

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 026**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2005 E 10183329 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2289534**

54 Título: **Anticuerpos de NKG2D para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide o enfermedad de Crohn**

30 Prioridad:

05.04.2004 US 559919 P

01.06.2004 US 576242 P

07.03.2005 US 659678 P

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

01.12.2017

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**LANIER, LEWIS L.;
OGASAWARA, KOETSU y
BLUESTONE, JEFFREY A.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 645 026 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).

Anticuerpos de NKG2D para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide o enfermedad de Crohn

Descripción

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones para uso en el tratamiento y / o prevención de síndromes inflamatorios, en particular mediante alteración de la expansión y función de las células T autorreactivas, y cualesquiera características de la invención adicionales relacionadas con la misma. Además, la presente invención proporciona composiciones para uso en el rechazo de injertos mediada por las células NK.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

NKG2D es un receptor de activación que se expresa en seres humanos y ratones en células NK y ciertos tipos de células T. NKG2D reconoce la proteína de unión a UL16 (ULBP1), ULBP2, ULBP3, ULBP4, y moléculas relacionadas con la cadena de MHC clase I (MICA y MICB) en seres humanos, y antígeno 60 de histocompatibilidad secundaria (H60), transcripción inducible temprana de ácido retinoico (RAE1), y transcripción de tipo ULBP de tipo murino 1 (MULT-1) en ratones. Homodímeros NKG2D asociados a la molécula adaptadora DAP10, que contiene el motivo de unión a p85 fosfatidil inositol-3-quinasa de consenso (PI3-K) Tyr-Ile-Asn-Met (YINM, establecido como la SEC ID N°: 9). NKG2D y DAP10 interactúan de manera temprana en su ruta biosintética y esta interacción se requiere para el transporte de NKG2D a la superficie de las células.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un agente que es específico para NKG2D y es capaz de debilitar la expansión de células NKG2D+T o células NK sin empobrecer dichas células, para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide o enfermedad de Crohn, en el que el agente es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Se divulgan métodos y composiciones para uso en el tratamiento o prevención de un síndrome asociado a activación mediada por NKG2D.

En un aspecto, los métodos se llevan a cabo poniendo en contacto los leucocitos que expresan NKG2D con un agente que reduce la activación de NKG2D inducida por ligando de las células en condiciones adecuadas para tratar o prevenir el síndrome. En algunas realizaciones, el contacto da como resultado una reducción de al menos aproximadamente el 30% en una activación de NKG2D inducida por ligando; en otras realizaciones, la reducción es al menos aproximadamente el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% con relación a un control.

El agente puede, sin limitación, reducir la interacción de NKG2D con DAP10; reducir la cantidad de NKG2D sobre la superficie de las células; incrementar la velocidad a la que NKG2D de superficie se internaliza; reducir la señalización a través del complejo de NKG2D-ligando de NKG2D; y / o reducir la transcripción o traducción de los ácidos nucleicos que codifican NKG2D. En algunas realizaciones, el agente potencia la internalización de los polipéptidos de NKG2D de superficie en condiciones (tales como, por ejemplo, los presentes en los síndromes inflamatorios crónicos) en los que uno o más de MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, o ULBP4 no pueden disminuir la cantidad de NKG2D de superficie celular hasta el grado que sería necesario (en el caso de un agente terapéutico) proporcionar un beneficio terapéutico.

El agente usado en las composiciones para su uso de acuerdo con la invención, comprende un anticuerpo que se une a NKG2D, y el fragmento de unión a NKG2D del mismo o un ARNi codificado por una secuencia de ADN que comprende la SEC ID N°:10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico.

En la puesta en práctica de la invención, los leucocitos diana pueden ser uno o más de un NKG2D+ CD8 + célula T, un NKG2D+ CD4 + Célula T, un NKG2D + $\gamma\delta$ Célula T; y un NKG2D + Célula NK; o las células T diana pueden comprender células de macrófagos.

En un aspecto, la invención puede usarse en un mamífero como un paciente humano. Al paciente humano se le puede haber diagnosticado que tiene o está en un riesgo sustancial de desarrollar un síndrome inflamatorio. En un aspecto particular, se trata una afección diagnosticada en un paciente humano. La invención proporciona composiciones para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide o enfermedad de Crohn.

En otro aspecto particular, la invención se refiere al uso de un agente seleccionado de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que es específico para NKG2D y es capaz de alterar la expansión de NKG2D+ células T o células NK sin empobrecimiento de tales células para la preparación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide.

65

En todavía otro aspecto ejemplar, la invención se refiere al uso de un agente seleccionado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es específico para NKG2D y es capaz de alterar la expansión de NKG2D + células T o células NK sin empobrecimiento de tales células para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino seleccionada de enfermedad de Crohn.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una ilustración gráfica de la expresión de RAE-1 sobre células pancreáticas en ratones NOD pre-diabéticos. La Figura 1 (a) muestra ARNm de RAE-1 medido mediante la RT-PCR cuantitativa en tejido pancreático de ratones NOD y BALB/c de 12 - 16 semanas de edad. La Figura 1(b) muestra ARNm de RAE-1 medido mediante la RT-PCR cuantitativa en tejido pancreático de ratones NOD y NOD.scid de 4 - 6 semanas y 12 - 16 semanas de edad. La Figura 1(c) muestra ARNm de RAE-1 medido mediante la RT-PCR cuantitativa en diferentes tejidos de ratones NOD pre-diabéticos. Los datos representativos se muestran y se expresan como veces de inducción de la transcripción de RAE-1. Las veces de inducción se calcularon de acuerdo con la fórmula: $\text{Veces de inducción} = \frac{\text{cantidad de la transcripción de RAE-1 en el órgano de NOD pre-diabético}}{\text{normalizado hasta HPRT}} \div \frac{\text{cantidad de transcripción de RAE-1 en el órgano de NOD joven normalizado para HPRT}}$. La Figura 1(d) muestra la expresión de RAE-1 sobre células pancreáticas CD45-NOD analizada sobre citometría de flujo usando anti-CD45 y anti-RAE-1 mAb. La Figura 1(e) muestra la expresión de RAE-1 sobre células de islotes de CD45 aisladas de páncreas (panel superior) y ganglios linfáticos pancreáticos de drenaje (PLN) (panel inferior) en ratones NOD teñidos con anti- CD45 y anti-RAE-1 mAb.

La Figura 2 (a) es una ilustración gráfica de la expresión de NKG2D sobre células T CD8 + T. Se aislaron leucocitos de bazo, hígado, ganglios linfáticos pancreáticos (PLN) y páncreas de ratones NOD de 10 y 25 semanas de edad y se tiñeron mediante procedimientos convencionales usando anticuerpos monoclonales contra CD8 y NKG2D. Se muestran los porcentajes indicados de células T NKG2D + CD8+ (expresados como el porcentaje total de células CD8 +). La Figura 2 (b) es una ilustración gráfica de la expresión de CD44 y Ly-6C sobre células pancreáticas y T PLN NKG2D + CD8 +. Se tiñeron las células con anticuerpos monoclonales contra CD8, NKG2D, y CD44 o Ly6C y se muestran los resultados para las células T CD8 + activadas. La Figura 2 (c) es una ilustración gráfica de la expresión de NKG2D y CD44 sobre células pancreáticas T CD8 + PLN NRP-V7/H-2K^d tetrámero-positivo. Se tiñeron las células con NRP-V7/H-2K^d tetrámero y con anticuerpos monoclonales contra CD8 y CD44 o NKG2D. Se muestran los porcentajes indicados de células T CD8+ NRP-V7/H-2K^d tetrámero-positivo (activadas sobre T CD8+).

La Figura 2(d) muestra micrografías de células T CD8⁺ + NKG2D⁺ acumuladas cerca de los islotes. Se tiñeron secciones congeladas secuenciales de páncreas aisladas de ratones NOD pre-diabéticos de 16 semanas de edad con anti-CD8, anti-C068 (marcador de macrófagos), anti-NKG2D y anticuerpos anti-insulina. Izquierda: imagen diferencial de contraste de fase, Centro: CD8 (rojo), NKG2D (verde), e insulina (azul); Derecha: C068 (rojo), NKG2D (verde), e insulina (azul). Células T CD8⁺ NKG2D⁺ doble-positivas y macrófagos C068⁺NKG2D⁺ son amarillos.

La Figura 3(a) es una ilustración gráfica del efecto de tratamiento con anti- NKG2D mAb de sobre la proporción de ratones NOD de 7 - 25 semanas de edad que desarrollaron diabetes. Círculos oscuros: ratones NOD tratados con anti-NKG2D mAb (n = 7) (dos veces a la semana a 200 µg/ratón IP); círculos claros, ratones NOD tratados con PBS no pirogénico estéril (n = 7). Diabetes se diagnosticó cuando el nivel de glucosa en sangre era mayor que 300 mg/dl en dos mediciones consecutivas. La Figura 3 45 (b) es una ilustración gráfica de los niveles de glucosa en sangre medidos semanalmente a partir de 6 semanas a 40 semanas de edad en los animales representados en la Figura 3a. La Figura 3(c) es una ilustración gráfica de la proporción de ratones NOD que desarrollaron diabetes después del tratamiento con anti-NKG2D mAb en una fase pre-diabética tardía. Se trataron ratones NOD con anti-NKG2D mAb (dos veces a la semana a 200 µg/ratón IP, círculos oscuros; n = 14) o control Ig (círculos claros; n = 14) de 13 semanas a 25 semanas de edad. A las 25 semanas de edad, siete ratones tratados con anti-NKG2D mAb continuaron recibiendo tratamiento hasta las 30 semanas de edad (triángulos oscuros). La Figura 3 (d) es una ilustración gráfica de los niveles de glucosa en sangre medidos semanalmente de 12 semanas a 36 semanas de edad en los animales representados en La Figura 3c.

La Figura 4(a) es una ilustración gráfica del análisis de leucocitos que infiltran el páncreas y ganglios linfáticos pancreáticos de ratones NOD de 11 semanas de edad tratados con control Ig (clg) o anti-NKG2D mAb (200 µg/ratón IP dos veces a la semana comenzando a las 7 semanas de edad) que se habían teñido con anti-CD8, anti-NKG2D, y anti-CD44 y se sometieron a citometría de flujo. Los resultados mostrados están activados sobre células T CD8⁺. La Figura 4(b) representa fotomicrografías de islotes pancreáticos de ratones NOD de 16 semanas de edad tratados con Ig control de 7 semanas de edad. Se prepararon secciones congeladas de páncreas y se tiñeron de ratones NOD de 16 semanas de edad tratados con Ig control. Izquierda: tinción DAPI (núcleos); Derecha: CD8 (rojo), NKG2D (verde) e insulina (azul). La Figura 4(c) representa fotomicrografías de islotes pancreáticos de ratones NOD de 16 semanas de edad tratados con tratamiento anti-NKG2D mAb (200 µg/ratón IP dos veces a la semana) de 7 semanas de edad que se prepararon y se tiñeron como en el panel (b). La Figura 4 (d) es una ilustración gráfica del efecto del tratamiento con anticuerpo anti-NKG2D sobre la acumulación de células T CD8⁺ autorreactivas NRP-V7/H-2K^d tetrámero positivo en el páncreas. Se aislaron los leucocitos de los páncreas y PLN de ratones NOD de

65

18 semanas de edad tratados con anti-NKG2D mAb (200 µg/ratón IP dos veces a la semana) o control Ig de 13 semanas de edad. Se muestran los porcentajes indicados de células T CD8⁺ NRP-V7/H-2K^d tetrámero positivo (activadas sobre células T CD8⁺). La Figura 4(e) es una ilustración gráfica de Linfocitos de bazo y sangre periférica en ratones tratados con control Ig o con anti-NKG2D (200 µg/ratón IP dos veces a la semana) teñidos con NRP-V7/H-2K^d tetrámero y anti- CD8 mAb. Los porcentajes indicados eran células NRP-V7/H-2K^d tetrámero positivo (activadas sobre la población de células T CD8⁺). La Figura 4(f) es una ilustración gráfica de células de ganglios linfáticos de páncreas aisladas de ratones NOD de 25 semanas de edad tratados con Ig control (clg) o anti- NKG2D (200 µg/ratón IP dos veces a la semana) comenzando a las 13 semanas de edad, como se indica, y cultivadas con PMA (20 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) y brefeldina A (5 µg/ml) durante 6 hr. Se detectó la IFN- y intracelular en células T CD8⁺ mediante tinción inmunofluorescente y citometría de flujo.

La Figura 5 es una ilustración gráfica de mediciones de citometría de flujo de un experimento de transferencia adoptiva de células NOD T en receptores NOD.scid. La Figura 5(a) muestra células T CD8⁺ NKG2D⁺ en el páncreas, PLN y bazo de ratones NOD.scid trasplantados con células NOD T. Antes de la transferencia adoptiva, células T purificadas de un donante NOD diabético se tiñeron con anti-CD8 y anti-NKG2D (a, panel izquierdo inferior). Cinco semanas después de la transferencia, se recogieron las células del páncreas, PLN y bazo se tiñeron con anti-CD8 y anti-NKG2D (a, paneles superiores) o anti- NKG2D y anti-CD44 (a, paneles inferiores). Se muestran los porcentajes de células NKG2D⁺ T CD8⁺ (activadas sobre células T CD8⁺). La Figura 5 (b) muestra la acumulación de células autorreactivas NRP-V7/H-2K^d tetrámero positivo T CD8⁺ en ratones NOD.scid que reciben de manera adoptiva células T transferidas de ratones NOD tratados con anti-NKG2D mAb (200 µg/ratón IP dos veces a la semana) o Ig control, que comienza en el momento de la transferencia y se analizaron 10 semanas después de la transferencia. Se detectaron los porcentajes indicados de células T CD8⁺ autorreactivas de NRP- V7/H-2Kd tetrámero positivo activadas sobre células vivas. La Figura 5(c) muestra la detección de NKG2D sobre células T de NRP-V7/H-2Kd tetrámero positivo de estos mismos ratones tratados, activadas sobre células T CD8⁺. La Figura 5 (d) es una ilustración gráfica de la proporción de ratones NOD.scid trasplantados con células T de ratones NOD diabéticos que desarrollaron diabetes. Los ratones NOD.scid de cinco semanas de edad que recibieron células T transferidas de manera adoptiva de ratones NOD diabéticos se trataron con anti-NKG2D mAb (círculos oscuros; n = 6) Ig control (círculos claros; n = 7) de 5 semanas a 14 semanas de edad. Se inyectaron los ratones por vía intraperitoneal con 200 µg de anti- NKG2D mAb CX5, dos veces a la semana. Se diagnosticó diabetes cuando el nivel de glucosa en sangre era mayor que 300 mg/dl en dos mediciones consecutivas. La Figura 5 (e) es una ilustración gráfica de la expansión de células autorreactivas NRP-V7/H-2Kd tetrámero positivo T CD8⁺ después de tratamiento de parada con anti-NKG2D mAb. Cuatro semanas después se cesó el tratamiento de anti-NKG2D mAb en ratones NOD.scid trasplantados con células T de ratones NOD diabéticos, se sacrificaron los animales y se analizaron los páncreas para evaluar la infiltración de células NRP-V7/H-2K^d tetrámero positivo, NKG2D⁺ T CD8⁺. Para comparación, también se analizaron los ratones tratados con Ig control que desarrollaron diabetes.

La Figura 6 (a) es una ilustración gráfica de la pérdida de expresión de NKG2D sobre células T de 8.3 TcR-transgénicos NOD antes de la transferencia adoptiva. Se aislaron de los ganglios linfáticos y bazo de ratones 8.3 TcR- transgénicos NOD. Se purificaron después las células T de 8.3 TcR- transgénicos NOD, mediante aislamiento magnético de células. Antes de la transferencia de células T, células T de 8.3 TcR-transgénicos NOD se tiñeron con anti-CD8 y NRP-V7/H-2K^d tetrameros o anti-NKG2D y se analizaron mediante citometría de flujo, como se muestra. La Figura 6 (b) es una ilustración gráfica de la expresión de NKG2D sobre células T de 8.3 TcR- transgénicos NOD en el páncreas dos días después de la transferencia adoptiva de células T de 8.3 TcR-transgénicos NOD. Dos días después de la transferencia adoptiva de células T de 8.3 TcR-transgénicos NOD, se aislaron los leucocitos del páncreas de ratones que se trataron con Ig control o anti-NKG2D mAb CX5 en el momento de la transferencia de células. Se tiñeron las células con NRP-V7/H-2K^d tetrámeros y anti-NKG2D y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestra la expresión de NKG2D sobre las células T transferidas de manera adoptiva (identificada mediante la activación sobre células NRP-V7/H- 2K^d tetrámero positivo).

La Figura 6(c) es una ilustración gráfica del efecto de anti-NKG2D mAb CX5 sobre la proliferación de células T CD8⁺ de 8.3 TcR-transgénicos NOD en el páncreas. Células T marcadas con CFSE-45 de 8.3 TcR-transgénicos NOD (1×10^7) se transfirieron en ratones NOD de tipo salvaje de 10 semanas de edad (día 0). Los ratones NOD receptores se trataron con clg o anti-NKG2D mAb CX5 (200 µg) el día -1, día 1, y día 5. Después de la transferencia, los ratones NOD receptores se sacrificaron y los leucocitos se aislaron y se analizaron del páncreas, ganglio linfático pancreático (PLN), ganglio linfático mesentérico (MLN). Las células mostradas en (c) se activaron sobre Linfocitos viables CD8-positivos. La Figura 6 (d) es una ilustración gráfica de los porcentajes de células marcadas con CSFS en los ratones tratados con Ig control (barras abiertas) y anti-NKG2D mAb (barras cerradas) que habían experimentado una o dos divisiones (es decir, proliferación de células) los días 2, 3 y 4 después de la transferencia, calculado por la siguiente fórmula: % de células de proliferación = (Total de células CFSE⁺ NRP-V7/H-2K^d tetrámero⁺ CD8⁺ menos células CFSE⁺ NRP-V7/H-2K^d tetrámero⁺ CD8⁺ que no se dividen) x 100/ Total de células CFSE⁺ NRP-V7/H-2K^d tetrámero⁺ CD8⁺.

La Figura 7 representa microfotografías de linfocitos de 8.3 TcR-transgénicos NOD cultivados con 100 nM IGRP (proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa) de péptido durante 3 días y después se desarrollaron en la presencia de 200 U/ml de IL-2 de recombinante humano y 4 ng/ml de IL-7

5 durante 5 días adicionales células T CD8⁺ activadas de 8.3 TcR- transgénicos se tiñeron sobre hielo con anti-NKG2D mAb CX5 y se tiñeron por contraste de fase con toxina b de cólera para marcar la membrana de superficie celular. Se incubó una alícuota de estas células teñidas durante 30 minutos a 37°C y se mantuvo otra alícuota sobre hielo. Se analizaron las células mediante el uso de un microscopio de fluorescencia. En la microfotografía, se muestra la expresión de NKG2D como fluorescencia verde y la tinción con fluorescencia roja indica toxina B de cólera (membrana). Hay que hacer notar que NKG2D estaba presente sobre la superficie celular de las células incubadas sobre hielo pero se modulaba y se internalizaba en las células cultivadas a 37°C.

10 La Figura 8 es una ilustración gráfica del efecto de anti-NKG2D mAb sobre células T CD8⁺ que llevan NKG2D in vivo. Se activaron células T CD8⁺ de TcR transgénicos específicas de ovoalbúmina OT-1 (OVA) con 100 nM de péptido de OVA durante 3 días y después se cultivaron con 200 U/ml de IL-2 humana recombinante y 4 ng/ml de IL-7 durante 5 días adicionales. Se expresó NKG2D sobre las células T activadas de OT-1 (> 95%), que se marcaron con CFSE y se transfirieron de manera adoptiva (2 x 10⁷ células) en ratones C57B/6. Los ratones que recibieron células T de CD8⁺ NKG2D⁺ OT-1 TcR-transgénicos se trataron con anti-NKG2D mAb o Ig de rata de control a -2, 0, y +2 días (200 µg por inyección intraperitoneal). La Figura 8 (a): Cuatro días después de la transferencia, se recogieron muestras de sangre, se tiñeron con mAbs contra CD8 y NKG2D de ratón y se analizaron mediante citometría de flujo.

20 Se indican los porcentajes de células CD8⁺ marcadas con CFSE. La Figura 8(b): El día 21 después de la transferencia adoptiva de células T de OT-1 TcR- transgénicos marcadas con CFSE y tratamiento con Ig control o anti-NKG2D mAb CX5 como se ha indicado en (a), se sacrificaron los ratones y se aislaron y se analizaron los esplenocitos mediante citometría de flujo. La Figura 8 (c): El día 7 después de la transferencia adoptiva de las células T CD8⁺NKG2D⁺ OT-1 marcadas con CFSE, los ratones se inyectaron con un anti-ratón CD8 mAb de rata de empobrecimiento (2.43 hibridoma, isotipo IgG2b de rata). Tres días después se tiñeron células de sangre periférica con Ig control, anti-CD8 o anti- NKG2D mAb y se analizaron mediante citometría de flujo. El propósito de este experimento era demostrar que el anticuerpo monoclonal CX5 anti-NKG2D no empobrece las células T CD8⁺ NKG2D⁺ cuando se administra el anticuerpo in vivo.

25 La Figura 9 es una ilustración gráfica del efecto de anti-NKG2D mAb sobre la proliferación de células T CD8⁺ autorreactivas. Células T de 8.3 TcR-20 transgénicos NOD se marcaron con CFSE y se transfirieron en ratones NOD de tipo salvaje, que se trataron con Ig control o anti-NKG2D mAb CX5 como se ha descrito en la Fig. 6. Las células recogidas del páncreas, ganglios linfáticos pancreáticos, ganglios linfáticos mesentéricos y bazo se tiñeron con NRP-V7/H-2K^d tetrámero y anti-CD8 mAb y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestran los histogramas de Linfocitos activados sobre células CD8-positivo NRP-V7/H-2K^d tetrámero positivo. Los porcentajes de células de proliferación (más de una división) y no proliferación (activadas sobre células T CFSE⁺ CD8⁺ NRP-V7/H-2K^d tetrámero⁺) se indican en cada histograma. Las células teñidas con Ig control emparejada a isotipo o controles para tinción de tetrámero demostró la especificidad de unión de los reactivos.

30 La Figura 10 ilustra la especificidad de la tinción para los ligandos de NKG2D sobre las células de páncreas de NOD. Figura 10 (a): se aislaron y se tiñeron células de páncreas de NOD con anti-CD45 mAb y con Ig control, un anti-pan RAE-1 mAb (clon 186107), anti-RAE-1 y mAb (clon CX1) o proteína de fusión NKG2D-Ig de ratón (dominio extracelular de NKG2D de ratón condensado a IgG1 Fc de tipo humano), seguido de los reactivos de la segunda etapa apropiados para visualización. Se analizaron las células mediante citometría de flujo y CD45-negativo y yoduro de propidio negativo, se evaluaron las células viables. Se tiñeron las células con Ig control emparejada a isotipo (clg) demostró la especificidad de unión a mAb (línea delgada). Figura 10 (b): Anti- RAE1 mAbs bloquearon la tinción de anti-RAE-1 mAbs marcados con biotina, que demuestra la especificidad de unión. Se incubaron previamente células de páncreas con 0,25 µg de clg, anti-pan RAE-1 mAb purificado 186107 o clon CX1 anti- RAE-1 y mAb (que también reacciona de manera cruzada con RAE-1 α y RAE-1 β). Después de 20 min de incubación sobre hielo, estas células se tiñeron después durante 20 min adicionales con 0,25 µg de Ig control biotinilada, clon 186107 anti-RAE-1 mAb biotinilado, clon CX1 anti-RAE-1y mAb biotinilado y anti-CD45 mAb conjugado a FITC. Para detectar las células mAbs biotiniladas, se lavaron las células y se incubaron con estreptavidina conjugada a PE. Se analizaron las células mediante citometría de flujo y los datos mostrados se activan sobre células CD45-negativo, yoduro de propidio -negativo, viables. De este modo, se detectan los ligandos de NKG2D sobre las células de páncreas de NOD usando tres reactivos independientes: clon 186107 anti-RAE-1 mAb, clon CX1 anti-RAE-1 mAb , y una proteína de fusión NKG2D-Ig. La tinción Anti-RAE-1 mAb es específica porque la tinción de anti- RAE1 biotinilado se bloquea completamente mediante anti-RAE-1 mAbs purificados, pero no una IgG de control de rata.

35 La Figura 11 (a) muestra la secuencia de ADNc (SEC ID N°: 1) de NKG2D murino. La Figura 11 (b) muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) de NKG2D murino. La Figura 11 (c) muestra la secuencia de ADNc (SEC ID N°: 3) de NKG2D humano. La Figura 11 (d) muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:4) de NKG2D humano.

40 La Figura 12 es una representación gráfica de de un análisis de citometría de flujo de células de NKL (una línea celular de leucemia NK numana) que se ha incubado con un anticuerpo anti-humano NKG2D de ratón (clon 149810) durante 16 h para estimular la internalización de NKG2D (panel derecho). El panel izquierdo muestra las células que se han incubado con un anticuerpo control durante 16 h. en cada caso, las células se lavaron brevemente en un tampón ácido (pH 3,5) para eliminar cualquier anticuerpo residual unido y

después se tiñó con Ig control o anti-NKG2D mAb, seguido de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado a ficoeritrina. El experimento muestra que el anticuerpo monoclonal anti-humano NKG2D monoclonal indujo la internalización (modulación) de NKG2D, mientras que la incubación con la Ig control no provocó la internalización de NKG2D.

5 La Figura 13 muestra que la RAE-1 se expresa sobre células B/c BM pero no sobre células B6 BM. Figura 13(a): Se tiñeron células recientemente aisladas de BM con una proteína de fusión NKG2D-humana Ig Fc humana (NKG2D Ig) o Ig control humana Ig (clg). Para detectar la unión de NKG2D-Ig, se usó un anticuerpo de IgG anti-humano conjugado a PE (anti-humano Ig PE) como un segundo anticuerpo de etapa. La línea de puntos representa una tinción de clg sobre células BM. La línea gruesa muestra la expresión del ligando NKG2D sobre células BM. Figura 13(b): se tiñeron las células BM con anti-pan RAE-1 mAb biotinilado, anti-H60 mAb biotinilado, anti-MULT1 mAb biotinilado o un clg emparejado a isotipo biotinilado, y después se tiñeron con estreptavidina conjugada a PE. La línea de puntos muestra la tinción de clg ya la línea gruesa muestra la expresión de RAE-1, H60 y MULT1 sobre las células BM. Figura 13 (c y d): los receptores de CB6F1 se trataron con anti-NK1.1 mAb el día -2. El día 0, se irradiaron los receptores (11 Gy) y después se reconstituyeron con células B/c o CB6F1 BM (4×10^6). El día 7, células del bazo del receptor se aislaron y se analizaron como se ha descrito para los paneles a y b. La línea de puntos representa la tinción de clg sobre células BM. La línea gruesa muestra la expresión de ligandos de NKG2D, RAE-1, H60 y MULT1 sobre células BM. Los números representan la fluorescencia media (unidades lineales arbitrarias) de las células teñidas. Figura 13 (e y f): ilustra de manera gráfica ese fenotipo de las células que expresan RAE-1. Se transfirieron las células BM en receptores irradiados tratados previamente con anti-NK1.1 mAb. Se aislaron las células y se tiñeron como se ha descrito para el panel c. La Figura 13(g): ilustra que la proliferación de células expresa RAE-1. Se transfirieron células B/c BM en ratones irradiados CB6F1 que se habían tratado previamente con anti-NK1.1 mAb. Seis días después de la transferencia, BrdU (0,8 mg/ ratón) se inyectó en ratones. Dos o 12 horas después, se recogieron células de bazo de receptores y se tiñeron con anti-pan-RAE-1 mAb y anti-BrdU. La Figura 13(h y i): ilustra que RAE-1 se expresa sobre la progenie de BM tratados con 5-FU. Células BM de ratones B/c tratados con 5-fluorouracilo se transfirieron en ratones CB6F1 irradiados que se trataron previamente con anti-NK1.1 mAb. Ocho días después de la transferencia, se aislaron las células y se analizaron como se ha descrito para los paneles c y e. La Figura 13 (i): muestra la tinción de c-kit y Sca-1 de células activadas positivas de RAE-1. En los paneles e - i, > 98% de las células teñidas con clg estaban en el cuadrante inferior izquierdo (no mostrado). Se muestra el porcentaje de células en cada uno de los dos cuadrantes superiores. Estos resultados eran reproducibles en al menos dos experimentos independientes (datos representativos no mostrados).

10 La Figura 14 (a): ilustra que Anti-NKG2D mAb bloquea el rechazo de B/c BM en ratones híbridos CB6F1. Aproximadamente 4×10^6 de células BM se transfirieron en receptores CB6F1 irradiados. Los ratones receptores se inyectaron con ^{125}I UdR el día 5, y se recogieron los bazos y se contaron el día 6. Las barras negras muestran la captación de ^{125}I UdR de los bazos en ratones B/c BM \rightarrow CB6F1 y las barras blancas muestran la captación de radiomarca en receptores CB6F1 BM \rightarrow CB6F1. Se trataron los receptores con anti-NKG2D mAb neutralizante no empobrecido o el anti-NK1.1 mAb no empobrecido de las células NK (200 μg /ratón el día -2), como se ha indicado. Los resultados se muestran como la media \pm D. E cpm (5 ratones por grupo). Se realizó el experimento dos veces con resultados comparables. La Figura 14 (b): ilustra de manera gráfica el fenotipo de células donantes de B/c que repoblaron receptores irradiados de CB6F1 tratados con anti-NKG2D mAb o Ig control. Se trataron los ratones como se ha descrito en el panel a, con los esplenocitos recogidos el día 8 después del trasplante, se tiñeron glóbulos blancos y se presentaron los datos como se ha descrito en la Figura 13.

15 La Figura 15 ilustra el rechazo de células BM singénicas que expresan RAE-1. La Figura 15(a) muestra la expresión de RAE-1 ϵ sobre células de médula ósea en ratones transgénicos B6 RAE-1 ϵ . Médula ósea recientemente aislada de ratones B6 y B6 RAE-1 ϵ transgénicos se tiñeron con clg o anti-pan-RAE-1 mAb. La Figura 15(b) ilustra que las células NK B6 matan células de BM transgénicos RAE-1 ϵ singénicas in vitro. Las células de BM recientemente aisladas de ratones B6 de tipo salvaje B6 y RAE-1 ϵ transgénicos se usaron como dianas en un ensayo de citotoxicidad in vitro usando células NK de tipo salvaje activadas por IL-2 (Células NK B6 cultivadas durante 7 días en 2000 U/ml de IL-2 recombinante humana del Almacén Pre-Clinico de la Rama de Fuentes Biológicas del Instituto de Cáncer Instituto Nacional) como efectores, en la presencia de clg o anti-NKG2D mAb (clon 191004) usados a 10 μg /ml. La Figura 15(c) ilustra que los ratones B6 rechazan la médula ósea singénica que expresa RAE-1- ϵ . Aproximadamente 4×10^6 de células RAE-1 ϵ de B6 BM transgénicos se transfirieron en receptores B6 irradiados. Los ratones receptores se inyectaron con ^{125}I UdR el día 5, y se recogieron los bazos y se contaron el día 6. Las barras negras muestran la captación de ^{125}I UdR de bazos en ratones RAE-1 ϵ transgénicos BM \rightarrow B6 y las barras blancas muestran la captación de radiomarca en receptores de tipo salvaje B6 BM \rightarrow B6. Se trataron los ratones con el anti-NKG2D mAb neutralizante no empobrecido o el anti-NK1.1 mAb empobrecido de las células (200 μg /ratón el día -2), como se ha indicado. Los resultados se muestran como la media \pm D. E cpm (5 ratones por grupo). El experimento se realizó dos veces con resultados comparables. La Figura 15(d) ilustra que los ratones CB6F1 rechazan la médula ósea singénica que expresa RAE-1 ϵ . Aproximadamente 4×10^6 células de RAE-1 ϵ transgénicos CB6F1 BM se transfirieron en receptores CB6F1 irradiados. Se inyectaron los ratones con ^{125}I UdR el día 5, y se recogieron los bazos y se contaron el día 6. Las barras negras muestran la captación de ^{125}I UdR de bazos en ratones RAE-1 ϵ transgénicos CB6F1 BM \rightarrow CB6F1 y las barras blancas muestran la captación de la

radiomarca en los receptores CB6F1 BM -> CB6F1 de tipo salvaje. Se trataron los ratones y los datos se muestran en como se ha descrito en el panel c.

5 La Figura 16(a) ilustra que los ratones DAP 10-1 rechazan de manera ineficaz la médula ósea singénica que expresa RAE-1ε. Aproximadamente 4×10^6 de células de B6 BM RAE-1 ε transgénicos se transfirieron en receptores irradiados. Los ratones se inyectaron con $^{125}\text{IUdR}$ el día 5 y se recogieron y se contaron los bazos el día 6. Las barras negras muestran la captación de $^{125}\text{IUdR}$ de bazos en ratones B6 BM -> RAE-1ε transgénicos B6 de tipo salvaje y las barras blancas muestran la captación de radiomarca en receptores RAE-1 ε transgénicos B6 BM -> DAP10-/- B6. Se trataron los ratones con el anti- NKG2D mAb neutralizante no o el anti-NK1.1 mAb empobrecido de células NK (200 µg/ratón el día -2), como se ha indicado. Los resultados son la media ± D. E cpm (5 ratones por grupo). La Figura 16(b) ilustra que los ratones DAP12-/- (Bakker et al., *Immunity*, 13: 345-353, 2000) rechazan la médula ósea singénica que expresa RAE-1 ε. Aproximadamente 4×10^6 de células de RAE-1 ε transgénicos B6 BM se transfirieron en receptores irradiados. Los ratones se inyectaron con $^{125}\text{IUdR}$ el día 5 y se recogieron y se contaron los bazos el día 6. Las barras negras muestran que la captación de $^{125}\text{IUdR}$ de bazos en ratones RAE-1 ε transgénicos B6 BM -> B6 de tipo salvaje y las barras blancas muestran la captación de radiomarca en receptores RAE-1 ε transgénicos B6 BM -> DAP12-/- B6. Se trataron los ratones y los resultados se muestran como se describe en el panel a.

20 La Figura 17 (a) ilustra la modulación de NKG2D sobre células NK en ratones B6 RAE-1 ε transgénicos. Se tiñeron esplenocitos de ratones de tipo salvaje y B6 RAE-1 ε transgénicos con anti-pan-RAE-1 mAb (paneles de la izquierda) o anti-NKG2D y anti-NK1.1 mAb (paneles de la derecha). Se analizó la expresión de RAE-1 sobre células de bazo, y se analizó la expresión de NKG2D mediante la activación sobre células NK1.1⁺. Las líneas delgadas muestran las células teñidas con clg, mientras las líneas gruesas muestran la tinción específica de RAE-1 o NKG2D. Los números representan la fluorescencia media (unidades lineales arbitrarias) de las células teñidas. La Figura 17(b) muestra de manera gráfica que la citotoxicidad dependiente de NKG2D está alterada en células de RAE-1 ε transgénicos (Tg) NK. Se prepararon células NK enriquecidas de los bazos de ratones de tipo salvaje o RAE-1E Tg B6 a los que se les inyectó por vía IP polil:C (100 µg/ ratón) un día antes de la recogida. Se realizaron ensayos de destrucción redirigida dependiente de anticuerpo monoclonal contra células diana 721.221 transfectadas en C032 como se ha descrito (Lanier et al., *J Immunol*, 141 : 3478 - 3485, 1998) mediante el uso de Ig control (clg), anti-NKG2D, o anti-NK1.1 mAbs. La Figura 17(c): ilustra la modulación de NKG2D sobre células NK de tipo salvaje que se desarrollan en huéspedes RAE-1 ε transgénicos. Células Ly 5.2 B6 BM (1×10^7 /ratón) se transfirieron en ratones (WT) o RAE-1 ε Tg B6. Tres meses después del trasplante, se analizó el nivel de expresión de NKG2D (paneles de la izquierda) y NK1.1 (paneles de la derecha) sobre células NK esplénicas (activadas sobre C03-, linfocitos NK1.1⁺). Las líneas delgadas muestran las células teñidas con clg, mientras que las líneas gruesas muestran la tinción específica de RAE-1 o NKG2D. Los números representan la fluorescencia media (unidades lineales arbitrarias) de las células teñidas. La Figura 17 (d) muestra de manera gráfica la citotoxicidad dependiente de NKG2D de células NK en ratones Ly5.2 B6 BM -> RAE-1 Tg quiméricos. Se prepararon células NK enriquecidas de los bazos de Ly5.2 B6 BM -> RAE-1 Tg y ratones Ly5.2 B6 BM -> B6 inyectados por vía IP -con polyI:C (100 µg/ratón) un día antes de la recogida. Se realizaron ensayos de citotoxicidad redirigida dependiente de mAb como se ha descrito en el panel b. La Figura 17(e) ilustra que las células NK de tipo salvaje que se desarrollan en ratones RAE-1 Tg demuestran el rechazo de médula ósea dependiente de NKG2D. Las barras de color negro muestran la captación de $^{125}\text{IUdR}$ en bazos de células RAE-1⁺ Tg BM -> ratones quiméricos (Ly5.2 B6 BM-> B6 de tipo salvaje), y las barras blancas muestran la captación de la radiomarca en bazos de células RAE-1⁺Tg BM -> ratones quiméricos (ratones quiméricos Ly5.2 B6 BM-> RAE-1 Tg). La Figura 17 (f) ilustra que la resistencia híbrida en ratones RAE-1 ε transgénicos CB6F1 está alterada. Se transfirieron aproximadamente 4×10^6 de células B/c BM en receptores irradiados. Los ratones receptores se inyectaron con $^{125}\text{IUdR}$ el día 5 y se recogieron y se contaron los bazos el día 6. Las barras de color negro muestran la captación de $^{125}\text{IUdR}$ de bazos en ratones B/c BM -> tipo salvaje CB6F1, las barras de color blanco muestran la captación de radiomarca en receptores B/c BM -> RAE-1 ε transgénicos CB6F1, y las barras de color gris muestran los ratones CB6F1 BM ->CB6F1. Se trataron los ratones con el anti-NKG2D mAb no empobrecido, neutralizante o el anti-NK1.1 mAb que empobrece las células NK (200 µg/ratón el día -2), como se ha indicado. Los resultados se muestran como la media ± D. E cpm (5 ratones por grupo). El experimento se realizó dos veces con resultados comparables.

55 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente hallazgo de la modulación de NKG2D, un receptor de activación sobre células T CD8⁺, células NK, y ciertas células T CD4⁺ activadas, es un medio eficaz para la prevención y / o tratamiento de síndromes autoinmunes e inflamatorios. En un aspecto, los presentes inventores han descubierto agentes y procedimientos para estimular la internalización de NKG2D y han identificados tales agentes como modalidades terapéuticas útiles para tratar los síndromes asociados a la activación de NKG2D. Los agentes son particularmente útiles en afecciones (tales como las que se cree que están presentes, por ejemplo, en síndromes inflamatorios crónicos) en las que los ligandos naturales solubles NKG2D no son capaces de estimular la internalización. Se divulga cualquier medio para reducir la expresión funcional de NKG2D con el fin de tratar tales síndromes inflamatorios. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención afectan solamente al

subconjunto de leucocitos que dependen de su activación principalmente sobre NKG2D. Se divulgan procedimientos y composiciones eficaces para uso en el tratamiento o prevención de un síndrome asociado a la activación mediada por NKG2D de leucocitos. Los usos se llevan a cabo poniendo en contacto los leucocitos que expresan NKG2D con un agente que reduce la activación mediada por NKG2D de las células en condiciones adecuadas para la prevención o tratamiento del síndrome. El contacto se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento adecuado, que incluye la administración del agente o una composición que comprende el agente a un paciente, o huésped que comprende las células activadas por la ruta (s) de NKG2D en condiciones que permiten la administración del agente a las células en el paciente o huésped. La activación de NKG2D se puede reducir de acuerdo con la invención mediante uno o más de: (i) empobrecer la superficie celular de las moléculas de NKG2D que existen previamente sobre la superficie; (ii) interferir con la interacción funcional entre NKG2D y DAP10 o de otra manera bloquear la función de señalización de NKG2D; y (iii) evitar que las moléculas NKG2D alcancen la superficie, incluyendo la interferencia con la producción de NKG2D a un nivel de transcripción, de traducción, o después de la traducción. En algunas realizaciones, la invención abarca la reducción de las moléculas de NKG2D de la superficie celular preexistentes mediante la estimulación de su internalización sin que provoque de manera simultánea la activación de que activaría las funciones efectoras de leucocitos que llevan NKG2D.

Los términos "NKG2D," "NKG2-D," "D12S2489E," "KLRK1," y "subfamilia K del receptor de tipo pectina de células destructoras, miembro 1," como se usa en el presente documento se refiere a un gen receptor que activa las células destructoras, ADNc (por ejemplo, *Homo sapiens* - N° de acceso del GENBANK NM_007360), y su producto génico, así como sus homólogos de mamíferos, que incluye productos de tipo salvaje y mutantes. Un NKG2D humano que codifica la región se establece como SEC ID N°:3, y una secuencia de proteína NKG2D humana se establece como la SEC ID N°:4. Los homólogos de mamíferos de NKG2D incluyen but pero no se limitan a NKG2D de ratón (por ejemplo, *Mus musculus* - N° de acceso del GENBANK NM_033078), NKG2D de rata (por ejemplo, *Rattus norvegicus* - N° de acceso del GENBANK NM_133512), NKG2D de cerdo (por ejemplo, *Sus scrofa* - N° de acceso del GENBANK AF285448), monkey NKG2D de mono (por ejemplo, *Macaca mulatta* - N° de acceso del GENBANK AJ554302), y NKG2D de orangután (por ejemplo, *Pongo pygmaeus* - N° de acceso del GENBANK AF470403). Los agentes que modulan NKG2D de la presente invención comprenden un anticuerpo que se une a NKG2D, un fragmento de unión de NKG2D -del mismo, o un ARNi codificado por una secuencia de ADN que comprende la SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11 o SEC ID N°: 12.

Salvo que se establezca de otra manera, los usos de acuerdo con la invención se pueden poner en práctica en el contexto de tratamiento (por ejemplo, reducir los síntomas asociados a y / o afecciones subyacentes que se consideran causantes de una afección o bien en términos de tiempo para que tales afecciones / síntomas existan, la extensión de tales afecciones / síntomas, gravedad de tales afecciones / síntomas etc.) o prevención (por ejemplo, reducción de la probabilidad de desarrollo de la aparición subyacente, retraso de la gravedad de la aparición posterior, reducción de la gravedad después de la aparición, etc.) cualquier tipo de afección inflamatoria asociada a la actividad de NKG2D, tal como enfermedad autoinmune inflamatoria asociada a la actividad de NKG2D. Sin embargo, se reconocerá que tales afecciones pueden variar de manera significativa de manera que los procedimientos para tratar diversas condiciones también se pueden considerar como aspectos únicos de la invención.

I. Agentes de modulación de NKG2D

A menos que se indique lo contrario o esté implícito claramente en el contexto, puede usarse cualquier agente que reduzca la activación celular mediada por NKG2D. Ejemplos no limitativos de tales agentes incluyen ligando de NKG2D, o un fragmento de unión a NKG2D, variante, o derivado del mismo; un anticuerpo, o un fragmento, variante o derivado del mismo (como, por ejemplo un anticuerpo de unión a NKG2D); un ácido nucleico (o variante o derivado del mismo), o una molécula pequeña, que inhibe la producción de NKG2D o DAP 10 en una célula; péptidos o moléculas pequeñas que interfieren con la formación o función del complejo NKG2D-DAP10; moléculas pequeñas que alteran la transducción de la señal de NKG2D, y combinaciones de cualquiera de los anteriores. Ligandos de NKG2D ejemplares pueden encontrarse, por ejemplo, en la Patente U.S. N° 6.653.447; Carayannopoulos et al., *J Immunol*, 169(8):4079-83, 2002; Carayannopoulos et al., *Eur J Immunol*, 32(3):597-605, 2002; Sutherland et al., *J Immunol*, 168(2):671-9, 2002; Sutherland et al., *Immunol Rev*, 181:185-92, 2001; y Cosman et al., *Immunity*, 14(2):123-33, 2001). Se divulgan agentes que ponen en contacto las células que expresan NKG2D desde el exterior y reducen la activación de células que llevan NKG2D -cuando se exponen de manera posterior a células que llevan ligando NKG2D o ligandos NKG2D recombinantes. Cualquier indicador de esta activación se puede controlar, que incluyen, sin limitación, estimulación de la fosforilación de DAP10, estimulación de la p85 PI3 quinasa, activación de Akt, producción dependiente de NKG2D -de interferón gamma (1 FN-γ) u otras citoquinas o quimioquinas, destrucción dependiente de NKG2D -de las células T diana que llevan ligando de NKG2D, y similares. Un medio de determinar el nivel de activación de NKG2D es mediante la medición de la destrucción de células NK humanas de células diana que llevan ligando de NKG2D (véase, por ejemplo, Ejemplo 1 más adelante). En algunas realizaciones, los agentes de modulación de NKG2D útiles son los que provocan al menos aproximadamente el 20% de reducción de activación de NKG2D inducida por el ligando de NKG2D en un sistema modelo tal como se describe en el Ejemplo 1; en otras realizaciones, el agente da como resultado al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más reducción en la activación de NKG2D inducida por ligando. Por

ejemplo, la activación inducida por el ligando de NKG2D se puede reducir en al menos aproximadamente el 30% en presencia del agente cuando se compara con un control. El control puede ser, por ejemplo, la activación de NKG2D en la ausencia del agente pero en condiciones sustancialmente idénticas en bien (a) un individuo, (b) una población de organismos sustancialmente similares, usando un valor medio como control, o (c) ambos. Otro medio de determinar el nivel de la activación de NKG2D es mediante la producción de IFN- γ en la presencia o ausencia de un ligando de NKG2D tal como MICA o ULBP. Se puede usar cualquier procedimiento para la medición de la producción de IFN- γ , incluyendo, sin limitación, inmunoensayos u otros ensayos que miden la proteína IFN- γ ; bioensayos que miden la actividad de IFN- γ , y similares. En algunas realizaciones de la invención, los agentes de modulación de NKG2D útiles son los que provocan al menos aproximadamente el 20% de reducción de la producción de IFN- γ mediada por NKG2D; en otras realizaciones, el agente da como resultado al menos aproximadamente el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más reducción en la producción de IFN- γ mediada por NKG2D.

En una serie de realizaciones, los agentes de modulación de NKG2D de acuerdo con la invención estimulan la internalización celular de NKG2D. La internalización se puede determinar mediante cualquier medio adecuado, tal como, por ejemplo, mediante citometría de flujo (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2 más adelante); microscopía de inmunofluorescencia (incluyendo, el control de la internalización de un anticuerpo mediante microscopía confocal); ensayos de unión que detectan NKG2D de superficie celular, y similares. En algunas realizaciones de la invención, los agentes de modulación de NKG2D útiles son los que provocan al menos aproximadamente el 10% de reducción en el nivel de la superficie celular de NKG2D o un 10% de incremento en la velocidad de desaparición de NKG2D de la superficie celular, cuando se compara con el control cuando se ensaya en un sistema modelo tal como se describe en el Ejemplo 2; en otras realizaciones, el agente da como resultado al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o >99% reducción en el nivel de superficie celular o al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% de incremento en la velocidad de desaparición de NKG2D.

Preferiblemente, los agentes que modulan NKG2D de acuerdo con la invención no dan como resultado una histólisis significativa o empobrecimiento de las células que expresan NKG2D, incluyendo, por ejemplo, una o más de células T CD8+, células T CD4+, y células T $\gamma\beta$ -TcR+, y células NK CD56/16+. La capacidad de un agente para destruir las células que expresan NKG2D se puede determinar usando cualquier medio apropiado, tal como, por ejemplo, mediante detección de células muertas por citometría de flujo o microscopía usando tinción por annexina V o yoduro de propidio, incorporación de azul Trypan, ensayo de europio o ensayo de liberación de cromo. En algunas realizaciones de la invención, los agentes de modulación de NKG2D útiles son los que muestran un beneficio terapéutico detectable en condiciones que conservan la viabilidad al menos aproximadamente el 90% de las células que expresan NKG2D. En otras realizaciones, el agente provoca menos de aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, u 80% de reducción en el número de células que expresan NKG2D.

La siguiente tabla contiene los ejemplos no limitantes de las características de los agentes de modulación de NKG2D de acuerdo con la invención.

Tabla 1. Características de los Agentes de modulación de NKG2D

Estimulación de la internalización de NKG2D	Activación de NKG2D	Empobrecimiento de células que expresan NKG2D
(% de reducción en los niveles de superficie de NKG2D o incremento en la velocidad de desaparición con relación al control)	(% de reducción la activación de células que llevan NKG2D después de la exposición a células que llevan el ligando NKG2D)	(% de reducción en células que expresan NKG2D con relación al control)
20%	30%	<5%
20	50	<5
20	70	<5
20	90	<5
20	70	10
20	70	20
20	70	30
20	70	50
40	30	<5
40	50	<5
40	70	<5
40	90	<5
40	70	10
40	70	20
40	70	30
40	70	50
90	30	<5
90	50	<5
90	70	<5
90	90	<5
90	70	10
90	70	20
90	70	30
90	70	50

Se divulga la incapacidad de de los ligandos solubles naturales de NKG2D (tal como, por ejemplo, MICA o ULBP) para estimular la internalización de NKG2D en pacientes que padecen de inflamación crónica de una manera similar a la internalización que se pudiera producir en individuos que no padecen inflamación crónica; sin tener en cuenta estrictamente la teoría, se cree que este fenómeno se produce en parte a partir como consecuencias de altos niveles de citoquinas que acompañan estados inflamatorios crónicos. (Este fenómeno se puede documentar mediante la comparación de los niveles de NKG2D en células T o células NK en pacientes que padecen de inflamación crónica y en pacientes sanos; niveles similares de NKG2D en los dos grupos, no obstante el hecho que la inflamación crónica esté acompañada de altos niveles circulantes de ligandos de NKG2D, reflejan un defecto en NKG2D internalización). Se divulgan además agentes que estimulan la internalización de NKG2D en condiciones en las que los ligandos de NKG2D naturales solubles no serían eficaces o serían menos eficaces de esta manera, así como el uso de tales agentes en los diversos procedimientos de la invención proporcionados en el presente

documento. Cualquier sistema de modelo adecuado para examinar este efecto se puede usar para demostrar que los agentes particulares comprenden o muestran tales características, por ejemplo comparando el efecto sobre la internalización de NKG2D de un ligando natural soluble y un agente de modulación de acuerdo con la invención, en condiciones en las que las células que expresan NKG2D se exponen a citoquinas (incluyendo, sin limitación, interleuquina-2, interleuquina-15, factor de necrosis tumoral, o las combinaciones de los anteriores) en condiciones adecuadas para contrarrestar el efecto de los ligandos naturales solubles sobre la internalización. En algunas realizaciones, los agentes de modulación de NKG2D de la invención pueden provocar una reducción en los niveles de NKG2D de superficie que es al menos el 10% mayor que la reducción de los niveles de NKG2D de superficie provocados por un ligando natural soluble de NKG2D, cuando se mide la internalización en condiciones (tal como, por ejemplo, en la presencia de uno o más citoquinas) que interfieren con la capacidad del ligando natural soluble para que medie la internalización. En otras realizaciones, los agentes de modulación de NKG2D son al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o >99% más eficaz que un ligando natural soluble de NKG2D en la mediación de la internalización de NKG2D.

15 A. Anticuerpos

La presente invención abarca el uso de cualesquiera anticuerpos que se pueden usar para disminuir la activación mediada por NKG2D, tal como, por ejemplo, los que estimulan la internalización de NKG2D sin activación significativa mediante las rutas de señalización mediadas por NKG2D. Los ejemplos no limitantes de tales anticuerpos incluyen anticuerpos dirigidos contra cualquier epítipo extracelular o intramembrana de NKG2D; anticuerpos dirigidos contra cualquier epítipo extracelular o intramembrana de DAP 10; y anticuerpos dirigidos contra un ligando soluble de NKG2D o un complejo de ligando NKG2D-NKG2D. También se abarcan anticuerpos biespecíficos, es decir anticuerpos en los que cada uno de los dos dominios reconoce un epítipo de unión diferente. La secuencia de aminoácidos de NKG2D se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 6.262.244, se describen la secuencia de aminoácidos de DAP10 en Wu et al., Science 285: 730, 1999, y la secuencia de aminoácidos de polipéptidos MICA y MICB, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0165835.

En general, la unidad de anticuerpo básico estructural se sabe que comprende un tetrámero. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50 - 70 kDa). La parte amino terminal de cada cadena puede incluir una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígeno. La parte carboxi-terminal de cada cadena puede definir una región constante principalmente responsable de la función efectora.

De manera típica, las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Además, las cadenas pesadas humanas se clasifican de manera típica como mu, delta, gamma, alfa, o epsilon, y definen el isotipo de anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante se unen con una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente más de 10 aminoácidos. Véase en general, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, ed., 2ª ed. Raven Press, NY, 1989).

Las regiones variables de cada par de par de cadena ligera / pesada de manera típica forman el sitio de unión de anticuerpo. De este modo, en general, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o bispecíficos, los dos sitios de unión, en general, los mismos. Normalmente, todas las cadenas muestran la misma estructura general de las regiones de marco conservadas relativamente (FR) unidos mediante tres regiones hipervariables, que también se llaman regiones determinantes complementarias o CDRs. Las CDRs de las cadenas pesada y ligera de cada par están usualmente en alineación con las regiones de marco conservadas, permitiendo la unión a un epítipo específico. En general, del N-terminal a C-terminal, tanto las cadenas ligera como pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La determinación de aminoácidos para cada dominio está, en general, de acuerdo con las definiciones de las Secuencias de Proteínas de Interés inmunológico, Kabat et al., National Institutes of Health, Bethesda, MO, 5ª ed., NIH Publ. No. 91 - 3242, 1991; Kabat, Adv Prot Chem, 32:1 - 75, 1978; Kabat et al., J Biol Chem, 252: 6609 - 6616, 1977; Chothia et al., J Mol Biol, 196:901 - 917, 1987; y Chothia et al., Nature, 342: 878 - 883, 1989.

Los anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente invención pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpos Fab, fragmentos de anticuerpos F(ab)₂, fragmentos de anticuerpos Fv (por ejemplo, V_H o V_L), fragmento de anticuerpos de la cadena sencilla Fv y fragmentos de anticuerpos dsFv. Además, las moléculas de anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención pueden ser anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos quiméricos. En algunas realizaciones, las moléculas de anticuerpo son anticuerpos monoclonales, completamente humanos. Los anticuerpos monoclonales abarcan anticuerpos obtenidos a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para las mutaciones posibles de origen natural que pueden estar presentes en cantidades pequeñas. Los anticuerpos monoclonales altamente específicos, que están dirigidos contra un único sitio antigénico. Los anticuerpos

monoclonales son ventajosos porque se pueden sintetizar mediante un cultivo de hibridoma, esencialmente sin contaminación por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por estar entre una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe considerar como la producción que requiere el anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular.

5 Los anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier región de anticuerpo variable, maduro o no procesado unido a cualquier región de inmunoglobulina constante. Si una región variable de cadena ligera está unida a una región constante, preferiblemente es una cadena kappa. Si una región variable de cadena pesada está unida a una región constante, preferiblemente es una región constante gamma 1, gamma 2, gamma 3 o gamma 4 humana, más preferiblemente, gamma 1, gamma 2 or gamma 4 y even more preferiblemente gamma 1 o gamma 4.

15 En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales totalmednte humanos dirigidos contra, por ejemplo, NKG2D o DAP10 se generan usando ratones transgénicos que llevan partes de sistema inmune humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos, que se pueden mencionar en el presente documento, como ratones "HuMAb", contienen el gen de la inmunoglobulina humana miniloci que codifica las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada humana sin disposición (mu y gamma) y la cadena ligera kappa, conjuntamente con las mutaciones dirigidas que inactivan los loci de la cadena murina mu y kappa endógena. De acuerdo con lo anterior, los ratones muestran una expresión reducida de IgM o kappa de ratón, y en respuesta a la inmunization, los transgenes introducidos de cadena pesada y ligera humanos sometidos a cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos de alta afinidad IgG/kappa monoclonales. La generación de los anticuerpos completamente humanos en ratones HuMAb se conoce comúnmente en la técnica

25 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler et al., Nature, 256: 495, 1975, o mediante otros procedimientos bien conocidos, desarrollados posteriormente. En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán de manera específica a la proteína usada para la inmunización. De manera alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro. Los linfocitos se fusionan después con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietien glicol, para formar una célula de hibridoma. Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el desarrollo o supervivencia de las células no fusionadas, parentales de mieloma. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas de manera típica incluirán hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), dichas sustancias evitan el crecimiento de de células deficientes en HGPRT.

40 El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se desarrollan se ensayan para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos mediante células de hibridoma se pueden determinar mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) o mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo o mediante transferencia de Western. Después se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y / o actividad deseada, los clones se peden suclonar mediante procedimientos de dilución limitantes y se desarrollan mediante procedimientos convencionales. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen por ejemplo, medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar in vivo como tumores de ascites en un animal: Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de manera adecuada del medio de cultivo, el fluido de ascites, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tal como, por ejemplo, proteína A-Sepharosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

50 El ADN que codifica anticuerpos monoclonales o fragmento de anticuerpos se aísla fácilmente y se secuencia usando y procedimientos convencionales. Las células de hibridoma sirven como una fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped tales como células *E. coli*, células COS de simio, células T 293 humanas, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

60 Anticuerpos o fragmentos de anticuerpos también se pueden aislar a partir de genotecas de fago de anticuerpos generada usando técnicas bien conocidas, con o sin el uso de recomposición de cadena así como infección de combinación y recombinación in vivo como una estrategia para construir genotecas de fago muy grandes. De este modo, estas técnicas son alternativas viables para las técnicas de hibridoma de anticuerpo monoclonal para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

65 Las variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina están abarcadas por la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de

aminoácidos mantengan al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%,90%,95%, y lo más preferiblemente el 99% de la secuencia. En particular, se contemplan reemplazos de aminoácidos conservadores. Los reemplazos conservadores son los que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que se relacionan en sus cadenas laterales. Si un cambio de aminoácidos da como resultado un péptido funcional se puede determinar fácilmente ensayando la actividad específica del derivado de polipéptido. Los fragmentos (o análogos) de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina, se pueden preparar fácilmente por los expertos en la técnica. Los extremos amino- y carboxi- de los fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales se pueden identificar mediante comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y / o de aminoácidos con las bases de datos de secuencias públicas o registradas. Preferiblemente, se usan procedimientos de comparación por ordenador para identificar los motivos de secuencia o predecir los dominios de conformación de proteína que se producen en otras proteínas de estructura conocida y / o función. Se conocen los procedimientos para identificar las secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional. Los motivos de secuencia y conformaciones estructurales se pueden usar para definir los dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la invención.

En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos se realizan de manera que: (1) reduzcan la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reduzcan la susceptibilidad a oxidación, (3) alteren la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteren las afinidades de unión, y / o (4) confieran o modifiquen otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos.

En general, los anticuerpos anti-NKG2D para su uso de acuerdo con la presente invención muestran una afinidad (Kd) para NKG2D humano que es al menos igual al de los ligandos de NKG2D solubles. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a NKG2D humano con afinidad nanomolar o, incluso más preferiblemente, afinidad picomolar. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a NKG2D humano con un Kd de menos de aproximadamente 100 nM, 50 nM, 20 nM, 20 nM, o 1 nM.

En algunas realizaciones, los anticuerpos útiles incluyen los que reducen la interacción entre NKG2D humano y uno o más de MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, y ULBP4. Tales anticuerpos de bloqueo se pueden identificar usando ensayos de competición convencionales.

II. Procedimientos de tratamiento

En un aspecto, el agente (por ejemplo, un anti-NKG2D mAb o fragmento de mAb) es un agente que se demuestra que es eficaz en la mejora de RA en un modelo aceptable de RA, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.414.218 y la publicación de Patente de Estados Unidos N° 20030005469 (los principios y modelos relacionados de describen en, por ejemplo, Wooley, P. H., *Animal Models of Arthritis*, eds. J. H. Klippel y P. A. Oieppe, Mosby Publishers (Londres), 1998; Erning et al., *Arthritis Res*, 4 Suppl 3:S133-40, 2002; Holmdahl et al., *Ageing Res Rev*, 1 (1):135-47, 2002; Anthony et al., *Clin Exp Rheumatol*, 17(2): 240 - 4,1999; Ourie et al., *Clin Immunol Immunopathol*, 73 (1) : 11 - 8,1994; y Muller-Ladner et al., *Drugs Today (Barc)*, 35(4-5):379-88, 1999). En un aspecto adicional, el agente es un anticuerpo que es capaz de reducir de manera detectable la activación de NKG2D inducida por ligando de los leucocitos de expresión de NKG2D y / o alteración de la expansión de células NKG2D+ T o células NK (por ejemplo, alteración de la expansión y / o función de las células T CD8+) (por el contrario, por ejemplo, al menos algunos de los anticuerpos descritos en la publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040115198), sin empobrecimiento de manera significativa tales células (por ejemplo, provocando una reducción de aproximadamente el 10% o menos de tales células cuando se compara con un control adecuado). En un aspecto, el procedimiento da como resultado una modulación de uno o más biomarcadores de una manera consistente con el tratamiento o prevención (según sea aplicable) de RA (por ejemplo, IL-6 de suero, TNF R, IL-2R, CD4 suprimido, CD8 suprimido, y / o proteína C reactiva). En otro aspecto, la práctica del procedimiento da como resultado una reducción detectable de inflamación sinovial en las articulaciones periféricas del paciente / huésped. En un aspecto, el procedimiento da como resultado la prevención del deterioro radiográfico y mejora de la función física en el paciente o huésped como se muestra mediante, por ejemplo, una reducción en la progresión radiográfica en el paciente o huésped, reducción de la inflamación y articulaciones sensibles (como se determina mediante criterio analítico aceptable), y / o mejora de la calidad de vida de manera significativa (por ejemplo, como se determina mediante una reducción en las puntuaciones de incapacidad en el Cuestionario De Evaluación de salud de RA). Un modulador de NKG2D se puede administrar a un paciente como una sola dosis que comprende una cantidad eficaz de dosis única para prevenir o tratar un síndrome inflamatorio o autoinmune, o en una serie de dosis por fases, que conjuntamente comprenden una cantidad eficaz de para prevenir o tratar el síndrome. Una cantidad eficaz de un modulador de NKG2D se refiere a la cantidad de modulador que, cuando se administra en una única dosis o el agregado de dosis múltiples, o como parte de cualquier otro tipo de régimen de tratamiento definido, produce a una mejora estadística cuantificable en resultado, como se evidencia mediante al menos un parámetro clínico asociado al síndrome. Una cantidad eficaz de un modulador de NKG2D puede ralentizar la progresión de una enfermedad cuando se compara con los pacientes que no reciben el modulador de NKG2D.

Se entenderá que la cantidad eficaz del modulador de NKG2D, así como el régimen de dosificación global, puede variar de acuerdo con la enfermedad y el estado clínico del paciente, que, a su vez se puede reflejar en uno o

más parámetros clínicos tales como las puntuaciones de enfermedad clínicamente aceptadas. Por ejemplo, para artritis reumatoide, la gravedad de la enfermedad y / o resultado de tratamiento, se puede evaluar controlando el número de articulaciones inflamadas; dolor; movilidad; y / o la puntuación de enfermedad oficial ACR 20/50 ó 70. Para la diabetes Tipo 1, gravedad de enfermedad y / o resultado de tratamiento se puede evaluar mediante la medición de los niveles de glucosa en sangre o sus variaciones, niveles de Hb1 C, y similares. Para la esclerosis múltiple, se puede determinar la inflamación de cerebro mediante el escaneo del cerebro. Para el rechazo de trasplante hematopoyético, se puede evaluar la gravedad de la enfermedad (fallo de trasplante) y / o resultado de tratamiento mediante la evidencia de neutropenia prolongada, trombocitopenia, y dependencia de la transfusión de glóbulos rojos en pacientes que se han sometido a acondicionamiento mieloablativo, y mediante incapacidad para observar el quimerismo en pacientes que se han sometido a acondicionamiento no mieloablativo. En general, los efectos detectables en el resultado del tratamiento que usan los procedimientos y composiciones de la presente invención incluyen una disminución en la necesidad de otros tratamientos (incluyendo, por ejemplo, una disminución en la cantidad de y / o duración de otros fármacos o tratamientos), una disminución en el número y / o duración de estancias en hospital, una disminución de la pérdida de días de trabajo debido a enfermedad, y similares. Se entenderá además que la cantidad eficaz se puede determinar por los expertos en la técnica mediante experimentación de rutina, mediante la construcción de una matriz de valores y ensayando los puntos diferentes en la matriz. Se divulga la administración combinada de uno o más agentes adicionales en conexión con un modulador de NKG2D. Se entenderá que, en las realizaciones que comprenden la administración de combinaciones de un modulador de NKG2D con otros agentes, la dosificación del modulador de NKG2D puede por sí mismo comprender una cantidad eficaz y el (los) aumentar agente (s) adicional (es) pueden además aumentar el beneficio terapéutico al paciente. De manera alternativa, la combinación del modulador de NKG2D y el segundo agente puede comprender conjuntamente una cantidad eficaz para prevenir o tratar el síndrome. También se entenderá que se pueden definir cantidades eficaces en el contexto de regímenes de tratamiento particular, incluyendo, por ejemplo, programación y número de administraciones, modos de administraciones, formulaciones, etc.

En algunas realizaciones en las que el síndrome asociado a NKG2D es diabetes Tipo 1, el agente adicional abarca uno o más de un agente que promueve el crecimiento de células beta pancreáticas o potencia el trasplante de células beta, tal como, por ejemplo factores de crecimiento de células beta o de supervivencia o anticuerpos inmunomoduladores. En algunas realizaciones en las que el síndrome asociado a NKG2D es artritis reumatoide, el agente adicional es uno o más de metotrexato; un anticuerpo anti-TNF- α ; una proteína de fusión TNF- α receptor-Ig un anticuerpo anti-IL-15, un fármaco antiinflamatorio no esteroide (NSAIO), y un fármaco antirreumático que modifica la enfermedad (OMARO). Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente biológico tal como un agente anti-TNF (por ejemplo, ENBREL®), infliximab (REMICAOE®) y adalimumab (HUMIRA®) o rituximab (RITUXAN®). En algunas realizaciones en las que el síndrome asociado a NKG2D es rechazo de trasplante hematopoyético, el (los) factor (es) de crecimiento hematopoyético (s) (por ejemplo, eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF, IL-3, EL- 11, trombopoyetina, etc.) o antimicrobiano (s) (por ejemplo, antibiótico, antiviral, antifúngico) se puede administrar como una terapia adjunta. En algunas realizaciones en las que el síndrome asociado a NKG2D es psoriasis, el agente adicional es uno o más de de tar y sus derivados, fototerapia, corticosteroides, Ciclosporina A, análogos de la vitamina D, metotrexato, inhibidores de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK) así como agentes biológicos tales como agentes anti-TNF-alfa y RITUXAN®. En algunas realizaciones en las que el síndrome asociado a NKG2D -es una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) tal como, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, el agente adicional es uno o más de aminosalicilatos, corticosteroides, inmunomoduladores, antibióticos, o agentes biológicos tales como REMICADE® y HUMIRA®.

III Formulaciones farmacéuticas y Modos de Administración

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden los moduladores de NKG2D también pueden comprender uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento o prevención de un síndrome como en la reivindicación 1. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualesquiera y todos los disolventes y, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes que retrasan la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles con un modulador de NKG2D o composición o combinación relacionada usada de acuerdo con la invención. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como una combinación de los mismos. En muchos casos, puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, o cloruro de sodio en tal composición. Las sustancias farmacéuticamente aceptables también cantidades menores de sustancias auxiliares tal como agentes humectantes o agentes emulsionantes, conservantes o tampones, que de manera deseable potencian la vida útil o eficacia del modulador del modulador de NKG2D, composición, o combinación relacionada. De manera adecuada para los vehículos y otros componentes de composiciones farmacéuticas se determina basándose en la falta de un impacto negativo significativo en las propiedades biológicas deseadas del modulador de NKG2D, composición, o combinación relacionada. Las composiciones de modulador de NKG2D, composiciones, o combinaciones relacionadas usadas de acuerdo con la invención pueden estar en una diversidad de formas adecuadas. Tales formas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y

sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, emulsiones, microemulsiones, comprimidos, pastillas, polvos, liposomas, dendrímeros y otras nanopartículas (véase, por ejemplo, Baek et al., *Methods Enzymol*, 362: 240 - 9, 2003; y Nigavekar et al., *Pharm Res*, 21: 476 - 83, 2004), micropartículas, y supositorios. La forma óptima depende del modo propuesto de administración, la naturaleza de la composición o combinación, y de la aplicación terapéutica. Las formulaciones también pueden incluir, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidra, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbocera (polietileno glicoles de diversos pesos moleculares), geles semi-sólidos, y mezclas semi-sólidas que contienen carbocera. Puede ser apropiada cualquiera de las mezclas anteriores en los tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre que el ingrediente activo en la formulación no esté inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también, por ejemplo, Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J Pharm Sci Technol*, 52: 238 - 311, 1998, y las citas en el documento para información adicional relacionada con los excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

Las composiciones de moduladores de NKG2D también incluyen composiciones que comprenden cualquier combinación adecuada de un péptido modulador de NKG2D y una sal adecuada del mismo. Cualquier sal adecuada, como una sal de metal terreo alcalino en cualquier forma adecuada (por ejemplo, una sal tampón), puede usarse en la estabilización de los moduladores de NKG2D (preferiblemente la cantidad de sal es tal que se evita la oxidación y/o precipitación del modulador de NKG2D). Las sales adecuadas incluyen típicamente cloruro sódico, succinato sódico, sulfato sódico, cloruro potásico, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, y cloruro cálcico. También se proporcionan composiciones que comprenden una base y moduladores de NKG2S. En otros aspectos, la invención proporciona una composición de modulador de NKG2D que carece de una cantidad tónica de cualquier sal.

Una composición para uso farmacéutico también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-80), estabilizantes (por ejemplo, azúcares o aminoácidos sin proteínas), conservantes, fijadores de tejido, solubilizantes, y / u otros materiales adecuados para la inclusión en una composición farmacéutica. Los ejemplos de componentes adecuados también se describen en, por ejemplo, Berge et al., *J Pharm Sci*, 6661 :1 - 19, 1977; Wang y Hanson, *J Parenteral Sci Tech*, 42:S4-S6, 1988, Patente de Estados Unidos números. 6.165.779 y 6.225.289; y otros documentos citados en los documentos. Tal composición farmacéutica también puede incluir conservantes, antioxidantes, u otros aditivos conocidos por los expertos en la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Urquhart et al., *Lancet*, 16: 40 367, 1980; Lieberman et al., *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS-DISPERSE SYSTEMS*, 2ª ed., vol. 3, 1998; Ansel et al., *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS & DRUG DELIVERY SYSTEMS*, 7ª ed., 2000; Martindale, *THE EXTRA PHARMACOPEIA*, 31ª ed.; Remington's *PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 16th-20th editions; *THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS*, Goodman y Gilman, eds., 9th ed., 1996; Wilson y Gisvold's *TEXTBOOK OF ORGANIC MEDICINAL y PHARMACEUTICAL CHEMISTRY*, Delgado y Remers, eds., 10ª ed., 1998; y las Patentes de Estados Unidos Números. 5.708.025 y 5.994.106. Los principios de formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables también se describen en, por ejemplo, Platt, *Clin Lab Med*, 7: 289 - 99, 1987; Aulton, *PHARMACEUTICS: THE SCIENCE OF DOSAGE FORM DESIGN*, Churchill Livingstone, NY, 1988; *EXTEMPORANEOUS ORAL LIQUID DOSAGE PREPARATIONS*, CSHP, 1998, y "Drug Dosage," *J Kans Med Soc*, 70(1): 30 - 32, 1969. Los vehículos farmacéuticamente aceptables particularmente adecuados para la administración de vectores se describen en, por ejemplo, Solicitud de Patente Internacional WO 50 98/32859. En un aspecto ejemplar, el compuesto activo o combinación se prepara con un vehículo que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Están patentados muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones o se conocen de manera general por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, 1978.

En otro aspecto, las composiciones propuestas para la administración oral, por ejemplo, se pueden formular con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también pueden estar contenidas en cápsulas de gelatina duras o blandas, comprimirse en comprimidos, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con excipientes y usarse en la forma de comprimidos que se pueden ingerir, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto usado en la invención mediante la administración distinta de la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o administrar de manera conjunta el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

Las composiciones de modulador de NKG2D, composiciones relacionadas, y composiciones de combinación se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada, tal como una vía oral, mucosal, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intertumoral, intratumoral, o tópica. También se puede administrar de manera continua mediante una minibomba u otro dispositivo adecuado. El

anticuerpo u otro modulador de NKG2D en general se administrará mientras la afección patológica esté presente, siempre que el anticuerpo provoque que el empeoramiento de la afección se detenga o se mejore. El anticuerpo u otro modulador de NKG2D will en general se administrará como parte de una composición farmacéuticamente aceptable como se describe en otra parte en el presente documento. El anticuerpo se puede administrar mediante cualquier vía adecuada, pero de manera típica se administra por vía parenteral en formulaciones de dosificación unitaria que contienen vehículos farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, y similares (estabilizantes, agentes disgregantes, anti-oxidantes, etc.). El término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye, técnicas subcutáneas, intravenosas, intraarteriales, intramusculares, intrasternales, intratendinosas, intraspinales, intracraneales, intratorácicas, de infusión y administración intraperitoneal. Lo más comúnmente, un anticuerpo se administró por vía intravenosa o subcutánea. Las vías de inyección también incluyen inyección en el músculo (intramuscular, IM); inyección bajo la piel (subcutánea, SC); inyección en una vena (intravenosa, IV); inyección en la cavidad abdominal (intraperitoneal, IP); y otra administración en / a través de la piel (intradérmica, ID, usualmente mediante inyecciones múltiples). Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar de manera adicional ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no se consideran limitantes del su alcance.

Ejemplo 1

Ensayo para la activación de NKG2D

Células NK humanas activadas con IL-2 se cultivaron conjuntamente con un cultivo de células diana apropiado marcado con ^{51}Cr , tal como células Ba/F3 de ratón que se habían transfectado con ADNc que codifica MICA humano en condiciones in en las que el polipéptido de MICA se expresa; y, como células control, las mismas células diana que no se han transfectado. La liberación de ^{51}Cr se controla para indicar la lisis de células. La lisis de células que expresan MICA mediante las células NK activadas a niveles por encima de controles indica la activación específica de NKG2D.

Para seleccionar los moduladores de NKG2Ds, las células NK activadas se incuban con agentes candidatos antes de la exposición a las células diana marcadas con ^{51}Cr . Los compuestos que disminuyen de manera significativa la destrucción de las células diana que llevan el ligando de NKG2D se identifican y se evalúan posteriormente.

Ejemplo 2

Ensayo para la internalización de NKG2D

Se cultivan células que expresan NKG2D humano a 37°C durante una o más horas en la presencia de un anticuerpo anti-NKG2D marcado con biotina. Como control, las células NKG2D+ células se cultivan con el anti-NKG2D marcado con biotina a 4°C ien la presencia del 0,05% de azida de sodio para evitar la internalización. Se lavan las células para retirar el exceso de anticuerpo, y después se tiñen con estreptavidina marcada con tinte fluorescente para detectar el anticuerpo NKG2D conjugado con biotina, después se evalúa la internalización mediante microscopía fluorescente o citometría de flujo. Una disminución en la cantidad de NKG2D en la superficie celular con el anticuerpo anti-NKG2D marcado con biotina a 37°C comparado con las células incubadas con el anticuerpo anti-NKG2D marcado con biotina a 4°C es un indicador de la internalización. Esto además se puede verificar mediante la fijación y permeabilización de las células y tinción con un anticuerpo de segunda etapa marcado con tinte fluorescente y permeabilización de las células y tinción con un anticuerpo de segunda etapa marcado con tinte fluorescente que detectará el anticuerpo primario anti- NKG2D. Si se internaliza, el anticuerpo de segunda etapa detectará el anticuerpo anti-NKG2D primario en el interior de las células cultivadas a 37°C , como se visualiza mediante microscopía fluorescente.

Ejemplo 3

El bloqueo de NKG2D evita la Diabetes Autoinmune en ratones

Se realizaron los siguientes experimentos para ensayar el efecto de bloqueo de NKG2D en el desarrollo de la diabetes de Tipo I en un sistema de modelo animal, el ratón NOD (Ogasawara et al., Immunity, 20: 757 - 767, 2004).

Ratones, Reactivos, Citoquinas y Anticuerpos

Se compraron ratones NOD de Taconic (Germantown, NY). Se compraron ratones NOD.scid de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME). Se han descritoos ratones 8.3 TcR-transgénicos NOD (Verdaguer et al., J Exp Med, 186: 5 1663 - 1676, 1997). Todos los ratones se mantuvieron en condiciones sin patógenos en la instalación de animales UCSF y se realizaron los experimentos de acuerdo con las guías del Comité UCSF de Investigación animal. Se diagnosticó diabetes cuando el nivel de glucosa en sangre era mayor que 300 mg/dl en

dos mediciones consecutivas. Se midieron los niveles de glucosa en sangre usando un control de glucosa en sangre (Walgreen's, Oeerfield, IL).

5 Se generaron clones Anti-ratón NKG2D mAb, CX5 y CX6 (isotipo IgG1 de rata), como se describe en (Ogasawara 10 et al., Immunity, 18: 41 - 51, 2003) y se obtuvo el clon anti-ratón NKG2D mAb 191004 (isotipo IgG2a de rata) de R&D Systems (Minneapolis, MN). Todos los anti-NKG2D mAbs reconocen el dominio extracelular de NKG2D y bloquean de manera eficaz la unión de NKG2D a sus ligandos. Para la inyección in vivo, se utilizó un anticuerpo CX5 purificado que no contenía endotoxina detectable (0,3 pg/inyección). Se compraron ratas control IgG de Sigma (St. Louis, MO). Anti-ratón pan RAE-1 mAb (clon 186107, isotipo de rata IgG2b) se une a RAE-1 α , β , δ γ , y ϵ . Se produjeron tetrámeros NRP-V7/H-2K^d y TUM/H-2K^d (control) como se describe en (Amrani et al., Nature, 406: 739 - 742, 2000) o a partir de la instalación de del tetrámero NIH (Atlanta, GA). El tetrámero TUMI H-2Kd no se unió a las células NRP-V71 H-2Kd tetrámero positivas. Se compraron otros anticuerpos de BD PharMingen o eBioscience (San Diego, CA).

15 *Preparación de células de islotes de Páncreas*

Se aislaron islotes de ratón como sigue. En resumen, se inyectaron 0,3 mg/ml de colagenasa P (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) en el conducto pancreático. Se retiraron los páncreas distendidos y se incubaron a 37°C durante 13 - 17 min Se purificaron los islotes mediante centrifugación en gradientes de Eurocollin-Ficoll que comprendía cuatro densidades diferentes (1,108, 1,096, 1,069, y 1,037). Después de la centrifugación, se recogieron y se lavaron los fragmentos de tejido a 1,069/1,096 Después de esto, para obtener las células individuales, se disociaron las células de islotes mediante solución de disociación de células no enzimática (Sigma, St. Louis, MO).

25 *Inmunofluorescencia, Citometría de flujo y Microscopía*

Para la detección de NKG2D, se tiñeron las células (-1×10^6) con 0,25 μ g de anti-NKG2D mAb biotinilado o marcado con PE (clon 191004). Se tiñeron conjuntamente las células con anti-CD8 conjugado a FITC, anti-CD8 conjugado a APC, antiCD44 conjugado a FITC, o anti-Ly-6C conjugado a FITC. Para detectar RAE-1, se tiñeron las células con un anti-pan RAE-1 mAb biotinilado que reconoce las cinco proteínas RAE-1 conocidas (Lodoen et al., JExp Med, 197: 1245 - 1253, 2003) o anti-RAE-1 mAb (clon CX1) (Ogasawara et al., supra, 2003). Se usó estreptavidina conjugada a PE o estreptavidina conjugada a APC para detectar mAbs biotinilados. Se incubaron las células con mAbs durante 20 min y se lavaron con PBS que contenía NaN₃ al 0,01%. Se analizaron las células usando un FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA) o un citómetro Personal Guava® con software Guava ViaCount™ y Guava Express™ (Hayward, CA). Se activaron las poblaciones de linfocitos viables basándose en los perfiles de dispersión anteriores y laterales y mediante la pérdida de tinción de yoduro de propidio. Para la inmunohistoquímica, se congelaron de manera rápida los órganos en medio, OCT y se prepararon las secciones y se tiñeron y mediante técnicas convencionales. Se adquirieron las imágenes usando un microscopio Deltavision (Applied Precision, Issaquah, WA) y se llevó a cabo la desconvolución por ordenador usando el software softWoRx (Applied Precision).

RT-PCR Cuantitativa

45 Se llevó a a cabo (tiempo real) PCR usando un instrumento ABI 7700 (Applied Biosystems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se compraron sondas en Applied Biosystems. Se describieron anteriormente sondas y cebadores específicos de RAE-1 (Ogasawara et al., supra, 2003). Los cebadores universales usados para detectar todas las transcripciones de RAE-1 conocidas eran: 5'-ctagtgcac ctgggaattc a-3' no codificante (SEC ID N°:6); 5'-catcattagc tgatctccag ctca-3' no codificante (SEO ID NO:7), y la sonda era 5'-6-FAM-catcagtgc agttactct tcaccttca cacagaga-Tamra-3' (SEC ID N°:8). Se tartó el ARN total con ADNasa I, y después se sintetizó ADNc de primera cadena usando cebadores de hexámeros al azar. Las condiciones de ciclación para PCR de tiempo real fueron: 50°C durante 10 min, seguido de 50 ciclos a 95°C durante 30 segundos, y 60°C durante 2 min. Se analizaron los datos mediante el uso del Software de Análisis de Detector de Secuencias v1.7 (Applied Biosystems). Se realizó el análisis estadístico usando un ensayo t de dos muestras.

55 *Estudios de Transferencia adoptiva - Células T NOD transferidas en ratones NOO.scid*

Se aislaron células T de bazo y ganglios linfáticos de ratones NOD diabéticos de 16 semanas de edad mediante aislamiento magnético de células usando MACS (Miltenyi Biotec Inc., Alemania). Se enriquecieron células T (pureza > 98%) mediante selección negativa con empobrecimiento de células C019⁺, C024⁺, y MHC clase II+. Aproximadamente 7,5 $\times 10^6$ de células T se transfirieron en ratones NOD.scid de 4 - 5 semanas de edad mediante la inyección en la vena de la cola. Se examinaron semanalmente los niveles de glucosa en sangre en los ratones transferidos de manera adoptiva.

65 *Estudios de Transferencia adoptiva de células T de 8.3 TcR-transgénicos en ratones NOD*

Se realizó la transferencia de células T como se ha descrito previamente (Serra et al., Proc Natl Acad Sci USA, 99: 15566 - 15571, 2002). En resumen, se aislaron Linfocitos de 8.3 TcR-transgénicos a partir de ganglios linfáticos y bazo. Se enriquecieron las células T (pureza > 95 %) mediante la selección negativa mediante aislamiento magnético usando un MACS. Aproximadamente 1×10^7 de células T marcadas con CFSE (5 μ M) se transfirieron en ratones NOD de 10 semanas de edad mediante inyección en la vena de la cola el día 0. Se inyectó Anti-NKG2D 10 mAb (CX5) o clg (200 μ g/inyección) en los ratones NOD receptores los días -1, +1 y +5.

Expresión de RAE-1 en el páncreas de ratones NOD pre-diabéticos

Para investigar si las interacciones entre NKG2D y RAE-1 están implicados en el desarrollo de diabetes autoinmune, se desarrolló en un ensayo de RT-PCR cuantitativo para detectar las transcripciones de genes RAE-1 conocidos. Se detectaron las transcripciones de RAE1 en los páncreas de ratones NOD pre-diabéticos de fase tardía (12 - 16 semanas de edad), pero no en los páncreas de ratones BALB/c de edad coincidente (Fig. 1a). Aunque las transcripciones de RAE-1 comparativamente menos pronunciadas también se detectaron en los páncreas de ratones NOD de 4 - 6 semanas de edad. RAE-1 también se detectó en los páncreas de ratones adultos NOD.scid (que carecían de células B y T) (Fig. 1b). Conjuntamente, estos resultados indicaron que la expresión de RAE es independiente de una respuesta autoinmune en curso. Para examinar si RAE-1 se regula hacia arriba de manera selectiva en el páncreas con la edad, se compararon los niveles de transcripciones de RAE-1 en un órgano particular de ratones NOD jóvenes con aquellos en el mismo órgano en ratones NOD prediabéticos de fase tardía. Mediante este criterio, se incrementó RAE-1 relativamente más en el páncreas de los ratones prediabéticos con la edad, comparados con el hígado, bazo, riñón y timo (Fig. 1c).

Para determinar si las proteínas de RAE-1 se expresan en la superficie celular, se aislaron células pancreáticas a partir de ratones NOD prediabéticos y no diabéticos BALB/c. Las células aisladas mediante digestión enzimática del páncreas se tiñeron con anti-RAE-1 y anti-CD45 mAb (que distingue la infiltración de células CD45⁺ hematopoyéticas de las células de los islotes pancreáticos CD45 no hematopoyéticas). Las células de linaje CD45 hematopoyéticas positivo se detectaron infiltrando el páncreas de NOD prediabéticos, pero no el páncreas de BALB/c no diabéticos (Fig. 1d). Se detectaron las proteínas de RAE-1 predominantemente sobre las células pancreáticas no hematopoyéticas CD45 negativo en ratones NOD, pero no se encontró en las células pancreáticas en ratones BALB/c. Usando técnicas de separación de gradiente de densidad, se aislaron los islotes a partir de páncreas de NOD y también se recogieron de ganglios linfáticos (PLN) de estos ratones. Se tiñeron suspensiones de células individuales de los islotes aislados y se tiñeron las PLN con anti-RAE-1 y anti-CD45 mAb y se analizaron mediante citometría de flujo. RAE-1 estaba presente a niveles inferiores en la mayoría de las células de los islotes de CD45-, pero no en las células CD45⁺ hematopoyéticas en el páncreas o PLN (Fig. 1d, e). Estos resultados indicaban que las transcripciones y proteínas de RAE-1 estaban presentes en el páncreas de ratones NOD pre-diabéticos, pero no en ratones BALB/c no diabéticos, e indicaban que la expresión de RAE-1 puede preceder a la aparición de la enfermedad y contribuir a la progresión de la enfermedad en ratones NOD.

Células T CD8+ que infiltran el páncreas de NOD expresan NKG2D

Ya que el desarrollo de diabetes en ratones NOD requiere tanto células CD4⁺ como T CD8⁺, se analizó la expresión de NKG2D sobre las células T aisladas de los tejidos inmunes periféricos y sobre los leucocitos de infiltración en los páncreas de ratones NOD. Como se muestra en la in Fig. 2a, se detectó NKG2D en un subconjunto de células T CD8⁺ que infiltran el páncreas in ratones NOD de 10 y 25 semanas de edad. Los porcentajes de células T CD8⁺ NKG2D⁺ que infiltran el páncreas con progresión de la enfermedad (Fig. 2a). Se detectó una fracción más pequeña de células T CD8⁺ NKG2D⁺ en las PLN y bazo (Fig. 2a, b). Además, células T CD8⁺ NKG2D⁺ en el páncreas y PLN se encontró que expresan altos niveles de CD44, pero no de Ly6C (Fig. 2b). También se observó una población de leucocitos CD8⁺ NKG2D⁺ leucocitos (que no expresaban CD3) en los leucocitos que infiltran el páncreas de NOD (Fig. 2a) y muchas de estas células expresaban de manera conjunta antígenos de células NK cell y mieloides. Como se ha indicado para las razas de ratones no diabéticos normales (Jamieson et al., Immunity, 17: 19 - 29, 2002), no se detectó NKG2D en células T CD4⁺ o en células B220⁺ B células en el páncreas o en los tejidos linfoides periféricos de o bien ratones NOD de 10 semanas o 25 semanas de edad.

Los estudios recientes revelaron que una proporción sustancial de células T autorreactivas CD8⁺ en ratones NOD reconocen un péptido de la proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa (IGRP) que se presenta por H-2K^d. Un péptido de mimotopo, NRP-V7 (KYNKANVFL, establecido como la SEQ ID N°:5), funciona como un super-agonista en los ratones NOD que expresan 8.3 TcR. Células T NRP-V7-reactivas CD8⁺ se acumulan en el páncreas de ratones NOD y juegan un papel crítico en la diabetogénesis. Se tiñeron de manera conjunta células T CD8⁺ y PLN en el páncreas con NRP-V7/H-2Kd tetrámeros y anti-NKG2D. Casi todas las células T NRPV7/H-2Kd tetrámero positivo CD8⁺ que infiltran el páncreas expresaron NKG2D y CD44^{alto} (Fig. 2c). De manera similar, las células T NKG2D⁺ CD8⁺ en el páncreas eran CD44^{alto}, pero Ly-6C⁺ (Fig. 2b), un fenotipo consistente con las células T CD8⁺ efectoras (Cerwenka et al., J Immunol, 161: 97 - 105, 1998). De manera notable, pocas células T CD8⁺ NRP-V7/H-2K^d tetrámero positivo se detectaron en las PLN (Fig. 2c). La inmunohistoquímica demostró que las células T CD8⁺ NKG2D⁺ se acumulan en los islotes de ratones pre-diabéticos NOD, cerca de las células beta que producen insulina (Fig. 2d). Además de las células T CD8⁺, un

subconjunto de las células C068 positivo (macrofagos) en el páncreas también expresó NKG2D (Fig. 2d).

Tratamiento con anti-NKG2D mAb neutralizante in vivo evita la diabetes autoinmune

5 La expresión de NKG2D sobre las células T CD8⁺ y ligandos de NKG2D sobre los islotes prediabéticos indicaron un papel para estas moléculas en la diabetogénesis. Se ensayó esta hipótesis, mediante tratamiento de ratones NOD prediabéticos con un anti-NKG2D mAb neutralizante. El CX5 anti-ratón NKG2D mAb bloquea la unión de NKG2D a sus ligandos, e incubación de células que llevan NKG2D con CX5 da como resultado la modulación e internalización del receptor. De manera importante, el tratamiento de ratones in vivo con CX5 no empobrecieron las células NKG2D⁺ NK o células T CD8⁺. Se trataron ratones NOD con anti-NKG2D mAb de 7 - 25 semanas de edad. Los ratones tratados con diluyente solamente desarrollaron diabetes comenzando a las 15 semanas de edad y todos (n = 7) tenían enfermedad a las 28 semanas (Fig. 3a, b). Por el contrario, ninguno de los ratones NOD tratados con anti-NKG2D (n = 7) desarrolló diabetes a las 30 semanas de edad, aunque el tratamiento con anticuerpo se detuvo 5 semanas antes (Fig. 3a, b).

15 Como un análisis más riguroso, se ensayó el tratamiento de anti-NKG2D mAb para la prevención de la aparición de la enfermedad en ratones pre-diabéticos de 13 semanas de edad con insulinitis establecida. Los ratones de control proporcionados con IgG desarrollaron diabetes comenzando a las 15 semanas de edad. Por el contrario, no se produjo diabetes en cualquiera de los ratones NOD durante las 12 semanas de tratamiento de anti-NKG2D (Fig. 3c, d). De manera notable, la mayoría de los ratones tratados con anti-NKG2D estaban sin enfermedad durante 7 semanas después de la detención de la terapia (Fig. 3c, d). De este modo, el bloqueo de NKG2D evitó la progresión de diabetes no solamente en los ratones jóvenes con insulinitis, pero también en ratones en una prediabetes tardía con la aparición inminente de la destrucción de islotes. Los efectos secundarios de del tratamiento de anti-NKG2D mAb no se observaron o bien mediante un examen bruto o análisis histológico. De este modo, el tratamiento de anti-NKG2D mAb es una terapia eficaz para prevenir la diabetes, al menos mientras se administre un anticuerpo de manera continua.

20 Para examinar el mecanismo de la terapia mediada por anti-NKG2D mAb, se analizaron los leucocitos aislados del páncreas y PLN de Ig de control y ratones NOD tratados con anti-NKG2D mAb. Células T CD8⁺ que expresan conjuntamente NKG2D y los niveles altos de CD44 estaban presentes en el páncreas de ratones tratados con Ig de control. Como se esperaba, la expresión de NKG2D se redujo de manera significativa en las células T CD8⁺, pero la expresión de CD44 era idéntica en el páncreas de ratones tratados con anti-NKG2D mAb comparado con la de los ratones tratados con Ig control (Fig. 4a). Por el contrario, Células T CD8⁺ que expresan NKG2D eran relativamente infrecuentes en las PLN de ratones tratados tanto como control como anti-NKG2D mAb, indicativo de la localización preferencial de las células T CD8⁺ NKG2D⁺ en el páncreas (consistente con los resultados presentados en la in Fig 2 para los ratones no tratados). El análisis inmunohistoquímico de las secciones congeladas de páncreas de ratones tratados con Ig control indicó células T CD8⁺ que expresan NKG2D en el páncreas de ratones NOD de 16 semanas de edad tratados con Ig control (Fig. 4b). Por el contrario, estaban presentes muchas menos células T CD8⁺ en el páncreas sano de los ratones de 16 semanas de edad que se habían tratado durante nueve semanas con antiNKG2D (Fig. 4c).

30 Los leucocitos aislados del páncreas y PLN de ratones NOD tratados con Ig control o anti-NKG2D mAb también se analizaron para determinar la presencia de células T CD8⁺ autorreactivas específicas de antígeno. De manera notable, la infiltración de células T CD8⁺ autorreactivas NRPV7/H-2Kd tetrámero positivo en el páncreas se disminuyó de manera notable (-75%) en los ratones tratados con antiNKG2D mAb (Fig. 4d). La frecuencia de células T CD8⁺ NRP-7/H-2Kd tetrámero positivo también disminuyó en PLN, bazo y sangre periférica de ratones tratados con anti-NKG2D mAb, comparado con los ratones tratados con Ig control (Fig 4d, e). No se detectó NKG2D sobre las células T CD8⁺ en ratones tratados con anti-NKG2D mAb. Debido a que CX5 es un anti-NKG2D mAb no empobrecedor (Véase, La Figura 8), la terapia se contempla para que trabaje mediante modulación del receptor (Véase, La Figura 7) y / o inhibición de unión de ligando. También se examinó la producción de IFN- γ por las células T CD8⁺ aisladas a partir de PLN de ratones tratados in vivo con Ig control o antiNKG2D mAb. Tras la estimulación con PMA y yonomicina in vitro, las células T CD8⁺ IFN- γ se detectaron en ratones NOD tratados con clg, mientras que se observaron menos células T IFN⁺ γ CD8⁺ en ratones sometidos a terapia de anti-NKG2D mAb (Fig. 4f). No obstante, un entendimiento del (de los) mecanismo (s) no es necesario con el fin de realizar y usar la presente invención.

El bloqueo de NKG2D evita la diabetes en ratones NOD.scid que reciben células Transferidas de manera adoptiva de ratones NOD diabéticos

60 Para dirigir si el bloqueo de NKG2D afecta a las células T CD8⁺ efectoras, las células T aisladas de ratones de 16 semanas de edad se transfirieron de manera adoptiva en receptores NOD.scid (que carecían de células T y no desarrollaban diabetes). En el momento de la transferencia, solamente un pequeño porcentaje de las células T CD8⁺ expresaban NKG2D (Fig. 5a). Sin embargo, 5 semanas después de la transferencia se detectaron un número sustancial de células T CD8⁺ NKG2D⁺ en el páncreas, PLN, y bazo en los ratones receptores (Fig. 5a), que sugiere la expansión de células T NKG2D⁺ preexistentes o adquisición de NKG2D sobre las células T

CD8⁺ transferidas. Aproximadamente el 15% de las células T CD8⁺ que infiltran el páncreas en ratones receptores tratados con clg eran NRP-V7/H-2K^d tetrámero positivo, mientras que se encontró de manera significativa que eran menos en los ratones tratados con anti-NKG2D mAb (Fig. 5b, c). NKG2D estaba presente en la mayoría de las células T CD8⁺ NRP-V7/H-2K^d tetrámero positivo autorreactivas en los ratones NOD tratados con Ig control, pero no se detectó en los ratones que recibieron terapia anti-NKG2D (Fig 5c). Aunque la diabetes desarrollada en todos los ratones NOD. scid control que recibían células T de ratones NOD diabéticos, ninguno de los ratones tratados con anti-NKG2D desarrolló diabetes mientras que se sometía a terapia (Fig 5d).

Para determinar si el tratamiento de anti-NKG2D bloqueaba la expansión de células T CD8⁺ patógenas en los ratones receptores NOD.scid, se detuvo el tratamiento de anti-NKG2D mAb después de 8 semanas, cuando habían sucumbido a la enfermedad todos los ratones tratados con Ig control. Cuatro semanas después de la detención de la terapia de anti-NKG2D, la diabetes desarrollada en la mayoría de los ratones NOD.scid que habían recibido células T de donantes NOD diabéticos (Fig. 5d). Además, en ese momento existía evidencia de expansión de células T CD8⁺ NRPV7/H-2K^d tetrámero positivo NKG2D⁺ en los ratones NOD.scid (Fig. 5e). Estos resultados indicaron que el tratamiento de antiNKG2D mAb inhibía la expansión y / o acumulación de células T CD8⁺ NKG2D⁺ en el páncreas. La rápida progresión a diabetes en poco tiempo después de la detención de la terapia indicó que las células T efectoras estaban controladas, en lugar de empobrecidas, durante el período de tratamiento de anticuerpo.

La terapia de Anti-NKG2D mAb evita la expansión de células T CD8+ autorreactivas en el páncreas

El hallazgo de pocas células T CD8⁺ NRP-V7/H-2K^d tetrámero positivo en el páncreas de ratones tratados con anti-NKG2D era consistente con la posibilidad de que la terapia de mAb bloqueaba la expansión de las células T autorreactivas. Para probar directamente esta hipótesis, células T de 8.3 TcR-transgénicos se marcaron con CFSE, transferidas de manera adoptiva a receptores NOD de 10 semanas de edad y se trataron o bien con Ig control o anti-NKG2D mAb (Fig. 6). Antes de la transferencia, células T CD8⁺ donantes de ganglios linfáticos y bazo de ratones NOD 8.3 TcR-transgénicos eran más de > 90 % NRP-V7/H2K^d tetrámero positivo pero no expresaban NKG2D (Fig. 6a). Dos días más tarde, las células T CD8⁺ marcadas con CFSE de 8.3 TcR-transgénicos NOD que infiltran el páncreas de ratones tratados con Ig control expresaron NKG2D (Fig. 6b) y sin embargo ya estaban proliferando, sin dilución de CFSE se observó en las células T transferidas presentes en los ganglios linfáticos pancreáticos o mesentéricos (Fig. 6c). Los días 4 y 8 después de la transferencia, las células T marcadas con CFSE de 8.3 TcR-transgénicos en el páncreas y ganglios linfáticos pancreáticos, pero no en los ganglios linfáticos mesentéricos, de ratones tratados con Ig control mostraron la proliferación extensiva (Fig. 6c). En un contraste sorprendente, no se detectó NKG2D sobre la superficie celular de las células T CD8⁺ transferidas marcadas con CFSE de 8.3 TcR-transgénicos en el páncreas de ratones NOD tratados con anti-NKG2D mAb (Fig. 6b). Además, la expansión de estas células en el páncreas se inhibió sustancialmente comparado con los ratones tratados con Ig control (Fig. 6c). De manera interesante, el tratamiento con antiNKG2D mAb tenía un efecto mucho más profundo en la proliferación de células T marcadas con CFSE de 8.3 TcR-transgénicos que infiltran el páncreas comparado con las células en los ganglios linfáticos. La expansión de las células T endógenas no marcadas con CFSE en el páncreas detectada con NRP-V7/H2K^d tetrámero también se administró mediante tratamiento con anti-NKG2D mAb, comparado con los ratones tratados con Ig control. La cuantificación de la proliferación de las células T transferidas de manera adoptiva de 8.3 TcR-transgénicos que infiltran el páncreas en ratones NOD tratados con Ig control y anti-NKG2D mAb indicaron un efecto profundo de la terapia de anti-NKG2D sobre la expansión de las células T CD8⁺ autorreactivas específicas de antígeno (Fig. 6d).

Los datos indican que RAE-1 está presente en los islotes de páncreas prediabéticos de los ratones NOD y que las células T CD8⁺ autorreactivas que infiltran el páncreas expresan NKG2D. El tratamiento con un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-NKG2D no empobrecedor durante la fase prediabética evitaba completamente la enfermedad mediante la alteración de la expansión y función de las células T CD8⁺ autorreactivas. Estos hallazgos demuestran que NKG2D es esencial para la progresión de la enfermedad y proporciona una nueva diana terapéutica para la diabetes de tipo I autoinmune. Estos datos directamente implican al receptor de NKG2D en el desarrollo funcional de las funciones efectoras de las células T CD8⁺ patógenas e indican que el anti-NKG2D mAb funciona de manera terapéutica para bloquear las señales mediadas por receptor en la ausencia de empobrecimiento de las células flanqueantes.

Ejemplo 4

Modulación de la Expresión de la superficie celular de NKG2D mediante ARNsh

Se realizó el siguiente experimento para examinar el efecto del ARN inhibitor en la expresión de NKG2D. El ADN que codifica NKG2D en un vector que contiene un elemento IRES-eGFP se transfectó de manera estable en células CHO. Se transfectaron después las células que expresan NKG2D transferidas de manera estable (usando Lipofectamina y procedimientos convencionales) con un ADNc que codifica CD8 de ratón (mCD8) y con un plásmido (el vector pCR2.1TOPO de InVitroGen) que contenía un ADNc de 22 pares de bases (bp) (5'-ggatgggact agtacatt cc-3' como se establece en la SEC ID N°:10) homólogo a un segmento de NKG2D humano (denominado

shDNA03). Como un control específico para demostrar la especificidad, células CHO que expresan NKG2D también se transfirieron de manera doble con mCD8 y con un ADNc de 22 pares de bases similar a NKG2D humano pero con 3 nucleótidos mutados (5'-ggatgggatt agtatagatt cc-3' como se establece en la SEC ID N°: 13). Las células en los paneles de la izquierda se transfectaron solamente con el plásmido que contiene el ADNc de CD8 de ratón (mCD8). Las células transfectadas se tiñeron con anticuerpos monoclonales contra CD8 de ratón y contra NKG2D humano y se analizaron mediante citometría de flujo. Se obtuvieron transferencias de puntos bivariadas mostrando la fluorescencia que representa (i) CD8 de ratón contra NKG2D humano y (ii) eGFP (fluorescencia verde intrínseca que se produce a partir de la expresión del vector NKG2D-IRES-eGFP humano) contra NKG2D humano.

Los resultados indicaron, primero, que las células T que expresaban CD8 de ratón sobre la superficie celular se puede detectar fácilmente revelando que se transfirieron con los plásmidos introducidos en las células CHO. Además, la expresión de NKG2D humano sobre las células que expresan el CD8 de ratón no estaba afectada por la co-transfección con el plásmido CD8 de ratón solo o con el plásmido contienen la construcción de NKG2D. Por el contrario, la co-transfección con la secuencia de NKG2D homóloga sustancialmente evitó la expresión de NKG2D.

Ejemplo 5

Modulación de NKG2D de superficie celular mediante el uso de un anticuerpo Monoclonal Anti-NKG2D

Se realizaron los siguientes experimentos para la evaluación de la capacidad de un anticuerpo monoclonal dirigido contra NKG2D para modular la expresión en la superficie celular de NKG2D.

Se tiñó una línea celular de NK humana (NKL) durante 30 min sobre hielo con una IgG control conjugada a biotina (clg bio) o con NKG2D mAb anti- humano de ratón conjugado a biotina (clon 149810 de R&D Systems), se lavó y se incubó una alícuota, y se incubó una alícuota durante toda una noche a 37°C. Las células se tiñeron con estreptavidina conjugada a alofocianina -o bien antes del cultivo (0 h) o después de cultivo (16 h), y y se analizaron posteriormente mediante citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (unidades arbitrarias) de células teñidas con anti-NKG2D antes del cultivo era 186 comparado con 61 después del cultivo, lo que indica una disminución del 67% en la expresión de NKG2D sobre la superficie celular de las células NK tratadas con anti-NKG2D mAb durante 16 horas.

Se cultivaron células NKL durante 16 h a 37°C con o bien IgG o con IgG anti-humano NKG2D de ratón (clon 149810 de R y D Systems). Al final de la incubación, se lavaron las células y se trataron con medio ácido a pH 3,5 durante 15 min para retirar el anticuerpo de superficie. Las células se tiñeron después con anticuerpo anti-NKG2D seguido de anticuerpo secundario de IgG anti-ratón de cabra marcado con PE para detectar NKG2D. La Figura 12 muestra que este anticuerpo anti-NKG2D es eficaz en la estimulación de la internalización de NKG2D de superficie sobre estas células humanas.

Ejemplo 6

El bloqueo de NKG2D evita el rechazo de Injerto de Médula Ósea Parental en ratones F1

Se realizaron los siguientes experimentos para ensayar el efecto del bloqueo de NKG2D en el desarrollo de resistencia (rechazo de injertos de médula ósea parental por los receptores F1) en un sistema de modelo animal, ratones (C57BU6 x BALB/c) F1 (CB6F1).

Ratones

Se compraron ratones C57BU6, BALB/c, y CB6F1 de aproximadamente 6 semanas de edad en el National Cancer Institute Animal Program (Frederick, MD). Se generaron ratones RAE-1 ε transgénicos y se retrocruzaron en el antecedente C57BU6 (Ehrlich et al., observaciones no publicadas). Ratones DAP12-/- en el antecedente C57BU6 (retrocruzados 9 generaciones) se describieron anteriormente (Bakker et al., Immunity, 13: 345 - 353,2000), y se generaron DAP10-/- a partir de células del tronco embrionario C57BU6 (Phillips et al., observaciones no publicadas). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías del Comité UCSF sobre la Investigación de Animales.

Reactivos, Citoquinas y Anticuerpos

Se generó Anti-ratón NKG2D mAb, clon CX5 (isotipo IgG1 de rata mediante la inmunización de ratas con proteína NKG2D de ratón purificada, como se ha descrito previamente (Ogasawara et al., Immunity, 18: 41 - 51, 2003). Se produjo Anti-ratón NKG2D, clon 191004 (isotipo IgG2a de rata), a partir de un hibridoma que se produce de la fusión de un mieloma de ratón con células B a partir de una rata inmunizada con el dominio de ratón NKG2D extracelular (R y D Systems, Minneapolis, MN). Todos los anti-NKG2D mAbs reconocen el dominio extracelular NKG2D bloquean de manera eficaz y la unión de NKG2D a sus ligandos. Para la inyección in vivo, se usaron anti-

NKG2D mAb CX5 y anti-NK1.1 mAb PK136 purificados que no contenían endotoxina detectable ($< 0,3$ pg/inyección). El anti-NKG2D mAb CX5 es un anticuerpo bloqueante que no empobrece las células NK o células T que llevan NKG2D -cuando se inyectan in vivo (Ogasawara et al., *Immunity*, 20, 757 - 7567, 2004; Lodoen et al., *J Exp Med*, 197: 1245 - 1253, 2003); y Lodoen et al., *J Exp Med*, 200: 1075 - 108, 2004). Se compró IgG control de rata en Sigma (S1. Louis, MO). Se generaron Anti-ratón pan-RAE-1 mAb (clon 186107, isotipo IgG2b de rata), anti-ratón H60 mAb (clon 205310) y anti-ratón MULT1 mAb (clon 237104) como se ha descrito (Lodoen et al., supra, 2003; y Lodoen et al., supra, 2004). Se compraron otros anticuerpos en BD PharMingen o eBioscience (San Diego, CA).

10 *Trasplante de médula ósea*

Se trasplantó médula ósea murina como se ha descrito anteriormente (George et al., *J Immunol*, 163: 1859 - 1867, 1999). En resumen, se realizaron tratamientos de mAb (200 μ g/ratón) 2 días antes de la transferencia de la médula ósea, y se trataron los receptores con poli I:C (Sigma, 200 μ g/ratón) para activar el rechazo de injerto mediado por células NK un día antes de la inyección de células de médula ósea (Murphy et al., *J Exp Med*, 166: 1499 - 1509, 1987). El día 0 se irradiaron los ratones mediante exposición a dosis letales (11 Gy) de irradiación ^{137}CS gamma, y después 4×10^6 de células BM se inyectaron por vía intravenosa. Cinco días después de la transferencia a los ratones se les proporcionó 26 μ g de 5-fluoro-2'-deoxyuridina (Sigma, St. Louis, MO) por vía intravenosa para suprimir la síntesis de timidina endógena (George et al., supra, 1999). Treinta minutos más tarde, a los ratones se les proporcionó 3 μ Ci de $^5\text{-}[^{125}\text{I}]\text{yodo-5 2'-deoxyuridina}$ (Amersham Life Science, Arlington Heights IL) por vía intravenosa. El día 6, se retiraron los bazos de los ratones receptores y se contaron con un contador gamma.

25 *Generación de ratones BM quiméricos*

En resumen, 1×10^7 de células Ly5.2 B6 BM se transfirieron por vía intravenosa en células NK empobrecidas y ratones receptores irradiados (dosis absorbida de radiación = 11 Gy), como se ha descrito previamente (Ogasawara et al., *Nature*, 391 :701-703, 1998). Durante la reconstitución, se mantuvieron los ratones en antibióticos.

30 *Preparación de células NK*

Las células NK se enriquecieron como se ha descrito previamente (Ogasawara et al., *J Immunol*, 169: 3676 - 3685, 2002). En resumen, se incubaron células de bazo con anti-ratón CD4 mAb (clon GK1.5) y anti-ratón CD8 mAb (clon 53-6.7), y después se mezclaron estas células con perlas magnéticas recubiertas con anti-ratón Ig y anti-rata Ig de cabra (Advanced Magnetic, Inc, Cambridge, MA). CD4, CD8, y se retiraron las células Ig (slg)-positivo de superficie mediante aislamiento de células magnético.

40 *Análisis de citometría de flujo*

Se usó una proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de ratón NKG2D condensado a IgG1 Fc humano (mNKG2D-Ig) para detectar ligandos de NKG2D (Cerwenka et al., *Immunity*, 12:721 - 727,2000). Se usó un fragmento de IgG Fcy anti-humana de cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) como un reactivo de segunda etapa. Las células (1×10^6) se tiñeron con 0,5 μ g de mNKG2D-Ig y con 0,25 μ g de otros mAbs. Para determinar qué ligandos de NKG2D se expresaban, se tiñeron células con un anti-pan RAE-1 mAb biotinilado, que reconoce las cinco proteínas RAE-1 conocidas (es decir, RAE-1 α , β , γ , δ y ϵ .) anti-H60 mAb biotinilado o anti-MULT1 mAb, estreptavidina conjugada a PE o estreptavidina conjugada a APC se usó para detectar mAbs biotinilados. Para la detección de NKG2D, células (-1×10^6) se tiñeron con 0,25 μ g de anti-NKG2D mAb biotinilado o marcado con PE (clon 191004). Se tiñeron conjuntamente las células con anti- CD43, anti- Ly6C/G, antiC011 c, anti-B220, anti-C03, anti-TER119, anti-NK1.1 y anti- CD49d (OX5) mAbs. Se incubaron las células con mAbs durante 20 min y se lavaron con PBS que contiene NaN_3 al 0,01 %. Se analizaron las células mediante el uso de un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA). Se activaron poblaciones de linfocitos viables basándose en los perfiles de dispersión directos y laterales y mediante la falta de yoduro de propidio.

55 *Ensayo Citotóxico*

Se realizaron ensayos de citotoxicidad redirigidos mediados por anticuerpo monoclonal como se ha descrito previamente (Lanier et al., *J Immunol*, 141 :3478 - 3485, 1988). Se marcaron las células T diana con 50 μ Ci de Na_2 (^{51}Cr) O_4 durante 2 h a 37°C en medio RPMI - 1640 que contiene un 10% de FCS, se lavó tres veces con medio, y se usó en ensayos de citotoxicidad. Se mezclaron células diana marcadas con ^{51}Cr (5×10^3) y células efectoras en pocillos con fondo en forma de U de una placa de microtitulación de 96 pocillos en las relaciones efector/diana (EIT) indicadas, por triplicado. Después de un período de incubación de 4 h, se recogieron los sobrenadantes sin células y se midió la radiactividad en un contador Micro-beta (Wallac, Turku, Finlandia). La liberación espontánea era menor que el 15% de la liberación máxima. Se calculó el porcentaje de liberación de ^{51}Cr específica de acuerdo con la siguiente fórmula: % de lisis específica = liberación (experimental - espontánea) x

100 / (máxima - espontánea) .

Expresión de ligandos NKG2D en células de ratón BM

5 Los genes que codifican ligandos de NKG2D son polimórficos; ratones BALB/c (B/c) tienen genes RAE-1 α ,
 β y γ , mientras que los ratones C57BU6 (B6) poseen los genes RAE-1 δ y ϵ (Cerwenka y Lanier, Tissue Antigens, 61
 :335 - 343,2003). De manera similar, ratones B/c pero no B6 expresan H60 (Malarkannan et al., J Immunol, 161:
 3501 - 3509, 1998). Se analizaron las células BM aisladas de ratones B/c, B6 y (BALB/c x C57BU6) F1 (CB6F1)
 10 para determinar si los ligandos de NKG2D se expresan en células BM. Se tiñeron las células con una proteína de
 fusión de ratón NKG2D-IgG Fc y se analizó mediante citometría de flujo. Se detectaron bajos niveles de ligandos de
 NKG2D sobre la superficie de células recientemente aisladas B/c BM, pero no de células B6 BM (Fig. 13a). Con el
 fin de determinar qué ligandos de NKG2D se expresaban, se tiñeron las células BM con anticuerpos monoclonales
 anti- pan RAE-1, anti-H60 y antiMULT1 (mAbs). Se expresaron RAE-1 y H60 a bajos niveles en células B/c BM
 15 recientemente aisladas, mientras que no se detectó MULT1 (Fig 13b). Por el contrario, RAE-1 no se detectó en
 esplenocitos recientemente aislados de ratones B/c, B6 o CB6F1 ratones.

Estudios anteriores han probado que las células NK en receptores F1 son capaces de rechazar injertos de
 médula ósea parental (Kießling et al., Eur J Immunol, 7: 655 - 663, 1977; Lotzova et al., Transplantation, 35: 490 -
 494, 1983; Murphy et al., J Exp Med, 165, 1212-1217, 1987; y Murphy et al., Eur J Immunol, 20: 1729-1734, 1990).
 20 Los inventores contemplaban que las células B/c BM que repueblan el bazo en un receptor CB6F1 irradiado expresa
 los ligandos NKG2D. De este modo durante el desarrollo de la presente invención, los ratones receptores CB6F1 se
 trataron previamente con anti- NK1.1 mAb para empobrecer las células NK residentes y por lo tanto evitan el
 rechazo de las células B/c BM trasplantadas. Como un control, un grupo de ratones CB6F1 irradiados se
 reconstituyeron con células CB6F1 BM singénicas. Siete días después del injerto, las células hematopoyéticas que
 25 repueblan los bazos de los ratones CB6F1 se aislaron y se analizaron para evaluar la expresión de ligandos de
 NKG2D. Como se muestra en la Fig. 13c, se detectaron los ligandos de NKG2D sobre las células hematopoyéticas
 aisladas de los bazos de ratones B/c BM -> CB6F1, pero no sobre las células aisladas de los bazos de ratones
 CB6F1 BM -> CB6F1. Las células B/c hematopoyéticas que reconstituyen los bazos de los receptores CB6F1
 irradiados predominantemente expresaban RAE-1, y no H60 o MULT1 (Fig. 13d).

30 Con el fin de identificar la población de células hematopoyéticas que expresan RAE-1, las células aisladas
 de los bazos de receptores CB6F1 BM -> CB6F1 y B/c BM -> CB6F1 se tiñeron con mAbs con marcadores de linaje
 hematopoyéticos. El día 7 después del trasplante, se detectó RAE-1 sobre la mayoría de las células aisladas de los
 bazos de receptores CB6F1 BM -> CB6F1. Por el contrario, no se detectó RAE-1 sobre una proporción sustancial de
 35 células de los bazos de receptores CB6F1 BM -> CB6F1. Esencialmente todas las células RAE-1- positivas aisladas
 de los receptores B/c BM -> CB6F1 expresaban CD43 (Fig. 13e). RAE-1 también estaban presentes sobre la
 mayoría de las células que expresan Gr-1 asociado a proteína de granulocitos (Ly-6C/G) y el marcador CD11 b
 asociado a células mieloides (Mac-1). Solamente una fracción menor de células positivas B220 (marcador asociado
 a células B) y células positivas Ter119 (un marcador asociado a eritrocitos) expresaban RAE-1, y no se detectó
 40 RAE-1 en las células T CD3+ (Fig. 13e). Se contempló que las células B y células T detectadas en los bazos eran
 células residuales resistentes a radiación de origen de huésped, debido a que es diferente de las células T o células
 B se habrían desarrollado a partir de las células de médula ósea del donante es menor que una semana después
 del trasplante. Se detectó RAE-1 sobre un pequeño subconjunto de células que expresan c-kit y Sca-1, aunque la
 45 mayoría de las células RAE-1 -positivas no tenían estos marcadores (Fig. 13f). El estado de proliferación de las
 células que expresan RAE-1 en los receptores B/c BM -> CB6F1 se evaluó mediante la inyección de BrdU en estos
 ratones a las 2 hr y 12 hr antes de la recogida de las células de bazo el día 7 después de trasplante. Como se
 muestra en la Fig. 13g, se detectó fácilmente RAE-1 en una fracción grande (pero no toda) de las células
 progenitoras proliferantes en los bazos de los receptores de trasplante.

50 En los experimentos iniciales, ratones CB6F1 se trasplantaron con médula ósea aislada de donantes B/c.
 Con el fin de dirigir si RAE-1 se expresa en la progenie de células de tronco hematopoyéticas (HSC), se trataron
 ratones B/c donantes con 5-fluorouracilo (5-FU) antes de la recogida de la médula ósea para enriquecer para HSC, y
 después se trasplantó médula ósea de donantes tratados con 5-FU en receptores CB6F1 que se habían tratado
 55 previamente con anti-NK1.1 mAb para empobrecer las células NK de huésped. Las células de médula ósea
 recogidas de los donantes tratados con 5-FU no expresaron RAE-1. Cuando las células en los bazos de receptores
 B/c 5-FU BM -> CB6F1 se analizaron el día 8 después de trasplante, esencialmente todas las células RAE-1-positivo
 expresaban bajos niveles de Ly-6C/G, CD11 b y CD43, pero no CD3, Ter119, o B220. Una pequeña población de
 células RAE-1 positivo expresaban bajos niveles de c-kit y Sca-1, aunque una mayoría de las células RAE-1 positivo
 60 que carecen de estos marcadores (Fig. 13i). Estos resultados indicaron que la mayoría de las células B/c
 progenitoras proliferantes en los receptores CB6F1 empobrecidos con células NK expresan RAE-1.

Después del desarrollo de la presente invención, se ha reseñado la expresión de los ligandos de NKG2D
 sobre las células de médula ósea humanas proliferantes (Nowbakht et al., Blood, publicado de manera electrónica el
 18 de enero de 2005). De este modo, los inventores contemplan que los experimentos descritos en el presente
 65 documento en ratones, son también relevantes para los humanos (y otros mamíferos).

NKG2D está implicado en la resistencia híbrida

5 Durante el desarrollo de la presente invención, el hallazgo que RAE-1 se expresó en las células progenitoras proliferantes en los bazos de ratones CB6F1 reconstituidos con médula ósea de B/c sugirió a los inventores que NKG2D está implicado en la resistencia híbrida. Esto se confirmó mediante la transferencia de células B/c BM en ratones CB6F1 irradiado tratados previamente con un anticuerpo control (clg), un anti-NKG2D mAb (CX5) neutralizante, no empobrecedor (Ogasawara et al., Immunity, 20: 757 - 767, 2004), o el anti-NK1.1 mAb (PK136) empobrecedor de las células NK. Hematopoyéticas. La reconstitución de las células hematopoyéticas de ratones receptores se evaluó mediante inyección de ¹²⁵IUdR doce horas antes de la recogida de bazos el día 7. Los ratones tratados con clg rechazaron las células de B/c BM células, y consistente con las reseñas anteriores (Lotzova et al., Transplantation, 35: 490 - 494, 1983), el empobrecimiento de las células NK en ratones CB6F1 evitaban de manera eficaz el rechazo de las células de médula ósea de B/c, que daban como resultado un incremento sustancial en la incorporación de la radiomarca en los bazos (Fig. 14a). El anti-NKG2D mAb no empobrecedor, neutralizante también incrementaba de manera notable la incorporación de ¹²⁵IUdR, comparable con los efectos de células NK empobrecedoras.

La capacidad de tratamiento de anti-NKG2D mAb para evitar el rechazo de de las células de médula ósea de B/c se confirmó mediante el examen de las células que repoblan los bazos el día 8 después de trasplante. Como se muestra en la Fig. 14b, se detectaron las células RAE-1 positivas predominantemente expresaban de manera conjunta CD43, Ly-6C/G, y CD11 b en los bazos de ratones CB6F1 tratados con antiNKG2D mAb. Por el contrario, se recuperaron muchas menos células de los ratones tratados con clg y muy pocas de estas células expresaron RAE-1. Estos datos indicaron que el rechazo de las células RAE-1-positivo de B/c BM en ratones CB6F1 se evita de manera eficaz mediante o bien el empobrecimiento de las células NK o mediante el bloqueo del receptor de NKG2D.

Las células NK eliminan las células de BM singénicas que expresan altos niveles de RAE-1

La capacidad de tratamiento de anti-NKG2D mAb para bloquear el rechazo de injerto de médula ósea parental en receptores F1 provocaban la pregunta de si el reconocimiento de H-2 parental por las células NK de F1 se requiere para el rechazo de dependiente de NKG2D o si las células NK también pueden rechazar las células de médula ósea singénicas siempre que RAE-1 se exprese a niveles suficientemente altos. De células de médula ósea CB6F1 que repueblan los receptores CB6F1 singénicos irradiados (Fig. 13c, e) y células B6 de médula ósea que repueblan los receptores B6 irradiados singénicos expresaban solamente niveles muy bajos de RAE-1 comparado con las células de médula ósea de B/c de repoblación (Fig. 13d, e). Por lo tanto, con el fin de evaluar si existe o no la expresión de RAE-1 sobre células de médula ósea de B6 o CB6F1 provocarían el rechazo de injertos de médula ósea singénicos, se generaron ratones transgénicos que expresan RAE-1 ϵ dirigidos mediante un promotor de β -actin humano, que da como resultado la expresión de RAE-1 ϵ en todos los tejidos. Como se muestra en la Fig. 15a el nivel de expresión de RAE-1 ϵ en las células de médula ósea aisladas recientemente de ratones transgénicos B6 RAE-1 ϵ , es similar a los niveles de RAE-1 presentes en las células de médula ósea de B/c (Fig. 13d,e).

Se ensayaron células de médula ósea aisladas recientemente de ratones B6 RAE-1 ϵ transgénicos como dianas para las células NK no transgénicas singénicas activadas por IL-2 NK en un ensayo de citotoxicidad in vitro convencional. Como se muestra en la Fig. 15b, las células NK activadas destruían las células médula ósea recientemente aisladas RAE-1 ϵ transgénicas B6, pero no las células de médula ósea RAE-1 negativo no transgénicas B6. Se bloqueó la citotoxicidad mediante un anti-NKG2D mAb, demostrando que la destrucción es dependiente de NKG2D. De acuerdo con los resultados in vitro, los ratones B6 no transgénicos irradiados rechazaron las células de médula ósea de donantes B6 transgénicos de RAE-1 ϵ transgénicos. De manera importante, se evitó el rechazo en ratones tratados con el anti-NKG2D mAb neutralizante, pero no en los ratones tratados con una Ig control (Fig. 15c). Se obtuvieron resultados similares cuando se cruzaron ratones RAE-1 ϵ transgénicos B6 con ratones B/c y la médula ósea de RAE-1 ϵ transgénicos CB6F1 se injertó en receptores no transgénicos CB6F1. Las células de médula ósea de RAE-1 ϵ transgénicos CB6F1, se diferenciaban de las células de médula ósea de CB6F1 no transgénicos (Fig. 13c,e), expresaron altos niveles de of RAE1 ϵ y se rechazaron por los receptores singénicos no transgénicos CB6F1 (Fig. 15d). Se evitó el rechazo mediante la administración de anti- NKG2D mAb neutralizante no empobrecedor o mediante el empobrecimiento de las células NK con anti-N K1.1 mAb. De manera colectiva, estos hallazgos demuestran que las células NK de B6 y CB6F1 pueden rechazar las células de médula ósea H-2 idénticas, siempre que las células de médula ósea expresen RAE-1.

DAP10 y DAP12 en rechazo de BM mediada por NKG2D

En ratones, el ajuste de ARN alternativo de transcripciones de NKG2D genera dos isoformas de proteínas llamadas NKG2D-S y NKG2D-L. NKG2D-L se expresa predominantemente en las células NK de reposo y se asocia con la proteína adaptadora DAP 10 mientras que NKG2D-S se induce mediante la activación de las células NK y se asocia o bien con DAP 10 o DAP12 (Diefenbach et al., Nat Immunol, 3: 1142 - 1149,2002). células de médula ósea

de ratones RAE-1 ϵ transgénicos B6 se transplantaron en receptores irradiados de tipo salvaje, DAP10-/-, y DAP12-/- C57BU6, con el fin de determinar si DAP10 o DAP12 o ambos adaptadores estaban implicados en el rechazo mediado por NKG2D. Los ratones se inyectaron con $^{125}\text{IUdR}$ el día 5 y se recogieron los bazo y se contaron el día 6. Comparado con los ratones B6 de tipo salvaje, los ratones DAP10-/- B6 demostraron una deficiencia significativa en el rechazo de injerto de médula ósea de RAE-1 ϵ transgénicos B6 (Fig. 16a). Por el contrario, los receptores DAP12-/- B6 rechazaron la médula ósea de RAE-1 ϵ transgénicos B6 de manera más eficaz que los ratones DAP10-/- B6, aunque ligeramente menos que los ratones B6 de tipo salvaje (Fig. 16b). Los ratones de tipo salvaje, DAP10-/- y DAP12-/- B6 todos confeccionados para rechazar el injerto de médula ósea de RAE-1 ϵ transgénicos B6 cuando se trata con anti-NK1.1 mAb de empobrecimiento con el anti-NKG2D mAb neutralizante no empobrecedor. Estos resultados indican un papel predominante de DAP10, y un papel menor de DAP12, en el rechazo de médula ósea dependiente de NKG2D. No obstante, no es necesaria una comprensión del mecanismo con el fin de realizar y usar la invención.

Resistencia híbrida detectada en ratones transgénicos in RAE-1 ϵ

La activación de las células NK de ratones NOD induce la expresión de RAE-1, que da como resultado la modulación dependiente de ligando de NKG2D en las células NK (Ogasawara et al., *Immunity*, 18, 41 - 51, 2003). El análisis de la expresión de NKG2D sobre la superficie de las células NK de los ratones RAE-1 ϵ transgénicos B6 reveló una expresión reducida de NKG2D cuando se compara con las células NK de ratones de tipo salvaje (Fig. 17a). Aunque la cantidad de NKG2D en los RAE-1 ϵ transgénicos B6 se disminuyeron de manera sustancial, el número de células NK en los bazo y la expresión de NK1.1, Ly-49D, Ly-49A, Ly-49C/I, Ly-49F/I/C/H, 50 y Ly-49G2 en las células NK eran similares a las NK células de tipo salvaje. Para examinar si la función de NKG2D está alterada en las células NK de RAE-1 ϵ transgénicos, se realizó un ensayo de citotoxicidad redirigida de anticuerpos usando clg, anti-NKG2D mAb y anti-NK1.1 mAbs. Aunque la actividad dependiente de NK1.1 de células NK de RAE-1 ϵ transgénicos era idéntica a las células NK de B6 de tipo salvaje, se alteró la citotoxicidad dependiente de NKG2D en células NK de RAE-1 ϵ transgénicos (Fig. 17b).

El transgen RAE-1 ϵ se dirige mediante un promotor de acción β es estos ratones transgénicos, y por lo tanto, las células NK de estos animales expresan de manera conjunta tanto el ligando como el receptor. Con el fin de determinar si las células NK de tipo salvaje (non-transgénicas) están inactivadas *in vivo* mediante la exposición constante a ligandos NKG2D, se generaron quimeras de médula ósea mediante trasplante de médula ósea de B6 congénicos Ly5.2 de tipo salvaje en receptores RAE-1 ϵ B6 (Ly5.1) irradiados de manera letal. Tres meses después del trasplante el número de células NK en los bazo y la expresión de NK1.1 (Fig. 17c), Ly-49D, Ly-49A, Ly-49C/I, Ly-49F/I/C/H y Ly-49G2 en ratones transgénicos Ly5.2 BM \rightarrow RAE-1 ϵ eran similares a a los que había en ratones B6 Ly5.2 BM \rightarrow de tipo salvaje. Por el contrario, la expresión de NKG2D en las células NK disminuyó drásticamente en ratones Ly-5.2 BM \rightarrow RAE-1E transgénicos (Fig. 17c). Consistente con los niveles disminuidos de NKG2D sobre las células NK, se alteró la actividad citotóxica dependiente de NKG2D -en ratones Ly-5.2 BM \rightarrow RAE-1 ϵ transgénicos, como se determina mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro* redirigido de anticuerpos (Fig. 17d). Los inventores también investigaron si células de RAE-1 ϵ transgénicos B6 BM se rechazaban en receptores Ly-5.2 B6 BM \rightarrow RAE-1 EB6 transgénicos. Como se esperaba, células NK en los ratones Ly5.2 B6 de tipo salvaje \rightarrow B6 de tipo salvaje rechazaron las células de RAE-1 ϵ transgénicos BM de manera eficaz (Fig. 17e). Por el contrario, las células NK que se desarrollaban en ratones Ly-5.2 B6 BM \rightarrow RAE-1 E transgénicos no rechazaban las células de RAE-1 ϵ transgénicos BM (Fig. 17). Estos hallazgos indicaban que la modulación de NKG2D de células NK está provocada por la interacción con el receptor RAE-1 resistente a la radiación que expresa las células *in vivo*, y que esto da como resultado la alteración de la función de NKG2D *in vivo*. Sin embargo, un entendimiento del mecanismo no es necesario con el fin de hacer uso la invención.

Para investigar si la resistencia de híbridos F1 está afectada por los niveles disminuidos de NKG2D en células NK en los ratones RAE-1 ϵ transgénicos B6, los ratones transgénicos se cruzaron con ratones B/c, y los ratones RAE-1 ϵ transgénicos CBF1 se ensayaron para evaluar su capacidad de rechazar las células B/c BM parentales. A diferencia de los ratones CB6F1 de tipo salvaje, los ratones RAE-1 ϵ transgénicos CB6F1 no rechazaban las células B/c BM (Fig. 17f). además, el tratamiento con anti-NK1.1 mAb o anti-NKG2D mAb no afectaron la incorporación de $^{125}\text{IUdR}$ de células B/c BM en los receptores RAE-1E transgénicos CB6F1. Sin embargo, las células NK empobrecedoras o que bloquean NKG2D permitieron el injerto de las células de médula ósea de B/c en receptores CB6F1 de tipo salvaje. De este modo como se demuestra en el presente documento, NKG2D está implicado como un componente importante en la resistencia de híbridos F1.

Ejemplo 7

Bloqueo de NKG2D para la Prevención y Tratamiento de Artritis reumatoide

Esto se puede ensayar en un modelo animal crónico de artritis donde NKG2D se puede demostrar que está presente en el sitio de la inflamación. Un ejemplo de tal modelo es la artritis inducida por colágeno crónica (Malfait et al., *Arthritis and Rheumatism* 44: 1215 - 1224, 2001).

Recientemente, células T CD4+ CD28- en la sangre periférica y tejidos sinoviales de pacientes de artritis reumatoide humanos se encontró que expresan NKG2D, mientras que los sinoviocitos inflamados se encontró que expresan de manera aberrante los ligandos MIC de NKG2D (Groh et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100: 9452 - 9457, 2003). De este modo, los inventores contemplan que las composiciones y procedimientos para bloquear NKG2D descritos en el presente documento son también adecuados para la prevención y tratamiento de artritis reumatoide. Se realizaron los siguientes experimentos para ensayar el efecto del bloqueo de NKG2D en el desarrollo de artritis reumatoide (RA) en un sistema de modelo animal, el ratón DBA/1.

En resumen, la artritis inducida por el colágeno de tipo II (CII) (CIA) se induce en ratones DBA/1 de 6 - 7 semanas de edad mediante inyección intradérmica en la base de la cola 100 µg de colágeno II bovino suplementado con 2,0 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA emulsionado en adyuvante de Freund completo, como se ha descrito (Seo et al., Nat Med, 10: 1088 - 1094, 2004). La inflamación de las articulaciones se puntuó de 1 a 4, con una puntuación máxima de 16 por ratón. la gravedad clínica de artritis se clasifica como sigue: 0, normal; 1, inflamación ligera y / o eritema; 2, inflamación eritematosa sustancial; 3, inflamación eritematosa sustancial más ligera rigidez de las articulaciones; o 4, laxitud (Véase, por ejemplo, Williams et al., Proc Natl Acad Sci USA, 89: 9784 - 9788, 1992). Cada miembro se clasifica, permitiendo una puntuación clínica máxima de 16 para cada animal. La inflamación de las patas traseras se mide con un par de calibres.

Se inyectan ratones con 200 µg de un anti-NKG2D mAb o un mAb IP emparejado a isotipo control, los días 0, 2, 4, 6 y 8 o los días 0, 3, 7 y 10 después de la inmunización. Los inventores contemplan que el tratamiento con IgG control da como resultado el desarrollo de artritis grave que comienza aproximadamente 28 d después de la inmunización (por ejemplo, gravedad mayor que 10; la incidencia mayor que el 80%, y el grosor de la pata mayor que 3,5 mm). Por el contrario, el tratamiento con anti-NKG2D mAb se espera que dé como resultado la supresión de la enfermedad, que se manifiesta como una disminución de la gravedad e incidencia de artritis, así como una reducción del grosor de la pata e histopatología de la articulación reducida con relación a los animales tratados con mAb control (por ejemplo, la gravedad menor que 10, preferiblemente menor que 5 y lo más preferiblemente menor que 2; la incidencia menor que el 80%, preferiblemente menor que el 50%, y lo más preferiblemente menor que el 20%; y grosor de la pata menor que 3,5 mm, preferiblemente menor que 3.0 mm, y lo más preferiblemente menor que 2,5 mm).

Para tratar CIA establecida, se inyectan ratones los días 28, 30, 32, 34 y 36 o los días 28, 31, 35 y 38 después de la inmunización. Los ratones se dividen después en dos grupos con puntuaciones medias de artritis iguales el día 28 después de la inmunización, y se trataron con mAb control, o anti-NKG2D mAb los días 28, 30, 32, 34 y 36 después de la inmunización. Se contempla que la artritis se invierte solamente en el grupo tratado con anti-NKG2D mAb (por ejemplo, de reducción en la gravedad de la enfermedad, incidencia, grosor de la pata e histopatología de la articulación). Además, los inventores contemplan que el tratamiento con anti-NKG2D mAb dará como resultado una reducción de los números de células que expresan NKG2D presentes en las articulaciones de sujetos artríticos, así como una reducción INEN los niveles de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, TNF-a, IL-15, etc.) en el fluido sinovial.

Ejemplo 8

Bloqueo de NKG2D para la Prevención y Tratamiento de Enfermedad celíaca

MIC se expresa de manera intensa en la superficie del epitelio del intestino en los pacientes de Enfermedad celíaca (CD), que a su vez activan de manera conjunta los linfocitos T intraepiteliales (IEL) mediante NKG2D, que conduce a la citólisis de dianas de células epiteliales (Meresse et al., Immunity, 21 :357 - 366, 2004; y Hue et al., Immunity, 21 :367 - 377, 2004). Los inventores contemplan que las composiciones y procedimientos para bloquear NKG2D descritos en el presente documento son también adecuados para la prevención y tratamiento de enfermedad celíaca. El efecto del bloqueo de NKG2D en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) se ensayará en un modelo de animal pequeño adecuado, tal como, por ejemplo, cualquiera de los dos siguientes modelos de ratón de colitis: TNB inducido (Chin et al., Digestive Diseases and Sciences 39: 513 - 525, 1994) o modelo de células T transferidas (Powrie et al., Int Immunol 15:1461 et seq., 1993) en ratones SCID.

Todos los encabezados y sub-encabezados se usan en la presente por conveniencia solamente y no deben considerarse limitativos de la invención de ninguna manera. Cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas sus posibles variaciones está abarcado por la invención a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente de otra manera por el contexto.

El uso de los términos "un" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) debe entenderse que cubre tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. La enumeración de intervalos de valores en la presente se pretende meramente que sirva como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado dentro del intervalo, a menos de que se indique lo contrario en la presente, y cada valor separado se incorpora en la descripción como si se citase individualmente en la presente. A

5 menos que se indique lo contrario, todos los valores exactos proporcionados en la presente son representativos de los valores aproximados correspondientes (por ejemplo todos los valores ejemplares exactos proporcionados con respecto a un factor o medición particulares puede considerarse que también proporcionan una medición aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", donde sea apropiado). Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario o se contradiga de otra manera claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "como") proporcionados en la presente, se pretende que meramente aclaren mejor la invención y no suponen una limitación al alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la descripción debe entenderse que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la puesta en práctica de la invención. La cita de documentos de patente en la presente se hace por conveniencia solamente y no refleja ningún punto de vista de la validez, patentabilidad, y/o ejecutabilidad de dicho documento de patente. Una descripción en la presente de un aspecto o realización de la invención usando términos como "comprende", "tiene", "incluye", o "contiene" un elemento particular se pretende que proporcione apoyo para un aspecto o realización de la invención que "consiste de", "consiste esencialmente de", o "comprende sustancialmente" ese elemento particular, a menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente por el contexto. Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia recitada en las reivindicaciones adjuntas a la presente según lo permitido por la ley aplicable.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> MODULACION DE NKG2D

25 <130> P055654EP

<140> EP-10_____.-
<141> 2005-04-05

30 <150> US-60/559,919
<151> 2004-04-05

<150> US-60/576,242
<151> 2004-06-01

35 <150> US-60/659,678
<151> 2005-03-07

40 <150> EP-09008665.3
<151> 2005-04-05

<150> EP-05761976.9
<151> 2005-04-05

45 <160> 13

<170> SeqWin2010, versión 1.0

50 <210> 1
<211> 699
<212> ADN
<213> Mus musculus

55 <400> 1

60

65

ES 2 645 026 T3

```

atggcattga ttcgtgatcg aaagtctcat cactcagaga tgagcaaatg ccataattac 60
gacctcaagc cagcaaagtg ggatacttct caagaacaac agaaacaaag attagcacta 120
actaccagtc aacctggaga aaatgggtatc ataagaggaa gataccctat agaaaaactc 180
5   aaaatatctc caatgttcgt tgttcgagtc cttgctatag ccttggcaat tcgattcacc 240
cttaacacat tgatgtggct tgccattttc aaagagacgt ttcagccagt attgtgcaac 300
aaggaagtcc cagtttcctc aagagagggc tactgtggcc catgccctaa caactggata 360
tgtcacagaa acaactgtta ccaatTTTTT aatgaagaga aaacctggaa ccagagccaa 420
10  gcttcctggt tgtctcaaaa ttccagcctt ctgaagatat acagtaaaga agaacaggat 480
ttcttaaagc tggttaagtc ctatcactgg atgggactgg tccagatccc agcaaatggc 540
tcctggcagt gggaagatgg ctctctctct tcatacaatc agttaactct ggtggaaata 600
ccaaaaggat cctgtgctgt ctatggctca agctttaagg cttacacaga agactgtgca 660
aatctaaaca cgtacatctg catgaaaagg gcggtgtaa 699

```

15 <210> 2
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 2

```

Met Ala Leu Ile Arg Asp Arg Lys Ser His His Ser Glu Met Ser Lys
1           5           10           15
25  Cys His Asn Tyr Asp Leu Lys Pro Ala Lys Trp Asp Thr Ser Gln Glu
           20           25           30
30  Gln Gln Lys Gln Arg Leu Ala Leu Thr Thr Ser Gln Pro Gly Glu Asn
           35           40           45
35  Gly Ile Ile Arg Gly Arg Tyr Pro Ile Glu Lys Leu Lys Ile Ser Pro
           50           55           60
40  Met Phe Val Val Arg Val Leu Ala Ile Ala Leu Ala Ile Arg Phe Thr
           65           70           75           80

```

40

45

50

55

60

65

ES 2 645 026 T3

Leu Asn Thr Leu Met Trp Leu Ala Ile Phe Lys Glu Thr Phe Gln Pro
 85 90 95

5 Val Leu Cys Asn Lys Glu Val Pro Val Ser Ser Arg Glu Gly Tyr Cys
 100 105 110

10 Gly Pro Cys Pro Asn Asn Trp Ile Cys His Arg Asn Asn Cys Tyr Gln
 115 120 125

Phe Phe Asn Glu Glu Lys Thr Trp Asn Gln Ser Gln Ala Ser Cys Leu
 130 135 140

15 Ser Gln Asn Ser Ser Leu Leu Lys Ile Tyr Ser Lys Glu Glu Gln Asp
 145 150 155 160

20 Phe Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val Gln Ile
 165 170 175

Pro Ala Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ser Leu Ser Tyr
 180 185 190

25 Asn Gln Leu Thr Leu Val Glu Ile Pro Lys Gly Ser Cys Ala Val Tyr
 195 200 205

30 Gly Ser Ser Phe Lys Ala Tyr Thr Glu Asp Cys Ala Asn Leu Asn Thr
 210 215 220

Tyr Ile Cys Met Lys Arg Ala Val
 225 230

35 <210> 3
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 3

atgggggtgga ttcgtggtcg gaggtctcga cacagctggg agatgagtga atttcataat 60
 tataacttgg atctgaagaa gagtgatttt tcaacacgat ggcaaaagca aagatgtcca 120
 45 gtagtcaaaa gcaaatgtag agaaaatgca tctccatttt ttttctgctg cttcatcgct 180
 gtagccatgg gaatccgttt cattattatg gtagcaatat ggagtgctgt attcctaaac 240
 tcattattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct 300
 aaaaactgga tatgttacaa aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg 360
 tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa 420
 50 gaggaccagg atttacttaa actgggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt 480
 ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggctccattc tctcacccaa cctactaaca 540
 ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgcct cgagctttaa aggctatata 600
 gaaaactggt caactccaaa tacatacatc tgcattgcaa ggactgtgta a 651

55 <210> 4
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <400> 4

65

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 6
 ctagtccac ctggaattc a 21

10 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Cebador

<400> 7
 catcattagc tgatctccag ctca 24

15 <210> 8
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Cebador

20 <400> 8
 catcagtgc agttacttct tcaccttcta cacagaga 38

25 <210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> motivo de unión p85 fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) de consenso

<400> 9

30 Tyr Ile Asn Met
 1

35 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> shADN03

<400> 10
 ggatgggact agtacacatt cc 22

45 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia codificante de ARNi

<400> 11
 tggcagtggg aagatggctc c 21

55 <210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Secuencia codificante de ARNi

<400> 12
 cagaaggag actgtgcact ctatgcctc 29

65

ES 2 645 026 T3

<210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> 22 bp ADNc similar a NKG2D humano

10

<400> 13
ggatgggatt agtatagatt cc 22

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un agente que es específico para NKG2D y es capaz de alterar la expansión de células T NKG2D+ o células NK sin empobrecer dichas células, para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide o enfermedad de Crohn, en donde el agente es un anticuerpo o un fragmente de anticuerpo.
- 10 **2.** El agente para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente aumenta la tasa a la que se internaliza la superficie celular de NKG2D.
- 15 **3.** El agente para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el agente reduce la activación de NKG2D inducida por ligando de leucocitos que expresan NKG2D.
- 20 **4.** El agente para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente reduce la señalización a través del complejo KG2D-ligando de NKG2D.
- 25 **5.** El agente para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente es un humano o anticuerpo humanizado.
- 30 **6.** El agente para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide.
- 35 **7.** El agente para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de enfermedad de Crohn.
- 40 **8.** El agente para el uso en el tratamiento de artritis reumatoide de acuerdo con la reivindicación 6, en combinación con un agente adicional seleccionado del grupo que consiste de uno o más de: metotrexato; un anticuerpo anti-TNF- α ; una proteína de fusión TNF- α receptor-Ig; un anticuerpo anti-IL-15, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAIO); y un fármaco antirreumático que modifica la enfermedad (OMARO).
- 45 **9.** El agente para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el agente adicional se selecciona del grupo que consiste de infliximab, adalimumab, y rituximab.
- 50 **10.** El agente para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn de acuerdo con la reivindicación 7, en combinación con un agente adicional seleccionado del grupo que consiste de uno o más de: aminosalicilatos; corticosteroides; inmunomoduladores; antibióticos; infliximab; y adalimumab.
- 55
- 60
- 65

Figura 1

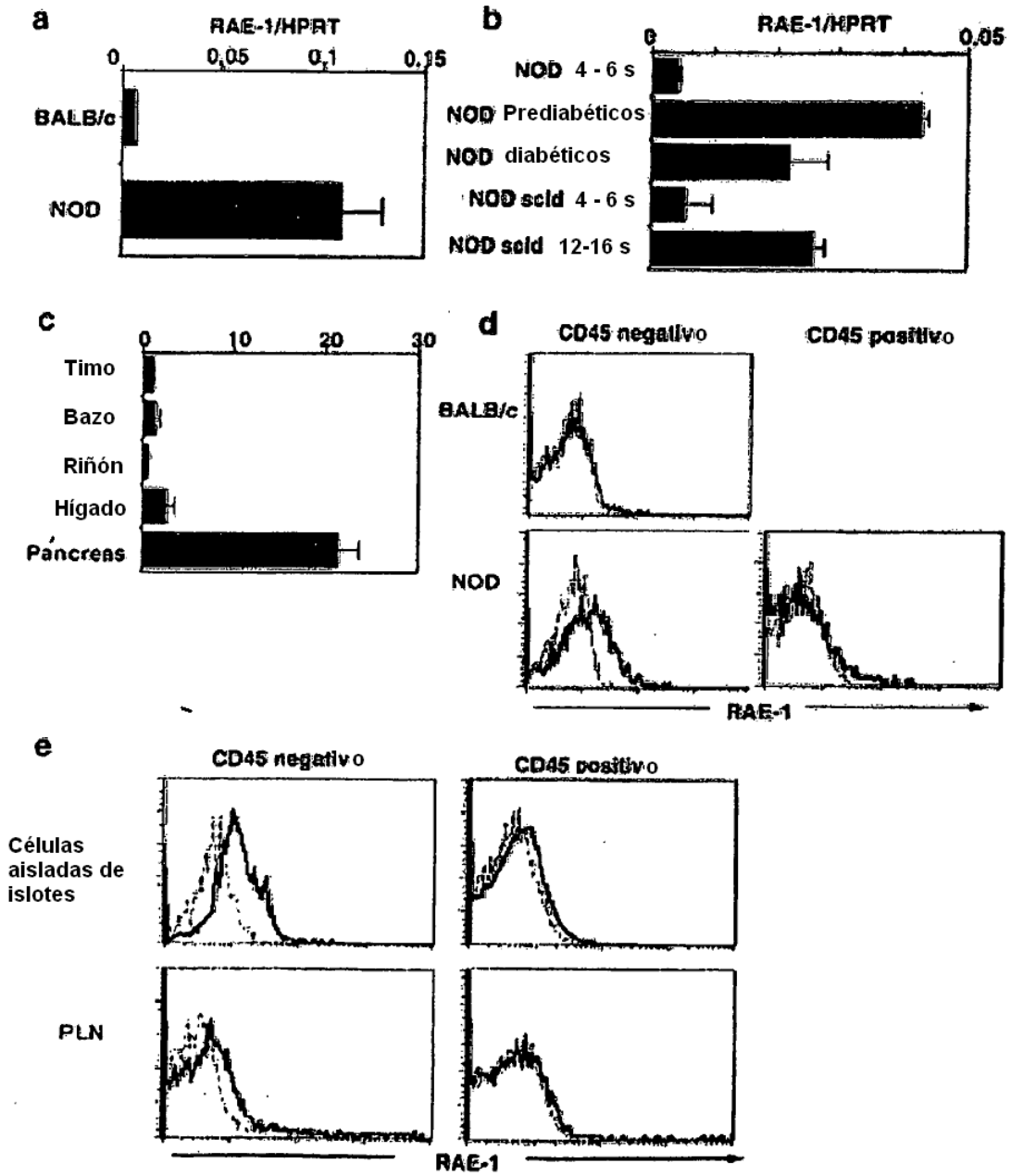


Figura 2

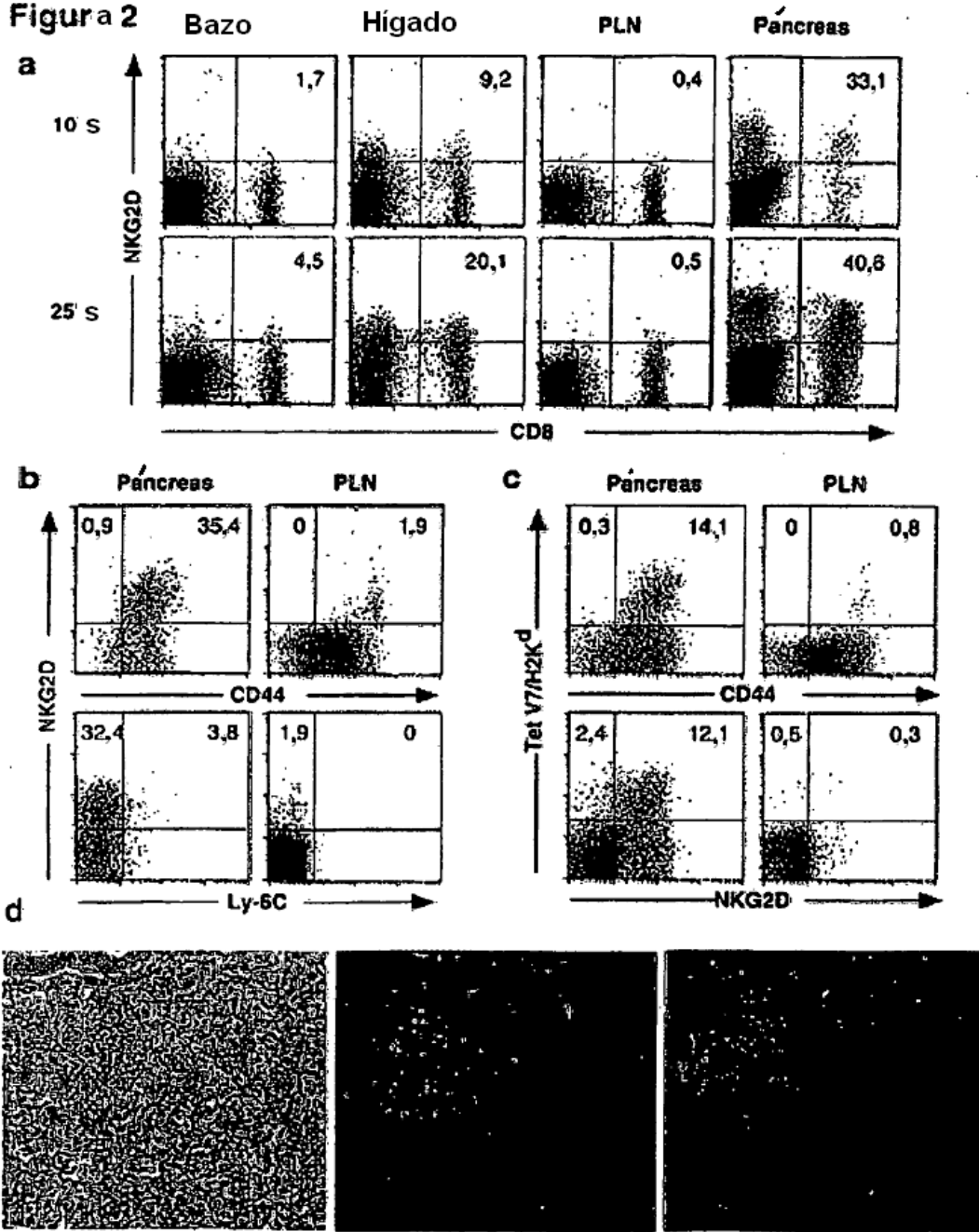


Figura 3

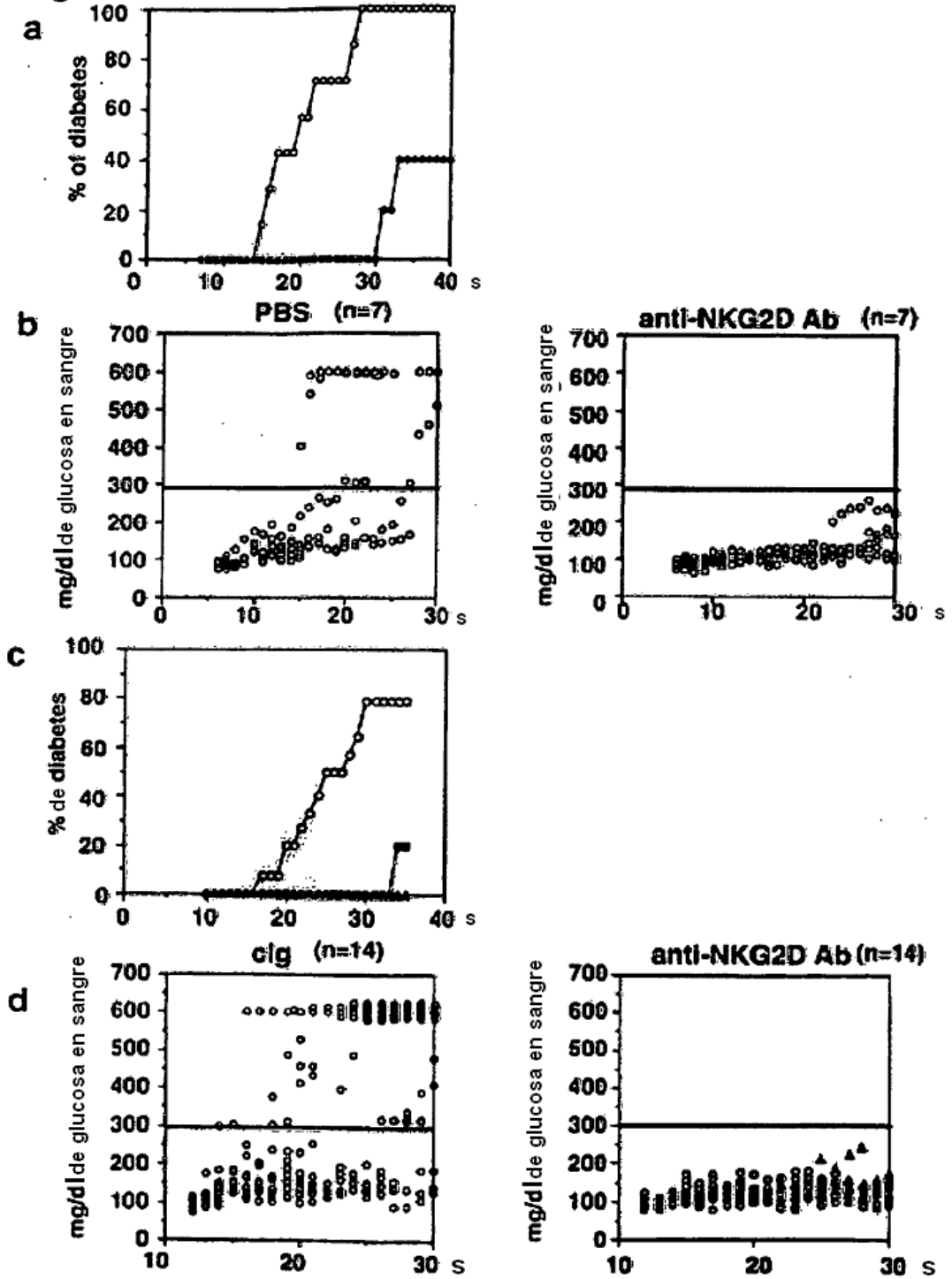
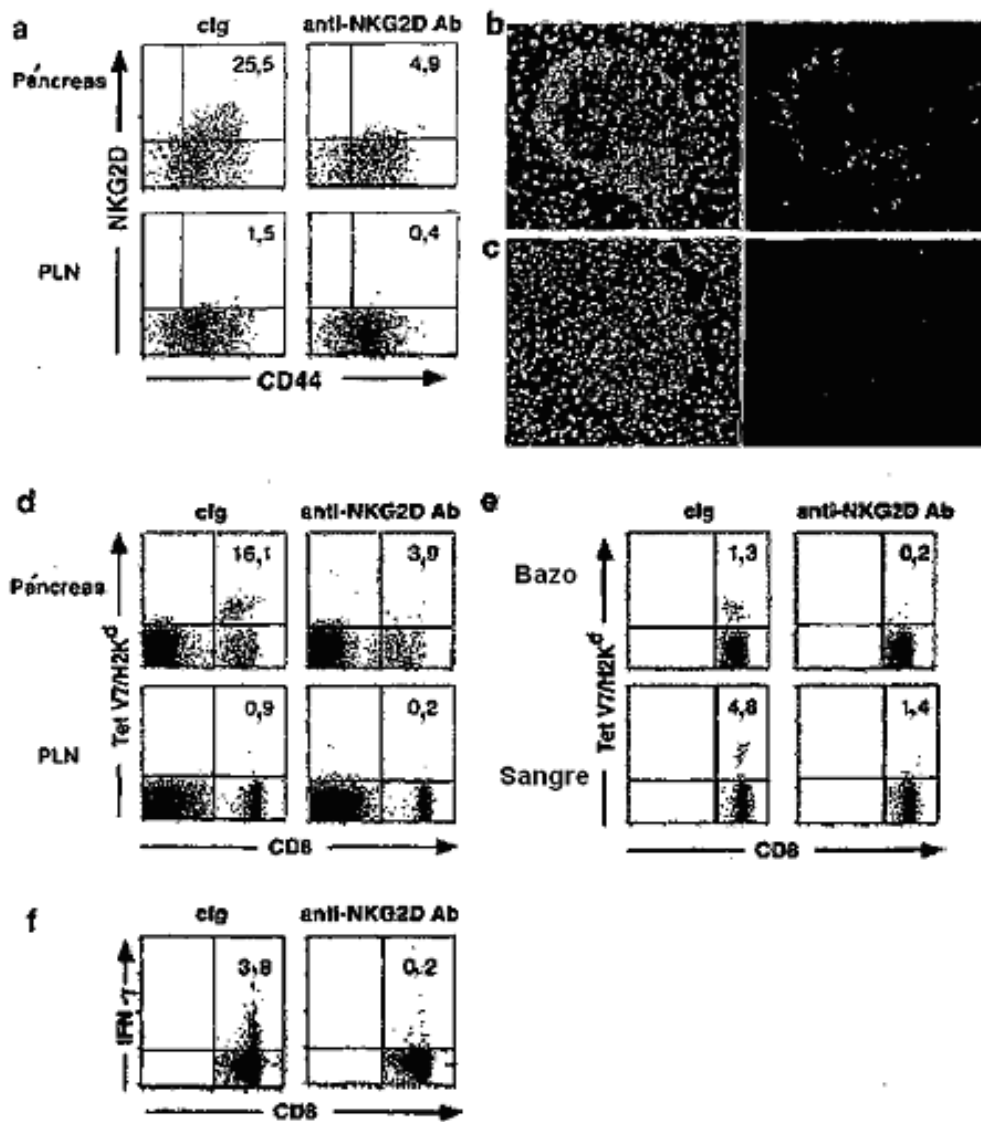


Figura 4



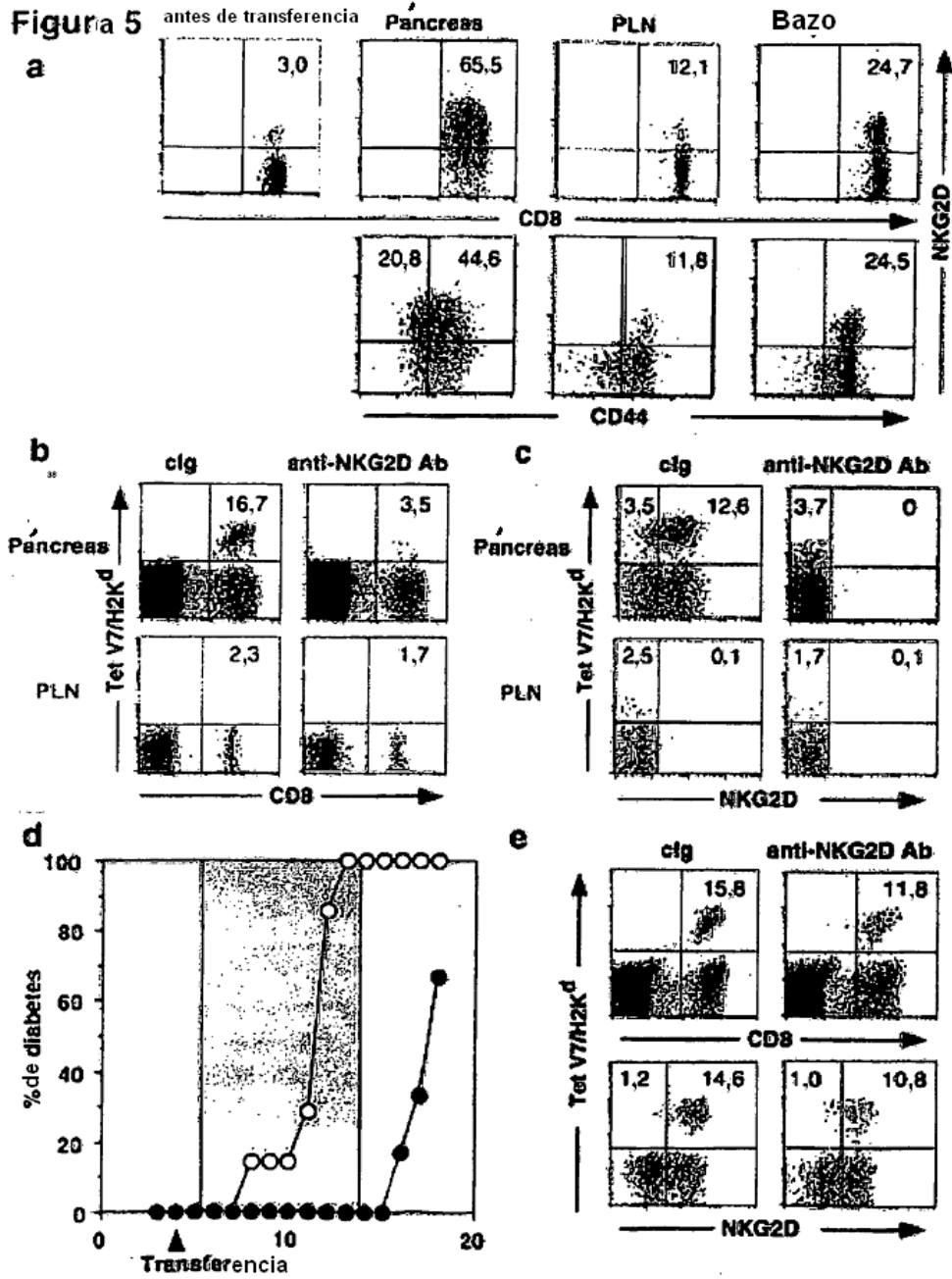


Figura 6

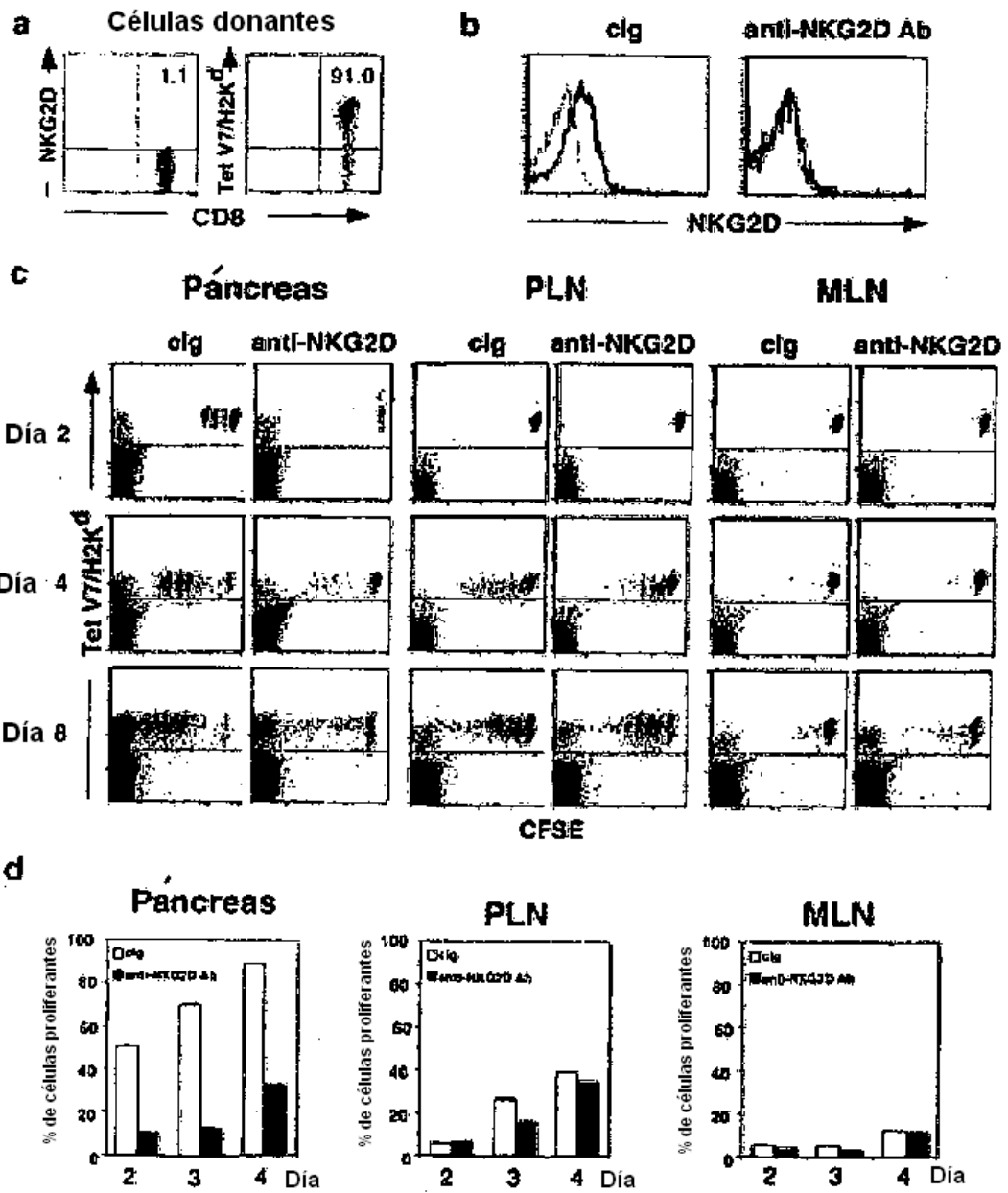


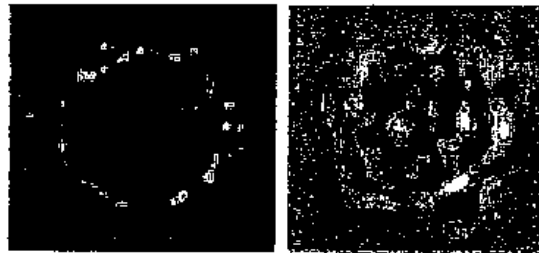
Figura 7

S1

anti-NKG2D Ab
(Verde)

Toxina B de cólera
Tinción (Rojo)

0 min



30 min

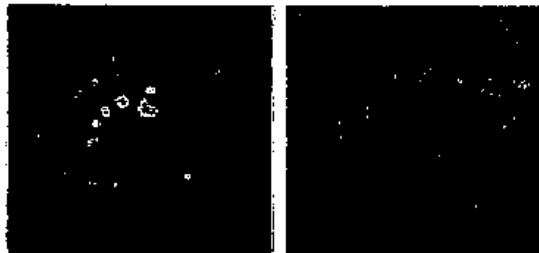


Figura 8

S1

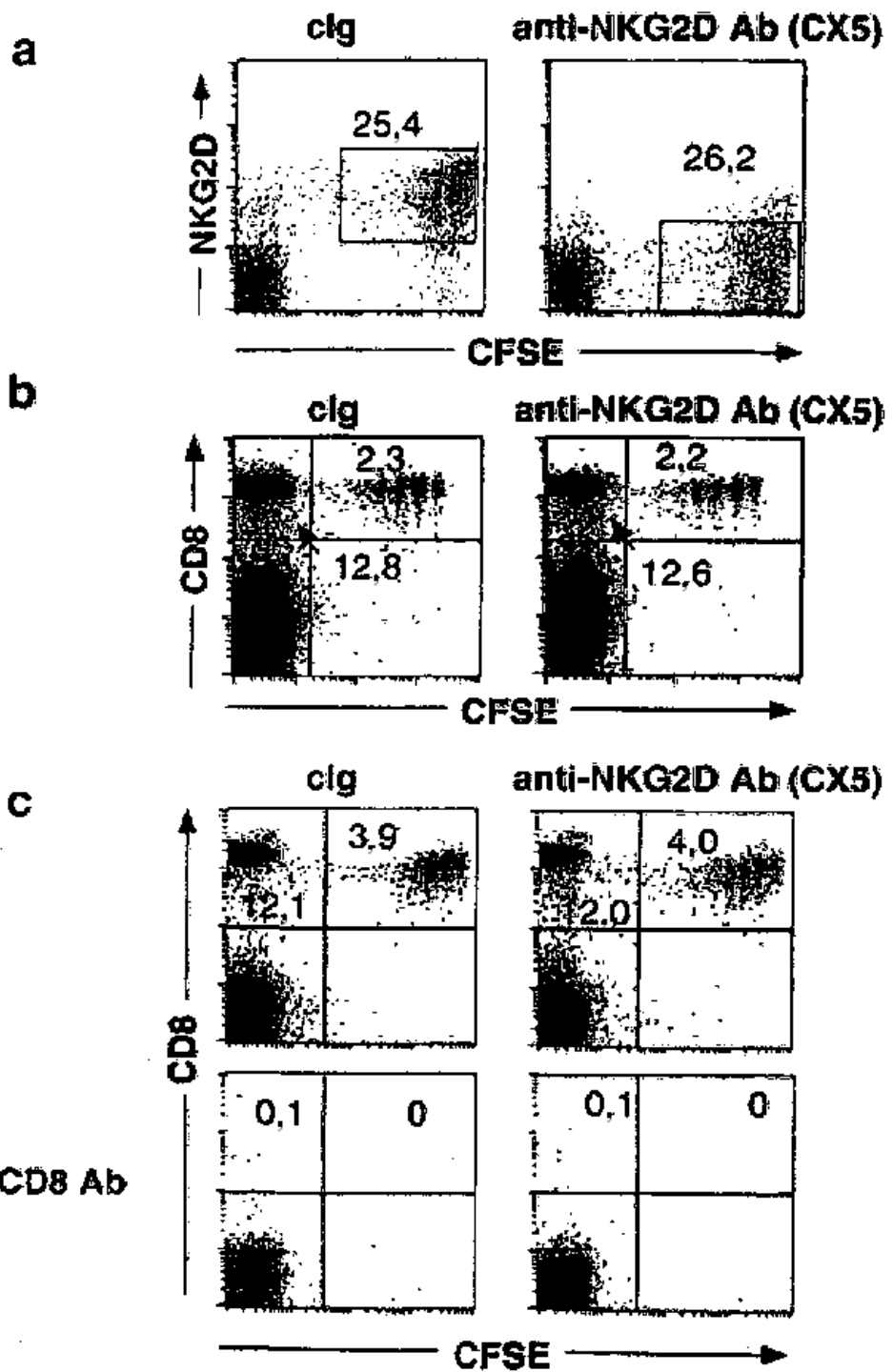


Figura 9

S3

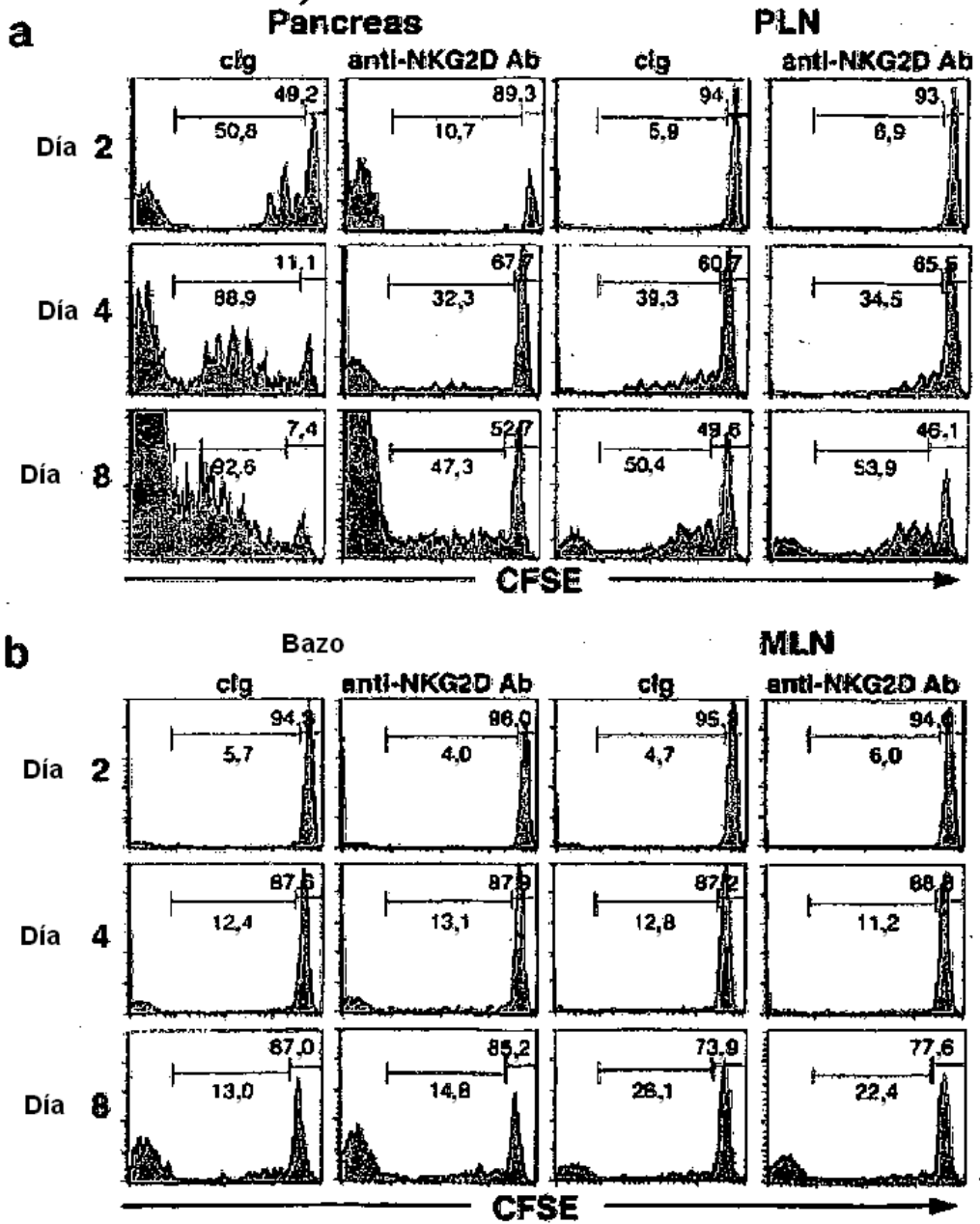
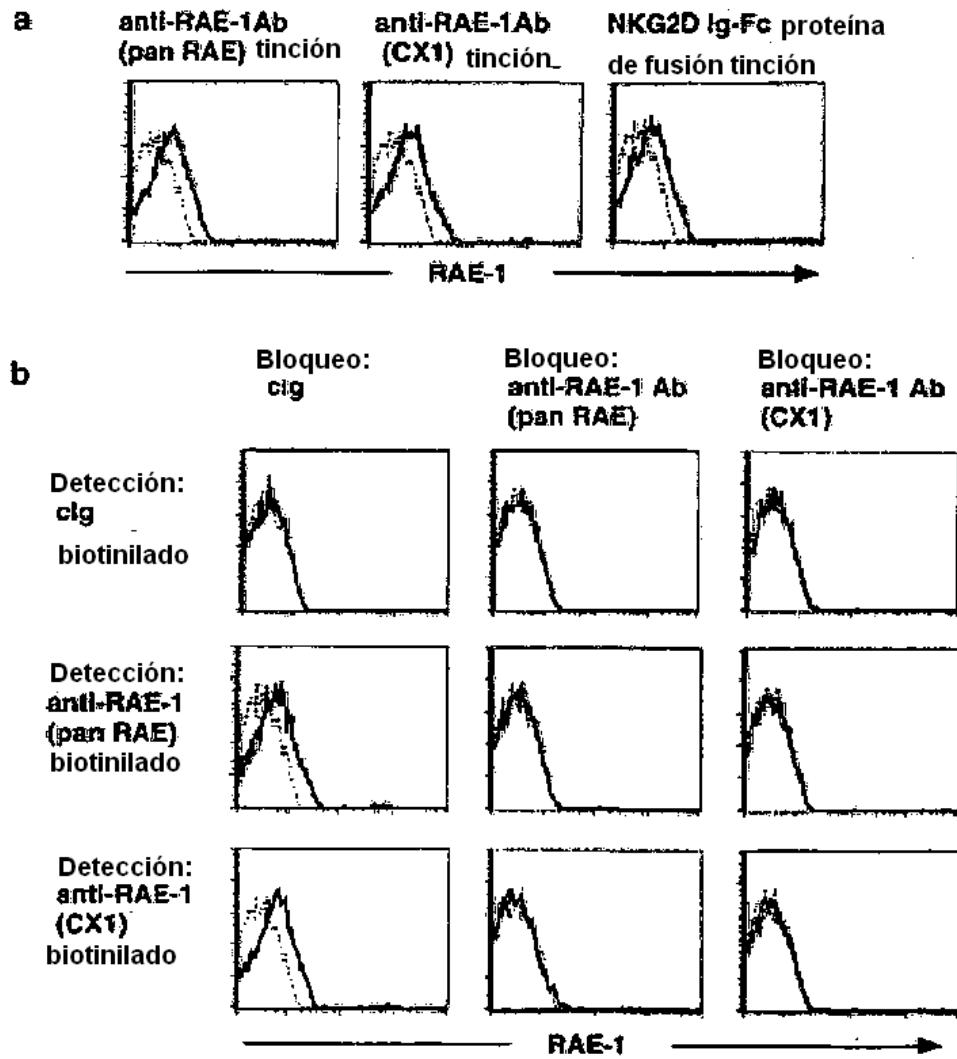


Figura 10



A

Secuencia de ADNc de NKG2D de tipo murino

```
atggcattga ttcgtgatcg aaagtctcat cactcagaga tgagcaaatg ccataattac
gacctcaagc cagcaaagtg ggatacttct caagaacaac agaaacaaag attagcacta
actaccagtc aacctggaga aaatgggtatc ataagaggaa gataccctat agaaaaactc
aaaatatctc caatgttcgt tgttcgagtc cttgctatag ccttggcaat tcgattcacc
cttaacacat tgatgtggct tgccattttc aaagagacgt ttcagccagt attgtgcaac
aaggaagtcc cagtttcctc aagagagggc tactgtggcc catgccctaa caactggata
tgtcacagaa acaactgtta ccaatttttt aatgaagaga aaacctggaa ccagagccaa
gcttctgtt tgtctcaaaa ttccagcctt ctgaagatat acagtaaaga agaacaggat
ttcttaaagc tggttaagtc ctatcactgg atgggactgg tccagatccc agcaaatggc
tcctggcagt ggaagatgg ctctctctc tcatacaatc agttaactct ggtggaaata
ccaaaaggat cctgtgctgt ctatggctca agctttaagg cttacacaga agactgtgca
aatctaaaca cgtacatctg catgaaaagg gcggtgtaa
```

B

Secuencia de aminoácidos de NKG2D de tipo murino

```
MALIRDRKSH HSEMSKCHNY DLKPAKWDTS QEQKQRLAL TTSQPGENGI IRGRYPIEKL
KISPMFVVRV LAIALAIRFT LNTLMWLAIF KETFQPVLCN KEVPVSSREG YCGPCPNWI
CHRNNCYQFF NEEKTWNQSQ ASCLSQNSSL LKIYSKEEQD FLKLVKSYHW MGLVQIPANG
SWQWEDGSSL SYNQLTLVEI PKGSCAVYGS SFKAYTEDCA NLNTYICMKR AV
```

C

Secuencia de ADNc de NKG2D humano

```
atgggggtgga ttcgtgggtcg gaggtctcga cacagctggg agatgagtga atttcataat
tataacttgg atctgaagaa gagtgatttt tcaacacgat ggcaaaagca aagatgtcca
gtagtcaaaa gcaaatgtag agaaaatgca tctccatttt ttttctgctg cttcatcget
gtagccatgg gaatccgttt cattattatg gtagcaatat ggagtgctgt attcctaaac
tcattattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct
aaaaactgga tatgttacia aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg
tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa
gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt
ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggctccattc tctacccaa cctactaaca
ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgctt cgagctttaa aggctatata
gaaaactgtt caactccaaa tacatacatc tgcatgcaaa ggactgtgta a
```

D

Secuencia de aminoácidos de NKG2D humano

```
MGWIRGRRSR HSWEMSEFHN YNLDLKKSD F STRWQKQRC P VVKSCKRENA SPFFFCFFIA
VAMGIRFIIM VAIWSAVFLN SLFNQEVQIP LTESYCGPCP KNWICYKNNC YQFFDESKNW
YESQASCMSQ NASLLKVYSK EDQDLLKLVK SYHWMGLVHI PTNGSWQWED GSILSPNLLT
I IEMQKGDCA LYASSFKGYI ENCSTPNTYI CMQRTV
```

Figura 11

Figura 12

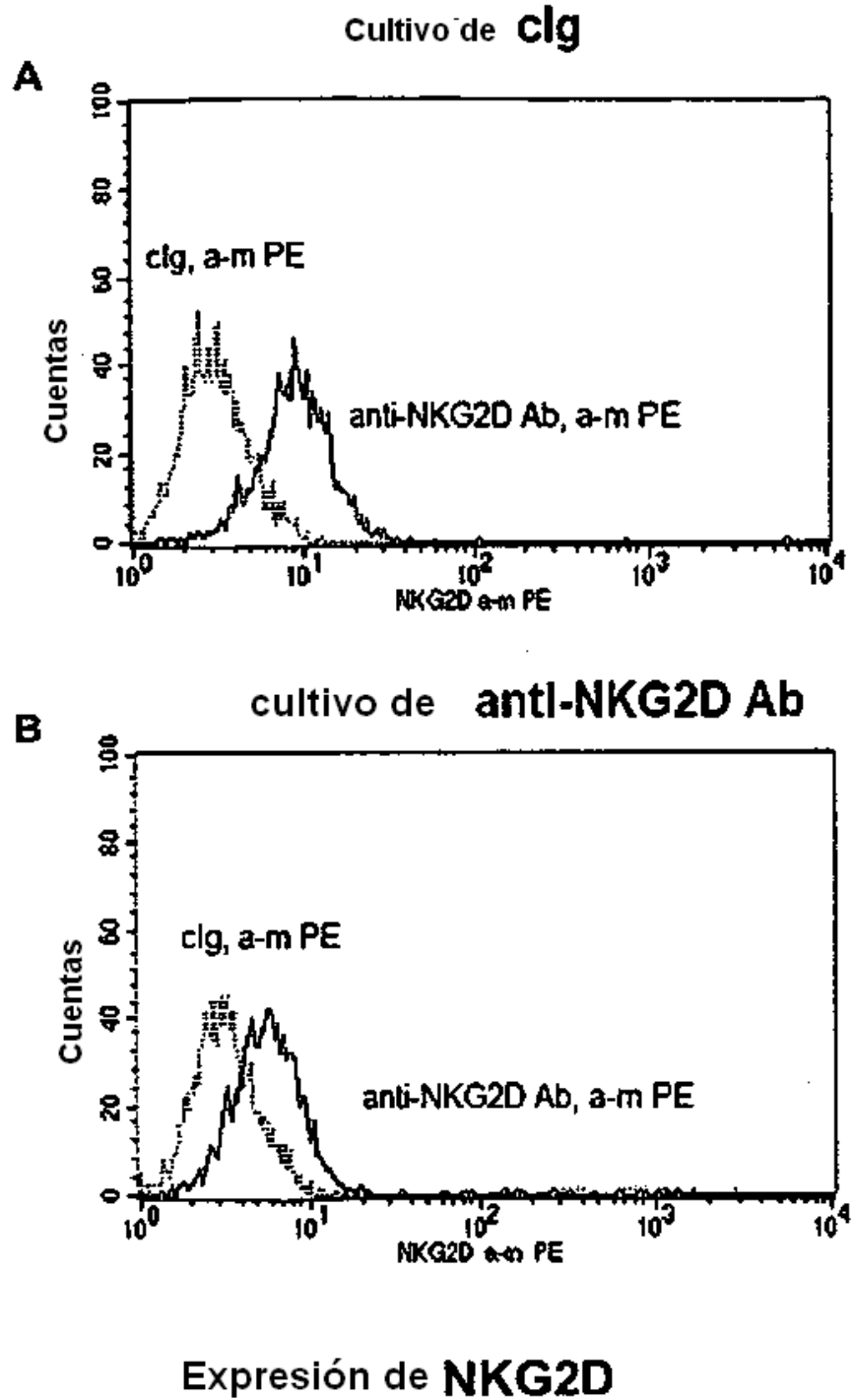


Figura 13

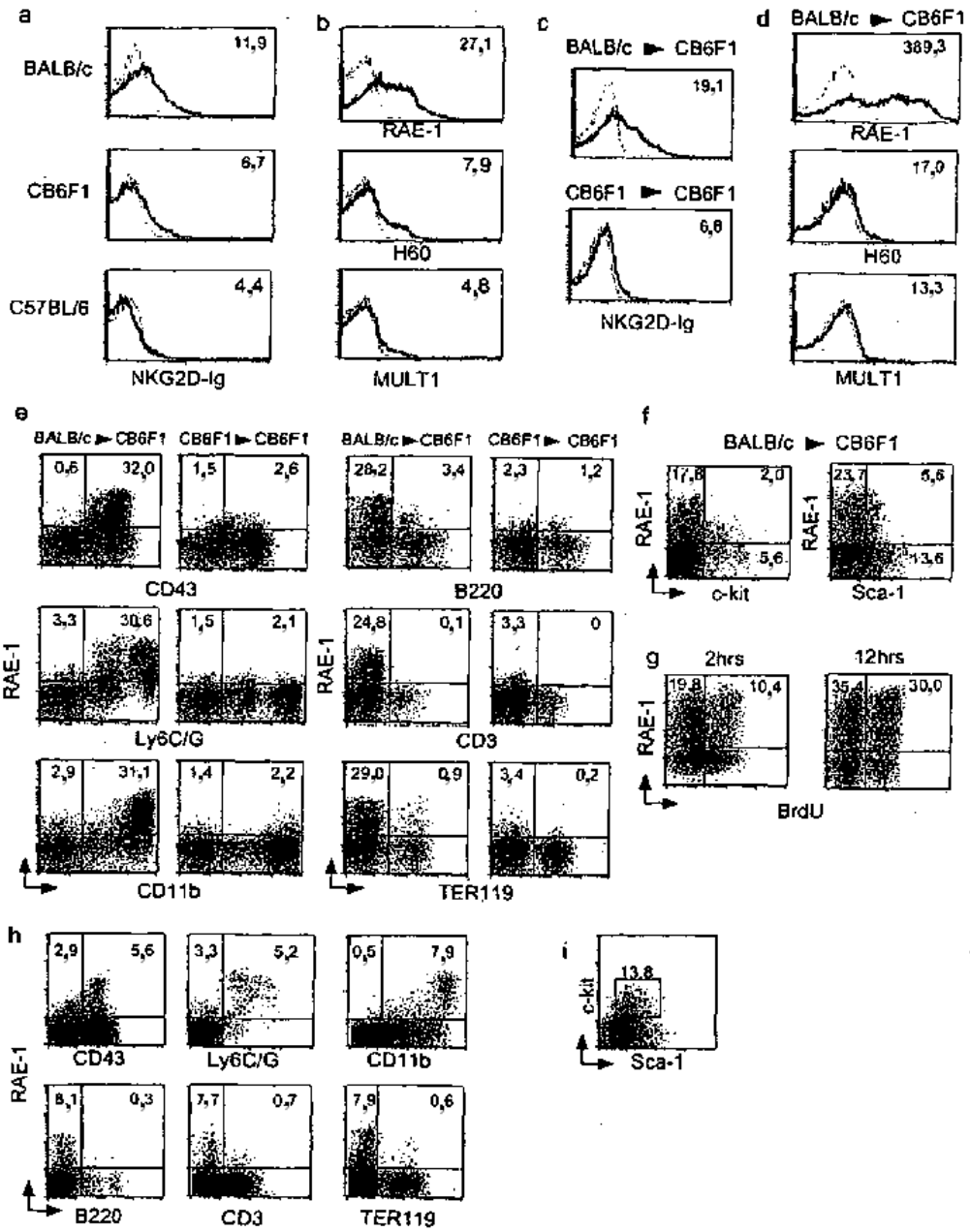


Figura 14

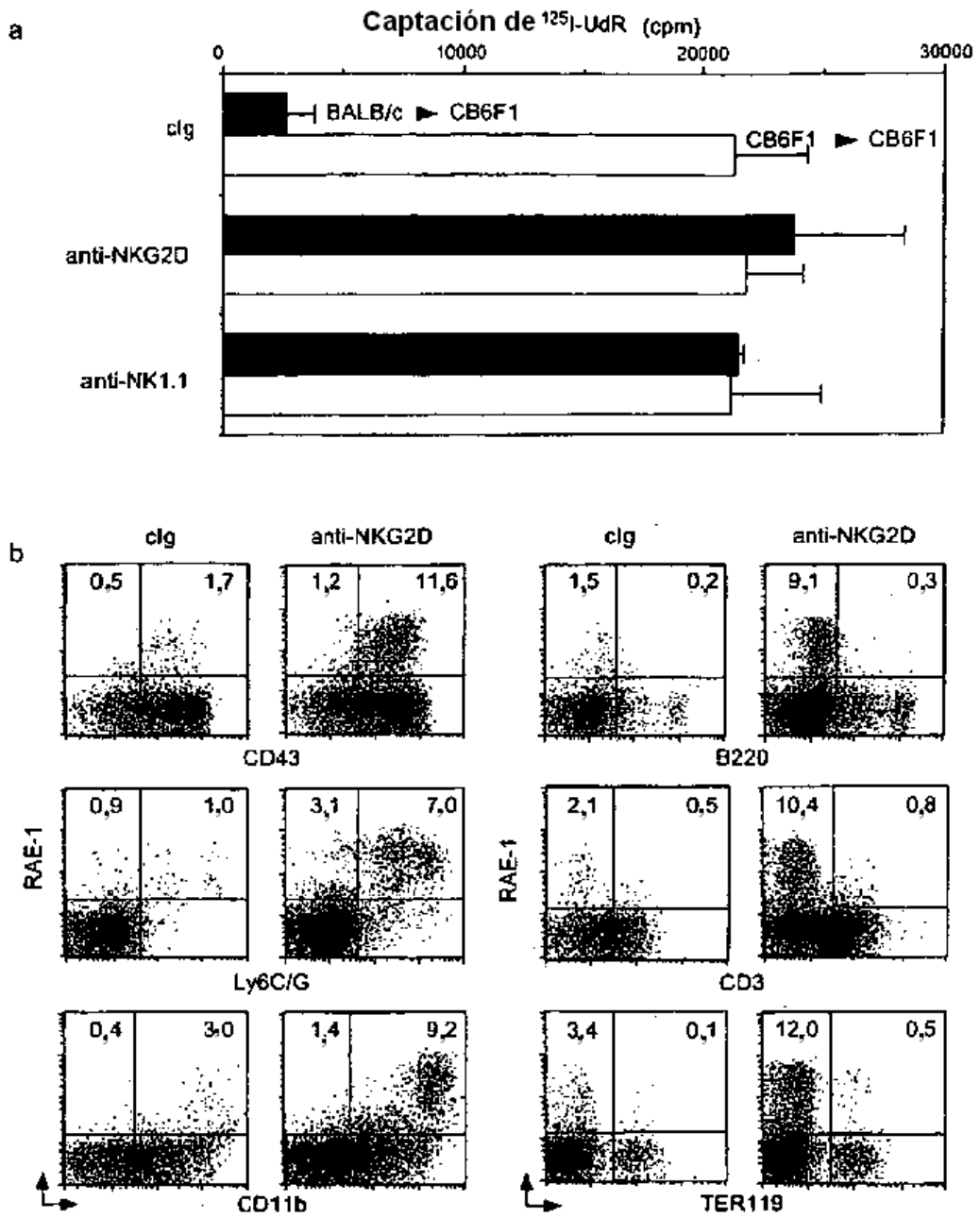


Figura 15

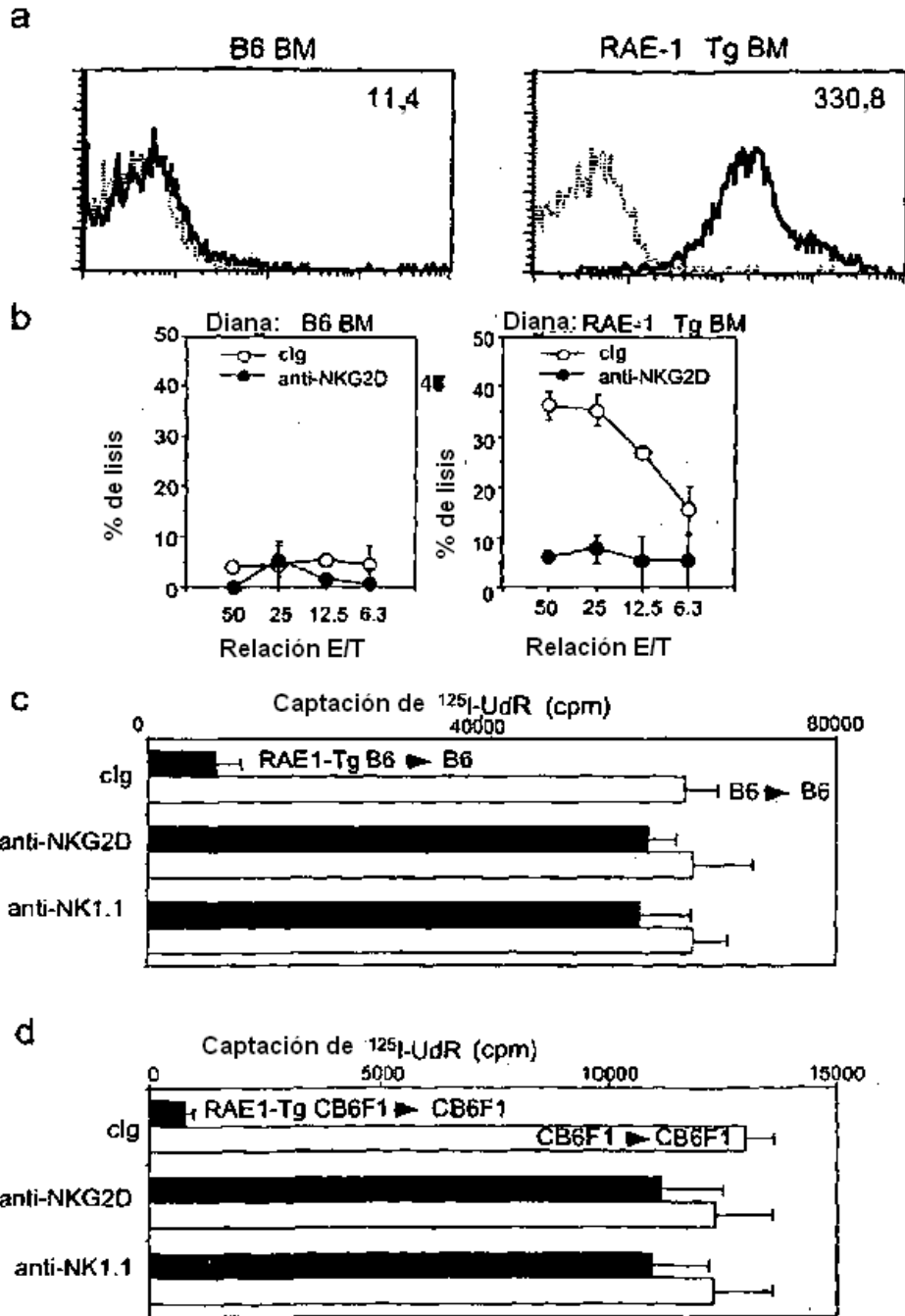


Figura 16

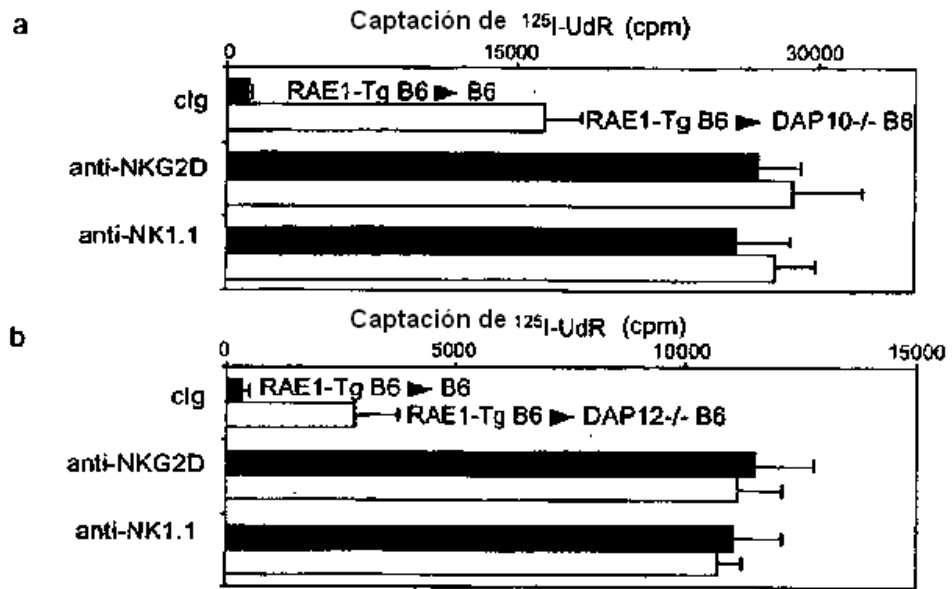


Figura 17

