de fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (p. ej. 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácido en cada sitio. Los fragmentos de anticuerpo así generados se despliegan en de un modo monovalente a partir de partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto génico III de M 13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes con fagos desplegados se criban a continuación con respecto a su actividad biológica (p. ej. afinidad de unión) según se divulga en la presente. A fin de identificar posibles sitios de la región hipervariable para la modificación, se puede realizar mutagénesis de barrido de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente. Una vez que se generan tales variantes, el conjunto de variantes se somete a cribado según se describe en la presente y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes se pueden seleccionar para una investigación adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Tal alteración incluye suprimir uno o más restos de carbohidrato del anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

65

La glicosilación de polipéptidos típicamente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere al enlace del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el enlace enzimático del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere al enlace de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se efectúa convenientemente al alterar la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato enlazado al mismo se puede alterar o retirar. Por ejemplo, en una variante de glicosilación de la presente, se introducen una o más sustituciones de aminoácido en una región Fc de un anticuerpo para eliminar uno o más sitios de glicosilación. Tal anticuerpo aglicosilado puede tener una función efectora reducida, p. ej., en comparación con IgG1 humana, de modo que se disminuye su capacidad para inducir la activación del complemento y/o la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, y el anticuerpo aglicosilado puede tener unión reducida (o nula) al receptor de Fc.

Para ciertos anticuerpos, p. ej., anticuerpos agotadores, puede ser deseable la modificación del anticuerpo para intensificar la ADCC y/o CDC del anticuerpo. Por ejemplo, anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carecen de fucosa enlazada a una región Fc del anticuerpo se describen en el documento 2003/0157108 de EE. UU. (Presta, L.). Véase además el documento 2004/0093621 de EE. UU. (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.). Anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante en el carbohidrato enlazado a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet y cols. y la Pat. EE. UU. N° 6.602.684, Umana y cols. Anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido enlazado a una región Fc del anticuerpo se presentan en el documento WO 1997/30087, Patel y cols. Véanse, además, los documentos WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) que tratan de anticuerpos con carbohidrato alterado enlazado a la región Fc del mismo.

Así, una variante de glicosilación comprende opcionalmente una región Fc, en donde una estructura de carbohidrato enlazada a la región Fc carece de fucosa. Tales variantes tienen función de ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácido en la misma que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "desfucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: los documentos 2003/0157108 de EE. UU.; WO 2000/61739; WO 2001/29246; 2003/0115614 de EE. UU.; 2002/0164328 de EE. UU.; 2004/0093621 de EE. UU.; 2004/0132140 de EE. UU.; 2004/0110704 de EE. UU.; 2004/0110282 de EE. UU.; 2004/0109865 de EE. UU.; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; Okazaki y cols. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); y Yamane-Ohnuki y cols. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Ejemplos líneas celulares que producen anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteína (Ripka y cols. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); documento 2003/0157108 de EE. UU., Presta, L.; y documento WO 2004/056312, Adams y cols., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares inactivadas, tales como células CHO con inactivación de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, (Yamane-Ohnuki y cols. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

La modificación del anticuerpo con respecto a una función efectora, p. ej. a fin de intensificar la ADCC y/o CDC del anticuerpo, se puede alcanzar al introducir una o más sustituciones de aminoácido en una región Fc de un anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, se puede introducir un residuo o residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodímero así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción celular mediada por el complemento y una ADCC incrementadas. Véanse Caron y cols., *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. *Immunol* 148:2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodímeros con actividad antitumoral intensificada usando reticuladores heterobifuncionales como los descritos en Wolff y cols. *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede manipular un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y de ese modo puede tener capacidades de lisis del complemento y ADCC intensificadas. Véase Stevenson y cols. *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989). El documento WO 2000/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función de ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, donde los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácido en la región Fc del mismo. Preferiblemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc. Preferiblemente, la región Fc alterada es una región Fc de IgG1 humana que comprende o que consiste en sustituciones en uno, dos o tres de estas posiciones.

Anticuerpos con unión a C1q y/o CDC alteradas se describen en el documento WO 1999/51642 y las Pat. de EE. UU. N° 6.194.551, 6.242.195, 6.528.624 y 6.538.124 (Idusogie y cols.). Los anticuerpos comprenden una sustitución

de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácido 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc del mismo.

Para incrementar la semivida sérica del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) según se describe en la Pat. EE. UU. N° 5.739.277, por ejemplo. Según se usa en la presente, el término epítipo de unión al receptor de rescate se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de incrementar la semivida sérica in vivo de la molécula de IgG. Anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y semividas séricas incrementadas también se describen en el documento WO 2000/42072 (Presta, L.).

Cualquiera de los anticuerpos no agotadores (u otros) divulgados en la presente puede comprender al menos una sustitución en la región Fc que mejore la unión a FcRn o la semivida sérica. Por ejemplo, se divulga además en la presente un anticuerpo que comprende una región Fc variante con afinidad de unión alterada al receptor de Fc neonatal (FcRn). FcRn es estructuralmente similar al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y consiste en una cadena α unida no covalentemente a β 2-microglobulina. Las múltiples funciones del receptor de Fc neonatal se revisan en Ghetie y Ward (2000) Annu. Rev. Immunol. 18:39-766. El FcRn representa un papel en el aporte pasivo de inmunoglobulina IgG de madre a hijo y la regulación de niveles séricos de IgG. FcRn actúa como un receptor de rescate, que se une a y transporta IgG pinocitosadas en forma intacta tanto dentro de como a través de las células, y que las rescata de un ruta degradativa por defecto. Aunque los mecanismos responsables de salvar IgG todavía no están claros, se cree que las IgG no unidas se dirigen hacia la proteólisis en los lisosomas, mientras que las IgG unidas se reciclan hacia la superficie de las células y se liberan. Este control tiene lugar dentro de las células endoteliales situadas en todos los tejidos adultos. FcRn es expresada al menos en el hígado, la glándula mamaria y el intestino adulto. FcRn se une a IgG; la interacción FcRn-IgG se ha estudiado ampliamente y parece implicar a residuos en la interfase de los dominios CH2, CH3 de la región Fc de IgG. Estos residuos interactúan con residuos principalmente situados en el dominio α 2 de FcRn.

Un anticuerpo variante no agotador según se divulga en la presente puede desplegar una unión incrementada a FcRn y comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434 de la región Fc, en donde la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Véanse, p. ej., la Patente de EE. UU. 6.737.056; y Shields y cols., J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001). Opcionalmente, tal anticuerpo comprende una región Fc de IgG variante que comprende al menos una sustitución de aminoácido en Asn 434 hasta His (N434H). Opcionalmente, tal anticuerpo comprende una región Fc de IgG variante que comprende al menos una sustitución de al menos un aminoácido en Asn 434 hasta Ala (N434A). Típicamente, estas variantes comprenden una afinidad de unión superior para FcRn que polipéptidos que tienen la región Fc de la secuencia natural/secuencia silvestre. Este polipéptido y los anticuerpos variantes de Fc tienen la ventaja de ser salvados y reciclados en vez de degradados. Estos anticuerpos no degradantes se pueden usar en los métodos proporcionados en la presente.

También se contemplan anticuerpos manipulados con tres o más (preferiblemente cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales (documento US 2002/0004587 A1, Miller y cols.).

Moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la especialidad. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de la secuencia de aminoácidos presentes en la naturaleza) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis por inserción de casete de una variante o una versión no variante previamente preparada del anticuerpo.

Tratamiento de la inflamación

Un aspecto de la invención proporciona composiciones para el uso en métodos de tratamiento de una afección inflamatoria en un sujeto mamífero, p. ej., un ser humano. La afección inflamatoria que se va a tratar se selecciona de: un trastorno inmunitario, una infección, cáncer, una alergia, artritis, asma, enteropatía inflamatoria, enfermedad de Crohn, uveitis, psoriasis, lupus, esclerosis múltiple, una enfermedad infecciosa crónica, tuberculosis, espondilitis anquilosante, rechazo de trasplantes, sarcoidosis y hepatitis. Opcionalmente, la afección está mediada por células T; por ejemplo, la afección puede estar mediada por células T_{H1}, células T_{H2}, células T_{H17}, células T_H-17, células T CD4+, células T CD8⁺, células T gamma/delta, células T asesinas naturales y/o células T reguladoras. Afecciones inflamatorias ejemplares que se van a tratar incluyen, pero no se limitan a, un trastorno inmunitario (p. ej., una enfermedad autoinmunitaria); una infección; cáncer, tal como mieloma múltiple y leucemias mielógena y otra, así como metástasis tumoral; una alergia; artritis; asma; enteropatía inflamatoria, tal como colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn; uveitis; psoriasis; lupus; esclerosis múltiple; una enfermedad infecciosa crónica; tuberculosis; espondilitis anquilosante; rechazo de trasplantes; sarcoidosis; hepatitis; inflamación del sistema nervioso central; síndrome de inmunodeficiencia adquirida; pancreatitis aguda; enfermedad de Addison; lesión hepática inducida por alcohol incluyendo cirrosis alcohólica; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica; asma y otras

5 enfermedades pulmonares; aterosclerosis; vasculitis autoinmunitaria; lesión hepática inducida por hepatitis autoinmunitaria; cirrosis biliar; caquexia/anorexia, incluyendo caquexia inducida por sida; síndrome de fatiga crónica; una dolencia asociada a Clostridium, incluyendo diarrea asociada a Clostridium; afecciones e indicaciones coronarias, incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva, reestenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción de miocardio e injerto de derivación de la arteria coronaria; diabetes, incluyendo diabetes mellitus tipo 1 de comienzo juvenil y resistencia a insulina; endometriosis, endometritis y afecciones relacionadas; epididimitis; resistencia a eritropoyetina; fiebre; fibromialgia o analgesia; glomerulonefritis; enfermedad del injerto contra el hospedador/rechazo de trasplantes; enfermedad de Graves; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad de Hashimoto; anemia hemolítica; choque hemorrágico; hiperalgesia; afecciones inflamatorias de una articulación y enfermedades reumáticas incluyendo osteoartritis, artritis reumatoide, artritis juvenil (reumatoide), poliartritis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, enfermedad de Still, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, escleroderma, esclerosis sistémica, vasculitis (p. ej., enfermedad de Kawasaki), vasculitis cerebral, enfermedad de Lyme, artritis inducida por estafilococos, síndrome de Sjogren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y arteritis de células gigantes; una enfermedad ocular inflamatoria, que puede estar asociada con, por ejemplo, trasplante corneal; enteropatía inflamatoria; isquemia, incluyendo isquemia cerebral; enfermedad de Kawasaki; deterioro del aprendizaje; enfermedades pulmonares; nefritis por lupus; esclerosis múltiple; miastenia grave; miopatías; enfermedades neuroinflamatorias; neurotoxicidad; enfermedades y afecciones oculares, incluyendo degeneración ocular y uveitis; osteoporosis; dolor, incluyendo dolor relacionado con cáncer; enfermedad de Parkinson; péfnigo; enfermedad periodontal; pitiriasis roja pilosa; parto prematuro; prostatitis y afecciones relacionadas; psoriasis y afecciones relacionadas; artritis psoriásica; fibrosis pulmonar; lesión por reperusión; fiebre reumática; artritis reumatoide; sarcoidosis; escleroderma; choque séptico; efectos secundarios de la radioterapia; síndrome de Sjogren; trastornos del sueño; espondiloartropatías; lupus eritematoso sistémico; enfermedad de la articulación mandibular temporal; tiroiditis; trasplante de tejido o una afección inflamatoria resultante de distensión muscular, esquinca, daño del cartílago, traumatismo y cirugía ortopédica; vasculitis; o una afección inflamatoria resultante de distensión muscular, esguince, daño del cartílago, traumatismo, cirugía ortopédica, infección u otros procesos de enfermedad.

30 En una clase, los métodos incluyen administrar al sujeto un resto aislado o recombinante seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido de WSX-1 soluble, un polipéptido de p28, un polipéptido de gp130 soluble, un polipéptido de EBI3, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/p28, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/EBI3, un complejo polipeptídico de WSX-1 soluble/IL-27, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/IL-27, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/p28, un complejo polipeptídico de gp130 soluble/EBI3, un polipéptido de p28 y un polipéptido de WSX-1 soluble, un polipéptido de EBI3 y un polipéptido de WSX-1 soluble, IL-27 y un polipéptido de WSX-1 soluble, un polipéptido de gp130 soluble y un polipéptido de p28, un polipéptido de gp130 soluble e IL-27, un polipéptido de gp130 soluble y un polipéptido de EBI3, y una variante de los mismos. En casos en los que se administra una combinación de polipéptidos recombinantes o aislados (p. ej., un polipéptido de 28 y un polipéptido de WSX-1 soluble), los polipéptidos pueden pero no necesitan formar un complejo, y los polipéptidos se pueden coadministrar o administrar separadamente.

40 En otra clase de realizaciones, los métodos incluyen administrar al sujeto un resto que se une a o modula específicamente la actividad de un complejo de gp130/WSX-1/IL-27, o que modula la formación de complejo en una célula (p. ej., en la membrana plasmática), tratando se ese modo la afección del sujeto. El resto puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un antagonista, un agonista y un modulador de la actividad. Opcionalmente, el resto potencia la formación o la actividad de un complejo de gp130/WSX-1/IL-27.

45 En cualquier clase de realizaciones, los métodos incluyen opcionalmente diagnosticar al paciente con la afección inflamatoria antes de dicha administración. Típicamente, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del resto. Opcionalmente, se verifica la respuesta al tratamiento del sujeto. En una clase de realizaciones, después del inicio del tratamiento el sujeto presenta una disminución de la inflamación, por ejemplo, números reducidos de células inflamatorias, una reducción en el número de células T IL17⁺ en circulación o en la zona de inflamación y/o una disminución de la expresión de IL17.

50 Será evidente que se pueden formar complejos pertinentes opcionalmente in vivo. Por ejemplo, en realizaciones en las que se administra un polipéptido, el polipéptido puede formar un complejo activo con una proteína o proteínas endógenas. Como un ejemplo, cuando se administra al sujeto un polipéptido de WSX-1 soluble (p. ej., una proteína de fusión de WSX-1Fc), el WSX-1 puede formar un complejo con p28 y/o IL-27 endógenas, conduciendo a resultados terapéuticos. Un polipéptido que se va a administrar es opcionalmente una variante que tiene una afinidad superior para los componentes del receptor, p. ej., que la proteína silvestre (p. ej., una p28 variante que tiene una afinidad superior para WSX-1 o el complejo receptor de WSX-1/gp130 que una p28 disponible en la naturaleza correspondiente de la que se deriva la variante, o un WSX-1 soluble variante que tiene una afinidad incrementada para gp130).

60 En un aspecto, los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación del resto y al menos un segundo compuesto. El segundo compuesto es típicamente uno que se usa para tratar la afección inflamatoria, por ejemplo, un patrón de cuidado o tratamiento experimental. Segundos compuestos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, moduladores inmunitarios que afectan a IL-23, IL-12, IL-6 o TGF (p. ej.,

- anticuerpos específicos para p40 de IL-12, p35 o p19 de IL-23); anticuerpos o reactivos que antagonizan las funciones de IL-1 (p. ej., anakinra (Kineret[®]), receptor de IL-1 soluble) y TNF (p. ej., anticuerpos anti-TNF, etanercept, infliximab y leflunomida); un agente citotóxico; un agente inmunosupresor (p. ej., ciclofosfamida); un antagonista de marcador superficial de células B; un anticuerpo para un marcador superficial de células B; un anticuerpo para CD20, p. ej., Rituximab, véase el documento US 20060051345); un anticuerpo o un agente de bloqueo para CD5, CD28 o CD40; un corticosteroide (p. ej., prednisona), CTLA4-Ig, un anticuerpo o antagonista para alfa4-integrina tal como natalizumab (Tysabri[®]), micofenolato de mofetilo, una estatina, un anticuerpo o agente de bloqueo para LFA-1 o CD-11a (véase la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 20050281817 de Jardieu y cols. titulada "Method for treating multiple sclerosis"), un anticuerpo para interleucina-12, un interferón beta (p. ej., un interferón β -1a tal como Avonex[®] o Rebif[®], o un interferón β -1b tal como Betaseron[®]), acetato de glatiramer (Copaxone[®]), un anticuerpo para CD52 tal como alemtuzumab (Campath[®]), un anticuerpo para receptor de interleucina tal como daclizumab (Zenapax[®], un anticuerpo para la subunidad alfa del receptor de interleucina-2), etc. En una clase de realizaciones, el segundo compuesto es factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).
- 15 En una realización, el sujeto nunca se ha tratado previamente con un fármaco o fármacos para tratar la afección inflamatoria y/o nunca se ha tratado previamente con un resto de la invención. En otra realización, el sujeto se ha tratado previamente con un fármaco o fármacos para tratar la afección inflamatoria y/o se ha tratado previamente con tal resto.
- 20 Típicamente, el sujeto el elegible para el tratamiento de la afección inflamatoria, es decir, un sujeto elegible. Para los propósitos de la presente, tal sujeto elegible es uno que está experimentando, ha experimentado o es probable que experimente uno o más signos, síntomas u otros indicadores de la afección inflamatoria; ha sido diagnosticado con la afección inflamatoria, ya sea, por ejemplo, recientemente diagnosticado, previamente diagnosticado con una nueva recidiva o exacerbación, previamente diagnosticado y en remisión, etc.; y/o tiene riesgo de desarrollar la afección inflamatoria.

Administración

- Como se entenderá por los expertos normales en la especialidad, las dosis apropiadas de restos de la invención (p. ej., polipéptidos, complejos, etc.) generalmente estará alrededor de las ya empleadas en terapias clínicas en las que se administran restos similares solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Probablemente, se producirá una variación en la dosificación dependiendo de la afección que se trate. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual. La preparación y los esquemas de dosificación para segundos compuestos disponibles comercialmente administrados en combinación con los restos se pueden usar según las instrucciones de los fabricantes o pueden ser determinados empíricamente por el profesional experto.
- 35 Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada del resto y cualquier segundo compuesto administrado en combinación con el resto dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, según se define anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, ya se administre el resto o la combinación con propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, los antecedentes del paciente y la respuesta al anticuerpo o la combinación, y el criterio del médico responsable. El resto o la combinación se administra adecuadamente al paciente en un momento o más típicamente a lo largo de una serie de tratamientos.
- 40 Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 μ g/kg a 50 mg/kg (p. ej. 0,1-20 mg/kg) del resto es una posible dosificación inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 μ g/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. Típicamente, el profesional clínico administrará un resto de la invención (solo o en combinación con un segundo compuesto) hasta que se alcancen una dosificación o dosificaciones que proporcionen el efecto biológico deseado. El avance de la terapia de la invención se verifica fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.
- 50 El resto se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, tópica, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal y/o intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. También se contempla la administración intratecal (véase, p. ej., la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2002/0009444 de Grillo-López). Además el resto se puede administrar adecuadamente mediante infusión pulsátil, p. ej., con dosis decrecientes del resto. Opcionalmente, la dosificación se aporta intravenosamente o subcutáneamente y opcionalmente mediante infusión o infusiones intravenosas. Cada una de las exposiciones se puede proporcionar usando medios de administración iguales o diferentes. En una realización, cada una de las exposiciones es mediante administración intravenosa.

Según se apunta, el resto se puede administrar solo o en combinación con al menos un segundo compuesto. Estos segundos compuestos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como las usadas hasta ahora, o aproximadamente de 1 a 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora. Si se usan estos segundos compuestos, opcionalmente se usan en cantidades menores que si no estuviera presente el resto, a fin de eliminar o reducir efectos secundarios provocados por los mismos.

La administración del resto de la invención y cualquier segundo compuesto se puede realizar simultáneamente, p. ej., como una sola composición o como dos o más composiciones distintas usando vías de administración iguales o diferentes. Alternativamente, o adicionalmente, la administración se puede realizar secuencialmente, en cualquier orden. En ciertas realizaciones, se pueden presentar intervalos que varían de minutos a días, a semanas a meses, entre las administraciones de las dos o más composiciones. Por ejemplo, el resto se puede administrar en primer lugar, seguido por el segundo compuesto de la invención. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del segundo compuesto de la invención en primer lugar.

Un tercer, cuarto, etc. compuesto se administra opcionalmente en combinación con el resto y el segundo compuesto. De forma similar, se puede administrar al sujeto un tratamiento para síntomas secundarios o relacionados con la afección inflamatoria (p. ej., espasticidad, incontinencia, dolor, fatiga, etc.), p. ej., durante el tratamiento con el resto o la combinación.

Formulaciones farmacéuticas

Se preparan para almacenamiento formulaciones terapéuticas de los restos de la invención (p. ej., polipéptidos, complejos, etc.) usadas según la presente invención al mezclar un resto que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes son atóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; iones conjugados formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (p. ej. complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween[®], Pluronic[®] o PEG.

Formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración subcutánea se describen, por ejemplo, en la Pat. EE. UU. N° 6.267.958 (Andya y cols.). Tales formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con un diluyente adecuado hasta una alta concentración de proteína y la formulación reconstituida se puede administrar subcutáneamente al mamífero que se va a tratar en la presente. También se contemplan formas cristalizadas del resto. Véase, por ejemplo, el documento U.S. 2002/0136719A1 (Shenoy y cols.).

La formulación de la presente también puede contener al menos un segundo compuesto según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), un agente citotóxico (p. ej. metotrexato, ciclofosfamida o azatioprina), un agente quimioterapéutico, un agente inmunosupresor, una citocina, un antagonista o anticuerpo para citocina, un factor de crecimiento, una hormona, una integrina, un antagonista o anticuerpo para integrina (p. ej., un anticuerpo para LFA-1 un anticuerpo para integrina alfa 4 tal como natalizumab), un fármaco de la clase de los interferones tal como IFN-beta-1a o IFN-beta-1b, un oligopéptido tal como acetato de glatiramer, una inmunoglobulina intravenosa (gammaglobulina), un fármaco agotador de linfocitos (p. ej., mitoxantrona, ciclofosfamida, CamPath[®] anticuerpos o cladribina), un fármaco inmunosupresor no agotador de linfocitos (p. ej., MMF o ciclosporina), un fármaco reductor del colesterol de la clase de las "estatinas", estradiol, un fármaco que trata síntomas secundarios o relacionados con lupus o MS (p. ej., espasticidad, incontinencia, dolor, fatiga), un inhibidor de TNF, un fármaco antiinflamatorio modificador de la enfermedad, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un corticosteroide (p. ej., metilprednisolona, prednisona, dexametasona o glucocorticoide), levotiroxina, ciclosporina A, un análogo de somatostatina, un antimetabolito, un anticuerpo/antagonista superficial de células T o B, etc., u otros según se apunta anteriormente en la formulación. El tipo y las cantidades eficaces de tales otros agentes dependen, por ejemplo, de la cantidad de resto presente en la formulación, el tipo de afección inflamatoria que se trate y los parámetros clínicos del sujeto.

Los ingredientes activos también se pueden encerrar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de aporte de fármacos (por

ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan, p. ej., en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

- 5 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, p. ej. películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (Pat. EE. UU. ° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el Lupron Depot® (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico).

- 15 Las formulaciones que se van a usar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Análisis de tecnologías relacionadas

Existen varias citocinas o antagonistas específicos de citocinas que actualmente se están desarrollando o están disponibles comercialmente:

- 20 Un número de citocinas recombinantes se usa en una variedad de entornos clínicos. Estas incluyen IL-2, GM-CSF, IL-11, IL-12 e IFN tipo I. Estas proteínas se están usando principalmente como estimulantes de células inmunitarias y para actuar como factores de crecimiento o para intensificar las respuestas anticancerosas y virales. Se han usado pocas citocinas para inhibir el sistema inmunitario; por ejemplo, IL-10, que trabaja indirectamente sobre funciones celulares accesorias necesarias para funciones de células T y que se estaba desarrollando específicamente con la enfermedad de Crohn y la enteropatía inflamatoria como objetivos, y TGF. El éxito con estos ha sido limitado.

Se han probado con algún éxito antagonistas de p40 de IL-12 en exámenes clínicos para pacientes con enfermedad de Crohn.

- 30 Se someten a exámenes clínicos para artritis antagonistas de IL-15 basándose en la observación de que esta citocina estaba implicada en el desarrollo de esta enfermedad.

El antagonista del receptor de IL-1 es un producto disponible comercialmente que se usa para tratar a pacientes con artritis reumatoide. Este es un producto que bloquea la interacción de la citocina proinflamatoria IL-1 con su receptor.

- 35 Amgen, Schering Plough y Centrocor (entre otros) han desarrollado anticuerpos/antagonistas específicos para la citocina TNF- α que se usan actualmente en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide. Este es un enfoque que se basa en la neutralización de una citocina endógena para prevenir la inflamación. Un enfoque similar se ha investigado con anticuerpos específicos para IL-1 e IL-6. Un problema de seguridad es que estos tratamientos están asociados con el desarrollo de infecciones oportunistas incluyendo TB y toxoplasmosis.

Diferencias/ventajas sobre otros productos

- 45 Muchos de estos productos (en particular IL-10) no se dirigen directamente a la respuesta de células T durante la inflamación. Puesto que el WSX-1 es expresado por células T, se anticipa que las estrategias que se dirigen a este receptor tendrán un efecto mucho más específico que algunos de los otros enfoques que se están usando o investigando actualmente. Adicionalmente, muchas de las dianas actuales son moléculas individuales aguas abajo de la actividad de células T mientras que p28/WSX-1 (y otras proteínas de fusión y complejos descritos en la presente) se dirige directamente a muchos de estos factores (p. ej., IL-2, IFN-gamma, IL-4, IL-17, TNF, IL-6) y puede incrementar adicionalmente la expresión de IL-10, amplificando de ese modo su efecto terapéutico. Adicionalmente, aunque se aprecian efectos secundarios con muchas citocinas (IL-2, IL-12, IFN) los presentes inventores no han observado signos obvios de enfermedad clínica en ratones tratados con IL-27 recombinante.

Secuencias y variantes de ácido nucleico y polipéptido

- 55 Están disponibles públicamente secuencias para una variedad de proteínas y ácidos nucleicos de WSX-1, gp130, p28 y EB13 presentes en la naturaleza. Véanse, por ejemplo, la identificación de secuencia proteínica NP_663634 y el número de registro de la secuencia nucleotídica NM_145659 para p28 humana, la identificación de secuencia proteínica NP_005746 y el número de registro de la secuencia nucleotídica NM_005755 para EB13 humana, la identificación de secuencia proteínica NP_004834 y el número de registro de la secuencia nucleotídica NM_004843 para WSX-1 humano, la identificación de secuencia proteínica NP_002175 y el número de registro de la secuencia nucleotídica NM_002184 para gp130 humana, la identificación de secuencia proteínica NP_663611.1 y el número de

registro de la secuencia nucleotídica NM_145636.1 para p28 murina, la identificación de secuencia proteínica NP_056581.1 y el número de registro de la secuencia nucleotídica NM_015766 para EBI3 de ratón, la identificación de secuencia proteínica NP_057880.1 y el número de registro de la secuencia nucleotídica NM_016671 para WSX-1 de ratón y la identificación de secuencia proteínica NP_034690 y el número de registro de la secuencia nucleotídica NM_010560 para gp130 de ratón. También son de interés en la presente invención secuencias homólogas o sustancialmente idénticas a estas secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Según se apunta en la presente, se han descrito diversas variantes solubles y/o de fusión de tales proteínas (véanse, p. ej., la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 20040185049 y Wirtz y cols., supra) y variedades recombinantes de p28 y EBI3 están disponibles comercialmente

Se describe en la presente un número de nuevos polipéptidos adicionales, incluyendo proteínas de fusión de WSX-1 y p28. Tales proteínas de fusión pueden incluir dominios de anticuerpo y, según se detalla anteriormente, se basan opcionalmente en anticuerpos biespecíficos.

Se proporciona una variedad de polinucleótidos que codifican los nuevos polipéptidos de la invención. Por ejemplo, se proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de WSX-1 recombinante o aislada, en donde la proteína de fusión comprende uno o más dominios que reconocen un marcador específico de una célula o uno o más dominios polipeptídicos derivados de p28 o EBI3. Opcionalmente, el ácido nucleico codifica uno o más dominios polipeptídicos seleccionados de: un dominio de anticuerpo, una región Fc, un dominio de p28 o un dominio de EBI3, así como que codifica un polipéptido de WSX-1. Además, se divulga un ácido nucleico que incluye una proteína de fusión de p28 recombinante o aislada. Como para los casos precedentes, el ácido nucleico codifica opcionalmente uno o más de un dominio de anticuerpo, una región Fc y un dominio de EBI3, así como un polipéptido de p28.

Un experto apreciará que se proporcionan muchas secuencias relacionadas con las funciones descritas en la presente, por ejemplo, polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de WSX-1, una proteína de fusión de p28, una proteína de fusión de gp130, una proteína de fusión de EBI3, un polipéptido de WSX-1 soluble, un polipéptido de gp130 soluble, etc.

Debido a la degeneración del código genético, muchos polinucleótidos codifican equivalentemente una secuencia polipeptídica dada. Secuencias polinucleotídicas complementarias a cualquiera de las secuencias descritas anteriormente se incluyen entre los polinucleótidos divulgados en la presente. De forma similar, un ácido nucleico artificial o recombinante que se hibrida a un polinucleótido indicado anteriormente bajo condiciones altamente restrictivas a lo largo de sustancialmente toda la longitud del ácido nucleico (y es distinto a un polinucleótido presente en la naturaleza) es un polinucleótido divulgado en la presente.

En ciertos casos, un vector (p. ej., un plásmido, un cósmido, un fago, un virus, etc.) comprende un polinucleótido divulgado en la presente. En un caso, el vector es un vector de expresión. En otro caso, el vector de expresión incluye un promotor ligado operativamente a uno o más de los polinucleótidos divulgados en la presente. En otro caso, una célula comprende un vector que incluye un polinucleótido divulgado en la presente.

Un experto también apreciará que se incluyen en la presente muchas variantes de las secuencias divulgadas. Por ejemplo, se incluyen en la presente variaciones conservativas de las secuencias divulgadas que dan una secuencia funcionalmente similar. Se considera que se incluyen en la presente variantes de las secuencias polinucleotídicas de ácido nucleico, en donde las variantes se hibridan a al menos una secuencia divulgada. También se incluyen en la presente subsecuencias únicas de las secuencias divulgadas en la presente, según se determina, p. ej., mediante técnicas de comparación de secuencias estándar.

Variaciones conservativas

Debido a la degeneración del código genético, las "sustituciones sinónimas" (es decir, sustituciones en una secuencia de ácido nucleico que no dan como resultado una alteración en un polipéptido codificado) son una característica implícita de cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique una secuencia de aminoácidos. De forma similar, las "sustituciones de aminoácidos conservativas", en las que uno o un número limitado de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos están sustituidos por aminoácidos diferentes con propiedades muy similares, también se identifican fácilmente por ser muy similares a una construcción divulgada. Tales sustituciones conservativas de cada secuencia divulgada son una característica de la presente divulgación.

"Variaciones conservativas" de una secuencia de ácido nucleico particular se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente idénticas, o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Un experto reconocerá que sustituciones, supresiones o adiciones individuales que alteran, añaden o suprimen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos de 5%, más típicamente menos de 4%, 2% o 1%) en una secuencia codificada son "variaciones modificadas conservativamente" en las que las alteraciones dan como resultado la supresión de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar, mientras que retienen la función pertinente. Así, las "variaciones conservativas" de una secuencia polipeptídica

5 listada incluyen sustituciones de un pequeño porcentaje, típicamente menos de 5%, más típicamente menos de 2% o 1%, de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, por un aminoácido del mismo grupo de sustituciones conservativas. Finalmente, la adición de secuencias no alteran la actividad codificada de una molécula de ácido nucleico, de modo que la adición de una secuencia no funcional o de etiquetado (intrones en el ácido nucleico, secuencias de poli-His o similares en el polipéptido codificado, etc.), es una variación conservativa del ácido nucleico o polipéptido básico.

10 Se conocen bien en la especialidad tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares, en las que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene propiedades similares (p. ej., cadenas laterales aromáticas o cadenas laterales cargadas positivamente), y por lo tanto no cambia sustancialmente las propiedades funcionales de la molécula polipeptídica. La Tabla 1 indica grupos ejemplares que contienen aminoácidos naturales de propiedades químicas similares, en la que la sustitución dentro de un grupo es una "sustitución conservativa".

15 Tabla 1. Sustituciones de aminoácidos conservativas

Cadenas laterales no polares y/o alifáticas	Cadenas laterales polares no cargadas	Cadenas laterales aromáticas	Cadenas laterales cargadas positivamente	Cadenas laterales cargadas negativamente
Glicina	Serina			
Alanina	Treonina	Fenilalanina	Lisina	
Valina	Cisteína	Tirosina	Arginina	Aspartato
Leucina	Metionina	Triptófano	Histidina	Glutamato
Isoleucina	Asparagina			
Prolina	Glutamina			

Hibridación de ácidos nucleicos

20 Se puede usar la hibridación comparativa para identificar ácidos nucleicos divulgados en la presente, incluyendo variaciones conservativas de ácidos nucleicos divulgadas en la presente. Además, se divulgan en la presente ácidos nucleicos diana que se hibridan a un ácido nucleico divulgado en la presente bajo condiciones de restricción alta, ultraalta y ultraultraalta, donde los ácidos nucleicos son distintos al ácido nucleico presente en la naturaleza. Ejemplos de tales ácidos nucleicos incluyen aquellos con una o una pocas sustituciones de ácido nucleico sinónimas o conservativas en comparación con una secuencia de ácido nucleico dada divulgada en la presente.

25 Se dice que un ácido nucleico de prueba se hibrida específicamente a un ácido nucleico sonda cuando se hibrida al menos 50% así como a la sonda en cuanto a la diana complementaria perfectamente emparejada, es decir, con una relación de señal a ruido al menos la mitad de alta que la hibridación de la sonda a la diana bajo condiciones en las que la sonda perfectamente emparejada se une a la diana complementaria perfectamente emparejada con una relación de señal a ruido que es al menos aproximadamente 5 veces-10 veces tan alta como la observada para la hibridación de cualquiera de los ácidos nucleicos diana no emparejados.

30 Los ácidos nucleicos se "hibridan" cuando se asocian, típicamente en solución. Los ácidos nucleicos se hibridan debido a una variedad de fuerzas fisicoquímicas bien caracterizadas, tales como unión por enlaces de hidrógeno, exclusión de disolvente, apilamiento de bases y similares. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes parte I capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," (Elsevier, Nueva York), así como en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y cols., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (complementado a lo largo de 2007) ("Ausubel"); Hames y Higgins (1995) Gene Probes 1 IRL Press at Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, (Hames y Higgins 1) y Hames y Higgins (1995) Gene Probes 2 IRL Press at Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (Hames y Higgins 2) proporcionan detalles de la síntesis, el marcaje, la detección y la cuantificación de ADN y ARN, incluyendo oligonucleótidos.

45 Un ejemplo de condiciones de hibridación restrictivas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios sobre un filtro en una transferencia Southern o Northern es formalina al 50% con 1 mg de heparina a 42°C, llevándose a cabo la hibridación durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado restrictivas es un lavado con 0,2x SSC a 65°C durante 15 minutos (véase, Sambrook y cols., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2000 ("Sambrook") para una descripción del tampón de SSC). A menudo, el lavado altamente restrictivo está precedido por un lavado poco restrictivo para retirar la señal de sonda de fondo. Un ejemplo de un lavado poco restrictivo es 2x SSC a 40°C durante 15 minutos. En general, una relación de señal a ruido de 5x (o superior) que la

observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica.

5 Las "condiciones de lavado de hibridación restrictivas" en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como hibridaciones Southern y Northern dependen de la secuencia, y son diferentes bajo parámetros ambientales diferentes. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993), anteriormente, y en Hames y Higgins, 1 y 2. Las condiciones de hibridación y lavado restrictivas se pueden determinar fácilmente empíricamente para cualquier ácido nucleico de prueba. Por ejemplo, al determinar
10 condiciones de hibridación y lavado restrictivas, las condiciones de hibridación y lavado se incrementan gradualmente (p. ej., al incrementar la temperatura, disminuir la concentración de sal, incrementar la concentración de detergente y/o incrementar la concentración de disolventes orgánicos tales como formalina en la hibridación o el lavado), hasta que se cumple un grupo de criterios seleccionado. Por ejemplo, en condiciones de hibridación y lavado altamente restrictivas, las condiciones de hibridación y lavado se incrementan gradualmente hasta que una sonda se une a una diana complementaria perfectamente emparejada con una relación de señal a ruido que es al
15 menos 5 veces más alta que la observada para la hibridación de la sonda a una diana no emparejada.

Las condiciones "muy restrictivas" se seleccionan para ser iguales al punto de fusión término (T_m) para una sonda particular. El T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que 50% de la secuencia de prueba se hibrida a una sonda perfectamente emparejada. Generalmente, las condiciones de hibridación y lavado
20 "altamente restrictivas" se seleccionan para ser aproximadamente 5°C inferiores que el T_m para la secuencia específica a una intensidad iónica y un pH definidos.

Las condiciones de hibridación y lavado de "restricción ultraalta" son aquellas en las que la restricción de las condiciones de hibridación y lavado se incrementan hasta que la relación de señal a ruido para la unión de la sonda al ácido nucleico diana complementario perfectamente emparejado es al menos 10 veces más alta que la observada para la hibridación a cualquiera de los ácidos nucleicos diana no emparejados. Se dice que un ácido nucleico diana que se hibrida a una sonda bajo tales condiciones, con una relación de señal a ruido de al menos ½ la del ácido nucleico diana complementario perfectamente emparejado se une a la sonda bajo condiciones de restricción ultraalta.
25
30

De forma similar, se pueden determinar niveles de restricción todavía superiores al incrementar gradualmente las condiciones de hibridación y/o lavado del ensayo de hibridación pertinente. Por ejemplo, aquellos en los que la restricción de las condiciones de hibridación y lavado se incrementan hasta que la relación de señal a ruido para la unión de la sonda al ácido nucleico diana complementario perfectamente emparejado es al menos 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o 500 veces o más más alta que la observada para la unión a cualquiera de los ácidos nucleicos diana no emparejados. Se dice que un ácido nucleico diana que se hibrida a una sonda bajo tales condiciones, con una relación de señal a ruido de al menos ½ la del ácido nucleico diana complementario perfectamente emparejado se une a la sonda bajo condiciones de restricción ultraultraalta.
35
40

Los ácidos nucleicos que ni no se hibridan entre sí bajo condiciones restrictivas son todavía sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto se produce, p. ej., cuando una copia de un ácido nucleico se crea usando la máxima degeneración codónica permitida por el código genético.

Comparación, identidad y homología de secuencias

45 Los términos "idénticas" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, según se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos posteriormente (u otros algoritmos disponibles para el experto) o mediante una inspección visual.

La expresión "sustancialmente idénticos", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos (p. ej., ADN que codifican un polipéptido de WSX-1, p28, EBI3 o gp130, o la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de WSX-1, p28, EBI3 o gp130) se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos aproximadamente 60%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más de identidad de nucleótidos o residuos de aminoácido, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, según se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Se considera típicamente que tales secuencias "sustancialmente idénticas" son "homólogas", sin referencia a la ascendencia real. Preferiblemente, la "identidad sustancial" existe a lo largo de una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 50 residuos de longitud, más preferiblemente a lo largo de una región de al menos aproximadamente 100 residuos y, lo más preferiblemente, las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de al menos aproximadamente 150 residuos, o a lo largo de toda la longitud de las dos secuencias que se van a
50
55
60 comparar.

Las proteínas y/o las secuencias proteínicas son "homólogas" cuando se derivan, naturalmente o artificialmente, de una proteína o secuencia proteínica ancestral común. De forma similar, los ácidos nucleicos y/o las secuencias de ácido nucleico son homólogos cuando se derivan, naturalmente o artificialmente, de un ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico ancestral común. La homología se infiere generalmente de una similitud de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o proteínas (o secuencias de los mismos). El porcentaje preciso de similitud entre secuencias que es útil al establecer la homología varía con el ácido nucleico y la proteína en cuestión, pero tan poco como 25% de similitud de secuencia a lo largo de 50, 100, 150 o más residuos (nucleótidos o aminoácidos) se usa habitualmente para establecer la homología. También se pueden usar niveles superiores de similitud de secuencia, p. ej., 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% o más, para establecer la homología. Métodos para determinar porcentajes de similitud de secuencias (p. ej., BLASTP y BLASTN usando parámetros por defecto) se describen en la presente y generalmente están disponibles. Los "ortólogos" son genes en diferentes especies que evolucionaron de un gen ancestral común mediante especiación. Normalmente, los ortólogos retienen la misma función o una similar en el transcurso de la evolución. Según se usa en la presente los "ortólogos" se incluyen en el término "homólogos".

Para la comparación de secuencias y la determinación de la homología, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y referencia se introducen en un ordenador, se diseñan las coordenadas de las subsecuencias, si es necesario, y se diseñan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula a continuación el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o las secuencias de prueba con relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa diseñados.

La alineación óptima de secuencias para comparación se puede efectuar, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante puestas en marcha informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual (véase generalmente *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y cols., eds., *Current Protocols*, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., complementada a lo largo de 2007).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y cols., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través de the National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencia de puntuación alta (HSP) al identificar palabras cortas de longitud W en la secuencia consultada, que bien está emparejada o bien satisface alguna puntuación T liminar de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Se hace referencia a T como el umbral de la puntuación de la palabra próxima (Altschul y cols., *supra*). Estas de palabras comunes próximas iniciales actúan como semillas para búsquedas iniciales para encontrar HSP más largos que las contienen. Las palabras comunes se extienden a continuación en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia durante tanto como se pueda incrementar la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos emparejados; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no emparejados; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las palabras comunes en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa se separa en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del programa BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) usa como defectos una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un valor de corte de 100, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defectos una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma menor ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se podría producir por casualidad. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico es similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma menor en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01 y lo más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

Elaboración y aislamiento de polipéptidos recombinantes

Generalmente, los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención para el uso en los métodos o las composiciones de la invención se puede elaborar mediante clonación, recombinación, síntesis in vitro, amplificación in vitro y/u otros métodos disponibles. Esencialmente, cualquier ácido nucleico puede ser adquirido por encargo o de forma estándar de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como Operon Technologies Inc. (Alameda, CA). Además, se puede usar una variedad de métodos recombinantes para expresar un vector de expresión que codifica un polipéptido de la invención. Métodos recombinantes para elaborar ácidos nucleicos, la expresión y el aislamiento de productos expresados son muy conocidos y se describen, p. ej., en Sambrook, Ausubel e Innis y cols. (eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc., San Diego, CA (1990).

Está disponible comercialmente un gran número de estuches para purificación de plásmidos u otros ácidos nucleicos pertinentes a partir de células (véanse, p. ej., EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™, de Stratagene; y QIAprep™ de Qiagen). Cualquier ácido nucleico aislado y/o purificado se puede manipular adicionalmente para producir otros ácidos nucleicos, usar para transfectar células, incorporar en vectores relacionados para infectar organismos para la expresión, y/o similares. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico diana particular. Los vectores comprenden opcionalmente casetes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del casete en eucariotas o procariotas o ambos, (p. ej., vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas tanto procarióticos como eucarióticos. Los vectores son adecuados para la replicación y la integración en procariotas, eucariotas o ambos. Véanse Giliman & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, y cols., Nature, 328:731 (1987); Schneider, B., y cols., Protein Expr. Purif. 6435:10 (1995); Ausubel anteriormente, Sambrook anteriormente y Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA. Un catálogo de bacterias y bacteriófagos útiles para clonar es proporcionado, p. ej., por la ATCC, p. ej., The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage publicado anualmente por la ATCC. Procedimientos básicos adicionales para la secuenciación, la clonación y otros aspectos de la biología molecular y consideraciones teóricas subyacentes también se encuentran en Watson y cols. (1992) Recombinant DNA Segunda Edición, Scientific American Books, NY.

Otras referencias útiles, p. ej. para el aislamiento y el cultivo de células (p. ej., para el posterior aislamiento del ácido nucleico o el polipéptido) incluyen Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas allí; Payne y cols. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, NY; Gamborg y Phillips (eds) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg Nueva York) y Atlas y Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Una variedad de métodos de aislamiento y detección de proteínas se conoce y se puede usar para aislar polipéptidos, p. ej., de cultivos recombinantes de células que expresan las proteínas de fusión o solubles recombinantes de la invención. Es muy conocida en la técnica una variedad de métodos de aislamiento y detección de proteínas, incluyendo, p. ej., los indicados en R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; Bollag y cols. (1996) Protein Methods, 2ª Edición Wiley-Liss, NY; Walker (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris y Angal (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3ª Edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Segunda Edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ; y las referencias citadas en las mismas. Detalles adicionales relativos a métodos de purificación y detección de proteínas se pueden encontrar en Satinder Ahuja ed., Handbook of Bioseparations, Academic Press (2000).

Los polipéptidos de WSX-1 y gp130 solubles, polipéptidos de gp130 y los polipéptidos de EBI3 pueden ser así expresados y purificados por un experto. Alternativamente, un número de tales polipéptidos está disponible comercialmente. Por ejemplo, p28 y EBI3 recombinantes están disponibles de Abnova Corporation (www (dot) abnova (dot) com (dot) tw). Cuando se desean complejos polipeptídicos, los dos (o más) componentes polipeptídicos del complejo opcionalmente se coexpresan y purifican conjuntamente como un complejo, o los componentes se pueden purificar separadamente y a continuación combinarse para formar el complejo. Opcionalmente, los componentes están asociados no covalentemente en el complejo, u opcionalmente están conectados covalentemente mediante un reticulador químico o similares en el complejo.

Ejemplos

Se ha de entender que los ejemplos y las realizaciones descritos en la presente tienen solamente propósitos ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos serán sugeridos para el experto en la especialidad y se deben incluir dentro del espíritu y la competencia de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Según esto, los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1: la interleucina 27 regula negativamente el desarrollo de células cooperadoras T productoras de interleucina 17 durante la inflamación crónica del SNC

Estudios recientes se han enfocado a los casos que influyen en el desarrollo de células T_H-17 asociadas con autoinmunidad, tal como encefalitis autoinmunitaria experimental, pero se conoce relativamente poco acerca de las citocinas que antagonizan respuestas efectoras de T_H-17. Los experimentos de la presente muestran que ratones deficientes en interleucina (IL)-27R infectados crónicamente con *Toxoplasma gondii* desarrollaban neuroinflamación grave que era dependiente de células T CD4+ y estaba asociada con una respuesta de IL-17 prominente. El tratamiento con IL-27 in vitro de células T primarias naturales suprimía el desarrollo de células T_H-17 inducido por IL-6 y TGF-β, que era dependiente de STAT1 pero independiente de la inhibición mediada por SOCS3 de la señalización de IL-6. Así, la IL-27, un potente inhibidor del desarrollo de células T_H-17, puede ser una diana útil para tratar enfermedades inflamatorias mediadas por estas células. De forma similar, las proteínas de fusión y los complejos descritos anteriormente en la presente proporciona enfoques útiles para tratar enfermedades inflamatorias mediadas por estas células.

Aunque el paradigma del tipo cooperador T 1 (T_H1)-T_H2 ha dominado los estudios de la función de células T cooperadoras durante casi 20 años¹, un trabajo reciente ha identificado un nuevo subgrupo de células T CD4+ que producen IL-17A, IL-17F, TNF e IL-6 en respuesta a IL-23^{2, 3}. Estos linfocitos 'T_H-17' se han relacionado como mediadores de la inflamación asociada con varias enfermedades autoinmunitarias, incluyendo encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE) y artritis inducida por colágeno³⁻⁷. Como consecuencia, ha existido un interés en definir la ontogenia de estas células T CD4+ patológicas y los factores que regulan sus actividades⁸⁻¹⁰. Aunque estudios iniciales establecieron un papel para la IL-23 en la promoción de la producción de células T_H-17, un trabajo más reciente mostraba que la IL-23 no es un inductor fuerte de novo de células T_H-17. La observación de que las células T procedentes de ratones deficientes en IL-23 pueden secretar IL-17 cuando se estimulaban mediante IL-23³ indicaba que otros factores promueven el desarrollo de células productoras de IL-17. Varios informes recientes han identificado de hecho un papel crítico para TGF-β e IL-6 en el desarrollo de novo de células T_H-17 murinas¹¹⁻¹³. Aunque el éxito en la demostración de la importancia de IL-6 y TGF-β en su desarrollo ha sido relativamente rápido (al menos en ratones), se sabe considerablemente menos acerca de los antagonistas fisiológicos de células T_H-17.

La IL-27, una citocina heterodímera compuesta por gen 3 inducido por virus de Epstein-Barr (EBI3) y p28, señala a través de un complejo receptor compuesto por IL-27R (WSX-1/TCCR) y gp130^{14,15}. Aunque la expresión del IL-27R está confinada a células inmunitarias¹⁵⁻¹⁸, su socio gp130, un componente receptor compartido de varias citocinas incluyendo IL-6, se expresa constitutivamente sobre células inmunitaria y no inmunitarias^{19,20}. Aunque pocos estudios se han dirigido directamente a los episodios que conducen a la producción de IL-27, un modelo actual sostiene que el heterodímero de IL-27 es producido por APC activadas²¹. Informes iniciales enfocados a la capacidad de IL-27 para promover la proliferación de células T y el desarrollo de respuestas de T_H1^{18,22}; estudios posteriores han indicado que también puede limitar respuestas de T_H1 y T_H2 implicados en la resistencia a diversas infecciones parasitarias. Así, los ratones deficientes en IL-27R (*Il27ra*^{-/-}) desarrollan respuestas exageradas de células T cooperadoras durante las fases agudas de la toxoplasmosis, la enfermedad de Chaga, la leishmaniosis y después de la excitación con helmintos²³⁻²⁶. Recientemente, un fenotipo similar se ha relacionado con la inhibición por IL-27 de la producción de IL-2²⁷, pero no estaba claro si la IL-27 tiene efectos supresores adicionales sobre otros subgrupos o funciones de células T.

Aunque existe una apreciación del papel de IL-27 en modelos agudos de inflamación⁸, ha habido una comprensión limitada de su papel en la enfermedad crónica y sus efectos específicos para un tejido. La evidencia sugiere que se produce IL-27 durante la inflamación en el SNC²⁸, pero no se ha abordado una posible función para IL-27 durante la toxoplasmosis crónica; no ha estado claro si la IL-27 tiene efectos pro- o antiinflamatorios en el SNC 'inmunoprivilegiado'.

Los resultados descritos en la presente demuestran que ratones *Il27ra*^{-/-} infectados crónicamente con *T. gondii* controlan la replicación de parásitos en el cerebro pero desarrollan una patología mediada por células T letal asociada con una respuesta exagerada de T_H-17. Estudios ex vivo adicionales mostraban que IL-27 o - incluso su componente p28 solo, en un menor grado – era capaz de antagonizar el desarrollo de células T_H-17. La actividad supresora de IL-27 era independiente de la inhibición dependiente de SOCS3 de la señalización de gp130 pero dependiente de STAT1. Conjuntamente, estos hallazgos identifican que la IL-27 es un antagonista del desarrollo de células T_H-17 y por lo tanto indican una posible diana terapéutica para tratar enfermedades inflamatorias asociadas con células T_H-17.

Resultados

Producción de IL-27 durante la encefalitis toxoplásmica

Se usó PCR en tiempo real para cuantificar niveles relativos de los transcritos para IL-27 durante la TE. Se detectaron cantidades de bajas a mínimas de ARNm para *ebi3* (gen para EBI3) e *Il27* (gen para p28) en cerebros no infectados. Sin embargo, en tejidos procedentes de ratones infectados crónicamente, había un incremento de > 3 veces en la cantidad de ARN de *ebi3* mRNA en el cerebro y un incremento de > 500 veces en las cantidades de ARNm para *Il27* (Panel A de la Figura 1). Dado que se cree que las células dendríticas y los macrófagos son fuentes de IL-27 en tejidos periféricos¹⁴, es posible que los transcritos de *ebi3* e *Il27* elevados detectados durante la TE se deban a la migración de estas células al SNC. Alternativamente, células cerebrales residentes que son capaces de producir IL-27 incluyen microglia y monocitos residentes en el cerebro²⁹. La activación de astrocitos, un subgrupo de células residentes del SNC, durante la TE, y su capacidad para producir citocinas en respuesta a una infección³⁰ sugieren que pueden representar una fuente de IL-27. Sin embargo, aunque astrocitos primarios procedentes de ratones WT expresaban niveles basales de ARNm de *ebi3*, no se observaba un incremento en la respuesta a la estimulación con LPS más IFN- γ (Panel B de la Figura 1). En contraste, las cantidades de ARNm de *Il27* se incrementaban casi 2.000 veces después de la estimulación con LPS e IFN- γ . Conjuntamente, estas observaciones sugieren que ambos componentes de IL-27 se producen localmente durante la TE y que los astrocitos activados pueden expresar tanto EBI3 como p28.

El papel de IL-27 durante la infección crónica con *T. gondii*.

El enfoque previo en la IL-27 implicaba un papel para ella en la diferenciación de células T vírgenes en células T_H1 efectoras^{14,31-34}. Sin embargo, se encontró que los ratones *Il27ra-/-* generaban respuestas de T_H1 robustas cuando se excitaban con *T. gondii*, aunque los ratones sucumbieron a una enfermedad inflamatoria dependiente de células T CD4+ aguda letal caracterizada por la producción exagerada de IFN- γ e IL-2^{26,27} asociada con una patología hepática y pulmonar grave²⁶.

Dada la propensión de los ratones *Il27ra-/-* a la toxoplasmosis aguda, se idearon varias estrategias que pudieran permitir que la infección crónica se desarrollara. La primera de estas era tratar a los ratones infectados con CTLA4-Ig, un antagonista de la coestimulación de células T dependiente de CD28³⁵, los días 7 y 10 después de la infección. Después del tratamiento con CTLA4-Ig, los ratones *Il27ra-/-* infectados sobrevivían a lo largo de 14 días después de la infección y avanzaban hasta el estadio crónico; sin embargo, el tratamiento no proporcionaba protección a largo plazo, ya que los ratones *Il27ra-/-* que recibían el CTLA4-Ig morían en menos de cinco semanas de infección. La letalidad observada después del tratamiento con CTLA4-Ig no parecía ser una consecuencia secundaria de la supresión inmunitaria mediada por CTLA4-Ig ya que los ratones WT que recibían el mismo tratamiento sobrevivían (Panel A de la Figura 2). El análisis histológico del hígado y el pulmón revelaba que aunque los ratones *Il27ra-/-* tratados con CTLA4-Ig sobrevivieran a la fase aguda, todavía desarrollaban una infiltración de células inmunitarias prominente, necrosis e inflamación en estos órganos el día 14 después de la infección (Panel C de la Figura 2). La patología no era evidente en los ratones WT infectados ya se hubieran tratado o no con CTLA4-Ig (datos no mostrados). En contraste con lo que se observaba en el hígado y los pulmones en este punto temporal, no se observaban signos histológicos de inflamación en el cerebro de ratones *Il27ra-/-* o WT (datos no mostrados).

Sin embargo, en ratones *Il27ra-/-* que avanzaban hasta el estadio crónico de infección (día 30), la patología presente en el hígado y los pulmones durante la infección aguda se ha resuelto (Panel C de la Figura 2). En contraste, en el cerebro y el SNC, los ratones *Il27ra-/-* presentaban zonas de inflamación intensa, numerosos manguitos perivasculares en el parénquima y meningitis grave (Panel D de la Figura 2). Por otra parte, los ratones WT tenían una TE de mínima a leve. Por otra parte, la activación de astrocitos, según se evalúa mediante tinción con respecto a proteína fibrilar glial (GFAP), revelaba que aunque la infección condujera a un incremento de la expresión de esta proteína estructural en animales WT, esta se incrementaba notablemente en los ratones *Il27ra-/-* (Panel D de la Figura 2). En un enfoque complementario para permitir que los ratones *Il27ra-/-* avancen hasta el estadio crónico, el tratamiento con el fármaco antiparasitario sulfadiazina empezando el día 5 después de la infección, que inhibe la replicación de los parásitos pero no erradica la infección, también evitaba la mortalidad aguda en los ratones *Il27ra-/-*. Después del cese del tratamiento farmacológico, los ratones WT no manifestaban enfermedad clínica, pero los ratones *Il27ra-/-* desarrollaban síntomas de enfermedad asociados con una patología grave del SNC y morían en menos de 2-3 semanas (Panel B de la Figura 2). Los datos presentados en el resto de este ejemplo se derivan así de ratones en los que se dejó que se desarrollara una enfermedad crónica a través del tratamiento con CTLA4-Ig o sulfadiazina y no eran evidentes diferencias entre estos grupos experimentales diferentes.

Dados informes en los que IL-27 puede aumentar la producción de IFN- γ ^{18,22,31-34}, una citocina crítica para el control de *T. gondii* en el SNC³⁶, la inflamación intensificada observada en el cerebro en ausencia de señalización de IL-27 podría ser una consecuencia de un fallo para elaborar IFN- γ y la incapacidad para controlar la replicación de parásitos. Sin embargo, no se encontró una diferencia medible en la carga de parásitos en los cerebros de ratones *Il27ra-/-* y WT infectados crónicamente (Panel E de la Figura 2). Por otra parte, células mononucleares aisladas de

los cerebros (BMNC) de ratones WT e *Il27ra-/-* no eran deficientes en su capacidad para producir la molécula efectora antiparasitaria dependiente de IFN- γ óxido nítrico (NO) (Panel F de la Figura 2). De acuerdo con esta observación, BMNC procedentes de ratones WT e *Il27ra-/-* estimulados con STAg (antígenos de *Toxoplasma solubles*) producían niveles similares de IL-12 e IFN- γ (Paneles G y H de la Figura 2). Esos hallazgos indicaban que la neuroinflamación intensa en ratones *Il27ra-/-* no era el resultado de un defecto en la producción de IFN- γ o un incremento en la carga de parásitos. Debido a que la IL-27 inhibe la producción de IL-2 por células T CD4+^{27,37}, era posible que en ausencia de señalización de IL-27 la producción aumentada de este factor de crecimiento de células T en el cerebro pudiera contribuir a la inmunopatología observada. Sin embargo, de acuerdo con informes previos, no se encontraron cantidades detectables de ARNm o proteína de *Il2* (IL-2) en el cerebro de ratones WT infectados crónicamente y esto no se alteraba en ausencia del IL-27R (datos no mostrados). De forma similar, no había transcritos detectables para *Il4* (IL-4) o *Il13* (IL-13), dos citocinas asociadas a T_H2, en el cerebro de estos grupos experimentales. Finalmente, el examen de otros subgrupos de células T revelaba la presencia de una población secundaria de células T reguladoras (T_{reg}) Foxp3+ en el cerebro, pero no había diferencia en los números de células entre ratones WT o *Il27ra-/-* infectados crónicamente (datos no mostrados).

15 La ausencia de IL-27R da como resultado la acumulación de células T CD4+ patógenas

Dada la prominente inflamación del SNC inducida por infección en ausencia del IL-27R, se realizaron experimentos para identificar el fenotipo de las células infiltrantes. De acuerdo con la histopatología, el análisis de BMNC aisladas de ratones infectados crónicamente mostraba un notable incremento en el número de células recuperadas de cerebros *Il27ra-/-* ($P \leq 0,05$; Panel A de la Figura 3) y un incremento significativo en el número y el porcentaje de células T CD4+ ($P \leq 0,05$) así como el número de células CD8+ T recuperadas (Panel B de la Figura 3). A pesar de las diferencias en la composición de las poblaciones de células T, el análisis de las células T procedentes de los cerebros de ratones WT e *Il27ra-/-* presentaba un fenotipo activado de CD44^{hi} y CD62L^{low} (Figura 8). Por otra parte, los monocitos procedentes de ambos grupos de ratones presentaban un fenotipo activado caracterizado por la expresión aumentada del complejo principal de histocompatibilidad clase II sobre su superficie (datos no mostrados). Sin embargo, aunque no hay diferencias en el número de microglia residente (CD11b^{int}, CD45^{int}) había un incremento significativo en el número de macrófagos infiltrantes (CD11b^{hi}, CD45^{hi}) en ausencia del IL-27R ($P \leq 0,05$; Panel B de la Figura 3).

En los estudios mencionados anteriormente, una de las características sorprendentes apuntadas en los ratones *Il27ra-/-* infectados crónicamente es el incremento significativo en el número de células T CD4+ presentes en el cerebro. Aunque se requieren linfocitos infiltrantes para el control de la TE³⁸, también pueden contribuir al desarrollo de una patología del SNC durante esta infección³⁹. Para determinar si las células T CD4+ estaban implicadas en la enfermedad letal observada en los ratones *Il27ra-/-* infectados crónicamente, los ratones se trataron con un mAb agotador específico para CD4 a las cuatro semanas después de la infección y se verificó la supervivencia. Los análisis de los ratones después del tratamiento con el mAb anti-CD4 revelaron un agotamiento de > 95% de las células T CD4+ en el bazo y una reducción de 50% en el cerebro (Panel C de la Figura 3). La supervivencia de los ratones *Il27ra-/-* tratados con mAb anti-CD4 era más prolongada que 60 días después de la infección, mientras que la mayoría de los ratones no tratados desarrollaba una patología grave en el cerebro y moría por la enfermedad para el día 50 (Panel D de la Figura 3). Por otra parte, el análisis histológicos 7 días después de este tratamiento revelaba una disminución de la inflamación en el parénquima y las meninges (Panel E de la Figura 3). Conjuntamente, estos datos establecían que las células T CD4+ infiltrantes contribuyen a la patología letal en el cerebro observada durante la TE en ausencia de IL-27.

La IL-27 inhibe la producción de IL-17 por células T experimentadas con antígeno

El conocimiento de que la neuropatología en ratones *Il27ra-/-* infectados crónicamente no es una consecuencia de una respuesta de T_H1 defectuosa pero en cambio está mediada por células T CD4+ condujo a la decisión de examinar el papel positivo del subgrupo T_H-17 recientemente descrito de células T CD4+ en la patología letal. Debido a que las células T_H-17 se han caracterizado por la producción de IL-17, IL-6 y TNF, implicados en el desarrollo de la enfermedad en un modelo de inflamación del SNC³, la cantidad de transcritos de ARNm para estas citocinas se evaluó mediante PCR en tiempo real derivadas del cerebro de ratones WT e *Il27ra-/-* infectados crónicamente. Mientras que los ratones tanto WT como *Il27ra-/-* expresaban cantidades comparables de *Il6* (IL-6) y *Tnf* (TNF), los transcritos para *Il17* (IL-17) solo se detectaban en las muestras procedentes de ratones *Il27ra-/-* (Panel A de la Figura 4).

Aunque existen múltiples fuentes celulares (astrocitos, microglia, macrófagos, células T) para IL-6 y TNF en el cerebro durante la TE, la producción de IL-17 está restringida en gran parte a las células T. Según esto, BMNC procedentes de ratones *Il27ra-/-* reestimulados en presencia de STAg producían significativamente más IL-17, IL-6 y TNF que células procedentes de ratones WT (Panel B de la Figura 4). También se produjeron bajas cantidades de IL-17 por BMNC WT estimulada con STAg, lo que se aumentaba al añadir IL-23 y se bloqueaba casi completamente por la adición de IL-27 (Panel C de la Figura 4). Por otra parte, la tinción intracelular de poblaciones de células T CD4+ y CD8+ en preparaciones de BMNC procedentes de ratones WT e *Il27ra-/-* infectados crónicamente revelaba

una producción elevada de IL-17 por células del cerebro de ratones *IL27ra-/-* (Panel D de la Figura 4). Conjuntamente, esos resultados sugieren que la IL-27 regula la inflamación en el SNC durante la TE crónica al limitar la actividad de T_H-17.

La IL-27 inhibe la producción de IL-17 por células T CD4+ y CD8+

5 Informes recientes sobre la diferenciación de células T_H-17 in vitro han concluido que se requieren TGF-β e IL-6 para la generación de estas células a partir de células T CD4+ vírgenes, mientras que el bloqueo de IFN-γ e IL-4 apoya un ambiente favorable para el desarrollo de T_H-17^{3,11-13,40-41}. Por lo tanto, las células T CD4+ y CD8+ T vírgenes aisladas de los bazo de ratones C57BL/6 se cultivaron bajo estas condiciones para evaluar directamente la capacidad de IL-27 para inhibir la producción de IL-17 por células T. Después de la estimulación con PMA e ionomicina casi todas las células T producían TNF y una población significativa coexpresaba IL-17 y TNF. De acuerdo con los estudios presentados anteriormente, la adición de IL-27 inhibía eficazmente la producción de IL-17 por células T CD4+ y CD8+, pero no alteraba la producción de TNF por estas células (Paneles A y B de la Figura 5). En ausencia de estimulación con PMA e ionomicina, el porcentaje y la media de intensidad fluorescente de células productoras de IL-17 eran inferiores, pero la IL-27 todavía era un antagonista potente de esta actividad (Figura 9).

15 La descripción original de p28 indicaba que esta proteína podía ser secretada por sí misma, pero, a diferencia de IL-27, no promovía la proliferación de células T o promovía la producción de IFN-γ¹⁴. A la luz de los hallazgos de que IL-27 inhibe la producción de IL-17 y la expresión de p28 se incrementa drásticamente en astrocitos activados, aunque la expresión de EB13 estuviera inalterada (Panel B de la Figura 1), se realizaron estudios para determinar sin la p28 por sí misma podía inhibir la producción de IL-17 por células T. Células T CD4+ o CD8+ aisladas de ratones C57BL/6 se estimularon bajo condiciones inductoras de IL-17 en presencia de p28. Aunque no era tan eficaz como IL-27, el tratamiento con p28 sola podía inhibir la producción de IL-17 por células T CD4+ y CD8+ T (Panel C de la Figura 5).

Las citocinas asociadas a gp130 tienen distintos efectos sobre el desarrollo de T_H-17

25 El trabajo reciente de múltiples grupos ha revelado un papel para la IL-6 en el desarrollo de células T_H-17¹¹⁻¹³. Debido a que IL-6 e IL-27 señalan a través de un componente receptor compartido, gp130, era posible que la capacidad de IL-27 para inhibir la producción IL-17 fuera una consecuencia de la competición con IL-6 por la unión a gp130 y/o la señalización. Para abordar esta cuestión, se realizó una serie de experimentos usando células T CD4+ aisladas de los bazo de ratones C57BL/6 WT. Cuando estas células se activaban con anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 en presencia de IL-23 o TGF-β bajo condiciones no polarizantes (anti-IFN-γ, anti-IL-4) se producía una secreción intensa de IL-17, y la adición de IL-27 podría inhibir la producción de IL-17 de un modo dependiente de la dosis (Paneles A and B de la Figura 6). La neutralización posterior de IL-6 en las condiciones de cultivo (usando un anticuerpo anti-IL-6) daba como resultado una disminución en la producción de IL-17, de forma similar a informes previos¹¹; sin embargo, incluso en esas condiciones la adición de IL-27 todavía reducía los niveles de IL-17 de un modo dependiente de la dosis (Paneles A y B de la Figura 6), indicando que IL-27 e IL-6, citocinas estrechamente relacionadas, tienen efectos contrapuesto sobre las células T_H-17.

40 Una de las consecuencias directas de la señalización mediante muchas citocinas de tipo I es la activación aguas abajo de proteínas SOCS, que conduce a la supresión de respuestas de células T a través de un bucle de retroalimentación regulador negativo⁴². Se ha presentado previamente que como la IL-6, la IL-27 induce la expresión de SOCS3 en células T CD4+^{27,37} y se ha propuesto que esta actividad explica la capacidad de IL-27 para inhibir la producción de IL-2³⁷. Para explorar el posible papel de esta ruta sobre la capacidad de IL-27 para inhibir la actividad de T_H-17, se usaron ratones gp130Y757F, que expresan una mutación hipermórfica en gp130⁴³; en estos ratones transgénicos, gp130 silvestre se ha reemplazado por una versión en la que el residuo Tyr757 se reemplaza por fenilalanina. Estudios previos han asociado este residuo con la unión de SOCS3 y SHP2, y de acuerdo con esta observación esta sustitución da como resultado la hiperactivación de STAT3 mediada por IL-6 y la activación impedida de la ruta Ras-ERK⁴⁴.

45 Células T procedentes de los ratones gp130Y757F estimulados con IL-6 daban como resultado una fosforilación exagerada y prolongada de STAT3 (Panel C de la Figura 6 y datos no mostrados). El máximo de fosforilación de STAT3 se producía en 1 h y permanecía elevado en las células T gp130Y757F T después de 24 h (Panel C de la Figura 6 y datos no mostrados). Posteriormente, se aislaron células T CD4+ de ratones gp130Y757F y controles de compañeros de camada WT y se hicieron crecer bajo condiciones inductoras de T_H-17 durante 4 días seguido por una medida de la IL-17 intracelular. En estos experimentos, esta mutación en gp130 condujo a un incremento en un factor de 3 en la frecuencia de las células IL-17⁺ sin reestimulación con PMA e ionomicina (Panel D de la Figura 6) aunque este efecto era menos evidente cuando se usaba estimulación con PMA e ionomicina (Figura 10). El análisis de sobrenadantes de cultivo revelaba que las células T CD4+ gp130Y757F secretaban cinco veces más IL-17 que las células T CD4+ WT (Panel E de la Figura 6). Esos datos establecen que la producción de SOCS3 mediada por IL-6 limita la capacidad de IL-6 para promover IL-17 y están de acuerdo con el informe reciente de un papel para SOCS3 como un regulador negativo de la producción de IL-17 inducida por IL-23⁴⁵. No obstante, la adición de IL-27

antagonizaba la producción de IL-17 por las células T_H-17 gp130Y757F con o sin reestimulación con PMA e ionomicina (Panel D de la Figura 6 y Figura 10) y la IL-27 era capaz de reducir los niveles de IL-17 secretada por células T CD4⁺ mutantes y WT de un modo dependiente de la dosis (Panel E de la Fig. 6). Finalmente, para examinar directamente el papel de SOCS3 en la limitación de la producción de IL-17 por IL-27, se usaron ratones *Cre*^{MMTV} *Socs3*^{fl/fl} con una supresión condicional de *Socs3* en células T CD4⁺. Cuando las células T CD4⁺ *Cre*^{MMTV} *Socs3*^{fl/fl} se hacían crecer bajo condiciones inductoras de T_H-17 en presencia de IL-27, la producción de IL-17 todavía se inhibía (Panel F de la Figura 6). Conjuntamente, esos resultados indican que la capacidad de IL-27 para inhibir la producción de IL-17 no se podía atribuir a una moderación mediada por SOCS3 de la señalización de gp130-IL-6.

10 IL-27 inhibe la producción de IL-17 a través de STAT1

Aunque IL-6 e IL-27 son citocinas estrechamente relacionadas y comparten la señalización mediada por gp130, los datos presentados hasta ahora demuestran que tienen efectos opuestos sobre la producción de IL-17. Esa conclusión implica que las señales inhibitorias procedentes de IL-27 están mediadas a través de los componentes específicos de IL-27R, y aunque IL-6 activa STAT3 predominantemente, varios estudios han ligado la cadena de IL-27R única a la activación de STAT1 y la inducción posterior del factor de transcripción T-bet^{32,33}. Por lo tanto, a fin de determinar si la capacidad de IL-27 para inhibir la producción de IL-17 implicaba a estos factores de transcripción, células T CD4⁺ procedentes de ratones bien *Stat1*^{-/-} o bien *Tbx21*^{-/-} (deficientes en T-bet) se estimularon bajo condiciones inductoras de T_H-17 en presencia o ausencia de IL-27. Como anteriormente, la adición de IL-27 daba como resultado una notable inhibición de la producción de IL-17 por células T CD4⁺ WT y deficientes en T-bet, pero el efecto estaba comprometido en ausencia de STAT1 (Panel A de la Figura 7). Esos datos identifican un papel dominante de STAT1 en la capacidad de IL-27 para antagonizar la función de T_H-17.

Para examinar el papel de STAT1 in vivo, ratones *Stat1*^{-/-} fueron infectados agudamente con *T. gondii* y se verificó la producción de IL-17. La reestimulación de esplenocitos con STAg el día 7 después de la infección mostraba que los esplenocitos *Stat1*^{-/-} secretan más IL-17 que sus homólogos WT (Panel B de la Figura 7). Aunque de acuerdo con los datos in vitro, los datos in vivo se tienen que interpretar con precaución debido a que los ratones *Stat1*^{-/-} son incapaces de controlar la replicación de parásitos⁴⁶, y sin embargo los resultados son similares a estudios con EAE⁷ que previamente proporcionaron in vivo una evidencia de la inhibición de la actividad de T_H-17 mediada por STAT1.

Análisis

30 Recientemente, un único subgrupo de células T se ha ligado a la producción de IL-17, TNF y IL-6 se han relacionado con el desarrollo de la patología observada en modelos de esclerosis múltiple, enteropatía inflamatoria y artritis reumatoide³⁻⁷. Aunque las respuestas de T_H-17 aberrantes se asocian con autoinmunidad, también tienen un papel en la resistencia aguda a la excitación con los patógenos klebsiella y toxoplasma⁴⁷⁻⁴⁹, pero en esas situaciones las respuestas de T_H-17 no conducen a autoinmunidad. La implicación de esos resultados, de forma similar a lo que se conoce para la mayoría de las respuestas de células T, es que existen mecanismos para regular apropiadamente la actividad de T_H-17; no hay una evidencia clara de que se requieran IFN- γ e IL-4 para que otras células T cooperadoras antagonicen a células T_H-17^{3,13,40,41}.

40 Los resultados de la presente mostraban que ratones *Il27ra*^{-/-} infectados crónicamente con *T. gondii* desarrollan neuropatología grave mediada por células T CD4⁺, asociada con la producción anormal de células T de IL-17, IL-6 y TNF, lo que indica un papel para la IL-27 en la regulación de la actividad de T_H-17. Los efectos supresores de IL-27 sobre las células T_H-17 se demostraron mediante experimentos en los que IL-27 inhibía la producción de IL-17 por BMNC procedentes de ratones infectados crónicamente estimulados con IL-23, así como células T CD4⁺ transgénicas para TCR y células T CD4⁺ y CD8⁺ derivadas del bazo. Esos resultados indican que es probable que la IL-27 regule las células T_H-17 en otras zonas de inflamación.

Según se destacó anteriormente, IL-6 e IL-27 son citocinas estrechamente relacionadas que señalan ambas a través de gp130 y sus efectos celulares están mediados a través de la activación de la ruta JAK-STAT^{3,52}, y sin embargo tienen muchos efectos diferentes sobre la actividad de T_H-17. Un informe reciente ha ligado la activación inducida por IL-23 de STAT3 a la promoción de la producción de células T CD4⁺ de IL-17⁵³, un hallazgo coherente con la capacidad de IL-6, un activador principal de STAT3, para promover la actividad de T_H-17. De forma similar, la observación de que las células T gp130Y757F producen cantidades elevadas de IL-17 está de acuerdo con modelos actuales que indican que SOCS3 es parte de un bucle de retroalimentación negativa clásico que limita la señalización mediada por IL-6. Sin embargo, aunque IL-27 activa SOCS3^{27,37} la capacidad de IL-27 para reducir la actividad de T_H-17 en ausencia de IL-6 y en las células T CD4⁺ deficientes en gp130Y757F o SOCS3 indica que tiene efectos inhibitorios distintos de simplemente antagonizar la señalización mediada por IL-6.

Aunque los informes iniciales se enfocaron a las actividades proinflamatorias de IL-27, existe un reconocimiento creciente de que IL-27 antagoniza respuestas patológicas de células T. Estudios recientes que muestran que IL-27 inhibe la producción de células T cooperadoras de IL-2 han proporcionado percepciones de sus posibles actividades

antiinflamatorias²⁷. Por otra parte, la capacidad de IL-27 para disminuir la producción de IL-17 en presencia de IL-2 endógena indica que la disminución de la actividad de T_H-17 no es simplemente una consecuencia de los niveles reducidos de IL-2 (Figura 11). En efecto, algunos datos sugieren que IL-2 promueve preferentemente respuestas de IFN- γ y no de IL-17.

5 Los datos presentados en la presente demuestran que IL-27 emplea STAT1 para suprimir la producción de IL-17 por células T CD4⁺ y CD8⁺, un efecto que es independiente de T-bet. Esa observación contrasta con un informe previo de que la inhibición por IL-27 de la producción de IL-2 era independiente de STAT1²⁷. Aunque la activación de STAT1 por IFN- γ o IL-27 se ha asociado predominantemente con el desarrollo de respuestas de T_H1, los presentes
10 datos destacan que esta ruta de señalización también media en las actividades antiinflamatorias. Esta conclusión es apoyada por la observación del desarrollo intensificado de células T_H-17 in vivo en ratones *Stat1*^{-/-}⁵⁴ y por el hecho de que la neutralización de IFN- γ promueve la producción de IL-17^{3,40,41}. Por otra parte, la hipótesis de que IL-27 media en la activación de STAT1 representa una ruta inhibidora endógena de células T productoras de IL-17 en el SNC puede explicar el hallazgo de que los ratones *Stat1*^{-/-} desarrollen EAE más grave⁵⁵. Aunque el último hallazgo
15 se ha atribuido a la falta de señalización de IFN- γ ⁸, parece probable que también pueda ser función de la actividad reducida de IL-27. En la actualidad, se desconoce la base molecular de los efectos inhibidores de STAT1 en diferentes sistemas experimentales, y sin embargo continúa aumentando la bibliografía que destaca el papel de diversos STAT en la represión de respuestas inmunitarias^{56,57}.

20 La inhibición de la producción de IL-17 por p28 sola provoca varias preguntas acerca de la biología de cómo esta proteína se une a su receptor y transduce sus efectos inhibidores. Una posibilidad es que la secreción de p28 se pueda dimerizar con EBI3 disponible constitutivamente conduciendo a la formación de IL-27 o p28 pueda señalizar en trans de un modo similar a IL-6¹⁹. Aunque ninguna de las actividades inmunoestimulantes de IL-27 se ha atribuido previamente a p28¹⁴, una mejor comprensión de la biología de esta proteína secretada puede proporcionar
25 una percepción de modo en los que se puede usar terapéuticamente. Los hallazgos presentados en la presente sugieren una pertinencia de la señalización de p28 por sí misma y la importancia de IL-27 como un antagonista fisiológico de la actividad de T_H-17. Aunque se ha descubierto una fuerte evidencia de que el bloqueo de la actividad de IL-17 mejora la enfermedad en una variedad de trastornos autoinmunitarios^{3,50,51,58}, la neutralización de IL-17 elige como diana específicamente las citocinas aguas abajo de la actividad de T_H-17. En contraste, la estimulación
30 por IL-27 y/o su subunidad p28 puede antagonizar directamente células T_H-17 específicas para un antígeno y proporcionar una oportunidad de elegir como diana específicamente fuentes celulares de IL-17, que pueden proporcionar un enfoque más eficaz para el tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunitarias.

Métodos

Ratones y parásitos

35 Los ratones C57BL/6 se obtuvieron de Jackson laboratories y los ratones WSX-1/- (*Il27ra*-/-) fueron proporcionados por el Dr. Christiaan Saris (Amgen Inc.). Los ratones DO11.10 transgénicos con un TCR específico para el péptido de ovoalbúmina de pollo (OVA(323-339)) en el contexto de I-Ad, los ratones *Stat1*-/- y los ratones *Tbx21*-/- fueron proporcionados por el Dr Phillip Scott (University of Pennsylvania, Filadelfia, PA). Los ratones gp130Y757F y *CreMMTVSocs3fl/fl* se habían descrito previamente^{43,45}. Los ratones se alojaron y se criaron en instalaciones libres
40 de patógenos específicas en the Department of Pathobiology at the University of Pennsylvania según las directrices institucionales.

La cepa Me49 de *T. gondii* se preparó a partir de ratones CBA/ca infectados crónicamente y los animales experimentales se infectaron intraperitonealmente con 20 quistes. A los ratones *Il27ra*-/- se les administraron 200 μ g de CTLA4-Ig (Bristol Meyers Squibb) intraperitonealmente el día 7 y 10 después de la infección o se trataron el día 5
45 después de la infección con 200 mg/l de sulfadiazina (Sigma) en su agua de bebida durante dos semanas. El antígeno toxoplásmico soluble (STAg) se preparó a partir de taquizoitos de la cepa RH según se describe previamente⁵⁹. Para los exámenes histológicos, los hígados, los pulmones y los cerebros se recogieron de los animales, se fijaron con formalina al 10%, se embebieron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para determinar la activación de astrocitos, las secciones de cerebro se tiñeron con respecto a GFAP según se describe previamente³⁰. Para medir la carga de parásitos, el gen *B1* de *T. gondii* 35 veces repetitivo se amplificó mediante PCR en tiempo real usando mezcla SYBR® Green PCR Master (Applied Biosystems) en un
50 aparato de PCR en tiempo real rápida AB7500 (Applied Biosystems) usando las condiciones descritas previamente³⁰. A fin de normalizar los valores de C_t obtenidos a partir de las muestras experimentales, el gen de β -actina de ratón se amplificó bajo las mismas condiciones³⁰.

Análisis de células mononucleares cerebrales (BMNC)

El aislamiento de BMNC de ratones WT e *Il27ra*-/- infectados crónicamente se realizó según un protocolo descrito previamente^{30,60}. Las células se procesaron para la tinción superficial y la tinción intracelular ex vivo según se describe previamente²⁷. Las células se tiñeron superficialmente usando anticuerpos contra CD4, CD8, CD44, CD45,

I-A/I-E (BD Pharmingen), CD62L y CD11b (eBioscience). Las células T se tificaron intracelularmente usando anticuerpos contra IL-17 (BD Pharmingen), IFN- γ y TNF (eBioscience). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScaliber (Becton Dickinson) y los resultados se analizaron usando el software FloJo (TreeStar Inc.). Las BMNC se sembraron a una densidad final de 2×10^5 células por pocillo en un volumen final de 200 μ l en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Costar). Las células se estimularon con o sin STAg (50 μ g/ml) en presencia o ausencia de mL-27 (100 ng/ml; Amgen Inc.), IL-23 (10 ng/ml; DNAX) recombinantes o ambas. Los sobrenadantes se recogieron después de 48 h y los niveles de IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-17, TNF e IL-6 se midieron mediante ELISA. Los niveles de óxido nítrico (NO) se midieron mediante el uso de un ensayo de Greiss.

Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real

10 Se aisló ARN celular total de cerebros perfundido y homogeneizados de ratones WT e *IL27ra-/-* infectados crónicamente así como ratones WT no infectados usando procedimientos estándar y se convirtió en ADNc según se describe²⁶. Además, se aisló ARN total de cultivos de astrocitos primarios C57BL/6 WT y se usó para elaborar ADNc. Los astrocitos primarios se recogieron de los cerebros de ratones de 1-3 días de edad según se describió previamente³⁰, y la pureza de los cultivos de astrocitos según se juzgaba mediante tinción de proteínas ácidas fibrilares gliales (GFAP) (anti-mouse GFAP, BD Pharmingen) era consecuentemente mayor de 90%. La expresión de TNF, IL-6, IL-27p28 y EBI3 se determinó usando cebadores obtenidos de Qiagen y se llevó a cabo en un aparato de PCR en tiempo real rápida AB7500 usando reactivos Power Sybr green® (Applied Biosystems). La expresión de IL-17 se determinó usando cebadores, sonda y reactivos Taqman® obtenidos de Applied Biosystems. El gen constitutivo de β -actina se usó como un control de normalización en ambos casos.

20 Generación de células T_H-17

Se produjeron células T CD4+ y CD8+ productoras de IL-17 según se describe en otras partes^{11,40} con cambios modificados. Brevemente, esplenocitos aislados de los susodichos ratones se agotaron de células CD8+ y NK1.1+ para enriquecer con respecto a células T CD4+ o se agotaron de células CD4+ y NK1.1+ para enriquecer con respecto a células T CD8+ mediante separación con cuentas magnéticas (Polysciences). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Costar) con una densidad de 5×10^6 células/ml. Las células T CD4+ Tg se estimularon con 5 μ g/ml de péptido de OVA, mientras que las otras células T se estimularon con anticuerpo anti-TCR (anti-CD3; 1 μ g/ml; eBioscience) y anti-CD28 (1 μ g/ml; eBioscience). Para la producción de células T_H-17 los cultivos se complementaron bien con IL-23 de ratón recombinante (10 ng/ml; DNAX) o bien con TGF- β humano (1 ng/ml; R & D) solo o en combinación con IL-6 (10 ng/ml; eBioscience), TNF (10 ng/ml; eBioscience) e IL-1 β (10 ng/ml; BD Pharmingen). Adicionalmente, IFN- γ e IL-4 se neutralizaron en los cultivos usando anti-IFN- γ (10 μ g/ml; clon XMG1.2) y anti-IL-4 (10 μ g/ml; clon 11B11). Cuando estuviera indicado, se añadió IL-27 recombinante (100 ng/ml; Amgen). La p28 recombinante fue proporcionada por eBioscience y se usó a una concentración de 100 ng/ml cuando estuviera indicado. Las células T CD8+ se recogieron el día 3, mientras que las células T CD4+ se complementaron con medio y reactivos recientes el día 3 y se recogieron el día 4. Ambos tipos de células se tificaron posteriormente con respecto a IL-17, TNF e IFN- γ intracelulares en presencia o ausencia de estimulación con PMA e ionomicina más Brefeldin A (Sigma).

Estadística

Se usó una prueba de la t de Student desapareada para determinar diferencias significativas y un valor de P < 0,05 se consideraba significativo.

40 Referencias para el Ejemplo 1

1. Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-73 (1989).
2. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278**, 1910-4 (2003).
- 45 3. Langrish, C. L. y cols. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**, 233-40 (2005).
4. Cua, D. J. y cols. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744-8 (2003).

5. Murphy, C. A. y cols. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* **198**, 1951-7 (2003).
6. Yen, D. y cols. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* **116**, 1310-6 (2006).
- 5 7. Chen, Y. y cols. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* **116**, 1317-26 (2006).
8. Hunter, C. A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* **5**, 521-31 (2005).
- 10 9. McKenzie, B. S., Kastelein, R. A. & Cua, D. J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* **27**, 17-23 (2006).
10. Bettelli, E. & Kuchroo, V. K. IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *J Exp Med* **201**, 169-71 (2005).
11. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-89 (2006).
- 15 12. Bettelli, E. y cols. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T(H) 17 and regulatory T cells. *Nature* (2006).
13. Mangan, P. R. y cols. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* (2006).
- 20 14. Pflanz, S. y cols. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* **16**, 779-90 (2002).
15. Pflanz, S. y cols. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* **172**, 2225-31 (2004).
16. Villarino, A. V. y cols. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J Immunol* **174**, 7684-91 (2005).
- 25 17. Sprecher, C. A. y cols. Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem. Biophys Res Commun* **246**, 82-90 (1998).
18. Chen, Q. y cols. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* **407**, 916-920 (2000).
- 30 19. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* **334**, 297-314 (1998).
20. Taga, T. & Kishimoto, T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* **15**, 797-819 (1997).
21. Villarino, A. V. & Hunter, C. A. Biology of recently discovered cytokines: discerning the pro- and anti-inflammatory properties of interleukin-27. *Arthritis Res Ther* **6**, 225-33 (2004).
- 35 22. Yoshida, H. y cols. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. *Immunity* **15**, 569-78 (2001).
23. Artis, D. y cols. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol* **173**, 5626-34 (2004).
24. Hamano, S. y cols. WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* **19**, 657-67 (2003).

25. Rosas, L. E. y cols. Interleukin-27R (WSX-1/T-Cell Cytokine Receptor) Gene-Deficient Mice Display Enhanced Resistance to *Leishmania donovani* Infection but Develop Severe Liver Immunopathology. *Am J Pathol* **168**, 158-69 (2006).
- 5 26. Villarino, A. y cols. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* **19**, 645-55 (2003).
27. Villarino, A. V. y cols. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol* **176**, 237-47 (2006).
28. Li, J., Gran, B., Zhang, G. X., Rostami, A. & Kamoun, M. IL-27 subunits and its receptor (WSX-1) mRNAs are markedly up-regulated in inflammatory cells in the CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* **232**, 3-9 (2005).
- 10 29. Sonobe, Y. y cols. Production of IL-27 and other IL-12 family cytokines by microglia and their subpopulations. *Brain Res* **1040**, 202-7 (2005).
30. Wilson, E. H., Wille-Reece, U., Dzierzinski, F. & Hunter, C. A. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol* **165**, 63-74 (2005).
- 15 31. Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal Malefyt, R. & Kastelein, R. A. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res* **23**, 513-22 (2003).
32. Kamiya, S. y cols. An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells. *J Immunol* **173**, 3871-7 (2004).
33. Takeda, A. y cols. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* **170**, 4886-90 (2003).
- 20 34. Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J. & de Sauvage, F. J. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15047-52 (2003).
35. Egen, J. G., Kuhns, M. S. & Allison, J. P. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* **3**, 611-8 (2002).
- 25 36. Suzuki, Y., Conley, F. K. & Remington, J. S. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol* **143**, 2045-50 (1989).
37. Owaki, T. y cols. IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* **176**, 2773-80 (2006).
38. Gazzinelli, R., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A. & Sher, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **149**, 175-80 (1992).
- 30 39. Israelski, D. M. y cols. Treatment with anti-L3T4 (CD4) monoclonal antibody reduces the inflammatory response in toxoplasmic encephalitis. *J Immunol* **142**, 954-8 (1989).
40. Harrington, L. E. y cols. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-32 (2005).
- 35 41. Park, H. y cols. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-41 (2005).
42. Alexander, W. S. & Hilton, D. J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* **22**, 503-29 (2004).
43. Tebbutt, N. C. y cols. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med* **8**, 1089-97 (2002).
- 40 44. Croker, B. A. y cols. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* **4**, 540-5 (2003).

45. Chen, Z. y cols. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8137-8142 (2006).
- 5 46. Lieberman, L. A., Banica, M., Reiner, S. L. & Hunter, C. A. STAT1 plays a critical role in the regulation of antimicrobial effector mechanisms, but not in the development of Th1-type responses during toxoplasmosis. *J Immunol* **172**, 457-63 (2004).
47. Kelly, M. N. y cols. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* **73**, 617-21 (2005).
48. Happel, K. I. y cols. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* **202**, 761-9 (2005).
- 10 49. Happel, K. I. y cols. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol* **170**, 4432-6 (2003).
50. Koenders, M.I. y cols. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am. J. Pathol.* **167**, 141-149 (2005).
- 15 51. Lubberts, E. y cols. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* **50**, 650-659 (2004).
52. Watford, W. T. y cols. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev* **202**, 139-56 (2004).
- 20 53. Cho, M. L. y cols. STAT3 and NF- κ B Signal Pathway Is Required for IL-23-Mediated IL-17 Production in Spontaneous Arthritis Animal Model IL-1 Receptor Antagonist-Deficient Mice. *J Immunol* **176**, 5652-61 (2006).
54. Hashimoto, K. y cols. Respiratory syncytial virus infection in the absence of STAT 1 results in airway dysfunction, airway mucus, and augmented IL-17 levels. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 550-7 (2005).
55. Bettelli, E. y cols. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **200**, 79-87 (2004).
- 25 56. Nguyen, K. B. y cols. Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol* **1**, 70-6 (2000).
57. Lee, C. K., Smith, E., Gimeno, R., Gertner, R. & Levy, D. E. STAT1 affects lymphocyte survival and proliferation partially independent of its role downstream of IFN-gamma. *J Immunol* **164**, 1286-92 (2000).
- 30 58. Hellings, P. W. y cols. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 42-50 (2003).
59. Sharma, S. D., Mullenax, J., Araujo, F. G., Erlich, H. A. & Remington, J. S. Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J. Immunol.* **131**, 977-983 (1983).
60. Villegas, E. N. y cols. Blockade of costimulation prevents infection-induced immunopathology in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* **68**, 2837-2844 (2000).
- 35 Ejemplo 2: el WSX-1 soluble intensifica la inhibición de la producción de IL-2 por IL-27
- Se aislaron esplenocitos totales de dos ratones *Il27ra*^{-/-} (WSX-1 KO1 y WSX-1 KO2). Los esplenocitos se agotaron de células NK1.1+ y CD8+ para enriquecer con respecto a células T CD4+. Las células T CD4+ se etiquetaron a continuación con CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) y se estimularon anticuerpo anti-CD3 y anticuerpo anti-CD28. Se añadió IL-27 con o sin la proteína de sIL-27R Fc (un polipéptido de WSX-1 soluble, una proteína de fusión de Fc que incluye la secuencia extracelular del dominio WSX-1, proporcionada por Amgen Inc.) a los pocillos que contenían las células. La proteína de sIL-27R Fc se incubó durante 30 minutos con IL-27 antes de la adición a los pocillos con células para facilitar la unión. Las células se incubaron durante 48 h a 37°C. Los sobrenadantes se usaron en ensayos ELISA para medir la producción de IL-2 e IFN- γ (Figura 12).
- 40

La adición de la proteína de fusión de WSX-1 soluble sIL-27R Fc potenciaba la inhibición de la producción de IL-2 e IFN- γ por IL-27. Los resultados demuestran que el receptor soluble puede funcionar en ausencia de receptor endógeno e indican que el receptor puede trabajar en trans.

5 Ejemplo 3: un papel fundamental para la activación mediada por interleucina 27 e IL-6 de STAT3 en la producción de IL-10 por células T

La IL-10 tiene un papel predominante en la regulación del equilibrio entre respuestas de células T protectoras y patológicas. De acuerdo con esta actividad, existen múltiples fuentes de esta citocina incluyendo células mieloides así como una variedad de subgrupos de células T. Sin embargo, aunque existen muchas rutas para regular la producción innata de IL-10, los factores que gobiernan su producción mediante la respuesta adaptativa son poco entendidos. Los estudios presentados en este ejemplo revelan que IL-27 e IL-6 son capaces de inducir una variedad de poblaciones de células T para producir IL-10. Este efecto depende de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 para IL-27, y STAT3 para IL-6. Conjuntamente, estos estudios identifican una nueva ruta que permite que el sistema inmunitario modere las respuestas inflamatorias.

La IL-10 fue descrita inicialmente con una citocina asociada a T_H2 que inhibía la producción de células IFN- γ T_H1 ^{1,2}. Más tarde se supo que esto era un efecto indirecto y que su capacidad para moderar la función de células T_H1 se debía a su capacidad para antagonizar una actividad celular accesoria. Así, IL-10 reducía la capacidad de los macrófagos para producir citocinas proinflamatorias tales como IL-1, TNF e IL-12, y disminuía la expresión de moléculas coestimulantes y del MHC requeridas para respuestas de células T ³⁻⁹. Aunque IL-10 tiene una variedad de propiedades biológicas, uno de sus principales papeles in vivo es limitar respuestas inflamatorias, de acuerdo con sus efectos inhibidores sobre células que presentan antígenos. Esta función se destacó en primer lugar en los informes iniciales que revelaban que los ratones *IL-10*^{-/-} desarrollaban espontáneamente enteropatía inflamatoria (IBD)¹⁰. Estudios posteriores usando modelos en ratones de septicemia, enfermedad infecciosa y autoinmunidad han ampliado la comprensión del papel de IL-10 en la regulación de respuestas innatas y adaptativas asociadas con las actividades de T_H1 , T_H2 y T_H17 ¹¹⁻¹³. En el contexto de una enfermedad infecciosa, existen varios ejemplos de cómo la ausencia de IL-10 conduce a una resistencia a patógenos intensificada, pero también da como resultado el desarrollo de una respuesta inflamatoria aberrante que puede matar al hospedador¹⁴⁻¹⁶. Conjuntamente, estos estudios ilustran el papel fundamental de IL-10 en el mantenimiento de un equilibrio entre la inmunidad protectora y el desarrollo de la patología.

Dado el importante papel de IL-10 en la limitación de la inflamación, quizá no sea sorprendente que haya múltiples fuentes de este modulador inmunitario, incluyendo macrófagos y células dendríticas estimuladas con productos microbianos. Además, aunque IL-10 se caracterizó inicialmente como una citocina T_H2 ^{1,2}, se sabe ahora que las células T_H1 ¹⁷, las células T reguladoras CD25^{hi}^{18, 19} y CD25⁻ (Treg)^{20, 21} y las células T_H1 ^{22, 23} también secretan IL-10. La importancia relativa de estos diferentes subgrupos como fuentes de IL-10 ha sido una cuestión antigua^{24, 25}, pero en los últimos años la ligazón entre células Treg e IL-10 ha dominado esta área de investigación. No obstante, existe una bibliografía establecida sobre la presencia de células cooperadoras T IFN- γ +IL-10+ en una variedad de entornos de enfermedad^{26, 27}, y varios estudios recientes han destacado la importancia de la supresión inmunitaria dependiente de IL-10 por células T CD4+CD25⁻Foxp3⁻ que también producen IFN- γ durante la infección con *T. gondii* y en modelo no curativo de *Leishmania major*^{28, 29}. No obstante, a pesar de la amplia evidencia de la importancia de la IL-10 derivada de células T para limitar la inflamación, los episodios que inducen la producción de esta citocina por células T han seguido sin estar claros^{24, 25}.

La IL-10 no es el único mediador antiinflamatorio usado por el sistema inmunitario para controlar la inflamación, y la lista de rutas (CTLA4, BTLA, PD1) implicadas en este proceso continúa creciendo. Recientemente, la citocina IL-27, una citocina heterodímera compuesta por proteína inducida por Epstein-Barr 3 (EBI3) y p28³⁰, se ha descrito como un antagonista de varias funciones de células T. Esta citocina se identificó inicialmente como un factor que promueve el desarrollo de células T_H1 ^{31, 32}, pero informes posteriores destacaron que la IL-27 también puede limitar respuestas de T_H1 , T_H2 y T_H17 implicadas en diversos modelos de infección y autoinmunidad³²⁻⁴⁰. En efecto, estudios en estos laboratorios revelaban que, como los ratones *IL-10*^{-/-}, los ratones *IL-27ra*^{-/-} infectados con *T. gondii* desarrollaban una respuesta mediada por células T CD4+ letal que se caracterizaba por una producción excesiva de citocinas proinflamatorias, grandes áreas de necrosis en el hígado y la presencia de infiltrados intensos de células inmunitarias en múltiples órganos^{14, 33, 38, 41, 42}. Las similitudes de estos fenotipos no solo destacan el importante papel que representan estas citocinas antiinflamatorias en la regulación de una respuesta inmunitaria en marcha, sino que también sugieren una relación potencial entre estos dos moduladores inmunitarios.

A fin de comprender mejor el efecto de IL-27 sobre las células T, se ensayó la producción de 67 mediadores inmunitarios solubles en presencia o ausencia de IL-27. Este análisis revelaba que aunque IL-27 inhibía múltiples citocinas asociadas con células T_H1 , T_H2 y T_H17 , sorprendentemente, también promovía la producción de IL-10. Esta observación se reflejaba in vivo ya que las células T procedentes de ratones *IL-27ra*^{-/-} infectados crónicamente con *T. gondii* tenían un defecto en su capacidad para elaborar IL-10. Estudios in vitro revelaban que IL-27 podía intensificar la producción de IL-10 por células T CD4+ y CD8+, pero la mayoría de las células T IL-10+ inducidas por

IL-27 no expresaba Foxp3 indicando que la IL-27 puede estimular la producción de IL-10 por múltiples poblaciones de células T. Por otra parte, la estimulación de células T con IL-27 más TGF- β daba como resultado un efecto aditivo sobre IL-10, e IL-6 (que como IL-27 señala a través de gp130) cuando se combinaba con TGF- β también era un potente inductor de IL-10. La capacidad de IL-27 para estimular la producción de IL-10 era independiente de la molécula de señalización intracelular STAT4 y el factor de transcripción T-bet, pero era dependiente de la activación de STAT1 y STAT3, mientras que la IL-6 solo requiere STAT3. Colectivamente, estos datos proporcionan una nueva perspectiva en el entorno de las citocinas que promueve la producción de IL-10 por células T y los episodios moleculares que apuntalan esta ruta reguladora.

Resultados

10 IL-27 induce la producción de IL-10 por células T

Aunque estudios recientes han destacado la capacidad de IL-27 para inhibir la producción por células T de múltiples citocinas proinflamatorias^{38, 43}, sería de interés un cribado que pudiera identificar dianas adicionales para IL-27. Por lo tanto, células T CD4+ vírgenes procedentes de ratones C57BL/6 se activaron con anticuerpos anti-TCR (α -CD3) y α -CD28 en presencia de células accesorias bajo condiciones no polarizantes (α -IFN- γ y α -IL-4) en presencia o ausencia de IL-27. Después de que las células se cultivaran durante tres días los sobrenadantes se ensayaron con respecto a un conjunto de 67 productos inmunitarios secretados usando un Rodent Multi-Analyte Profile (RodentMAP™). De acuerdo con informes previos, la adición de IL-27 a estos cultivos no polarizados condujeron a disminuciones en múltiples citocinas asociadas con respuestas de T_H1 (IFN- γ), T_H2 (IL-5) y T_H17 (IL-17) pero también incluían GM-CSF, IL-1 β , IL-3, MIP-1 α y β y linfotactina (Panel A de la Figura 14). Además, varias otras citocinas incluyendo IL-18, IL-6, IL-7 y quimocinas incluyendo MCP-1, MCP-3, M-CSF, MMP-9 no se alteraban mediante este tratamiento (Tabla 2). Sin embargo, el resultado más sorprendente era la observación de que la IL-27 conducía a un incremento de 1.000 veces en los niveles de IL-10 en estos sobrenadantes de cultivo (Panel A de la Figura 14 y Tabla 2).

25 Tabla 2. Resultados de MAP en roedores.

	pg/ml	
	No polarizante	IL-27
Apo A1 (Apolipoproteína A1)	1,2E+05	1,3E+05
Microglobulina Beta-2	<BAJO>	<BAJO>
Calbindina	51	51
Clusterina	19000	19000
CRP (Proteína Reactiva C)	<BAJO>	<BAJO>
Cistatina-C	64000	53000
EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico)	3,7	2,8
Endotelina-1	8	5
Eotaxina	4,4	3
Factor VII	480	330
FGF-9 (Factor de Crecimiento de Fibroblastos 9)	550	460
FGF-básico (Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico)	800	470
Fibrinógeno	1,70E+06	1,20E+06
GCP-2 (Proteína Quimiotáctica de Granulocitos 2)	5,4	4,4
GM-CSF	272	96
Hormona del Crecimiento	<BAJO>	<BAJO>
GST-alfa (Glutathiona S-Transferasa alfa)	<BAJO>	<BAJO>
GST-Mu	8700	6600
Haptoglobina	3,10E+05	2,90E+05
IFN-gamma (Interferón-gamma)	765	342
IgA (Inmunoglobulina A)	1,6E+05	1,2E+05
IL-10 (Interleucina-10)	303	3480

	pg/ml	
	No polarizante	IL-27
IL-11 (Interleucina-11)	14	13
IL-12p70 (Interleucina-12p70)	<BAJO>	9,9
IL-17 (Interleucina-17)	1900	820
IL-18 (Interleucina-18)	180	130
IL-1alfa (Interleucina-1alfa)	12	11
IL-1beta (Interleucina-1beta)	430	380
IL-2 (Interleucina-2)	638	570
IL-3 (Interleucina-3)	205	93
IL-4 (Interleucina-4)	8,8	<BAJO>
IL-5 (Interleucina-5)	1600	670
IL-6 (Interleucina-6)	14	15
IL-7 (Interleucina-7)	17	23
Insulina	1,3*	1,2*
IP-10 (Proteína Inducible 10)	108	121
KC/GROalfa	<BAJO>	<BAJO>
Leptina	42	21
LIF (Factor Inhibidor de Leucemia)	2410	2580
Linfotactina	1690	749
MCP-1 (Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1)	12	9
MCP-3 (Proteína Quimioatrayente de Monocitos 3)	8,9	7,5
MCP-5 (Proteína Quimioatrayente de Monocitos 5)	1,9	0,62
M-CSF (Factor Estimulantes de Colonias de Macrófagos)	17	13
MDC (Quimocina Derivada de Macrófagos)	1450	429
MIP-1alfa (Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1alfa)	1300	410
MIP-1beta (Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1beta)	1540	1340
MIP-1gamma (Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1gamma)	170	110
MIP-2 (Proteína Inflamatoria de Macrófagos 2)	33	14
MIP-3beta (Proteína Inflamatoria de Macrófagos 3beta)	380	190
MMP-9 (Metaloproteinasas de Matriz 9)	750	890
MPO (Mieloperoxidasa)	400	540
Mioglobina	<BAJO>	<BAJO>
NGAL (Lipocalina 2)	9900	6700
OSM (Oncostatina M)	82	98
Osteopontina	170	270
RANTES	46	22
SAP (Amiloide Sérico P)	<BAJO>	<BAJO>
SCF (Factor de Células Madre)	17	14
SGOT (Transaminasa Glutámica-Oxaloacética Sérica)	<BAJO>	<BAJO>
TIMP-1 (Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas Tipo 1)	120	160
Factor Tisular	1700	920
TNF-alfa (Factor de Necrosis Tumoral alfa)	700	1000
TPO (Trombopoyetina)	1800	470

	pg/ml	
	No polarizante	IL-27
VCAM-1 (Molécula de Adhesión de Células Vasculares 1)	1400	1300
VEGF (Factor de Crecimiento de Células Endoteliales Vasculares)	2810	2460
vWF (Factor de von Willebrand)	190	230

<BAJO> los valores reflejan muestras no medibles en la curva estándar
 * uIU/ml

5 Un análisis adicional usando tinción intracelular revelaba que cuando se estimulaban bajo condiciones similares después de la reestimulación con 12-miristato 13-acetato de (PMA) e ionomicina, había un pequeño porcentaje de células T CD4+ y CD8+ IL-10+, pero la adición de IL-27 conducía a un incremento notable en este porcentaje de (Paneles B y C de la Figura 14). Aunque estos resultados indican que un número similar de células T CD4+ y CD8+ elaboraban IL-10 en respuesta a IL-27, la cantidad de IL-10 en el sobrenadante procedente de los cultivos enriquecidos en células T CD4+ era superior que la observada para los cultivos que contenían las células T CD8+, de acuerdo con diferencias en la intensidad fluorescente media (MFI) (Paneles B y C de la Figura 14). Por consiguiente, la mayoría de los estudios presentados en este ejemplo se enfocaban a células T CD4+ como una fuente de IL-10.

El IL-27R se requiere para la producción óptima de IL-10 por células T in vitro e in vivo

15 Los estudios descritos anteriormente indicaban que la IL-27 podía intensificar la producción de IL-10 por células T. Para evaluar el papel del IL-27R en estos episodios, esplenocitos procedentes de ratones WT o *Il-27ra-/-* se activaron bajo condiciones no polarizantes en presencia o ausencia de IL-27, y se ensayó la IL-10. Mientras que las células procedentes de ratones WT secretaban niveles intensificados de IL-10 en respuesta a IL-27, esto no se observaba en los cultivos procedentes de ratones *Il-27ra-/-* (Panel A de la Figura 15). En efecto, incluso los niveles basales de IL-10 en estos sobrenadantes se reducían en comparación con los controles WT. Para evaluar si IL-27/IL-27R estaba implicada en la regulación de respuestas inflamatorias in vivo, se usó un sistema experimental en el que ratones WT e *Il-27ra-/-* se infectaban crónicamente con *T. gondii*³⁸. En estos estudios, la reestimulación de preparaciones de células mononucleares cerebrales (BMNC) y esplenocitos procedentes de ratones WT infectados crónicamente ex vivo revelaba la presencia de células T CD4+ que producen IL-10. En contraste, cuando se usaban células procedentes de los cerebros y los bazo de ratones *Il-27ra-/-* infectados crónicamente, había un defecto notable en IL-10 (Panel B de la Figura 15). A la inversa, la reestimulación de BMNC silvestres con STAg en presencia de IL-27 daba como resultado un aumento significativo de IL-10 (Panel C de la Figura 15). Estos resultados sugieren colectivamente un papel predominante para IL-27 y el IL-27R en la promoción de la producción de IL-10 por células T in vitro y en el entorno de una inflamación inducida por infección crónica asociada con *T. gondii*.

30 La IL-27 induce la producción de IL-10 bajo condiciones T_{H1} y T_{H2} pero no T_{H17}

Aunque los estudios descritos anteriormente se realizaron bajo condiciones neutras, los datos procedentes de ratones infectados con *T. gondii* implican un papel para la IL-27 en el desarrollo de productores de IL-10 durante una respuesta dominada por T_{H1}. Por lo tanto, se realizaron estudios in vitro adicionales para determinar en qué punto después de la activación de células T se producía IL-10 y para evaluar la capacidad de IL-27 para promover IL-10 bajo condiciones que favorecían el desarrollo de células T_{H1}, T_{H2} o T_{H17}. El análisis de la producción de IL-10 por células T CD4+ a lo largo de un período de cuatro días en respuesta a IL-27 revelaba que las células comenzaban a elaborar IL-10 48 horas después de la activación y que los números de células IL-10+ alcanzaban el máximo a las 72 horas y se mantenía a lo largo de 96 horas (Panel A de la Figura 16). Además, las células se etiquetaban con CFSE para determinar si las células T productoras de IL-10 generadas por IL-27 eran activamente proliferantes o parte de una población de células T no replicante. Según se muestra mediante dilución con CFSE, solo las células CFSE dim elaboraban IL-10 en respuesta a IL-27. Este hallazgo está de acuerdo con modelos en los que se requiere la proliferación para que las células T adquieran producción de citocinas⁴⁴. Además, el patrón de producción de IL-10 en estos experimentos se correlaciona con el perfil de expresión del IL-27R sobre células T recientemente activadas⁴⁵.

45 De acuerdo con informes previos²³, bajo condiciones T_{H1} (IL-12 más α-IL-4) había números bajos de células T CD4+ que elaboraran IL-10, pero la adición de IL-27 daba como resultado un incremento en el porcentaje de células que se teñían positivamente con respecto a IL-10 (Panel B de la Figura 16). Bajo condiciones T_{H2} (IL-4 más α-IFN-γ) había un número considerable de células T CD4+ IL-10+, de forma similar a informes previos, y la adición de IL-27 daba como resultado un incremento notable en el porcentaje y la MFI para la tinción de IL-10. Sorprendentemente, la polarización de células T CD4+ bajo condiciones T_{H17} (TGF-β más IL-6) daba como resultado la presencia de la mayor población de células T que producían IL-10 cuando se comparaba con todas las otras condiciones. Sin embargo, cuando se añadía IL-27, no había un incremento adicional en IL-10 (Panel B de la Figura 16).

Conjuntamente, estos datos indican que la capacidad de IL-27 para promover la producción de IL-10 es la más destacada bajo condiciones T_{H1} y T_{H2} pero no T_{H17} .

Efectos de IL-27 sobre productores de citocinas dobles

5 Aunque IL-27 puede promover la producción de IL-10 bajo condiciones T_{H1} y T_{H2} , y había una proporción significativa de células T CD4+ IL-10+ después de la polarización T_{H17} , no estaba claro si estas células IL-10+ también producían citocinas de firma asociadas con estos subgrupos T_H . Por lo tanto, las células T CD4+ se estimularon bajo condiciones T_{H1} , T_{H2} y T_{H17} y la tinción intracelular con respecto a IL-10 se combinó con IFN- γ , IL-13 o IL-17, respectivamente. Cuando se estimulaban bajo condiciones T_{H1} , la mayoría de las células T productoras de IL-10 también se teñían positivamente con respecto a IFN- γ , pero esta población de productores dobles todavía era una minoría en comparación con las células que producían solo IFN- γ (Panel A de la Figura 17). La adición de IL-27 no reducía el número de células IFN- γ + en lugar de dar como resultado un incremento en el porcentaje de células T CD4+ IFN- γ +IL-10+. Bajo condiciones T_{H2} , aproximadamente 50% de las células IL-10+ también elaboraban IL-13 (Panel A de la Figura 17). La adición de IL-27 incrementaba el porcentaje de células IL-10+ y provocaba una reducción simultánea en el número de células IL-13+IL-10+ y los productores individuales de IL-13.

15 Inesperadamente, el análisis de células T cultivadas con IL-6 más TGF- β (T_{H17}) para la producción de IL-17 e IL-10 revelaba la presencia de tres poblaciones distintas de células T: productores individuales de IL-17 o IL-10, y una población de células IL-17+IL-10+ (Panel A de la Figura 17). De forma similar a informes previos³⁸, la adición de IL-27 inhibía la expresión de IL-17, pero no incrementaba el porcentaje de células que expresan IL-10. En cambio, existe un incremento en la expansión de las células T IL-10+IL-17-. Dada la presencia de células accesorias en estos cultivos, era posible que la capacidad de IL-27 para inhibir la producción de IL-17 sea resultado de su capacidad para inducir la secreción de IL-10. Sin embargo, cuando se usaban células T CD4+ procedentes de ratones IL-10-/-, la IL-27 todavía era capaz de inhibir la producción de IL-17 (Panel B de la Figura 17).

El TGF- β intensifica la capacidad de IL-27 para conducir una población de células T CD4+ IL-10+

25 El hallazgo de que las células T_{H17} producían niveles significativos de IL-10 combinado con la incapacidad de IL-27 para intensificar la IL-10 bajo estas condiciones sugería que TGF- β o IL-6 también pueden estar implicados en la regulación de estos episodios. El examen de los efectos de TGF- β sobre células T CD4+ revelaba que, a diferencia de IL-27, el TGF- β solo daba como resultado un incremento moderado en IL-10, pero cuando se combinaba con IL-27, tenía un efecto aditivo que conducía a un incremento en el porcentaje de células IL-10+ así como un incremento en la MFI (Paneles A y B de la Figura 18). Además, aunque el TGF- β exógeno incrementaba la producción de IL-10, la neutralización de TGF- β endógeno no eliminaba la capacidad de IL-27 para promover la producción de IL-10, sino que conducía a una reducción moderada en el porcentaje de células IL-10+ (datos no mostrados).

35 Puesto que el TGF- β puede convertir células T CD4+CD25- en células Treg inducidas por CD4+CD25+ que expresan Foxp3^{46, 47}, era posible que la inclusión de TGF- β favoreciera la expansión de Treg y que la IL-27 promoviera la secreción por Treg de IL-10. Por lo tanto, células T CD4+ procedentes de ratones quiméricos Foxp3GFP⁴⁸ se activaron con α -CD3 y α -CD28 bajo condiciones no polarizantes en presencia de TGF- β , IL-27 o la combinación de ambas citocinas. Después de 72 horas de incubación bajo condiciones no polarizantes, estaban presentes pocas células Foxp3GFP+ en los cultivos sin TGF- β ; sin embargo, la adición de TGF- β daba como resultado la generación de una gran población de células T CD4+ Foxp3GFP+ cuando menos de 10% elaboraban IL-10 (Panel C de la Figura 18). Cuando se cultivaban células T CD4+ en presencia de IL-27, no había expansión de células Foxp3GFP+, pero 50% de las células Foxp3GFP+ elaboraban IL-10. Sin embargo, la mayoría de las células T productoras de IL-10 que se generaban en respuesta a IL-27 eran Foxp3GFP- (20% frente a 1,4%). Finalmente, cuando se combinaba TGF- β con IL-27, había una disminución de casi 70% en el número de células Foxp3GFP+ en comparación con los cultivos que contenían TGF- β solo. Como se observa con IL-27 solo, cerca de 50% de las células Foxp3GFP+ elaboraban IL-10, pero la mayoría de las células T CD4+ productoras de IL-10 seguían Foxp3GFP-, indicando que los efectos de IL-27 sobre la producción de IL-10 no son específicos para Treg Foxp3+. Conjuntamente, estos datos indican que el TGF- β tiene un efecto sinérgico sobre la producción de IL-10 por células T CD4+ cuando se combina con IL-27, y este resultado no se debe a números incrementados de células Treg Foxp3+ en estos cultivos.

50 Un papel de IL-6 en la promoción de la producción de IL-10

Aunque el TGF- β podría intensificar la capacidad de IL-27 para estimular la producción de IL-10 solo, no podía explicar el alto porcentaje de células IL-10+ presente bajo condiciones T_{H17} . Por lo tanto, para determinar si IL-6, una citocina tipo I que comparte homología estructural y una subunidad reguladora con IL-27, también puede promover la producción de IL-10, células T CD4+ se incubaron con IL-6 bajo condiciones no polarizantes. En estos experimentos, como se observa con TGF- β , la adición de IL-6 daba como resultado solamente un incremento moderado en IL-10 (Paneles A y B de la figura 19). Sin embargo, cuando se combinaba con TGF- β , la IL-6 tenía un

efecto sinérgico para promover la aparición de una gran población de células T CD4+ IL-10+. Puesto que la capacidad de IL-27 para regular positivamente IL-10 era la más evidente bajo condiciones polarizantes T_{H1}, se examinó el efecto de IL-6 sobre la producción de IL-10 bajo condiciones T_{H1} y T_{H2}. A diferencia de IL-27, IL-6 no era capaz de intensificar IL-10 bajo polarización T_{H1} de seguimiento (Figura 21). En contraste, bajo condiciones de diferenciación T_{H2}, la adición de IL-6 tenía un efecto aditivo sobre el nivel de IL-10 que se elaboraba (Figura 21).

Un papel de Stat1 y Stat3 para la generación de células T CD4+ productoras de IL-10

La activación de proteínas STAT específica en células T CD4+ es uno de los factores contribuyentes asociados con la diferenciación de células T en linajes de células T_H distintos, y se ha mostrado que IL-27 activa un número de proteínas STAT incluyendo STAT1 (y como consecuencia T-bet), STAT3 y en un menor grado STAT4^{49, 50} mientras que la IL-6 activa principalmente STAT3 y en un menor grado STAT1^{51, 52}. A fin de determinar la cinética con la que IL-27 e IL-6 activan STAT1 y STAT3, células T CD4+ purificadas se estimularon con cada citocina a lo largo de un período de tres horas y se verificó la fosforilación de estos factores de transcripción. Estos estudios revelaban que las células T CD4+ también eran capaces de fosforilar STAT1 y STAT3 en respuesta a IL-6 e IL-27, sin embargo, la IL-6 era capaz de hacerlo a una velocidad mayor que IL-27 (Paneles C y D de la Figura 19). Aunque el número más alto de células P-STAT1+ no se observaba hasta 30 minutos después de la estimulación con IL-27, no había diferencia en el porcentaje de células P-STAT1+ entre el máximo de la respuesta de IL-6 e IL-27. Por otra parte, la IL-6 era un inductor tan fuerte de la fosforilación de STAT3 que después de 5 minutos de estimulación aproximadamente 90% de las células T eran P-STAT3+, y un nivel alto de P-STAT3 se mantenía a lo largo de un período de 3 horas. En contraste, un porcentaje mucho menor de células T CD4+ se teñía positivamente con respecto a P-STAT3 en respuesta a IL-27 y esta población de células P-STAT3+ no se mantenía a las 3 horas después de la estimulación.

Para investigar adicionalmente el papel de la ruta de señalización JAK-STAT en la inducción de IL-10 por IL-27, se usaron ratones deficientes en proteínas STAT individuales. La capacidad de IL-27 para inhibir IL-17 se ha atribuido previamente a su capacidad para activar STAT1³⁸, mientras que un papel para la señalización de IL-27R en la promoción de la diferenciación de T_{H1} se ha atribuido en gran parte a la activación de T-bet a través de mecanismos dependientes así como independientes de STAT1⁵³. Por lo tanto, para determinar si la capacidad de IL-27 para promover IL-10 implicaba a estas proteínas, células T CD4+ obtenidas de ratones *Stat1*^{-/-} y *Tbx21*^{-/-} (deficientes en T-bet) se estimularon bajo condiciones no polarizantes en presencia o ausencia de IL-27. Las células T CD4+ procedentes de ratones *Stat1*^{-/-} eran incapaces de producir IL-10 en respuesta a IL-27 (Panel A de la Figura 20), mientras que la ausencia de T-bet no afectaba a la capacidad de IL-27 para promover IL-10 (Panel B de la Figura 20).

Para evaluar el papel de STAT3, células T CD4+ derivadas de ratones con un alelo de STAT3 "floreado" que también expresa un transgén CD4-Cre (*Stat3*^{CD4}^{-/-})⁵⁴ se estimularon como anteriormente en presencia o ausencia de IL-27. La retirada del alelo de STAT3 de las células T CD4+ reducía su capacidad para elaborar IL-10 en respuesta a IL-27 en comparación con sus controles de compañeros de camada silvestres negativos a CD4-Cre *Stat3*^{fl/fl} (Panel C de la Figura 20). Estos datos indican que STAT1 y STAT3 están implicados en la capacidad de IL-27 para promover la producción de IL-10.

Además, aunque la IL-27 también se ha ligado a STAT4, cuando células T CD4+ derivadas de ratones *Stat4*^{-/-} se cultivaban bajo condiciones no polarizantes en presencia de IL-27, la ausencia de STAT4 no impedía la capacidad de IL-27 para promover IL-10 (Panel D de la Figura 20), indicando que este es un episodio independiente de STAT4. Sin embargo, es importante apuntar que cuando células T *Stat4*^{-/-} se cultivaban bajo condiciones T_{H1}, producían menos IL-10 en comparación con células silvestres en respuesta a IL-12 incluso cuando se añadía IL-27 (Figura 22).

Finalmente, se evaluó la capacidad de células T CD4+ procedentes de ratones *Stat1*^{-/-} y *Stat3*^{CD4}^{-/-} para producir IL-10 cuando se estimulaban con IL-6 sola o en combinación con TGF-β. Las células T CD4+ procedentes de ratones *Stat1*^{-/-} y *Stat3*^{CD4}^{-/-} presentaban una capacidad reducida para elaborar IL-10 en respuesta a IL-6 (Paneles E y F de la Figura 20). En contraste, células T CD4+ procedentes de ratones *Stat1*^{-/-} elaboraban cantidades equivalentes de IL-10 cuando se incubaban con IL-6 más TGF-β en comparación con los controles silvestres mientras que las células T procedentes de ratones *Stat3*^{CD4}^{-/-} eran deficientes en su capacidad para producir IL-10 bajo estas mismas condiciones. Estos hallazgos indican que la señalización de STAT3, pero no STAT1, es requerida por IL-6 a fin de iniciar la producción de IL-10 bajo condiciones T_{H1}.

55 Análisis

Desde la descripción original de IL-10 como una citocina asociada con células T_{H2}, se sabe ahora que existen múltiples fuentes innatas y adaptativas de IL-10 que a su vez actúa como un inhibidor global de muchas clases (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}) de respuestas inmunitarias. No obstante, a pesar de la apreciación inicial de que las células T eran fuentes principales de IL-10, sigue habiendo muchas preguntas acerca de los factores que gobiernan su expresión en estos linfocitos. El trabajo inicial de Trinchieri y colaboradores implicaba a la IL-12 en la conducción del desarrollo

de productores dobles de IFN- γ /IL-10^{23, 26}, observaciones recapituladas aquí por datos que muestran que bajo condiciones T_H1 STAT4 está implicado en estos episodios. Por otra parte, la estimulación crónica de células T de ser humano y de ratón en presencia de IL-10 condujo a la aparición de una población de células T cooperadoras (Tr1) que secretaban altos niveles de IL-10 y que podían mejorar la colitis¹⁷. De forma similar, se ha observado que la estimulación repetida de células T CD4+ humanas y murinas vírgenes in vitro con dexametasona más vitamina D3 promueve la producción de IL-10 por una población de células Treg⁵⁵. En contraste, los estudios presentados aquí revelan que, incluso después de la estimulación a corto plazo, IL-27 e IL-6 eran capaces de inducir la producción de IL-10 por células T bajo una variedad de condiciones polarizantes. Esta observación identifica una nueva ruta que promueve la producción de IL-10 y refuerza la compleja relación entre las propiedades pro- y antiinflamatorias de los miembros de la familia IL-6/IL-12.

Aunque la IL-27 se describió en primer lugar basándose en su capacidad para promover respuestas de T_H1, se sabe ahora que esta citocina tipo I tiene un papel como un regulador negativo de la intensidad y la duración de respuestas de células T³²⁻³⁴. Los amplios efectos antiinflamatorios de IL-27 se han atribuido a su capacidad para antagonizar funciones de células T cooperadoras a través de la inhibición de la producción de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-17^{50,56}. Sin embargo, en un número de entornos experimentales, el fenotipo de ratones *Il-27ra*^{-/-} ha sido notablemente similar al de los ratones IL-10^{-/-}^{33, 38, 39}. A modo de ejemplo, ratones tanto IL-10^{-/-} como *Il-27ra*^{-/-} infectados con *T. gondii* desarrollan una inflamación mediada por células T CD4+ letal que está asociada agudamente con respuestas de T_H1 desreguladas^{14, 15, 33}, pero respuestas de T_H17 alteradas en la enfermedad crónica^{38, 42}. En relación con estos últimos informes, Sher y colaboradores establecieron que se requieren células T CD4+CD25-Foxp3-IL-10+ para prevenir la patología inducida por toxoplasma²⁹. Los datos presentados aquí, junto con estos hallazgos, sugieren un modelo en el que una de las funciones de IL-27 es promover la producción por células T de IL-10 que ayuda a limitar la patología mediada por células T durante la infección. Presumiblemente, esta ruta reguladora no se restringiría a la toxoplasmosis sino que la inflamación intensificada observada en ratones *Il-27ra*^{-/-} en una variedad de entornos infecciosos e inflamatorios^{50, 56} se puede atribuir, al menos en parte, a respuestas de IL-10 defectuosas.

Aunque existen múltiples fuentes celulares de IL-10, existe un número limitado de estudios que han definido los requisitos de linaje específicos para la transcripción de IL-10. En macrófagos, los productos microbianos y los complejos inmunitarios pueden inducir IL-10 y MAPK, NF-KB y Sp1 están implicados en la regulación de la transcripción de este gen⁵⁷⁻⁵¹. En células T, se sabe mucho menos acerca de los episodios moleculares que controlan la síntesis de IL-10 aunque en células T_H2 las proteínas JUN se han relacionado con estos episodios y GATA3 se asocia con la remodelación y la estabilidad del locus de IL-10 requerido para la transcripción de este gen⁶⁰. Puesto que IL-27 antagoniza la expresión de GATA3⁶¹, parece improbable que este factor de transcripción particular explique la capacidad de IL-27 e IL-6 para promover la transcripción de IL-10 bajo condiciones polarizantes T_H1 y T_H17. En cambio, los datos presentados aquí ligan STAT3 predominantemente, así como STAT1 y STAT4, a la inducción de IL-10 mediada por citocina. Esta observación está de acuerdo con la presencia de sitios de unión a STAT en el promotor de IL-10 y un informe previo de que IFN- α puede inducir la incorporación de STAT1 y STAT3 para transactivar un indicador de IL-10⁶².

Es destacado que mientras que IL-6 e IL-27 señalizan ambas a través de gp130, activan STAT1 y STAT3 y pueden promover IL-10, solo la IL-27 puede regular a la baja IL-2 e IL-17 mientras que IL-6 promueve la actividad de T_H17. Estas observaciones son parte de una bibliografía la que ha destacado algunos de los efectos aparentemente contradictorios de moléculas de STAT en la diferenciación y la función de células TH. Desde mediados de los 90, se sabía que STAT4 y STAT6 eran factores de transcripción clave que promovían el desarrollo de T_H1 y T_H2^{63, 64} aunque estudios más recientes han ligado STAT3 a las células T_H17⁶⁵⁻⁶⁷. Se está haciendo ahora evidente que las proteínas STAT median en los efectos de IL-27 en células T. Así, la capacidad de IL-27 para inducir STAT1 puede antagonizar el desarrollo de T_H17 mientras que STAT1 y STAT3 se requieren para que IL-27 induzca IL-10. En contraste, la capacidad de IL-6 para promover la actividad de T_H17 e IL-10 es dependiente de STAT3. Una probable explicación para estos efectos distintos es que aunque los receptores para IL-6 e IL-27 contengan ambos gp130, existen cadenas de IL-6Ra e IL-27Ra únicas. Si esto indica que un heterodímero de STAT1/STAT3 media en los efectos de IL-27 mientras que IL-6 (cuando se combina con TGF) sólo requiere homodímeros de STAT3 sigue por estar formalmente probado. Alternativamente, la diferencia en la magnitud de la fosforilación de STAT3 entre IL-6 e IL-27 sugiere que los altos niveles de STAT3 inducidos activamente por IL-6 pueden ser suficientes para promover IL-10 mientras que IL-27 requiere la combinación de STAT1 y STAT3.

Aunque el enfoque de este trabajo descrito en este ejemplo se ha puesto en la capacidad de IL-6 e IL-27 para promover IL-10, quizás igualmente importante sea la observación de que TGF- β también influye en esta ruta. Basándose, en parte, en la presencia de inflamación medida por células T en los ratones TGF- β ^{-/-}⁶⁸, y la capacidad de TGF- β para inhibir directamente la producción innata y adaptiva de IFN- γ ^{1, 69, 70} se supuso que TGF- β era una citocina antiinflamatoria. Con la comprensión de que TGF- β tiene un papel destacado en el desarrollo de células Treg y T_H17 y ahora la producción de IL-10 por células no Treg, sigue sin estar claro si dirige la diferenciación de células T o es un regulador fundamental compartido de la actividad de células T que es modulado por citocinas (IL-12, IL-6, IL-27) presentes en el ambiente que determina el destino de las células.

Aunque los estudios presentados aquí identifican IL-27 e IL-6 como factores que promueven la producción de IL-10 por células T, una de las mayores cuestiones se refiere a si esta observación indica el desarrollo de distintos subgrupos de células T. Cuando Mossman y Coffman describieron en primer lugar las células T_{H1} y T_{H2} cuestionaron la diversidad total de fenotipos de células T y si existen in vivo otros tipos de células T⁷¹. Sin limitación a ningún mecanismo particular, una posible interpretación de los datos presentados aquí es que los subgrupos de cooperadores T se pueden definir por su capacidad para producir IFN- γ , IL-4 e IL-17 solos o en combinación con IL-10. Hasta la fecha, los intentos iniciales que usaban IL-27 para generar poblaciones estables de células T productoras de IL-10 in vitro han sido insatisfactorios. Aunque existen varios modos de interpretar estos datos preliminares, una posibilidad es que la capacidad para secretar IL-10 no sea una señal de identidad de distintos subgrupos de células T sino en cambio que citocinas como IL-27 e IL-6 representen modificadores para los principales subgrupos de células T que los permiten elaborar IL-10 en el contexto de la inflamación crónica. De nuevo, sin limitación, este puede ser un mecanismo que permite el establecimiento de un subgrupo de cooperadores T apropiado para enfrentarse a diferentes clases de patógenos, pero proporciona a cada uno de estos distintos subgrupos efectores un mecanismo para supervisar sus propias actividades inflamatorias. Independientemente, con la identificación de IL-10 como una potente citocina antiinflamatoria, existen esperanzas de que se pudiera usar para tratar una variedad de afecciones autoinmunitarias. Sin embargo, por razones que no están claras, los exámenes clínicos con IL-10 han sido decepcionantes. Se espera que el uso de citocinas como IL-27 que pueden inhibir funciones efectoras de células T combinado con su capacidad para promover la producción de IL-10 resulten más útiles para el manejo de afecciones inflamatorias.

En el contexto de la presente invención, los experimentos descritos en este ejemplo identifican la inducción de la expresión de IL-10 como otra ruta (además de la acción directa sobre células T) por la que los complejos y las proteínas de fusión descritos anteriormente en la presente pueden suprimir la respuesta inflamatoria. Además, los resultados descritos en este ejemplo indican que la coadministración de factor de crecimiento transformante beta puede potenciar los efectos de los complejos y las proteínas de fusión.

Métodos

Ratones y parásitos

Los ratones C57BL/6, Balb/c, *Stat4*^{-/-} y *Tbx21*^{-/-} se obtuvieron de Jackson laboratories. Los ratones WSX-1^{-/-} (*Il27ra*^{-/-}) fueron proporcionados por el Dr. Christiaan Saris (Amgen Inc.). Los ratones *Stat1*^{-/-} fueron proporcionados por el Dr Phillip Scott (University of Pennsylvania, Filadelfia, PA). Los ratones con un indicador de GFP inactivado totalmente en el sitio de traducción para Foxp3 se han descrito anteriormente⁷², y fueron proporcionados por el Dr. Laurence Turka (University of Pennsylvania). Los ratones fueron alojados y criados en instalaciones libres de patógenos específicas en the Department of Pathobiology at the University of Pennsylvania según las directrices institucionales.

La cepa ME49 de *T. gondii* se preparó a partir de ratones CBA/ca infectados crónicamente y los animales experimentales se infectaron intraperitonealmente con 20 quistes. Los ratones de control *Il27ra*^{-/-} y C57BL/6 silvestres se trataron el día 5 después de la infección con 200 mg/l de sulfadiazina (Sigma) en su agua de bebida durante dos semanas a fin de permitir que los *Il-27ra*^{-/-} avanzaran hasta un estadio de infección crónico. El antígeno toxoplasmático soluble (STAg) se preparó a partir de taquizoitos de la cepa RH según se describe previamente⁷³. Las BMNC procedentes de ratones infectados crónicamente se aislaron según un protocolo publicado^{42, 74}.

Generación de células T productoras de IL-10

Las células T CD4⁺ y CD8⁺ se aislaron de esplenocitos y nódulos linfáticos que estaban agotados de células CD8⁺ y NK1.1⁺ para enriquecer con respecto a células T CD4⁺ o estaban agotados de CD4⁺ y NK1.1⁺ para enriquecer con respecto a células T CD8⁺ mediante separación con cuentas magnéticas (Polysciences). Las células se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Costar) a una densidad de 5 x 10⁶ células/ml. Las células se estimularon con anticuerpo anti-TCR (α -CD3; 1 μ g/ml; eBioscience) y anticuerpo anti-CD28 (1 μ g/ml; eBioscience). Para la producción de IL-10, los cultivos de células T se complementaron bien con IL-27 de ratón recombinante (100 ng/ml; Amgen) o bien con TGF- β humano (1 ng/ml; R & D) solos o en combinación con IL-27. Adicionalmente IFN- γ e IL-4 se neutralizaron en los cultivos no polarizados usando anti-IFN- γ (10 μ g/ml; clon XMG1.2) y anti-IL-4 (10 μ g/ml; clon 11B11). En algunos casos, las células T se cultivaron bajo condiciones T_{H1} (10 ng/ml de IL-12 recombinante; eBioscience más 10 μ g/ml de α -IL-4), T_{H2} (8 ng/ml de IL-4 recombinante; eBioscience más 10 μ g/ml de α -IFN- γ) o T_{H17} (1 ng/ml de TGF- β ; R & D, 10 ng/ml de IL-6; eBioscience, más 10 μ g/ml de α -IFN- γ y α -IL-4). Las células T CD8⁺ se recogieron el día 3, mientras que las células T CD4⁺ se complementaron con medio y reactivos recientes el día 3 y se recogieron el día 4. A continuación, las células T se reestimularon con PMA e ionomicina más brefeldina A (Sigma). El análisis de citometría de flujo se realizó en un instrumento FACSCaliber (BD Biosciences) o BDFACS Cantoll (BD Biosciences) y se analizó usando el software FlowJo (Tree Star Inc.). Todos los anticuerpos se adquirieron de BD Pharmingen o eBioscience. Para la tinción intracelular de GFP, las células se tiñeron en primer

lugar con un anticuerpo de ratón anti-GFP (eBioscience) seguido por una segunda tinción con un anticuerpo de conejo anti-FITC de ratón (Jackson Immunoresearch).

Tinción intracelular con respecto a P-STAT1 y P-STAT3

5 Las células T CD4+ se purificaron de ratones C57BL/6 usando un estuche de aislamiento de CD4+ (Milltenyi). Se incubaron 1×10^6 células T CD4+ purificadas con IL-6 o IL-27 durante 5, 30, 60 o 180 minutos. A continuación, las células se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído al 2% a 37°C. Después de la fijación, las células se impermeabilizaron a continuación con metanol al 90% durante 30 minutos sobre hielo seguido por tinción con respecto a CD4, P-STAT1 y P-STAT3. Los anticuerpos contra residuos de tirosina fosforilados de STAT1 y STAT3 se adquirieron de BD Pharmingen.

10 Estadística

Se usó una prueba de la t de Student apareada para determinar diferencias significativas y un valor de $P < 0,05$ se consideraba significativo.

Referencias para el Ejemplo 3

- 15 1. Fiorentino, D. F., Bond, M. W. & Mosmann, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170, 2081-95 (1989).
2. Moore, K. W. y cols. Homology of Cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248, 1230-4 (1990).
- 20 3. de Waal Malefyt, R. y cols. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174, 915-24 (1991).
4. Ding, L. & Shevach, E. M. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 148, 3133-9 (1992).
- 25 5. Hsu, D. H., Moore, K. W. & Spits, H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol* 4,563-9 (1992).
6. Bogdan, C., Vodovotz, Y. & Nathan, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174, 1549-55 (1991).
7. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. & de Vries, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174, 1209-20 (1991).
- 30 8. Ding, L., Linsley, P. S., Huang, L. Y., Germain, R. N. & Shevach, E. M. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 151, 1224-34 (1993).
9. Murphy, E. E. y cols. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J Exp Med* 180, 223-31 (1994).
- 35 10. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-74 (1993).
11. Yen, D. y cols. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 116, 1310-6 (2006).
- 40 12. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765 (2001).
13. Grunig, G. y cols. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med* 185, 1089-99 (1997).

14. Gazzinelli, R. T. y cols. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 157, 798-805 (1996).
- 5 15. Neyer, L. E. y cols. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 65, 1675-82 (1997).
16. Hunter, C. A. y cols. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 158, 3311-6 (1997).
17. Groux, H. y cols. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-42 (1997).
- 10 18. Suffia, I. J., Reckling, S. K., Piccirillo, C. A., Goldszmid, R. S. & Belkaid, Y. Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med* 203, 777-88 (2006).
19. Zhang, X. y cols. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16, 249-56 (2004).
- 15 20. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192, 1213-22 (2000).
21. Vieira, P. L. y cols. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172, 5986-93 (2004).
- 20 22. Del Prete, G. y cols. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150, 353-60 (1993).
23. Gerosa, F. y cols. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med* 183, 2559-69 (1996).
24. O'Garra, A. & Vieira, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7, 425-8 (2007).
- 25 25. Trinchieri, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med* 204, 239-43 (2007).
26. Gerosa, F. y cols. CD4(+) T cell clones producing both interferon-gamma and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clin Immunol* 92, 224-34 (1999).
- 30 27. Pohl-Koppe, A., Balashov, K. E., Steere, A. C., Logigian, E. L. & Hafler, D. A. Identification of a T cell subset capable of both IFN-gamma and IL-10 secretion in patients with chronic *Borrelia burgdorferi* infection. *J Immunol* 160, 1804-10 (1998).
28. Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J. & Sacks, D. CD4+CD25-Foxp3- Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 204, 285-97 (2007).
- 35 29. Jankovic, D. y cols. Conventional T-bet+Foxp3- Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 204, 273-83 (2007).
30. Pflanz, S. y cols. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16, 779-90 (2002).
31. Chen, Q. y cols. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407, 916-920 (2000).
- 40 32. Yoshida, H. y cols. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L.* major infection. *Immunity* 15, 569-78 (2001).

33. Villarino, A. y cols. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 19, 645-55 (2003).
34. Hamano, S. y cols. WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 19, 657-67 (2003).
- 5 35. Artis, D. y cols. Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following *Leishmania major* infection. *J Immunol* 172, 4672-5 (2004).
36. Yamanaka, A. y cols. Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 172, 3590-6 (2004).
- 10 37. Holscher, C. y cols. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol* 174, 3534-44 (2005).
38. Stumhofer, J. S. y cols. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 7, 937-45 (2006).
- 15 39. Batten, M. y cols. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 7, 929-36 (2006).
40. Amadi-Obi, A. y cols. T(H)17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* (2007).
41. Wille, U., Villegas, E. N., Striepen, B., Roos, D. S. & Hunter, C. A. Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 23, 291-6 (2001).
- 20 42. Wilson, E. H., Wille-Reece, U., Dzierszynski, F. & Hunter, C. A. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol* 165, 63-74 (2005).
43. Villarino, A. V. y cols. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol* 176, 237-47 (2006).
44. Bird, J. J. y cols. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9, 229-37 (1998).
- 25 45. Villarino, A. V. y cols. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J Immunol* 174, 7684-91 (2005).
46. Chen, W. y cols. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-86 (2003).
47. Rich, S., Seelig, M., Lee, H. M. & Lin, J. Transforming growth factor beta 1 costimulated growth and regulatory function of staphylococcal enterotoxin B-responsive CD8⁺ T cells. *J Immunol* 155, 609-18 (1995).
- 30 48. Fontenot, J. D. y cols. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329-41 (2005).
49. Villarino, A. V. & Hunter, C. A. Biology of recently discovered cytokines: discerning the pro- and anti-inflammatory properties of interleukin-27. *Arthritis Res Ther* 6, 225-33 (2004).
- 35 50. Hunter, C. A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 5, 521-31 (2005).
51. Lutticken, C. y cols. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263, 89-92 (1994).
52. Zhong, Z., Wen, Z. & Darnell, J. E., Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95-8 (1994).

53. Villarino, A. V., Huang, E. & Hunter, C. A. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol* 173, 715-20 (2004).
54. Chiarle, R. y cols. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med* 11, 623-9 (2005).
- 5 55. Barrat, F. J. y cols. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195, 603-16 (2002).
56. Kastelein, R. A., Hunter, C. A. & Cua, D. J. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25, 221-42 (2007).
- 10 57. Brightbill, H. D., Plevy, S. E., Modlin, R. L. & Smale, S. T. A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J Immunol* 164, 1940-51 (2000).
58. Liu, Y. W., Chen, C. C., Tseng, H. P. & Chang, W. C. Lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of interleukin-10 is mediated by MAPK- and NF-kappaB-induced CCAAT/enhancer-binding protein delta in mouse macrophages. *Cell Signal* 18, 1492-500 (2006).
- 15 59. Lucas, M., Zhang, X., Prasanna, V. & Mosser, D. M. ERK activation following macrophage FcgammaR ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *J Immunol* 175, 469-77 (2005).
60. Shoemaker, J., Saraiva, M. & O'Garra, A. GATA-3 directly remodels the IL-10 locus independently of IL-4 in CD4+ T cells. *J Immunol* 176, 3470-9 (2006).
61. Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J. & de Sauvage, F. J. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15047-52 (2003).
- 20 62. Ziegler-Heitbrock, L. y cols. IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. *J Immunol* 171, 285-90 (2003).
63. Hou, J. y cols. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265, 1701-6 (1994).
64. Jacobson, N. G. y cols. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med* 181, 1755-62 (1995).
- 25 65. Chen, Z. y cols. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8137-42 (2006).
66. Cho, M. L. y cols. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol* 176, 5652-61 (2006).
- 30 67. Mathur, A. N. y cols. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol* 178, 4901-7 (2007).
68. Shull, M. M. y cols. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-9 (1992).
- 35 69. Espevik, T. y cols. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. *J Exp Med* 166, 571-6 (1987).
70. Silva, J. S., Twardzik, D. R. & Reed, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med* 174, 539-45 (1991).
71. Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-73 (1989).

72. Bettelli, E. y cols. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-8 (2006).
73. Sharma, S. D., Mullenax, J., Araujo, F. G., Erlich, H. A. & Remington, J. S. Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J. Immunol.* 131, 977-983 (1983).
- 5 74. Villegas, E. N. y cols. Blockade of costimulation prevents infection-induced immunopathology in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* 68, 2837-2844 (2000).

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el uso en el tratamiento de una afección inflamatoria que comprende: un complejo de WSX-1 soluble/IL-27 aislado o recombinante,
- 5 en donde la afección inflamatoria se selecciona de:

un trastorno inmunitario, una infección, cáncer, una alergia, artritis, asma, enteropatía inflamatoria, enfermedad de Crohn, uveítis, psoriasis, lupus, esclerosis múltiple, una enfermedad infecciosa crónica, tuberculosis, espondilitis anquilosante, rechazo de trasplantes, sarcoidosis and hepatitis.
- 10 2. La composición para el uso según la reivindicación 1, en donde la composición comprende además una o más células T, una o más células B, mastocitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células que expresan gp130 o células que expresan WSX-1.
3. La composición para el uso según la reivindicación 2, en donde la célula T presenta una expresión alterada de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, IL-4, IL-13, IL-17, IL-25, IL-10, IL-5 o CD25, proliferación alterada o supervivencia alterada.
- 15 4. La composición para el uso según la reivindicación 1, en donde la composición comprende factor de crecimiento transformante beta.

Fig.1A

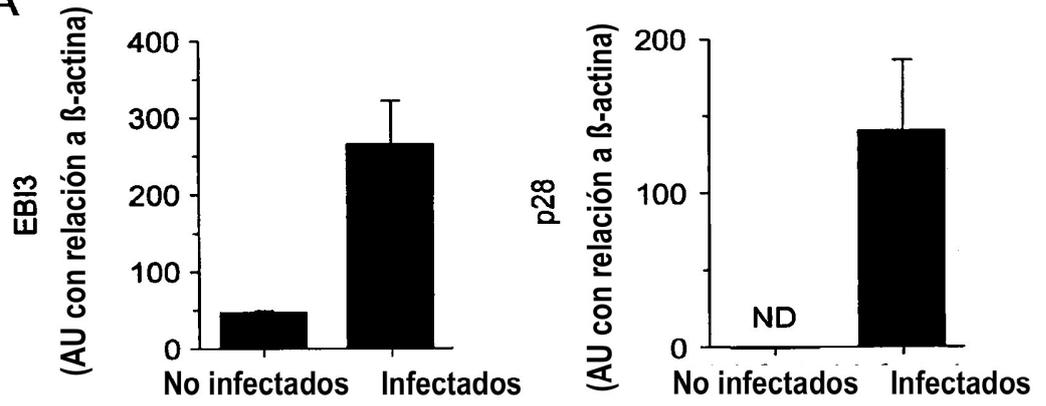


Fig.1B

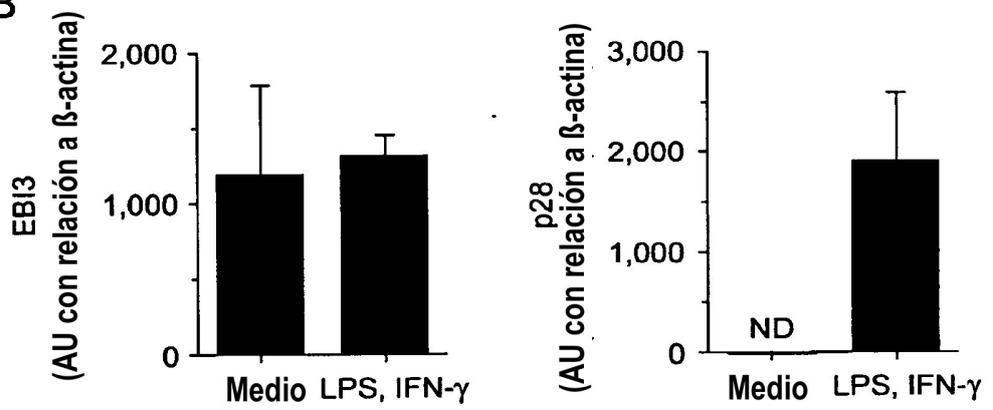


Fig. 2A

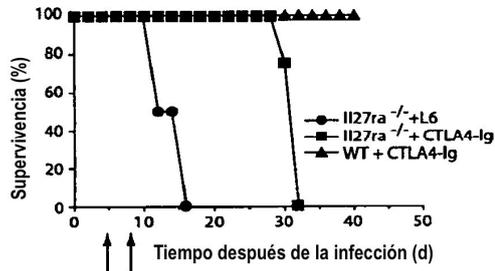


Fig. 2B

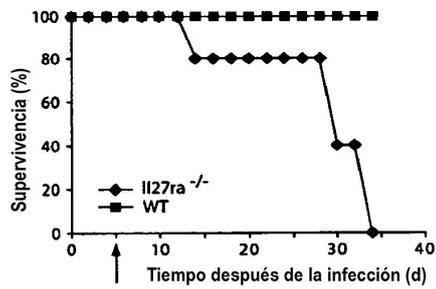


Fig. 2C

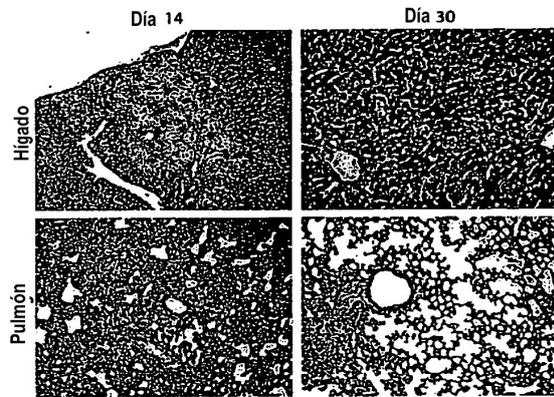


Fig. 2D

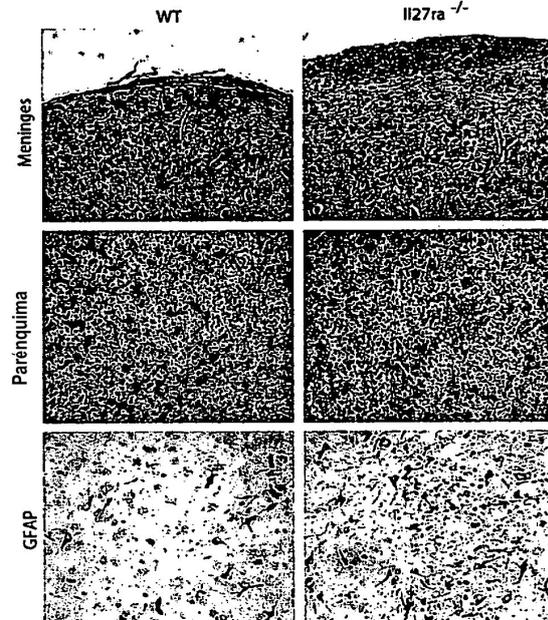


Fig. 2E

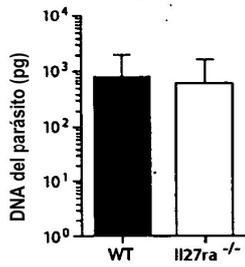


Fig. 2F

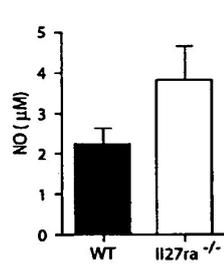


Fig. 2G

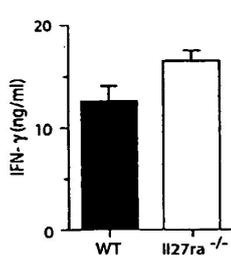
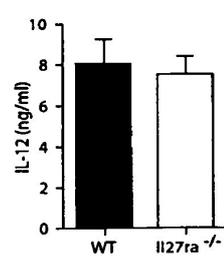
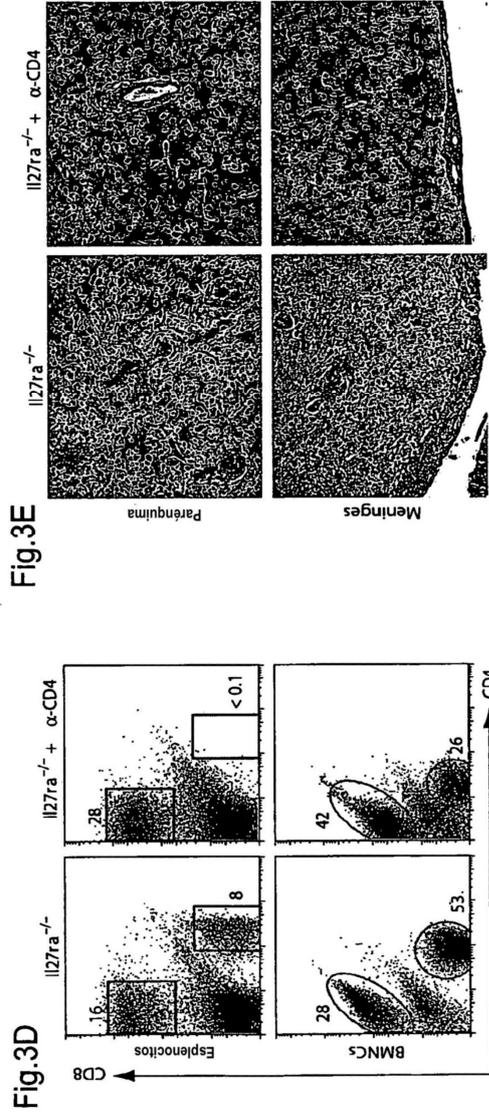
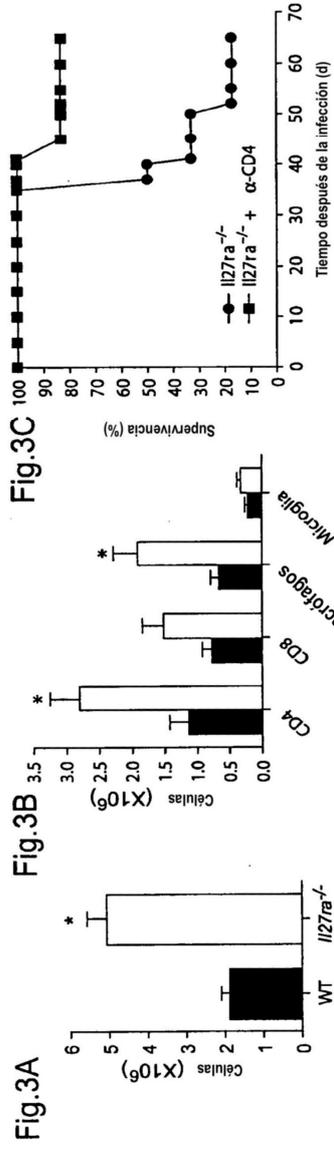
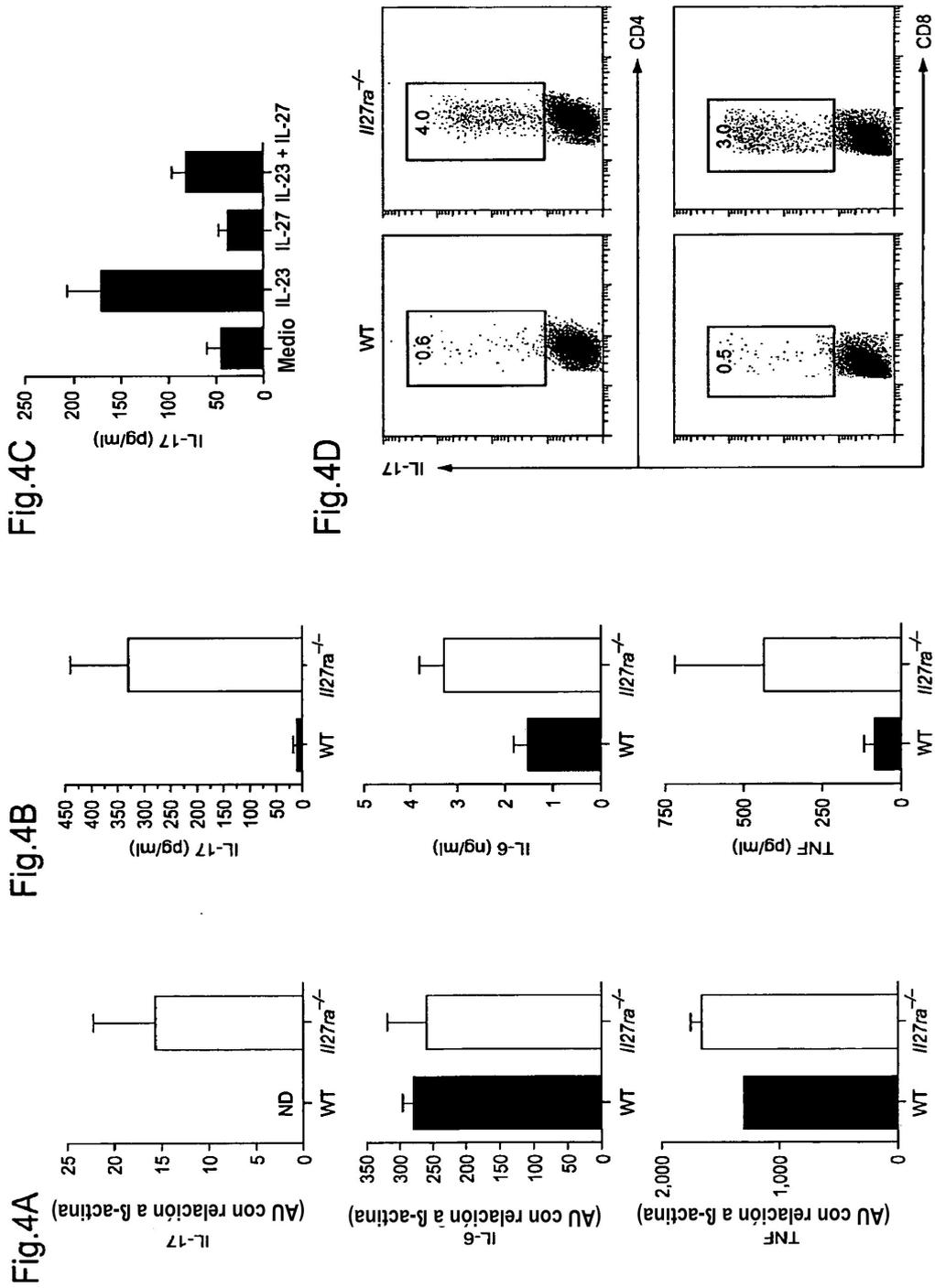


Fig. 2H







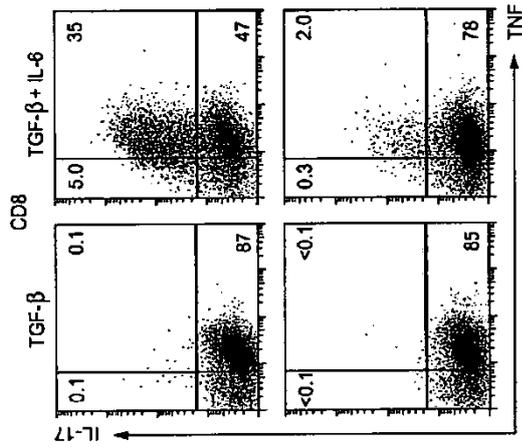


Fig.5B

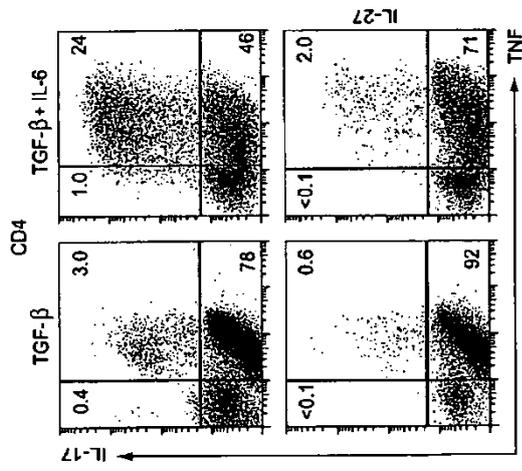


Fig.5A

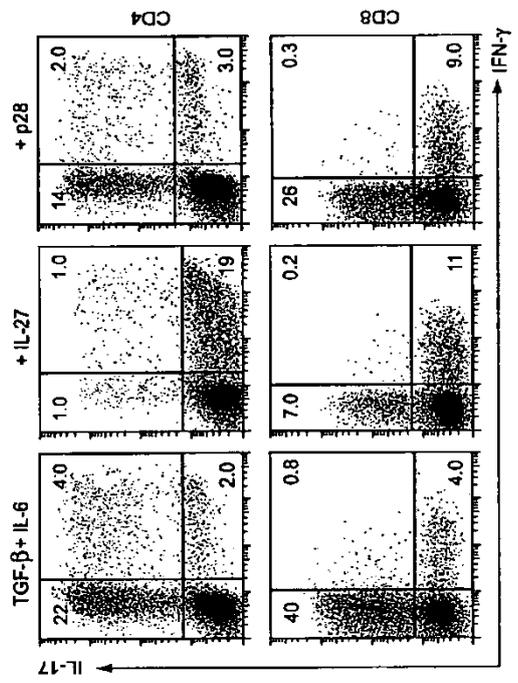


Fig.5C

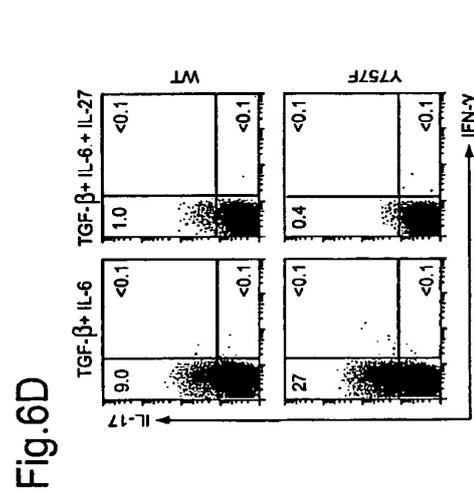
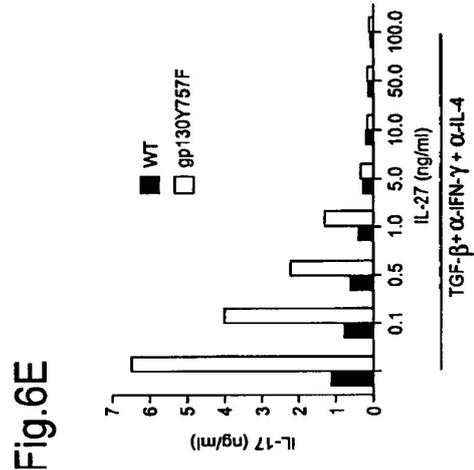
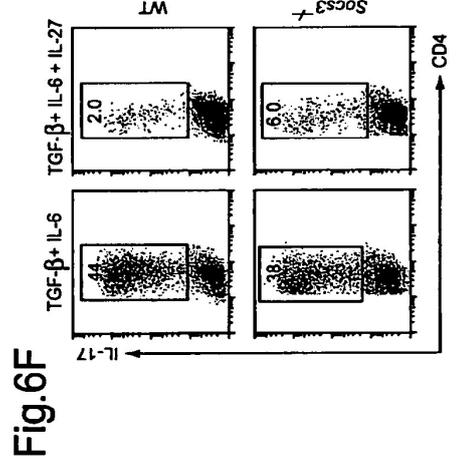
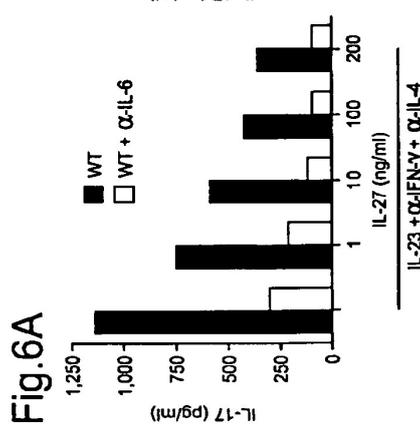
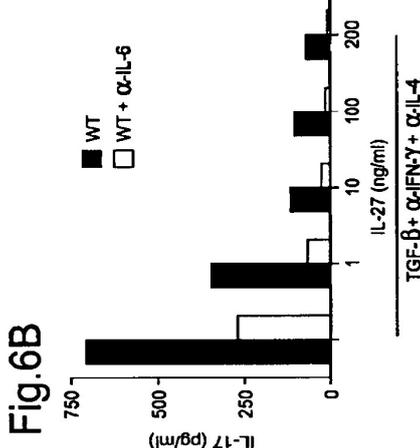
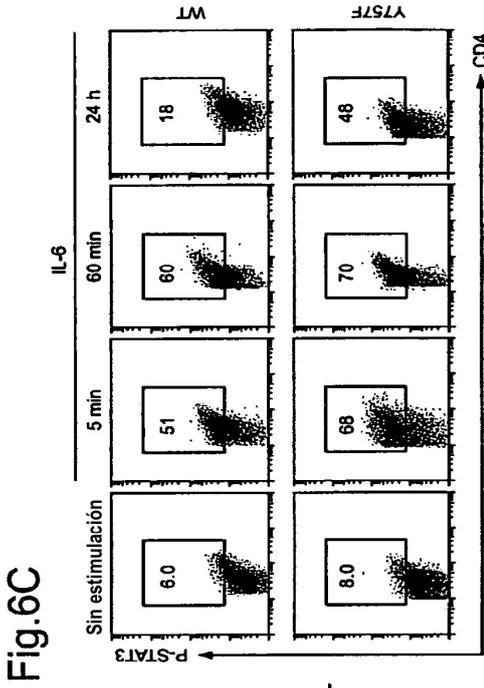


Fig.7B

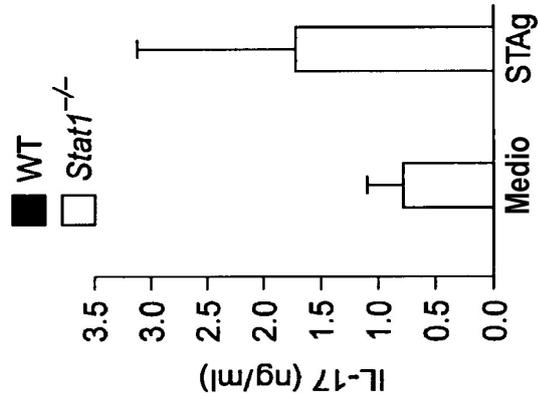
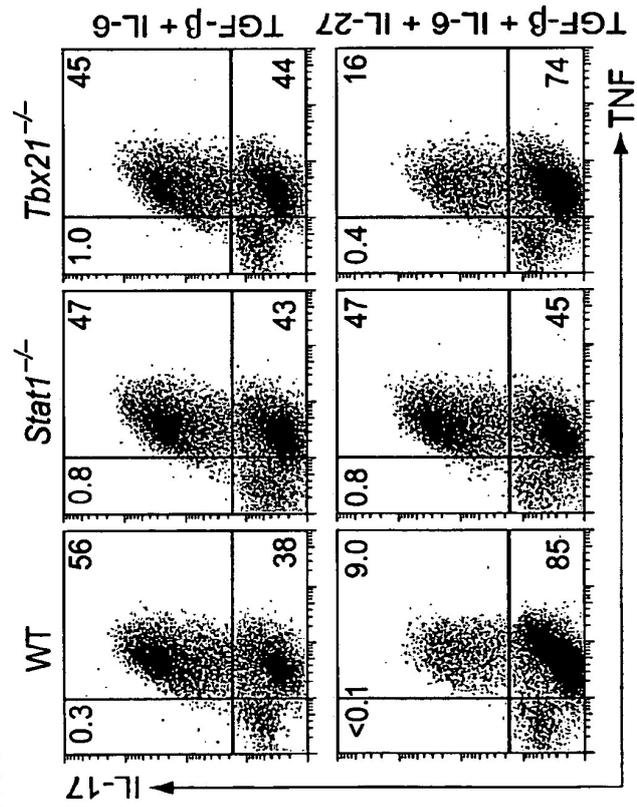


Fig.7A



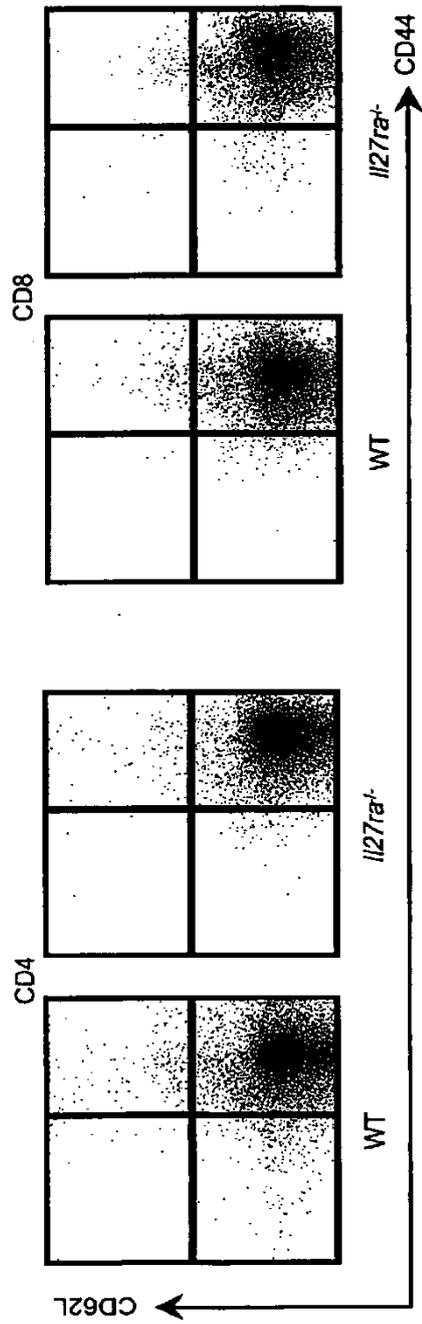


Fig. 8

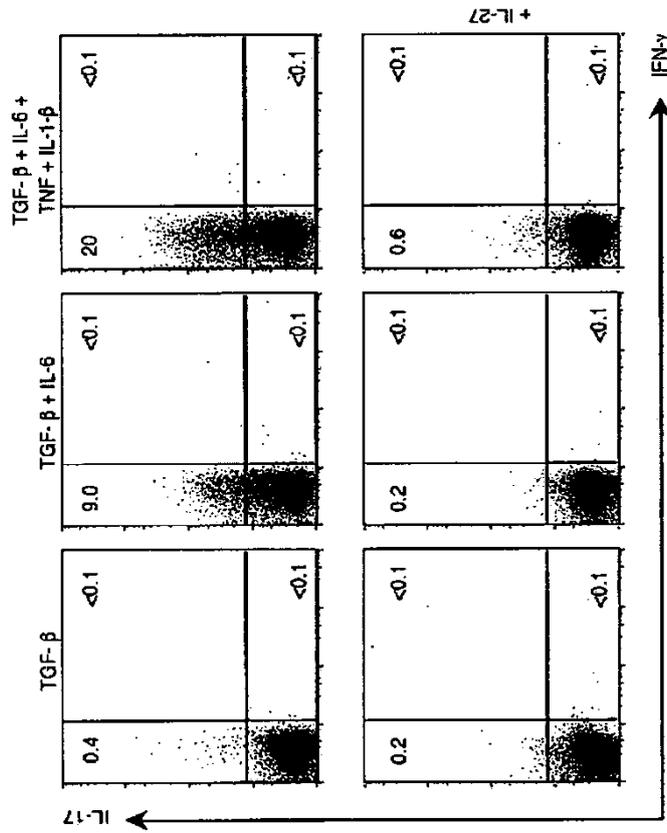


Fig. 9

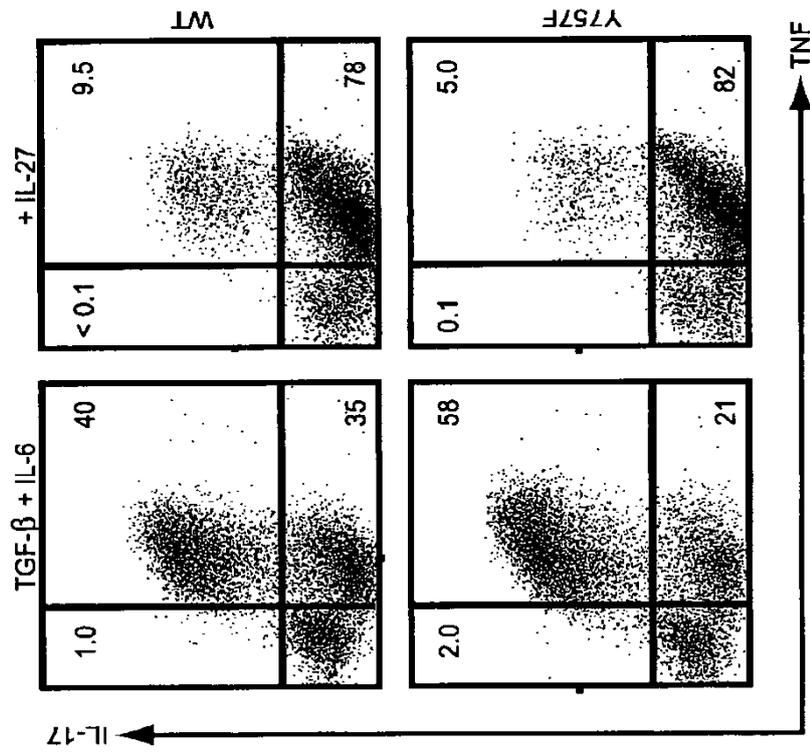


Fig. 10

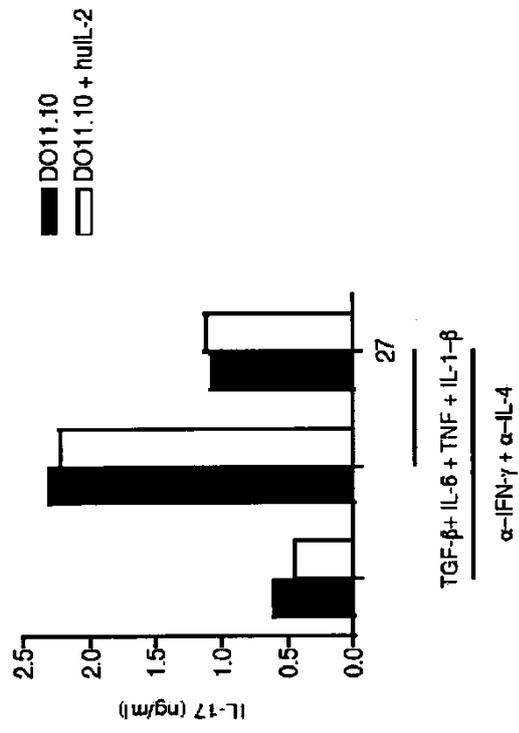


Fig. 11

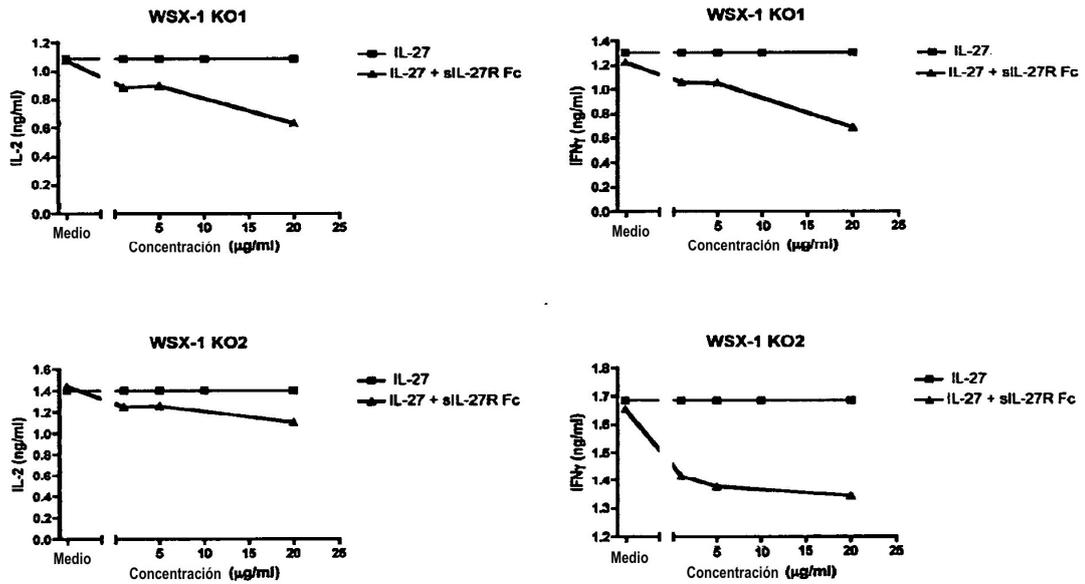


Fig.12

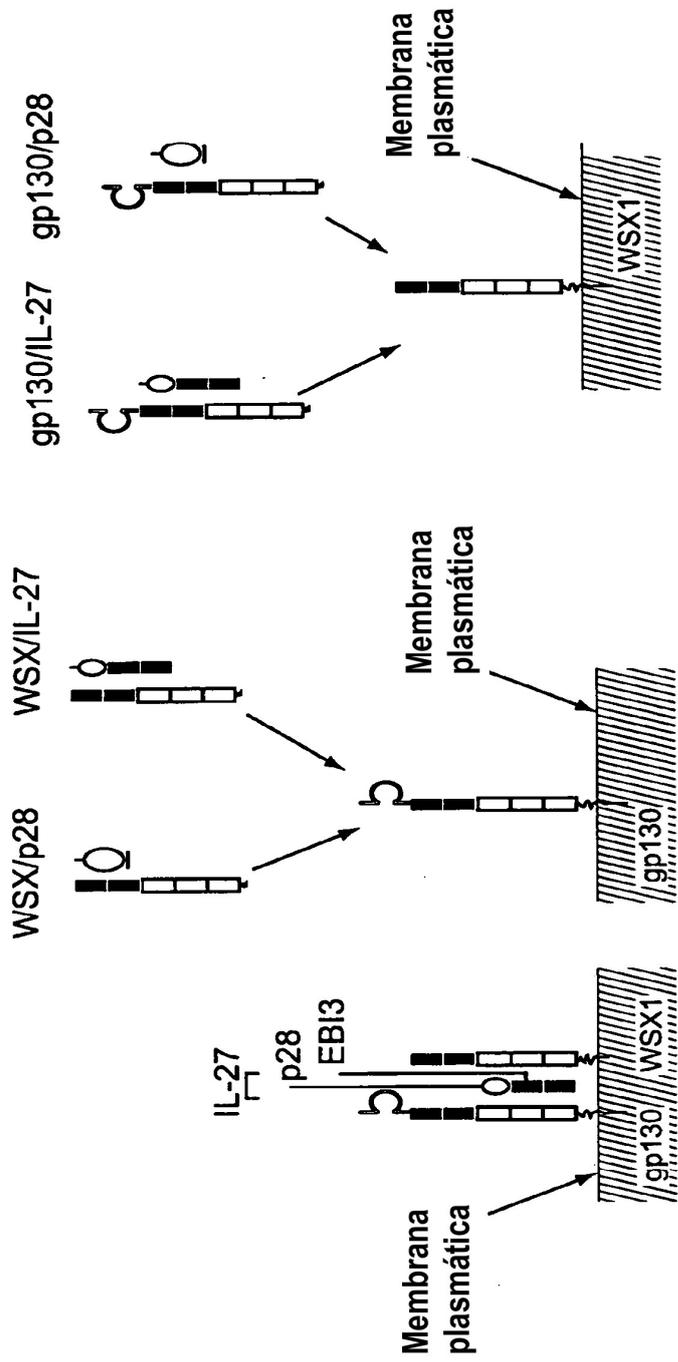
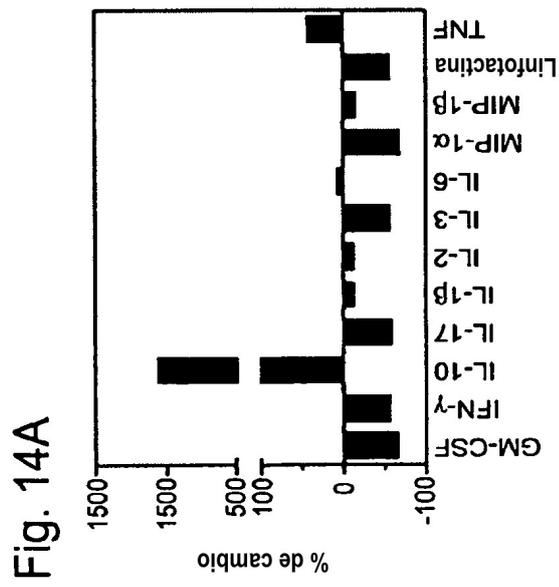
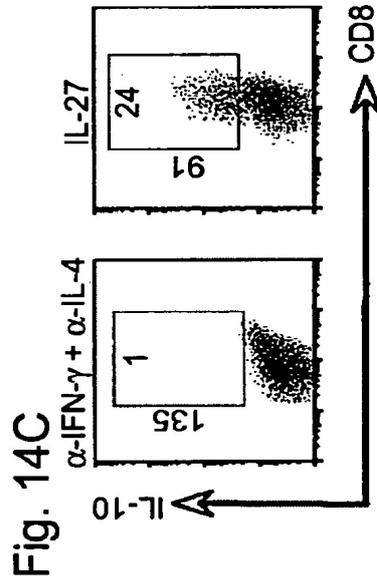
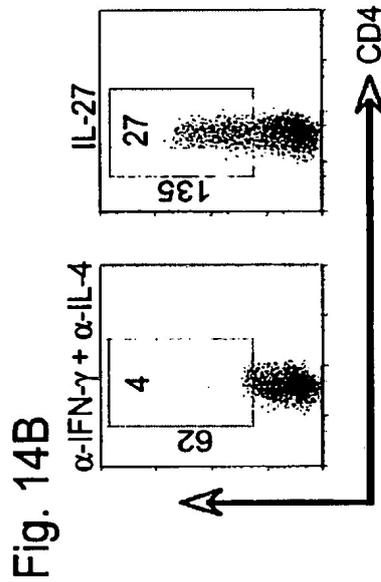
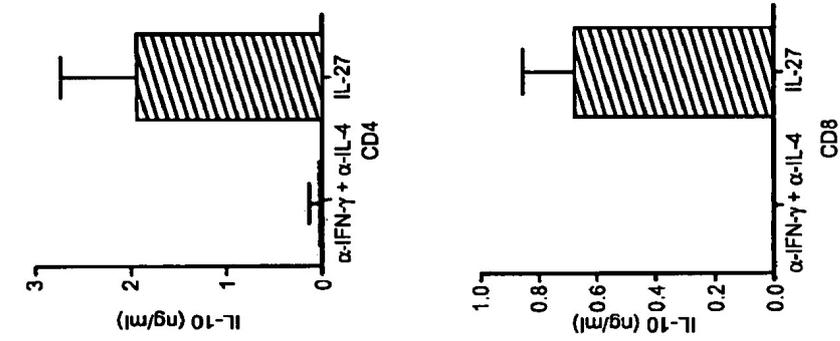


Fig. 13C

Fig. 13B

Fig. 13A



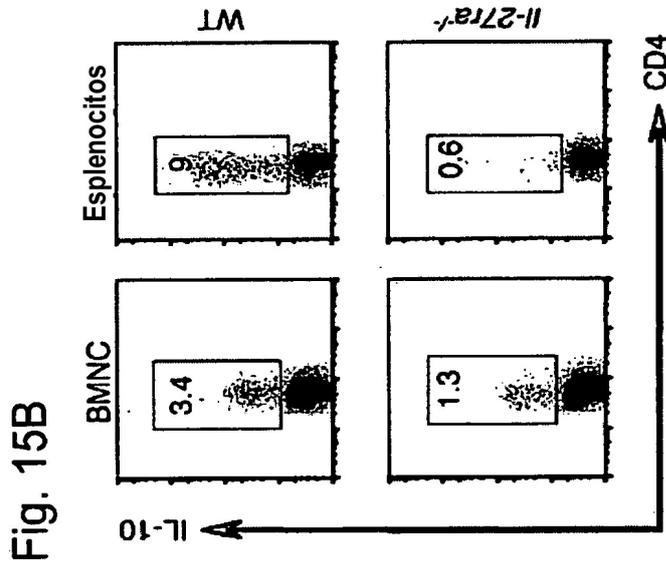


Fig. 15B

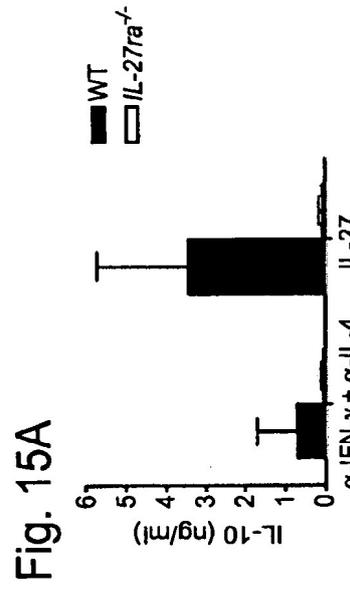


Fig. 15A

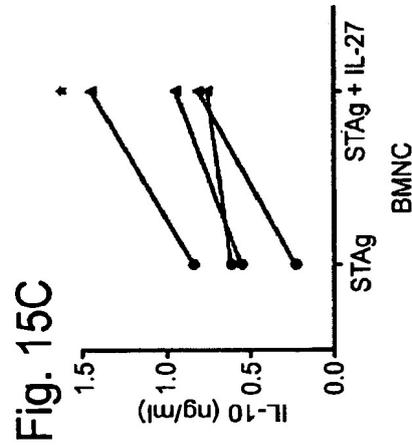


Fig. 15C

Fig. 16A

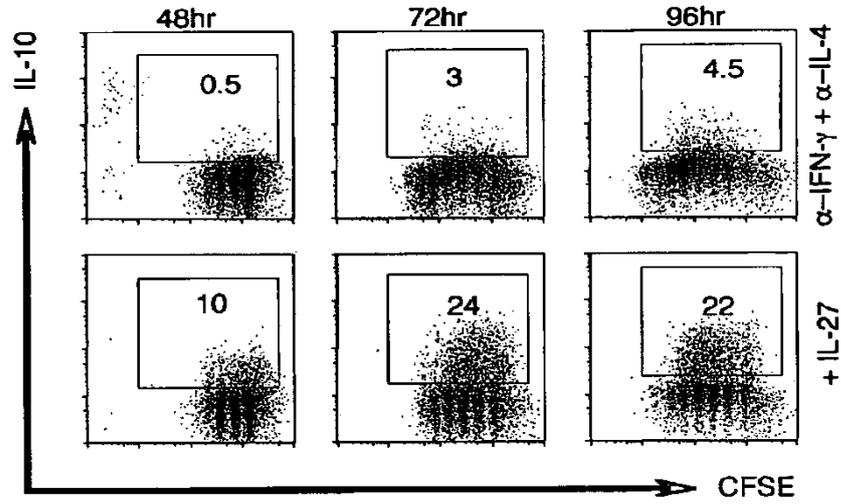
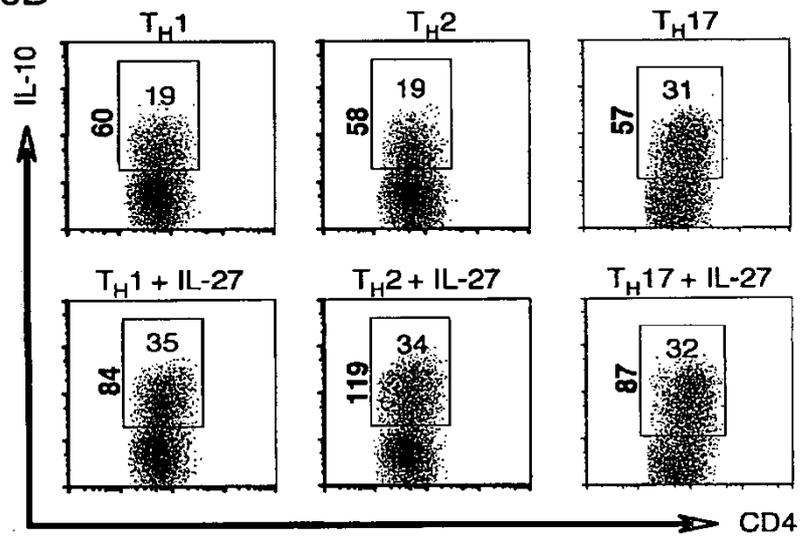


Fig. 16B



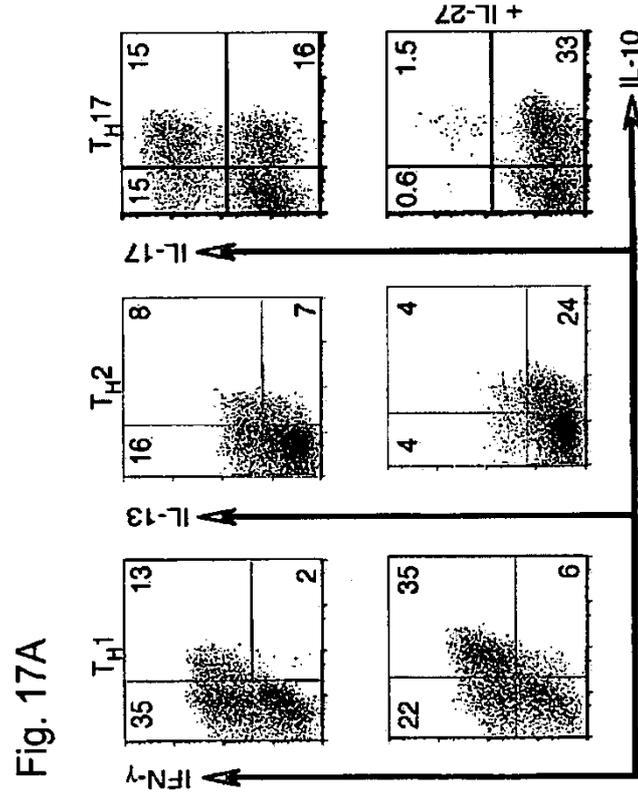
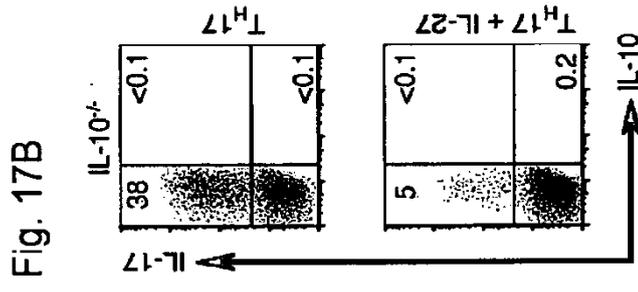


Fig. 18A

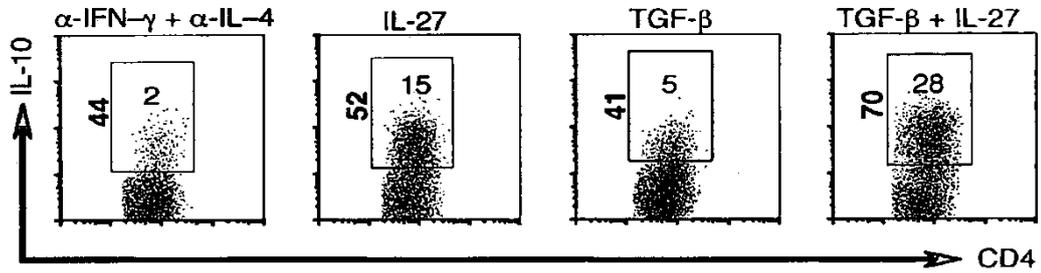


Fig. 18B

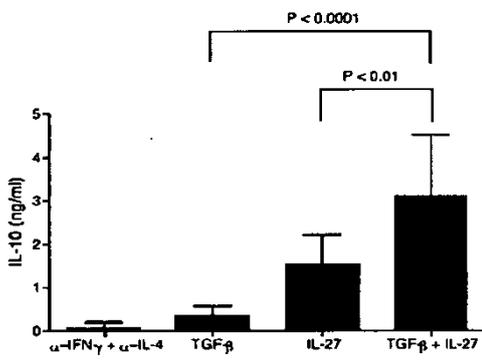


Fig. 18C

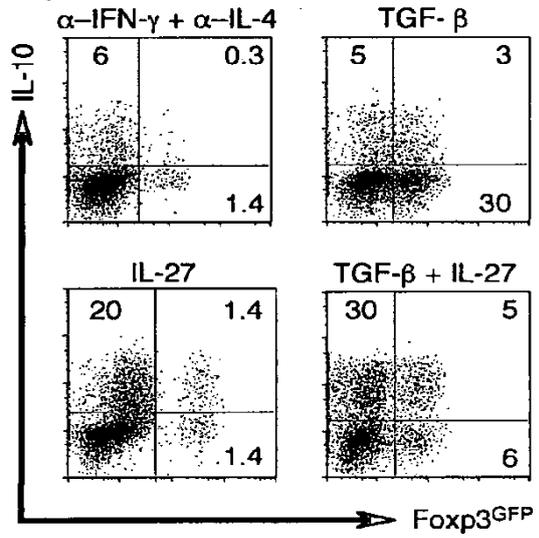


Fig. 19A

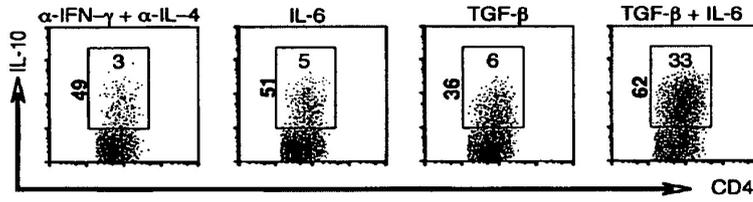


Fig. 19B

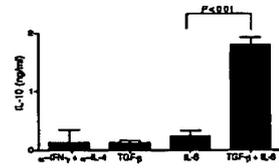


Fig. 19C

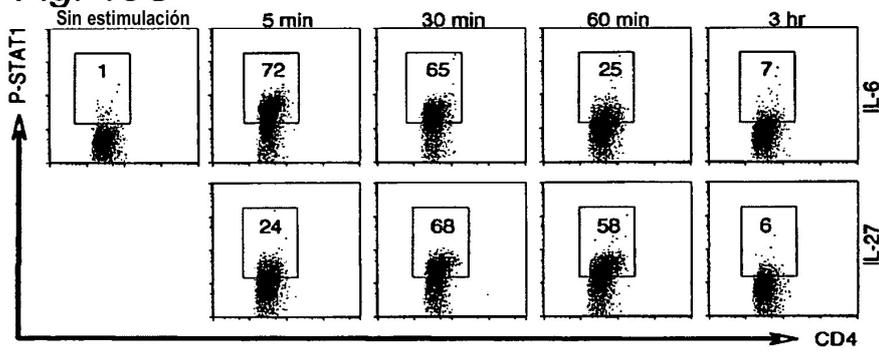


Fig. 19D

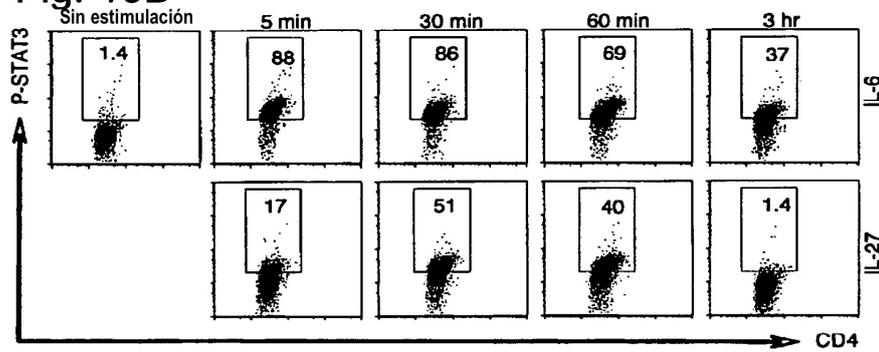


Fig. 20A

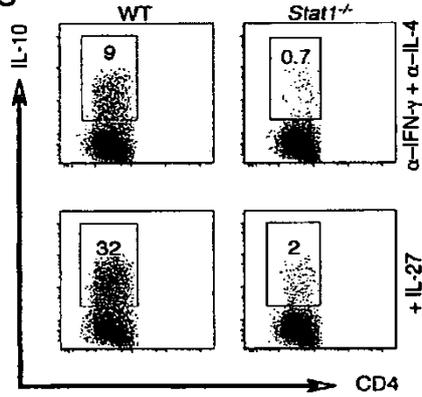


Fig. 20B

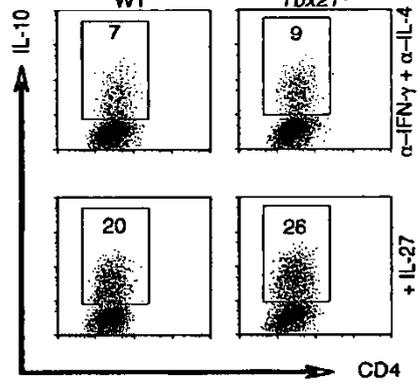


Fig. 20C

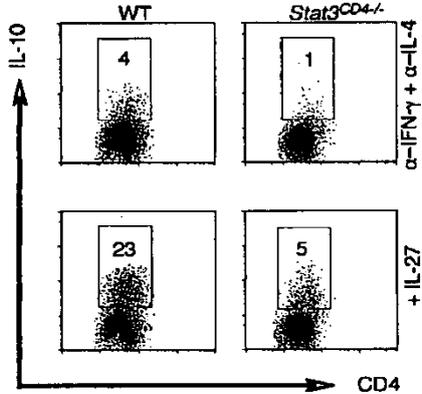


Fig. 20D

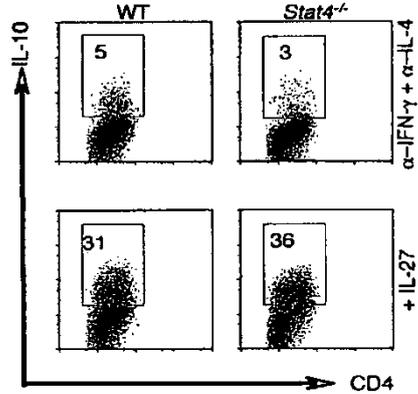


Fig. 20E

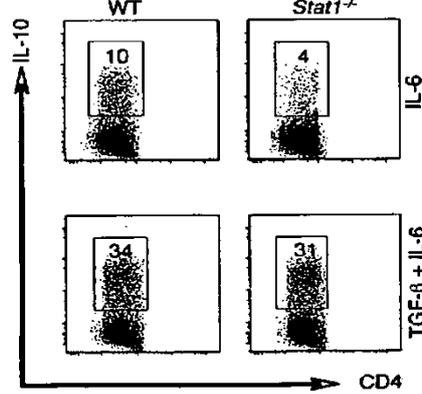
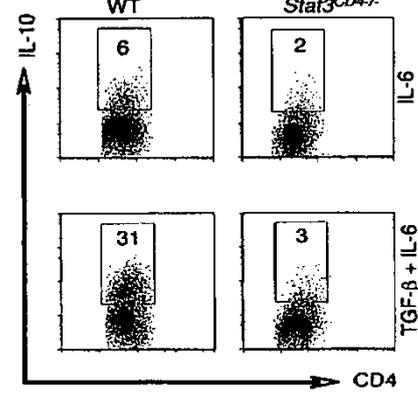


Fig. 20F



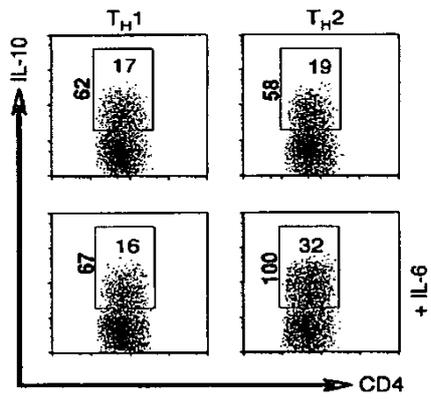


Fig. 21

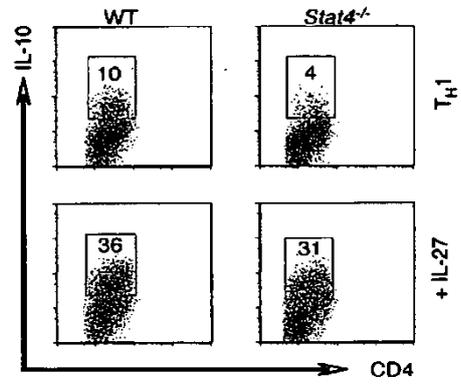


Fig. 22