

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 493**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2010 PCT/US2010/026841**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10104961**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2010 E 10751363 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2405929**

54 Título: **Un polipéptido SAP para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios y enfermedad del injerto contra el huésped**

30 Prioridad:

11.03.2009 US 209845 P

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

03.10.2018

73 Titular/es:

**PROMEDIOR INC. (100.0%)
101 Hartwell Avenue
Lexington, MA 02421-3125, US**

72 Inventor/es:

MURRAY, LYNNE, ANNE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

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

ES 2 684 493 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un polipéptido SAP para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios y enfermedad del injerto contra el huésped

5 La tolerancia inmunitaria es central para la capacidad de sistema inmunitario de diferenciar entre proteínas propias y exógenas. La tolerancia central se alcanza inicialmente durante la selección tímica por la delección de células T auto-reactivas. Sin embargo, la tolerancia central está incompleta, y se requiere regulación inmunitaria adicional en la periferia. Los mecanismos periféricos de regulación de células T incluyen la inducción de anergia, activación de muerte celular inducida, y modulación de la actividad de células T.

15 Las células T reguladoras son fundamentales en controlar varias respuestas inmunitarias. La ausencia o función deficiente de células T reguladoras se ha correlacionado con autoinmunidad en seres humanos, mientras que su presencia se ha asociado con tolerancia. Datos convincentes de modelos animales preclínicos indican que la transferencia adoptiva de células T reguladoras puede prevenir o curar varias enfermedades mediadas por células T, incluyendo enfermedades autoinmunitarias y rechazo de aloinjertos restableciendo la tolerancia inmunitaria hacia antígenos propios o aloantígenos. Se han descrito tres categorías de células T reguladoras en la población celular de linfocitos T CD4+: células TH3, células reguladoras de tipo 1, y células reguladoras T CD4+CD25+. Las células TH3 funcionan a través de la secreción de TGF- β y se pueden generar *in vitro* por estimulación en presencia de IL-4 o *in vivo* mediante administración oral de antígenos a baja dosis (Chen et al., Science 265:1237-1240, 1994; Inobe et al., Eur. J. Immunol. 28:2780-2790, 1998). Las células T reguladoras de tipo 1 suprimen las células T mediante la producción de IL-10 y TGF- β y se derivan por estimulación de células T de memoria en presencia de IL-10 (Groux et al., Nature 389:737-742, 1996; Groux et al., J. Exp. Med. 184:19-29, 1996). Se piensa que las células T reguladoras CD4+CD25+ funcionan como un regulador de autoinmunidad suprimiendo la proliferación y/o producción de citoquinas de células respondedoras a células T CD4+CD25- en el sitio de inflamación. Además, estas células reguladoras T disminuyen la magnitud de la respuesta inmunitaria, lo que permite que se elimine antígeno inocuo sin inducir patología.

30 Las células T reguladoras CD4+CD25+ están presentes tanto en seres humanos como en ratones y se caracterizan por la expresión de CD25 (para una revisión, véase Sakaguchi et al., Immunol. Rev. 182:18-32). Las células T reguladoras aisladas de sangre periférica humana son células de memoria muy diferenciadas basado en sus características de tinción por FACS y la corta longitud de telómeros y se piensa históricamente que derivan del timo (Taams et al., Eur. J. Immunol. 32:1621-1630, 2002; Jonuleit et al., J. Exp. Med. 193:1285-1294, 2001). En seres humanos, se cree que las células T reguladoras representan el 1-3% de todas las células T CD4+ y requieren activación para inducir función supresora. La función supresora de estas células T reguladoras está mediada principalmente a través de contacto célula-célula y se anula por la adición de IL-2 (Baecher-Allan et al., J. Immunol 167:1245-1253, 2001).

40 La población de células T reguladoras está reducida en animales y seres humanos propensos a autoinmunidad (véase, Salomon et al., Immunity 12:431-440, 2000; Kukreja et al., J. Clin. Invest. 109:131-140, 2002). Los ratones que portan la mutación scurfy ligada al cromosoma X desarrollan una enfermedad autoinmunitaria multiorgánica y carecen de células T reguladoras CD4+CD25+ convencionales (Fontenot et al., Nat. Immunol. 4:330-336, 2003; Khattri et al., Nat. Immunol. 4:337-342, 2003). Se ha mostrado que el gen mutado en estos ratones es FoxP3, que codifica un miembro de la familia forkhead/hélice winged y actúa como un represor transcripcional (Schubert et al., J. Biol. Chem. 276:37672-37679, 2001). En ratones, se ha mostrado que FoxP3 se expresa exclusivamente en células T reguladoras CD4+CD25+ y no se induce tras la activación de células CD25-. Sin embargo, cuando se introduce FoxP3 a través de retrovirus o a través de expresión de transgén, las células T CD4+CD25- indiferenciadas se convierten en células T reguladoras (Hori et al., Science 299:1057-1061, 2003). En seres humanos, se ha indicado que mutaciones en FoxP3 producen un trastorno linfoproliferativo grave conocido como síndrome IPEX (inmunidisregulación, poliendocrinopatía, enteropatía ligado al cromosoma X), caracterizado por enfermedad linfoproliferativa, diabetes dependiente de insulina, tiroiditis, eccema y muerte a una edad temprana (véase Wildin et al., J. Med. Genet. 39:537-545, 2002).

55 La población reguladora CD4+CD25+ es heterogénea, ya que el 20-30% también expresa HLA-DR. Las células T reguladoras DR+ inhiben la proliferación de células T y la producción de citoquinas a través de un mecanismo dependiente de contacto temprano que se asocia con una inducción adicional del ARNm de FoxP3. En contraste, las células T reguladoras DR- no inducen supresión dependiente de contacto temprano, sino que más bien inicialmente aumentan la secreción de IL-10 e IL-4. Finalmente, las células T reguladoras DR- inducen una supresión tardía de la proliferación que se asocia con un aumento retrasado en el ARNm de FoxP3 por las células T reguladoras. Por tanto, las células T reguladoras tanto DR+ como DR- pueden suprimir a través de un mecanismo mediado por contacto celular, pero la población DR- también puede suprimir induciendo la secreción de IL-10. Por tanto, es posible que diferentes tipos de enfermedades autoinmunitarias se puedan asociar con un defecto en la supresión por células T reguladoras ya sean DR+ o DR-.

65 Debido a su baja frecuencia en sangre periférica, las células T CD4+CD25+ humanas con función supresora recién aisladas son difíciles de aislar y expandir. En el modelo de ratón NOD autoinmunitario, un grupo de investigadores

- ha aislado recientemente células T reguladoras específicas de antígeno naturales del bazo y ganglios linfáticos de ratón. Estas células T reguladoras se expandieron *ex vivo* y se transfirieron al ratón NOD propenso a diabetes. Se demostró que el trasplante de estas células T reguladoras suprimía el desarrollo de diabetes (Tang et al., J. Exp. Med. 199:1455-1465, 2004, Masteller et al., J. Immunol 175:3053-3059, 2005; Tarbell et al., J. Exp Med 199:1467-1477, 2004). Este enfoque demuestra el beneficio terapéutico de la transferencia de células T reguladoras para tratar enfermedad autoinmunitaria. Sin embargo, el enfoque usado en el modelo de ratón NOD no es terapéuticamente aplicable a sujetos humanos, debido al requisito de que se necesita aislar un gran número de células T CD4+CD25+ raras (aproximadamente el 4% de las células T circulantes) de sangre periférica. Además, este modelo de ratón contiene un único receptor de células T (TCR) fijo y no aborda el problema de seguir la evolución del repertorio de TCR o identificar células T específicas de antígeno en sistemas complejos donde está presente una respuesta de células T policlonal. Estudios similares no han sido posibles en sujetos humanos debido a la baja frecuencia de células T reguladoras específicas de antígeno que circulan en la sangre periférica, en especial con respecto a células T autorreactivas.
- Las células reguladoras de tipo I surgen en la periferia después de encontrarse con antígeno en presencia de IL-10. El perfil de producción de citoquinas único (IL-2^{bajo/-} IL-4⁻, 1L-5⁺, IL-10⁺, TGF-β⁺) distingue las células reguladoras de tipo I de células T cooperadoras 0 (T₀1) y T_H2. Hasta la fecha, no se han identificado marcadores de superficie celular específicos para células reguladoras de tipo I. Las células reguladoras de tipo I tienen una capacidad proliferativa muy baja después de la activación *in vitro* a través del receptor de células T, en parte debido a la producción autocrina de IL-10. Las células reguladoras de tipo I regulan las respuestas inmunitarias mediante la secreción de las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF-β, y suprimen respuestas de células T tanto indiferenciadas como de memoria y disminuyen la expresión de moléculas coestimuladoras y citoquinas proinflamatorias por células presentadoras de antígeno. Además, las células reguladoras de tipo I favorecen la producción de IgD, IgA e IgG por células B. De forma importante, las células reguladoras de tipo I son inducibles, específicas de antígeno, y necesitan ser activadas a través de su TCR para ejercer sus funciones supresoras. Sin embargo, una vez activadas, median la supresión de una manera no específica de antígeno (Roncarolo *et al. Immunol. Rev.* 2006. 212: 28-50).
- Dado el importante papel que las células T reguladoras desempeñan en la tolerancia inmunitaria, hay una necesidad para desarrollar métodos para generar, seleccionar y expandir células T reguladoras humanas para uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunitarias, afecciones inflamatorias, y para la prevención de rechazo a injertos en un receptor después de trasplante de órgano sólido o células madre.
- La invención se define mediante las reivindicaciones.
- La invención proporciona un polipéptido P amiloide de suero (SAP) para uso en tratar o prevenir un trastorno o afección autoinmunitaria en un paciente humano, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 1.
- La invención proporciona un polipéptido P amiloide de suero (SAP) para uso en tratar o prevenir la enfermedad del injerto contra el huésped en un paciente humano, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 1.
- En parte, la divulgación demuestra que el componente P amiloide de suero (SAP) y agonistas de SAP son útiles en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios. Un aspecto de la divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir un trastorno o afección autoinmunitaria en un paciente en necesidad de ello administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de SAP. El agonista de SAP puede fomentar la supresión mediada por células T reguladoras del trastorno o afección autoinmunitaria. La administración de un agonista de SAP puede inhibir el inicio de un trastorno o afección autoinmunitaria, reducir el número de días que un paciente está afectado con un trastorno o afección autoinmunitaria, y/o reducir la gravedad de un trastorno o afección de hipersensibilidad. La divulgación proporciona métodos para tratar tanto pacientes afectados con un trastorno autoinmunitario, así como pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno autoinmunitario. En algunas implementaciones, la administración de un agonista de SAP puede comenzar antes de, al mismo tiempo que, o después de tratamientos u otros sucesos que pueden colocar a los pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno autoinmunitario. En ciertos aspectos, los agonistas de SAP son útiles en tratar un trastorno autoinmunitario antes del inicio de fibrosis. En algunas formas de realización, al paciente se le administra un agente activo adicional. En ciertos aspectos, el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir el trastorno autoinmunitario o síntomas. En ciertas implementaciones, SAP y agonistas de SAP son útiles en tratar trastornos o afecciones autoinmunitarias antes del inicio de fibrosis.
- La divulgación proporciona además métodos para tratar o prevenir la enfermedad del injerto contra el huésped en un paciente en necesidad de ello administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de SAP. El agonista de SAP puede fomentar la supresión mediada por células T reguladoras de la enfermedad del injerto contra el huésped. La administración de un agonista de SAP puede inhibir el inicio de un trastorno o afección autoinmunitaria, reducir el número de días que un paciente está afectado con un trastorno o afección autoinmunitaria, y/o reducir la gravedad de la enfermedad del injerto contra el huésped. La divulgación proporciona

métodos para tratar tanto pacientes afectados por la enfermedad del injerto contra el huésped, así como pacientes en riesgo de desarrollar la enfermedad del injerto contra el huésped. En algunas implementaciones, la administración de un agonista de SAP puede comenzar antes de, al mismo tiempo que, o después de tratamientos que pueden colocar a los pacientes en riesgo de desarrollar la enfermedad del injerto contra el huésped. En ciertos aspectos, los agonistas de SAP son útiles en tratar la enfermedad del injerto contra el huésped antes del inicio de fibrosis. En algunas implementaciones, al paciente se le administra un agente activo adicional. En ciertos aspectos, el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir la enfermedad del injerto contra el huésped. En ciertas formas de realización, SAP y agonistas de SAP son útiles en tratar la enfermedad del injerto contra el huésped antes del inicio de fibrosis.

La divulgación comprende además métodos para tratar o prevenir un trastorno o afección autoinmunitaria en un paciente usando células T reguladoras. El método comprende obtener una muestra que contiene células T, poner en contacto la muestra de células T con un agonista de SAP en un cultivo *ex vivo* para producir una población de células enriquecida para células T reguladoras, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T reguladoras aisladas al paciente para tratar o prevenir un trastorno o afección autoinmunitaria. En algunas formas de realización, las células T reguladoras son células T reguladoras FoxP3⁺ y/o productoras de IL-10. El agonista de SAP puede fomentar la supresión mediada por células T reguladoras del trastorno o afección autoinmunitaria. La administración de células T reguladoras puede inhibir el inicio de un trastorno o afección autoinmunitaria, reducir el número de días que un paciente está afectado con un trastorno o afección autoinmunitaria, y/o reducir la gravedad de un trastorno o afección autoinmunitaria. La divulgación proporciona métodos para tratar tanto pacientes afectados con un trastorno autoinmunitario, así como pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno autoinmunitario. En algunas implementaciones, la administración de células T reguladoras puede comenzar antes de, al mismo tiempo que, o después de tratamientos que pueden colocar a los pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno autoinmunitario. En algunas implementaciones, las células T reguladoras se administran en base periódica. En ciertos aspectos, las células T reguladoras son útiles en tratar un trastorno autoinmunitario antes del inicio de fibrosis. En algunas formas de realización, al paciente se le administra un agente activo adicional. En ciertos aspectos, el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir el trastorno autoinmunitario. En ciertos aspectos, el agente activo adicional es un agonista de SAP. En ciertos aspectos, el agente activo adicional es una citoquina. Las citoquinas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, IL-2, IL-4, IL-10, TGF-β, IL-15 y/o IL-17. En algunas implementaciones, el agente activo adicional se administra en base periódica.

La divulgación proporciona además métodos para tratar o prevenir una respuesta inmunitaria adversa en un paciente que ha experimentado, o experimentará, un trasplante de órgano o tejido. El método comprende obtener una muestra que contiene una célula T, poner en contacto la muestra de célula T con un agonista de SAP en un cultivo *ex vivo* para producir una población de células enriquecida para células T reguladoras, aislar las células T reguladoras y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T reguladoras aisladas al paciente para tratar o prevenir una respuesta inmunitaria adversa. En ciertas implementaciones, al paciente se le administra un agonista de SAP antes de obtener la muestra que contiene células T. En algunas implementaciones, las células T reguladoras son células T reguladoras FoxP3⁺ y/o productoras de IL-10. En ciertas implementaciones, el órgano o tejido trasplantado es un órgano sólido seleccionado de riñón, corazón, pulmón, hígado, páncreas o tejido corneal. En algunas implementaciones el órgano o tejido trasplantado es sangre o médula ósea. En ciertos aspectos la respuesta inmunitaria adversa es enfermedad del injerto contra el huésped. En ciertos aspectos, las células T reguladoras se administran al menos un día antes del trasplante. En ciertos aspectos, las células T reguladoras se administran desde uno a cinco días antes del trasplante. En ciertos aspectos, las células T reguladoras se administran en base periódica. En algunas implementaciones, al paciente se le administra un agente activo adicional. En ciertos aspectos, el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir la enfermedad del injerto contra el huésped. En ciertos aspectos, el agente activo adicional es un agonista de SAP. En ciertos aspectos, el agente activo adicional es una citoquina. Las citoquinas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, IL-2, IL-4, IL-10, TGF-β, IL-15 y/o IL-17. En algunas implementaciones, el agente activo adicional se administra en base periódica. En ciertas implementaciones, las células T reguladoras de la invención son útiles en tratar o prevenir una respuesta inmunitaria adversa en un paciente que ha experimentado, o experimentará, un trasplante de órgano o tejido antes del inicio de fibrosis.

La divulgación proporciona además una composición que comprende una población de células T reguladoras FoxP3⁺ aisladas y un soporte farmacéuticamente aceptable que es adecuada para uso en un paciente humano. En algunas implementaciones, la composición comprende además un agente activo adicional. En ciertas implementaciones, el agente activo adicional es un agonista de SAP. En ciertos aspectos, el agente activo adicional es una citoquina. Las citoquinas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, IL-2, IL-4, IL-10, TGF-β, IL-15 y/o IL-17. En ciertas implementaciones, el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir el trastorno autoinmunitario.

La divulgación proporciona métodos para producir una población de células enriquecida para células T reguladoras proporcionando una muestra de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), poner en contacto la muestra de CMSP con un agonista de SAP, y cocultivar la muestra de CMSP con células T. En algunas formas de

realización, la muestra de CMSP comprende células T. En ciertos aspectos, las células T reguladoras son células T reguladoras FoxP3⁺ y/o productoras de IL-10.

5 La divulgación proporciona además métodos para tratar un trastorno autoinmunitario en un paciente proporcionando una muestra de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), poner en contacto la muestra de CMSP con un agonista de SAP mientras se cocultiva con las células T para producir una población de células enriquecida para células T reguladoras, y administrar las células T reguladoras al paciente.

10 La divulgación proporciona además métodos para producir una población de células enriquecidas para células T reguladoras proporcionando una población de células T y poniendo en contacto las células T con un agonista de SAP.

15 La divulgación proporciona además métodos para expandir células T reguladoras poniendo en contacto una población de células T reguladoras con un agonista de SAP. En algunas formas de realización, el contacto se efectúa *ex vivo*. En algunas implementaciones, el contacto se efectúa *in vivo* administrando el agonista de SAP a un paciente. En ciertos aspectos, el paciente está afectado con o en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria. En ciertos aspectos el paciente está afectado con la enfermedad del injerto contra el huésped. En ciertos aspectos, la población de células T reguladoras incluye células T reguladoras FoxP3⁺ y/o productoras de IL-10.

20 Los trastornos o afecciones autoinmunitarias que se pueden tratar por los métodos de la divulgación incluyen, pero no están limitados a, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, miocarditis autoinmunitaria, pénfigo, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, artritis de Lyme crónica, cardiomiopatía dilatada familiar, dermatomiositis juvenil, policondritis, síndrome de Sjogren, psoriasis, artritis idiopática juvenil, enfermedad intestinal inflamatoria, lupus eritematoso sistémico, y enfermedad de injerto contra el huésped. En ciertas formas de realización, los agonistas de SAP y las células T reguladoras de la invención son útiles en tratar trastornos o afecciones autoinmunitarios antes del inicio de fibrosis. En ciertas formas de realización, los agonistas de SAP y las células T reguladoras de la invención son útiles en tratar artritis reumatoide antes del inicio de fibrosis. En ciertas formas de realización, los agonistas de SAP y las células T reguladoras de la invención son útiles en tratar artritis psoriásica antes del inicio de fibrosis. En ciertas formas de realización, los agonistas de SAP y las células T reguladoras de la invención son útiles en tratar psoriasis antes del inicio de fibrosis. En ciertas formas de realización, los agonistas de SAP y las células T reguladoras de la invención son útiles en tratar lupus eritematoso sistémico antes del inicio de fibrosis. En ciertas implementaciones, los agonistas de SAP y las células T reguladoras de la invención son útiles en tratar enfermedad intestinal inflamatoria antes del inicio de fibrosis.

35 En ciertos aspectos, los agonistas de SAP y las células T reguladoras de la divulgación se pueden usar para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad ocular inflamatoria incluyendo, por ejemplo, enfermedades de ojos secos, conjuntivitis alérgica, uveítis, y uveorretinitis, así como inflamación ocular asociada con trasplante de córnea, trastornos neoplásicos y trastornos congénitos.

40 La divulgación proporciona agonistas de SAP útiles en los métodos de la divulgación. Los agonistas de SAP se pueden administrar por vía tópica, por inyección (por ejemplo, inyección intravenosa), por inhalación, depósito o bomba continuo, o cualquier combinación de los mismos. Los agonistas de SAP pueden aumentar o imitar la señalización de SAP, aumentar la actividad de SAP, aumentar el ARNm y/o expresión de proteína de SAP, o aumentar los niveles de SAP en suero. Un agonista de SAP puede ser una molécula pequeña, ácido nucleico, polipéptido o anticuerpo. En ciertos aspectos, el agonista de SAP es un polipéptido SAP, un anticuerpo anti-FcγRI, un anticuerpo anti-FcγRII, un anticuerpo anti-FcγRIII, un anticuerpo anti-FcγR entrecruzado, un anticuerpo IgG agregado, o un anticuerpo IgG entrecruzado. El agonista de SAP se puede formular para ser administrado junto con uno o más agonistas de SAP u otros agentes activos.

50 Los agentes activos adicionales que se pueden administrar junto con agonistas de SAP incluyen, pero no están limitados a, beta-interferones, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, bloqueantes de necrosis tumoral alfa, fármacos antipalúdicos, ciclosporinas, inhibidores de necrosis tumoral alfa, inmunosupresores, inmunomoduladores, agentes terapéuticos de anticuerpo, terapias celulares y epítomos de células T (por ejemplo, Tolerotrans Transplant Rejection Therapy por Circassia, etc.).

60 **Figura 1.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de polipéptidos P amiloide séricos (la secuencia señal no está representada) humano (SEQ ID NO: 1, aminoácidos 20-223 del No. de acceso de Genbank NP_001630), Gallus gallus (SEQ ID NO: 2, aminoácidos 20-227 del No. de acceso de Genbank NP_001034653), Bos taurus (SEQ ID NO: 3, aminoácidos 20-224 del No. de acceso de Genbank AAI02624), y Cricetulus migratorius (SEQ ID NO: 4, aminoácidos 20-223 del No. de acceso de Genbank AAB28726). Los aminoácidos idénticos al SAP humano están sombreados.

65 **Figura 2.** La terapia con SAP exógeno previno y revirtió la hipersensibilidad de las vías respiratorias establecida en un modelo de asma fúngico. Ratones C57BL/6 sensibilizados con *A. fumigatus* y expuestos a conidios recibieron

PBS o hSAP a través de inyección intraperitoneal en días alternos desde los días 0-15 (A) o 15-30 (B) después de los conidios, y se midió la resistencia de las vías respiratorias después de exposición a metacolina usando análisis de resistencia en vías respiratorias invasivo (Buxco). Los datos son media \pm EEM, n=5 ratones/grupo, *P<0,05, ***P<0,001 comparado con la resistencia de vías respiratorias basal en el grupo de tratamiento apropiado.

Figura 3. Generación de citoquinas en cultivo de esplenocitos de células aisladas y estimuladas con antígeno de aspergillus y tratadas *in vitro* e *in vivo* con hSAP. Las células del bazo se aislaron de animales 15 días (A) o 30 días (B) después de exposición intratraqueal a conidios. Los animales se trataron *in vivo* con hSAP (8 mg/kg, c2d, intranasal; barras rellenas) o PBS control (c2d, intranasal; barras abiertas) durante al menos las dos últimas semanas del modelo.

Figura 4. Expresión de FoxP3 en ganglios linfáticos drenantes pulmonares (A y B) o cultivos de esplenocitos (C). A y B son de ganglios linfáticos drenantes del pulmón tomados el día 15 de animales tratados con PBS (control) o animales tratados con SAP (+SAP) y teñidos para FoxP3. C es de cultivos de esplenocitos que se estimularon con antígeno de *Aspergillus in vitro* en presencia o ausencia de SAP y se evaluaron sobrenadantes sin células para niveles de proteína de B. IL-10, C. IL-4, D. IL-5 y E. IFN- γ por ELISA específico. La expresión total de FoxP3 se cuantificó usando RT-PCR a tiempo real.

Figura 5. Efectos de SAP *in vivo* e *in vitro* en IL-10 y memoria de antígeno. Los ratones se sensibilizaron y expusieron con *Aspergillus fumigatus in vivo* y se trataron con control (PBS, i.p., 2cd, barras abiertas) o SAP (5 mg/kg, i.p., c2d, barras rellenas) los días 15-30 tras la exposición a conidios vivos. El día 30 los ratones se sacrificaron, A. se midió IL-10 pulmonar total por luminex, B-E. Se estimularon cultivos de esplenocitos *in vitro* con antígeno de *Aspergillus fumigatus*, en presencia o ausencia de SAP y se evaluaron sobrenadantes sin células para niveles de proteína de B. IL-10, C. IL-4, D. IL-5 y E. IFN- γ por ELISA específico. Los animales tratados con SAP (i.p., 2cd los días 15-30) tuvieron niveles aumentados de IL10 en los pulmones en comparación con animales tratados con PBS (i.p., c2d, los días 15-30) y comparado con pulmón nativo, no alérgico. Además, hubo una respuesta de memoria de antígeno disminuida, lo que indica número y/o función aumentados de células T reguladoras.

Visión de conjunto

Las células T reguladoras son un subconjunto de células T que suprimen la actividad de células T efectoras, así como otros tipos celulares implicados en la inmunidad tanto innata como adaptativa (Shevach, EM. 2006. Immunity 25: 195-201). Una de las funciones principales de las células T reguladoras es proteger el huésped frente a autoantígenos, limitando así la autoinmunidad. Además, ciertas enfermedades autoinmunitarias, incluyendo diabetes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y artritis idiopática juvenil, resultan de defectos o bien en el número o función de células T (Baecher-Allan *et al.* 2006. Immunological reviews 212: 203-216). De hecho, IPEX (síndrome de disregulación inmunitaria, poliendocrinopatía ligado al cromosoma X) es el resultado de una mutación de FoxP3, un factor de transcripción clave expresado por células T reguladoras (Baecher-Allan *et al.* 2003. Novartis foundation symposium 252: 67-91; Fontenot *et al.* 2003. Nature immunology 4: 330-336). Una estrategia terapéutica actual para tratar trastornos autoinmunitarios es la transferencia adoptiva de células T reguladoras que se han purificado y expandido *in vitro* a un paciente. Esta divulgación demuestra que la administración de proteína P amiloide sérica (SAP) *in vivo* produce una expansión de células T supresoras que son eficaces en tratar enfermedades mediadas por células T. Esta divulgación proporciona nuevos enfoques terapéuticos para expandir células T reguladoras (*in vivo* o *ex vivo*) para tratar o prevenir enfermedades donde se han observado anomalías en el número y/o función de células T (por ejemplo, trastornos autoinmunitarios, enfermedad del injerto contra el huésped, etc.).

SAP es una proteína de suero natural en mamíferos compuesta de cinco subunidades idénticas o protómeros que están asociados de forma no covalente en una molécula de tipo disco. SAP es una glucoproteína pentamérica de 125.000 dalton compuesta de cinco protómeros de 25.000 dalton unidos de forma no covalente. SAP pertenece a la superfamilia de pentraxina de proteínas, caracterizada por esta estructura pentamérica cíclica. Las pentraxinas cortas clásicas incluyen SAP, así como la proteína C reactiva (Osmand, A. P., et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 74:739-743 (1977)). SAP se sintetiza en el hígado y la semivida fisiológica de SAP humana es 24 horas. La secuencia de la subunidad de SAP humana se representa en SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 20-223 del No. de acceso de Genbank NP_001630, sin representar la secuencia señal). Trabajo previo ha demostrado que SAP se une a receptores de Fc para IgG (Fc γ R). La unión de SAP a Fc γ R proporciona una señal inhibitoria para la diferenciación de fibrocito, precursor de fibrocito, precursor de miofibroblasto y/o precursor de monocito hematopoyético.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un trastorno o síntomas del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno (por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria) y/o efecto adverso atribuible al trastorno. "Tratamiento", como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) aumentar el tiempo de supervivencia; (b) disminuir el riesgo de muerte debido a la enfermedad; (c) prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero aún no se ha diagnosticado que la tiene; (d) inhibir la enfermedad, es decir,

parar su desarrollo (por ejemplo, reducir la velocidad de evolución de la enfermedad); y (e) mejorar la enfermedad, es decir, producir regresión de la enfermedad.

5 Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico que “inhibe” un trastorno o afección es un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada en relación a una muestra control sin tratar, o retrasa el inicio o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección relativo a la muestra control sin tratar.

10 Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico que “previene” un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada en relación a una muestra control sin tratar, o retrasa el inicio o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección relativo a la muestra control sin tratar.

15 Como se usa en el presente documento, los términos “sujeto” y “paciente” se refiere a animales incluyendo mamíferos, incluyendo seres humanos. El término “mamífero” incluye primates, animales domesticados incluyendo perros, gatos, oveja, ganado, caballos, cabras, cerdos, ratones, ratas, conejos, cobayas, animales cautivos tal como animales de zoo, y animales salvajes.

20 Como se usa en el presente documento el término “tejido” se refiere a un órgano o conjunto de células especializadas tal como tejido de piel, tejido pulmonar, tejido renal, y otros tipos de células.

25 El término “efecto terapéutico” está reconocido en la técnica y se refiere a un efecto local o sistémico en animales, particularmente mamíferos, y más particularmente seres humanos, causado por una sustancia farmacológicamente activa. La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad de tal sustancia que produce algún efecto local o sistémico deseado a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz de tal sustancia variará dependiendo del sujeto y estado de enfermedad que se trata, el peso y edad del sujeto, la gravedad del estado de enfermedad, la manera de administración y similares, que puede determinar fácilmente un experto en la materia. Por ejemplo, ciertas composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar en una cantidad suficiente para producir un efecto deseado a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a tal tratamiento.

30

35 El término “respuesta inmunitaria” se refiere a respuestas del huésped a antígenos exógenos o propios. El término “respuestas inmunitarias anómalas” se refiere al fracaso del sistema inmunitario para distinguir lo propio de lo no propio o el fracaso para responder a antígenos exógenos. En otras palabras, las respuestas inmunitarias anómalas son respuestas inmunitarias inapropiadamente reguladas que producen trastornos en el paciente incluyendo respuestas autoinmunitarias e hipersensibilidad a antígenos exógenos. “Inapropiadamente reguladas” puede significar inapropiadamente inducida, inapropiadamente suprimida y/o sin sensibilidad.

40 Como se usa en el presente documento, una “enfermedad autoinmunitaria” es una enfermedad o trastorno que surge de y dirigida a los tejidos propios de un individuo. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero no están limitados a, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, miocarditis autoinmunitaria, pénfigo, enfermedad celiaca, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, artritis de Lyme crónica, cardiomiopatía dilatada familiar, dermatomiositis juvenil, policondritis, síndrome de Sjogren, psoriasis, artritis idiopática juvenil, enfermedad intestinal inflamatoria, lupus eritematosos sistémico, y enfermedad de injerto contra el huésped.

45

50 Como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a un polinucleótido tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, donde sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). También se debe entender que el término incluye, como equivalentes, análogos de cualquiera de ARN o ADN hechos de análogos de nucleótidos y, según sea aplicable a la forma de realización que se describe, polinucleótido monocatenario (tal como sentido o antisentido) y bicatenario.

55 Los términos “péptidos”, “proteínas” y “polipéptidos” se usan de forma intercambiable en el presente documento. El término “proteína purificada” se refiere a una preparación de una proteína o proteínas que están preferiblemente aisladas de, o de otra manera sustancialmente libres de, otras proteínas normalmente asociadas con la(s) proteína(s) en una célula o lisado celular. El término “sustancialmente libre de otras proteínas celulares” (también denominado en el presente documento como “sustancialmente libre de otras proteínas contaminantes”) se define como que abarca preparaciones individuales de cada una de las proteínas componentes que comprenden menos del 20% (en peso seco) de proteína contaminante, y preferiblemente comprenden menos del 5% de proteína contaminante. Las formas funcionales de cada una de las proteínas componentes se pueden preparar como preparaciones purificadas usando un gen clonado como se describe en los ejemplos adjuntos. Mediante “purificado”, se quiere decir, cuando se hace referencia a preparaciones de proteínas componentes usadas para generar una mezcla de proteína reconstituida, que la molécula indicada está presente en la ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, tal como otras proteínas (particularmente otras proteína que pueden sustancialmente enmascarar, disminuir, confundir o alterar las características de las proteínas componentes ya sea como preparaciones purificadas o en su función en la mezcla reconstituida objeto). El término “purificado” como se usa en

60

65

el presente documento preferiblemente significa al menos el 80% en peso seco, más preferiblemente en el intervalo del 85% en peso, más preferiblemente el 95-99% en peso, y lo más preferiblemente al menos el 99,8% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo presente (pero agua, tampones, y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular de menos de 5000, pueden estar presentes). El término “puro” como se usa en el presente documento preferiblemente tiene los mismos límites numéricos que “purificado” inmediatamente antes.

Los términos “compuesto”, “compuesto de prueba”, y “agente activo” se usan en el presente documento de forma intercambiable y se pretende que incluyan, pero sin estar limitados a, polipéptidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas y anticuerpos. “Molécula pequeña” como se usa en el presente documento, se pretende que se refiera a una molécula que tiene un peso molecular de menos de 5 kD y los más preferiblemente de menos de aproximadamente 2,5 kD, o incluso menos de 1 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas (incluyendo, pero no limitado a, metales y compuestos organometálicos). Muchas empresas farmacéuticas tienen bibliotecas extensas de mezclas químicas y/o biológicas que comprenden matrices de moléculas pequeñas, con frecuencia extractos fúngicos, bacterianos o de algas, que se pueden cribar con cualquiera de los ensayos de la divulgación.

Métodos de tratamiento

Un aspecto de la divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir un trastorno o afección autoinmunitario en un paciente administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de SAP a un paciente en necesidad de ello. Los ejemplos de la divulgación demuestran que la administración de SAP a un mamífero produce la expansión de células T reguladoras determinado por un aumento en células FoxP3⁺ y supresión aumentada de actividad de células T efectoras mediada por células T (véase, por ejemplo, la figura 3). Como muchas enfermedades autoinmunitarias en seres humanos están asociadas con bajos números de células T reguladoras y/o función de células T reguladoras reducida, la expansión preferente de células T reguladoras sobre células T efectoras autorreactivas promete un beneficio terapéutico sustancial a pacientes afectados con trastornos autoinmunitarios. La presente divulgación enseña métodos de administrar agonistas de SAP para fomentar la supresión mediada por células T reguladoras de trastornos o afecciones autoinmunitarias.

En algunas implementaciones, la administración de un agonista de SAP reduce el número de días que un paciente está afectado con un trastorno autoinmunitario en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días. En algunas implementaciones, la administración de un agonista de SAP inhibe el inicio de un trastorno autoinmunitario en un paciente en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días.

Mientras que el método de la invención se puede usar para tratar pacientes afectados con un trastorno autoinmunitario, en algunas implementaciones, los métodos también se aplican a pacientes que no tienen, pero están en riesgo de desarrollar una respuesta autoinmunitaria. En pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno autoinmunitario, el tratamiento de los métodos de la divulgación puede reducir el número de días que un paciente está afectado con o inhibe el inicio de un trastorno autoinmunitario en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días. En algunas implementaciones, el tratamiento según los métodos de la divulgación previene un trastorno autoinmunitario en un paciente en riesgo de desarrollar tal enfermedad.

En ciertos aspectos de la divulgación, se administra un agonista de SAP a un paciente antes, durante y/o después de tratamiento con una terapia que produce una respuesta autoinmunitaria o pone un paciente en riesgo de desarrollar tal trastorno. En algunas implementaciones, el trastorno autoinmunitario es la enfermedad del injerto contra el huésped.

Otro aspecto de la divulgación proporciona métodos para tratar trastornos autoinmunitarios por administración conjunta de múltiples agonistas de SAP. Como se usa en el presente documento, el término “administración conjunta” se refiere a cualquier forma de administración de dos o más compuestos terapéuticos diferentes de modo que el segundo compuesto se administra mientras que el compuesto terapéutico previamente administrado es aún eficaz en el cuerpo (por ejemplo, los dos compuestos son simultáneamente eficaces en el paciente, que puede incluir efectos sinérgicos de los dos compuestos). Por ejemplo, los compuestos terapéuticos diferentes se pueden administrar o bien en la misma formulación o en formulaciones separadas, sea al mismo tiempo o secuencialmente. Por tanto, un individuo que recibe tal tratamiento se puede beneficiar de un efecto combinado o diferentes compuestos terapéuticos.

Otro aspecto de la divulgación proporciona métodos para tratar trastornos autoinmunitarios por administración conjunta de uno o más agonistas de SAP y al menos un agente activo adicional. Los agentes activos de la invención pueden incluir, pero no están limitados a, beta-interferones, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, bloqueantes de necrosis tumoral, fármacos antipalúdicos, ciclosporinas, inhibidores de necrosis tumoral alfa, inmunosupresores, inmunomoduladores, citoquinas, agentes terapéuticos anti-rechazo a injertos, agentes terapéuticos celulares, vitamina D3, dexametasona y agentes terapéuticos anticuerpos. Las citoquinas adecuadas para la administración conjunta pueden incluir, pero no están limitadas a IL-2, IL-4, IL-10, TGF-β, IL-15 y/o IL-17. En

algunas formas de realización, el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir una enfermedad autoinmunitaria.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para producir una población de células enriquecida para células T reguladoras a partir de una muestra que contiene células T. En algunas implementaciones, los métodos para producir una población de células enriquecida para células T reguladoras se efectúan *in vivo*. En algunas implementaciones, el método comprende obtener una muestra de un sujeto mamífero que comprende células T (por ejemplo, células CD4+) y poner en contacto las células T con SAP durante un periodo de tiempo suficiente para generar células T reguladoras. En algunas implementaciones, las células T se aíslan de la muestra de mamífero antes de la exposición a SAP. En algunas formas de realización, las células T reguladoras se aíslan de las otras células en el cultivo después de la exposición a SAP. En algunas implementaciones, a un paciente se le administra SAP antes de obtener una muestra biológica que contiene células T del paciente.

El término “aislado” con respecto a células T se refiere a una preparación de población celular en una forma que tiene al menos el 70, 80, 90, 95, 99 o el 100% de células T. En algunas formas de realización, estas células T pueden ser el 70, 80, 90, 95, 99 o el 100% de células T reguladoras FoxP3⁺ y/o productoras de IL-10. En algunos aspectos, una población celular deseada se aísla de otros componentes celulares, en algunos casos para excluir específicamente otros tipos celulares que pueden “contaminar” o interferir con el estudio de las células en aislamiento. Se debe entender, sin embargo, que tal población celular “aislada” puede incorporar tipos celulares adicionales que son necesarios para la supervivencia celular o para alcanzar los resultados deseados proporcionados por la divulgación. Por ejemplo, células presentadoras de antígenos, tal como monocitos (macrófagos) o células dendríticas, pueden estar presentes en una población celular “aislada” de células T o añadirse a una población de células T aislada para la generación de células T reguladoras. En algunos aspectos, estas células presentadoras de antígeno pueden ser monocitos activados o células dendríticas. En algunos aspectos las células presentadoras de antígeno se activan por exposición a un antígeno estimulante y/o agonistas de SAP.

Las células T de mamífero para uso en los métodos de la divulgación se pueden aislar de una muestra biológica tomada de un sujeto mamífero. La muestra se puede originar un número de fuentes incluyendo, pero no limitada a sangre periférica, producto sanguíneo de leucaféresis, producto sanguíneo de aféresis, médula ósea, timo, biopsia tisular, tumor, tejido de ganglio linfático, tejido linfoide asociado al intestino, tejido linfoide asociado a mucosa, sangre de cordón umbilical, hígado, sitios de lesiones inmunológicas (por ejemplo, líquido sinovial), páncreas, y líquido cefalorraquídeo. El sujeto donante preferiblemente es humano, y puede ser fetal, neonatal, infantil, adulto, y puede ser normal, enfermo, o susceptible a una enfermedad de interés. En algunas implementaciones, al mamífero se le administra SAP antes de aislar la muestra biológica.

En algunas implementaciones, la muestra de células T comprende células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una muestra de sangre. Mediante “células mononucleares de sangre periférica” o “CMSP” se quiere decir linfocitos (incluyendo células T, células B, células NK, etc.) y monocitos. En general, las CMSP se aíslan de un paciente usando técnicas estándar. En algunas formas de realización, solo se toman CMSP, sea dejando o devolviendo sustancialmente todos los glóbulos rojos y leucocitos polimorfonucleares al donante. Las CMSP se pueden aislar usando métodos conocidos en la técnica, tal como leucaféresis. En general, se realiza una etapa de leucaféresis de 5 a 7 litros, que esencialmente retira las CMSP de un paciente, devolviendo los componentes sanguíneos restantes. La recogida de la muestra se realiza preferiblemente en presencia de un anticoagulante (por ejemplo, heparina).

La muestra que contiene células T que comprende las CMSP o las células T aisladas se pueden pretratar usando varios métodos antes del tratamiento con SAP o un agonista de SAP. En general, una vez recogidas, las células se pueden además concentrar, si esto no se hizo simultáneamente con la recogida o adicionalmente purificar y/o concentrar las células. Por ejemplo, las CMSP se pueden purificar parcialmente por centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, a través de gradiente de Ficoll-Hypaque). Las células aisladas de una muestra del donante normalmente se lavan para eliminar proteínas séricas y componentes sanguíneos solubles, tal como autoanticuerpos, inhibidores, etc., usando métodos bien conocidos en la técnica. En general, esto implica la adición de medio fisiológico o tampón, seguido por centrifugación. Esto se puede repetir según sea necesario. Las células se pueden después contar, y en general, se recogen de 1×10^9 a 2×10^9 glóbulos blancos de una leucaféresis de 5-7 litros. Las células purificadas se pueden resuspender en medio o tampón adecuado para mantener la viabilidad. Las soluciones adecuadas para resuspensión en general serán una solución salina equilibrada (por ejemplo, solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hank, etc.) opcionalmente suplementada con suero de ternera fetal, BSA, HSA, suero normal de cabra, y/u otros factores naturales, junto con un tampón aceptable a baja concentración, en general de 5-50 mM. Los tampones convenientes incluyen, pero no están limitados a HEPES, tampones fosfato, tampones lactato, etc.

Se puede separar un tipo celular específico (por ejemplo, células T efectoras, células T reguladoras, etc.) de una mezcla compleja de células usando técnicas que enriquecen para células que tienen las características deseadas (por ejemplo, CD4+, FoxP3+, etc.). La mayoría de los métodos de separación estándar usan técnicas de purificación por afinidad para obtener una población celular sustancialmente aislada. Las técnicas para la separación por afinidad pueden incluir, pero no están limitadas a, separación magnética (por ejemplo, usando bolas magnéticas

recubiertas con anticuerpo), cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, complemento y citotoxinas), e “inmunoadsorción” con anticuerpo unido a una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan separación precisa incluyen separación celular activada por fluorescencia, que puede tener grados variables de sofisticación, tal como múltiples canales de color, canales de impedancia, etc. Las células vivas se pueden seleccionar contra células muertas empleando colorantes que se asocian con células muertas (por ejemplo, yoduro de propidio, LDS, etc.). Se puede usar cualquier técnica que no sea excesivamente perjudicial para la viabilidad de las células seleccionadas.

Los reactivos de afinidad usados pueden ser receptores o ligandos específicos para moléculas de superficie celular (por ejemplo, CD4, CD25, etc.). Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y se pueden producir mediante animales transgénicos, animales inmunizados, células B inmortalizadas, y células transfectadas con vectores de ADN que codifican el anticuerpo. Los detalles de la preparación de anticuerpos y su idoneidad para uso como miembros de unión especificados las conocen bien los expertos en la materia. Además de reactivos anticuerpos, se pueden usar pares péptido-antígeno MHC y receptor de células T, así como ligandos peptídicos, efector y moléculas receptoras.

Los anticuerpos usados como reactivos de afinidad para purificación en general se conjugan con un marcador para uso en separación. Los marcadores pueden incluir bolas magnéticas (que permiten la separación directa), biotina (que se puede eliminar con avidina o estreptavidina unida a un soporte), fluorocromos (que se pueden usar con un separador celular activado por fluorescencia), u otros tales marcadores que permiten para facilidad de separación del tipo celular particular. Los fluorocromos pueden incluir ficobiliproteínas, tal como ficoeritrina y alofocianinas, fluoresceína y Texas red. Con frecuencia, cada anticuerpo está marcado con un fluorocromo diferente para permitir separación independiente para cada marcador.

Para la purificación de una población celular deseada, se añaden anticuerpos específicos de célula a una suspensión de células y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente para unir los antígenos de superficie celular disponibles. La incubación habitualmente será de al menos aproximadamente 5 minutos y habitualmente menos de aproximadamente 30 minutos. Es deseable tener una concentración suficiente de anticuerpos en la mezcla de reacción, de modo que la eficacia de la separación no esté limitada por la falta de anticuerpo (es decir, usar una cantidad saturante de anticuerpo). La concentración apropiada también se puede determinar por titulación. El medio en el que las células se separan será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es solución salina tamponada con fosfato que contiene del 0,1% al 0,5% de BSA. Varios medios están comercialmente disponibles y se pueden usar según la naturaleza de las células, incluyendo Medio de Eagle modificado por Dulbecco, solución salina básica de Hank, solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, RPMI, medio de Iscove, PBS con EDTA 5 mM, etc., opcionalmente suplementados con suero de ternera fetal, BSA, HSA, etc.

La intensidad de tinción de las células se puede seguir por citometría de flujo, donde laser detectan los niveles cuantitativos de fluorocromo (que es proporcional a la cantidad de antígeno de superficie celular unido por los anticuerpos). La citometría de flujo, o separación celular activada por fluorescencia (FACS), también se puede usar para separar poblaciones celulares basado en la intensidad de tinción del anticuerpo, así como otros parámetros tal como tamaño celular y dispersión de la luz. Aunque el nivel absoluto de tinción puede ser diferente con un fluorocromo particular y preparación de anticuerpo, los datos se pueden normalizar respecto a un control.

Las células marcadas se separan después respecto a la expresión del marcador designado (por ejemplo, CD4, CD25, etc.). Las células separadas se pueden recoger en un medio apropiado que mantenga la viabilidad de las células, que habitualmente tienen un colchón de suero en el fondo del tubo de recogida. Varios medios están comercialmente disponibles y se pueden usar según la naturaleza de las células, incluyendo dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, medio de Iscove, etc., con frecuencia suplementados con suero fetal de ternera.

Las poblaciones celulares muy enriquecidas para una característica deseada (por ejemplo, células T CD4+, células T reguladoras CD4+CD25+, etc.) se logran de esta manera. La población deseada será el o aproximadamente el 70% o más de la composición celular, y habitualmente el o aproximadamente el 90% o más de la composición celular, y puede ser tanto como aproximadamente el 95% o más de la población celular. La población celular enriquecida se puede usar inmediatamente. Las células también se pueden congelar, aunque es preferible congelar las células antes del procedimiento de separación. Alternativamente, las células se pueden congelar a temperaturas de nitrógeno líquido y almacenar durante largos periodos de tiempo, descongelándose y pudiéndose reutilizar. Las células habitualmente se almacenarán en DMSO y/o SFT, en combinación con medio, glucosa, etc. Una vez descongeladas, las células se pueden expandir mediante el uso de factores de crecimiento, antígeno, estimulación, células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas), etc., para proliferación y diferenciación.

En algunos aspectos, los métodos presentes son útiles para la generación *ex vivo* de células T reguladoras para trasplante en un paciente o el desarrollo de modelos *in vitro* y ensayos para función de células T reguladoras. Los cultivos de células T reguladoras sirven como una fuente valiosa de factores reguladores novedosos y fármacos. Los agentes terapéuticos autoinmunitarios comunes se usan para bloquear los sucesos terminales de daño tisular, pero en general no alteran la respuesta inmunitaria subyacente. Mientras no se quiere estar unido por ninguna teoría, la

estrategia de los métodos divulgados en el presente documento es producir remisión restableciendo la función celular reguladora normal y por tanto "reiniciando" el sistema inmunitario usando células T reguladoras hechas según la divulgación en el presente documento.

5 Una vez las CMSP o células T aisladas han experimentado cualquier pretratamiento necesario, las células se tratan con SAP. Mediante "tratada" en el presente documento se quiere decir que las células se incuban en un medio nutriente adecuado con SAP durante un periodo de tiempo suficiente para producir células T reguladoras que tienen la capacidad para inhibir respuestas inmunitarias mediadas por células T efectoras. En algunas formas de realización, el primer cultivo se diluye con aproximadamente un volumen igual de medio nutriente. En otros aspectos, un primer cultivo celular se divide en dos o más porciones que se diluyen después con medio nutriente. La ventaja de la división del cultivo es que los grupos de células formados en el primer cultivo (miles de células) se desorganizan mecánicamente y se forman grupos celulares más pequeños (de decenas a cientos de células) durante la división del primer cultivo. Estos pequeños grupos pueden después crecer en grupos mayores durante el siguiente periodo de crecimiento. Un cultivo celular producido de esta manera se puede subcultivar dos o más veces usando un método similar. En algunas implementaciones, el segundo cultivo o cualquier cultivo posterior está sustancialmente libre de SAP, por ejemplo, el cultivo puede contener menos de 10 µg/ml, preferiblemente menos de 0,1 µg/ml, o más preferiblemente menos de 0,001 µg/ml. Un cultivo que está sustancialmente libre de SAP es uno en el que la concentración de SAP no es suficiente para fomentar la generación de células T reguladoras.

20 Una población celular se puede hacer crecer *in vitro* en varias condiciones de cultivo. El medio de cultivo puede ser líquido o semisólido (por ejemplo, que contiene agar, metilcelulosa, etc.). La población celular se puede suspender de forma conveniente en cualquier medio nutriente apropiado incluyendo, pero no limitado a medio de Dulbecco modificado por Iscove, o RPMI-1640, normalmente suplementado con suero fetal de ternera (aproximadamente el 5-10%), L-glutamina, y antibióticos (por ejemplo, penicilina y estreptomina).

25 El cultivo celular puede contener factores de crecimiento a los que las células responden. Los factores de crecimiento, como se define en el presente documento, son moléculas capaces de fomentar la supervivencia, crecimiento y/o diferenciación de las células, ya sea en cultivo o en el tejido intacto, mediante efectos específicos en un receptor transmembrana. Los factores de crecimiento incluyen polipéptidos y factores no polipeptídicos. Los factores de crecimiento específicos que se pueden usar en cultivar las células objeto incluyen las interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, etc.) y antígenos (por ejemplo, antígenos peptídicos, antígenos proteicos tal como aloantígenos) preferiblemente en combinación con células presentadoras de antígenos, lectinas, estímulos no específicos (por ejemplo, Con A; LPS; etc.). El cultivo también puede contener anticuerpos (por ejemplo, anti-CD3) o ligandos específicos (en forma de ligando purificado, proteínas de fusión con Fc, u otras formas etiquetadas recombinantes como formas de cremallera de leucina) para receptores de superficie celular que pueden estimular o inhibir actividad de células T reguladoras. Por ejemplo, se pueden incluir Acm o ligandos que se unen a TNFR u otras moléculas coestimuladoras en células T reguladoras y podrían estimular y aumentar la actividad de células T reguladoras, anular la actividad de células T reguladoras (e inducir proliferación), o que estimulan la apoptosis de células T reguladoras. Las condiciones de cultivo específicas típicamente se eligen para alcanzar un fin particular (es decir, mantenimiento de actividad de células T reguladoras, expandir la población de células T reguladoras, etc.). La célula T reguladora se puede cocultivar con células dendríticas inmaduras o maduras, así como otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo, monocitos, células B, macrófagos, etc.) antes de, durante o después del tratamiento con SAP. Las células T reguladoras se pueden cocultivar con otras poblaciones de células T. En algunos aspectos, el cultivo también contiene vitamina D3 y/o dexametasona, que han demostrado fomentar la generación de células T CD4+ reguladoras productoras de IL-10 (Barrat *et al.* J. Exp. Med. 195(5): 2002, 603-616).

50 Se pueden introducir genes en las células T reguladoras antes del cultivo o trasplante para una variedad de fines (por ejemplo, prevenir o reducir la susceptibilidad a infección, sustituir genes que tienen una mutación de pérdida de función, aumentar la potencia de células T reguladoras para inhibir células Th, hacer que células T reguladoras migren a regiones específicas *in vivo*, etc.). Alternativamente, se pueden introducir vectores que expresen ARNm antisentido o ribozimas bloqueando de esta manera la expresión de un gen indeseado. Otros métodos de terapia génica incluyen la introducción de genes de resistencia a fármacos para permitir que las células trasplantadas tengan una ventaja y sean objeto de presión selectiva, por ejemplo, el gen de multiresistencia a fármacos (MDR), o genes anti-apoptosis, tal como *bcl-2*. Se pueden usar varios métodos conocidos en la técnica para transfectar las células diana (por ejemplo, electroporación, ADN precipitado con calcio, fusión, transfección, lipofección, etc.). La manera particular en que el ADN se introduce no es crítica para la práctica de la invención siempre que no afecte la viabilidad de las células.

60 Muchos vectores útiles para transferir genes exógenos en células de mamífero están disponibles. Los vectores pueden ser episomales (por ejemplo, plásmidos, vectores derivados de virus tal como citomegalovirus, adenovirus, etc.) o se pueden integrar en el genoma de la célula diana, mediante recombinación homóloga o integración aleatoria (es decir, retrovirus, incluyendo vectores derivados de lentivirus, tal como MMLV, VIH-1, ALV, etc.).

65 En algunas implementaciones, las células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación se pueden trasplantar o reintroducir de vuelta en el paciente. Los métodos para la transferencia adoptiva de células T

reguladoras están bien descritos en la técnica, por ejemplo, véanse las solicitudes de patente en EE UU 2006/0115899, 2005/0196386, 2003/0049696, 2006/0292164, y 2007/0172947 (cuyos contenidos se incorporan al presente documento mediante referencia). Por tanto, un experto en la materia podría fácilmente trasplantar o reintroducir las células T reguladoras producidas por los métodos de la presente divulgación en un paciente en necesidad de ello. Las células T trasplantadas se pueden originar de una muestra que contiene células T obtenida del paciente mismo o de otro donante que no recibe tratamiento. Esto se hace en general como se sabe en la técnica y habitualmente comprende inyectar, u otros métodos de introducir, las células tratadas de vuelta en el paciente a través de administración intravenosa. Por ejemplo, las células se pueden colocar en una bolsa de infusión Fenwall de 50 ml por inyección usando jeringas estériles u otros mecanismos de transferencia estériles. Las células se pueden después infundir inmediatamente a través de administración IV durante un periodo de tiempo, en una línea IV de flujo libre en el paciente. En algunos aspectos, se pueden añadir también reactivos adicionales tal como tampones o sales.

En algunas implementaciones, las células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación se pueden usar para tratar o prevenir un trastorno o afección autoinmunitaria en un paciente administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de células T reguladoras a un paciente en necesidad de ello. Las células T reguladoras de la divulgación pueden fomentar la supresión mediada por células T reguladoras de trastornos o afecciones autoinmunitarias. En algunas implementaciones, la administración de células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación, reduce el número de días que un paciente está afectado con un trastorno autoinmunitario en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días. En algunas implementaciones, la administración de células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación, inhibe el inicio de un trastorno autoinmunitario en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días.

Mientras que los métodos se pueden usar para tratar pacientes afectados con un trastorno autoinmunitario, en algunas implementaciones, los métodos también se aplican a pacientes que no tienen, pero están en riesgo de desarrollar una respuesta autoinmunitaria. En pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno autoinmunitario, el tratamiento con células T reguladoras, generadas por los métodos de la divulgación, puede reducir el número de días que un paciente está afectado con o inhibir el inicio de un trastorno autoinmunitario en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días. En algunas implementaciones, el tratamiento con células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación, previene un trastorno autoinmunitario en un paciente en riesgo para desarrollar tal enfermedad.

En ciertos aspectos de la divulgación, las células T reguladoras se administran a un paciente antes, durante y/o después del tratamiento con una terapia que produce una respuesta autoinmunitaria o pone un paciente en riesgo para desarrollar tal trastorno. En ciertas implementaciones, la respuesta autoinmunitaria es una respuesta inmunitaria adversa en un paciente que ha experimentado, o experimentará, un trasplante de órgano o tejido (por ejemplo, enfermedad del injerto contra el huésped). La administración de células T reguladoras a un paciente en necesidad de ello se puede usar para tratar o prevenir la enfermedad del injerto contra el huésped como resultado de cualquier órgano (por ejemplo, riñón, corazón, pulmón, páncreas, tejido corneal, etc.) o tejido (por ejemplo, sangre, médula ósea, etc.). Se pueden administrar células T reguladoras antes y/o después del trasplante (por ejemplo, al menos un día antes del trasplante, de uno a cinco días después del trasplante, etc.) En algunas implementaciones, se administran células T reguladoras en una base periódica antes y/o después del trasplante.

Otro aspecto de la divulgación proporciona métodos para tratar trastornos autoinmunitarios por administración conjunta de células T reguladoras y al menos un agente activo adicional. En algunas implementaciones, el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir una enfermedad autoinmunitaria. Los agentes activos de la invención pueden incluir, pero no están limitados a, beta-interferones, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, bloqueantes de necrosis tumoral, fármacos antipalúdicos, ciclosporinas, inhibidores de necrosis tumoral alfa, inmunosupresores, inmunomoduladores, citoquinas, agentes terapéuticos anti-rechazo a injertos, vitamina D3, dexametasona, agentes terapéuticos anticuerpos, y epítopos de células T (por ejemplo, TolerTrans Transplant Rejection Therapy por Circassia, etc.). Las citoquinas adecuadas para la administración conjunta pueden incluir, pero no están limitadas a IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, TGF- β , IL-15 y/o IL17. En algunas formas de realización, el agente activo adicional puede ser una población celular que comprende otros tipos celulares diferentes de células T reguladoras. Por ejemplo, las células T reguladoras se pueden administrar a un paciente en necesidad de ello junto con uno o más tipos de células presentadoras de antígeno, tal como monocitos o células dendríticas. En algunos aspectos, estas células presentadoras de antígeno pueden ser monocitos o células dendríticas activadas. En algunos aspectos las células presentadoras de antígenos se activan por exposición a antígeno estimulante y/o agonistas de SAP. En algunas formas de realización, los métodos para tratar trastornos autoinmunitarios comprenden la administración conjunta de células T reguladoras, al menos un agonista de SAP, y uno o más agentes activos adicionales. Los agentes activos adicionales se pueden administrar en una base periódica.

Cualquier método de tratamiento de la divulgación se puede repetir según sea necesario o requerido. Por ejemplo, el tratamiento se puede hacer en una base periódica. La frecuencia de administrar el tratamiento la puede determinar un experto en la materia. Por ejemplo, el tratamiento se puede administrar una vez a la semana durante un periodo de semanas, o múltiples veces a la semana durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 3-5 veces durante un

periodo de dos semanas). En general, la mejora de los síntomas de la enfermedad autoinmunitaria persiste durante algún periodo de tiempo, preferiblemente al menos meses. A lo largo del tiempo, el paciente puede experimentar una recaída de los síntomas, momento en el que los tratamientos se pueden repetir.

5 Después de trasplantar las células en el paciente, el efecto del tratamiento se puede evaluar, si se desea. Un experto en la materia reconocería que hay muchos métodos de evaluar las manifestaciones inmunológicas de una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, cuantificación de títulos de anticuerpos totales o de inmunoglobulinas específicas, pruebas de la función renal, evaluación del daño tisular, etc.). También se pueden hacer pruebas de la función de células T tal como números de células T, fenotipo, estado de activación y capacidad para responder a antígenos y/o mitógenos.

10 La divulgación también proporciona kits para tratar o prevenir trastornos autoinmunitarios que comprenden uno o más agonistas de SAP. En algunas implementaciones, el kit puede incluir un agente activo adicional que se va a administrar junto con uno o más agonistas de SAP. En algunas formas de realización el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir una enfermedad autoinmunitaria. Los agentes activos de la invención pueden incluir, pero no están limitados a, beta-interferones, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, bloqueantes de necrosis tumoral, fármacos antipalúdicos, ciclosporinas, inhibidores de necrosis tumoral alfa, inmunosupresores, inmunomoduladores, citoquinas, agentes terapéuticos anti-rechazo a injertos, y agentes terapéuticos anticuerpos. Las citoquinas adecuadas para la administración conjunta pueden incluir, pero no están limitadas a IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β , IL-15 y/o IL17. En ciertos aspectos, el agente activo adicional es una población de células T reguladoras. El/los agonista(s) y los agentes activos adicionales se pueden formular para que se administren de forma conjunta. Los agentes activos del kit se pueden administrar por separado o en una formulación de combinación. Los agentes activos se pueden administrar simultáneamente o en diferentes programas de dosis.

25 En algunas implementaciones, la divulgación se refiere además a kits para la práctica de los métodos de la invención (es decir, la incubación de células con el agonista de SAP para generar células T reguladoras). El kit puede tener un número de componentes. En algunos aspectos el kit puede comprender un envase de tratamiento celular que está adaptado para recibir células de un paciente. El paciente puede ser un donante normal o un paciente afectado con un trastorno autoinmunitario u otra afección. El envase debe ser estéril. En algunas implementaciones, el envase de tratamiento celular se usa para la recogida de las células, por ejemplo, es adaptable para ser enganchado a una máquina de leucaféresis usando un puerto de entrada. En otras implementaciones, se puede usar un envase de recogida de células separado. El kit también se puede adaptar para uso en un sistema cerrado automatizado para purificar subconjuntos de células T específicas y expandirlas para transferirlas de vuelta al paciente.

35 La forma y composición del envase de tratamiento de células puede variar, como apreciarán los expertos en la materia. En general, el envase puede estar un número de diferentes formas, incluyendo una bolsa flexible similar a una bolsa de IV, o un envase rígido similar a un recipiente de cultivo celular. Se puede configurar para que permita la agitación. En general, la composición del envase puede ser cualquier material biológicamente inerte adecuado (por ejemplo, vidrio o plástico, por ejemplo, polipropileno, polietileno, etc.). El envase de tratamiento celular puede tener uno o más puertos de entrada o salida, para la introducción o eliminación de células, reactivos, composiciones reguladoras, etc. Por ejemplo, el envase puede comprender un puerto de muestreo para la retirada de una fracción de las células para análisis antes de la reintroducción al paciente. De forma similar, el envase puede comprender un puerto de salida para permitir la introducción de las células al paciente; por ejemplo, el envase puede contener un adaptador para la unión a un sistema de IV.

45 El kit comprende además al menos una dosis de una composición que comprende un agonista de SAP y opcionalmente uno o más agentes activos adicionales (por ejemplo, citoquinas, mitógenos, etc.). Los componentes se pueden usar como dosis separadas o combinadas. Por ejemplo, se puede combinar SAP con al menos una o más citoquinas y/o uno o más mitógenos. El kit también puede contener al menos una dosis de una segunda composición reguladora que contiene una o más citoquinas (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-10, IL-15, IL-17, etc.), mitógenos o agentes activos adicionales. En algunas implementaciones, el agente activo adicional puede ser un agente terapéutico usado para tratar o prevenir una enfermedad autoinmunitaria. Los agentes activos del kit pueden incluir, pero no están limitados a, beta-interferones, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, bloqueantes de necrosis tumoral, fármacos antipalúdicos, ciclosporinas, inhibidores de necrosis tumoral alfa, inmunosupresores, inmunomoduladores, citoquinas, agentes terapéuticos anti-rechazo a injertos, y agentes terapéuticos anticuerpos. Las citoquinas adecuadas para la administración pueden incluir, pero no están limitadas a IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β , IL-15 y/o IL17.

60 El kit también puede contener al menos una dosis de medio nutriente para diluir el primer cultivo y/o para disolver componentes del kit liofilizados. "Dosis" en este contexto significa una cantidad de la composición que es suficiente para producir un efecto (es decir, expansión inducida por agonista de SAP de células T reguladoras). En algunos casos, se pueden incluir múltiples dosis. En una forma de realización, la dosis se puede añadir al envase de tratamiento celular usando un puerto; alternativamente, en una forma de realización preferida, la primera composición reguladora ya está presente en el envase de tratamiento celular. En algunas implementaciones, las composiciones reguladoras y/o medios nutrientes están liofilizados para estabilidad, y se reconstituyen usando medio nutriente, u otros reactivos. En algunas formas de realización, el kit puede comprender además al menos un

reactivo, incluyendo tampones, sales, medios, proteínas, fármacos, etc. Por ejemplo, pueden estar incluidos mitógenos, anticuerpos monoclonales y bolas magnéticas tratadas para separación celular. En algunas implementaciones, el kit puede comprender además instrucciones escritas para usar los kits.

5 Trastornos autoinmunitarios

Se cree que la patogénesis de un número de enfermedades autoinmunitarias está causada por respuestas de células T autoinmunitarias a antígenos propios presentes en el organismo. Por ejemplo, se han implicado células T autorreactivas en la patogénesis de: diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, miocarditis autoinmunitaria, pénfigo, enfermedad celiaca, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, artritis de Lyme crónica, cardiomiopatía dilatada familiar, dermatomiositis juvenil, policondritis, síndrome de Sjogren, psoriasis, artritis idiopática juvenil, enfermedad intestinal inflamatoria, lupus eritematoso sistémico, y enfermedad de injerto contra el huésped.

La importancia de las células T reguladoras en la protección de la autoinmunidad se ha demostrado en varios modelos animales. Por ejemplo, la eliminación de células T reguladoras CD4+CD25+ de ratones produce un espectro de manifestaciones autoinmunitarias específicas de órganos espontáneas y aumenta la susceptibilidad a la inducción de enfermedades autoinmunitarias tal como artritis inducida por colágeno (Sakaguchi et al., J. Exp. Med. 161:72-87, 1985; Morgan et al., Arthritis Rheum. 48:1452-1460, 2003). Además, estudios han demostrado que las enfermedades autoinmunitarias se pueden mejorar por la adición de células T reguladoras. Se ha mostrado que la terapia de células T reguladoras puede eficazmente retrasar y/o tratar animales en una variedad de modelos de enfermedades autoinmunitarias, incluyendo diabetes, colitis, gastritis y enfermedad del injerto contra el huésped (Salomon et al., Immunity, 12:431-440, 2000; Read et al., J. Exp. Med., 192:295-302, 2000; Taylor et al., Blood 99:3493-3499, 2002; Hoffman et al., J. Exp. Med 196:389-399, 2002; y Edinger et al., Nat. Med. 9:1144-1150, 2003).

En seres humanos, la capacidad de células T reguladoras para modular la actividad de células T de una manera específica de antígeno se ha demostrado en el contexto de varias enfermedades, incluyendo la regulación de células T específicas para antígenos tumorales (Viguer et al., J. Immunol. 173:1444-1453, 2004); aloantígenos en el marco de trasplante de médula ósea (Ng et al., Blood 98:2736-2744, 2001); y el antígeno exógeno HA (Walker et al., PNAS 102:4103-4108, 2005). Por tanto, la inmunoterapia con células T reguladoras es útil en el contexto de una terapia celular para regular la respuesta inmunitaria en el sujeto.

En algunas implementaciones, las células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación y/o agonistas de SAP se usan para prevenir o tratar una enfermedad o afección, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, o rechazo a trasplante como consecuencia de respuesta del injerto contra el huésped. En ciertas implementaciones, las células T reguladoras y/o agonistas de SAP se administran de forma conjunta con uno o más agentes activos adicionales. En ciertas implementaciones, estos agentes activos adicionales pueden ser agentes terapéuticos usados para tratar o prevenir enfermedad autoinmunitaria. Cualquier agente terapéutico o método de tratamiento usado para tratar o prevenir un trastorno autoinmunitario se puede usar como parte de una terapia conjunta con la administración de células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación y/o agonistas de SAP. Para cada indicación autoinmunitaria descrita en el presente documento, se han descrito los agentes terapéuticos o métodos de tratamiento más prevalentes. Mientras no se quiere estar unido por ninguna teoría o limitado a los agentes especificados, cualquiera de estos agentes terapéuticos se puede usar como un agente terapéutico conjunto adecuado.

Diabetes de tipo I

La diabetes de tipo I (DMT1) es una enfermedad autoinmunitaria mediada por la destrucción de células de islotes, las células β productoras de insulina del páncreas. Esta destrucción representa una pérdida de tolerancia inmunitaria y se debe a respuestas de células T CD4+ y CD8+ y B patogénicas dirigidas contra proteínas encontradas en el páncreas. En seres humanos, varios estudios han identificado anomalías en el número o función de células T reguladoras en pacientes con DMT1 (Kukreja et al., J. Exp. Med. 199:1285-1291, 2004; Kriegel et al., J. Exp. Med. 199:1285-1291, 2004). Una falta de células T reguladoras también está implicada en la patogénesis de la diabetes por el hallazgo de diabetes tanto en animales de los que se han eliminado las células T reguladoras como en seres humanos con IPEX (véase Wildin et al., Nat. Genet. 27:18-20, 2001). En el modelo de ratón NOD, estudios han demostrado la capacidad para usar células T reguladoras específicas de islotes para proteger y diabetes (Tang et al., J. Exp. Med 199:1455-1465, 2004; Tarbell et al., J. Exp. Med., 199:1467-1477, 2004).

El tratamiento para la diabetes de tipo I es un compromiso de por vida de seguimiento del azúcar en sangre, tomar insulina, mantener un peso saludable, comer alimentos saludables y hacer ejercicio de forma regular. El fin es mantener el nivel de azúcar en sangre tan cerca al normal como sea posible para retrasar o prevenir complicaciones. De hecho, el control estrecho de los niveles de azúcar en sangre puede reducir el riesgo de ataques al corazón e ictus relacionados con diabetes en más del 50 por ciento. La terapia de insulina es necesaria para la supervivencia de los pacientes afectados con diabetes de tipo I. Puesto que las enzimas del estómago interfieren con la insulina tomada por la boca, la insulina oral no es una opción preferida para disminuir el azúcar en sangre. Con frecuencia, la insulina se inyecta usando una aguja fina y jeringa o por una bomba de insulina. Muchos tipos de

insulina están disponibles, incluyendo insulina de acción rápida, insulina de acción prolongada, y opciones intermedias. Los ejemplos incluyen insulina regular (por ejemplo, Humulin R, Novolin R, etc.), insulina isofano (por ejemplo, Humulin N, Novolin N, etc.), insulina lispro (por ejemplo, Humalog), aspartato de insulina (por ejemplo, NovoLog) e insulina glargina (por ejemplo, Lantus).

Otros agentes terapéuticos incluyen pramlintida, para retrasar el movimiento de la comida a través del estómago para frenar el aumento agudo en el azúcar en sangre que se produce después de las comidas, y terapia de aspirina a baja dosis, que puede ayudar a prevenir enfermedad del corazón y los vasos sanguíneos. Una cura potencial para la diabetes de tipo 1 es un trasplante de páncreas. Otros tipos de trasplantes actualmente en investigación para eficacia terapéutica incluyen trasplante de células de islotes y trasplante de células madre.

Enfermedad de injerto contra el huésped (EICH)

El rechazo a un injerto mediado por células T del huésped es un problema principal que se trata por inmunosupresión a largo plazo del receptor de trasplante. Estudios en ratones han demostrado que la transferencia adoptiva de células T reguladoras puede bloquear la enfermedad del injerto contra el huésped sin afectar la respuesta del injerto contra leucemia (Edinger et al., Nat. Med. 9:1144-1150, 2003). Según esto, en una implementación, la divulgación se refiere a un método de reducir el riesgo de, o la gravedad de, una respuesta inmunitaria adversa en un paciente que ha experimentado, experimenta, o experimentará, un trasplante de órgano, que comprende administrar al paciente según los métodos descritos en el presente documento una población de células T reguladoras en una cantidad eficaz para reducir el riesgo o gravedad de una respuesta inmunitaria adversa en el paciente. Los métodos se pueden aplicar a receptores de trasplante de órgano sólido (por ejemplo, riñón(es), corazón, pulmón(es), hígado y páncreas, etc.) o a receptores de trasplante de tejido (por ejemplo, sangre, médula ósea, etc.).

El mejor tratamiento para EICH es la prevención. La profilaxis para EICH habitualmente consiste en metotrexato con o sin prednisona, ciclosporina, ciclofosfamida o tacrolimus. El tacrolimus tópico puede ser útil para enfermedad de la mucosa. Una vez se ha establecido el diagnóstico de EICH, el tratamiento consiste en continuar el agente inmunosupresor original y añadir metilprednisolona. La EICH crónica requiere terapia inmunosupresora continuada más otros agentes modificantes. Halofuginona, un inhibidor de la síntesis de colágeno de tipo I aplicado por vía tópica, es beneficioso en pacientes con EICH esclerodermatosa. Se ha usado talidomida para EICH crónica con beneficio descrito, pero el alto índice de efectos adversos (incluyendo granulocitopenia) descarta su uso en muchos pacientes. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra células T activadas (por ejemplo, daclizumab, visilizumab, anticuerpo monoclonal murino anti-CD147, etc.) o contra citoquinas (por ejemplo, infliximab, etanercept, etc.) han tenido resultados preliminares prometedores.

Esclerosis múltiple

La patogénesis de células T autorreactivas en esclerosis múltiple (EM) se cree que surge de respuestas de células T a antígenos de mielina, en particular a la proteína básica de la mielina (MBP). Aunque las células T reactivas contra MBP se pueden aislar tanto de individuos sanos como de pacientes de EM, se encontró que las células T aisladas de pacientes de EM experimentaban activación *in vivo* y se producen a mayor frecuencia de precursor en sangre y líquido cefalorraquídeo en apacientes de EM. Estas células T reactivas contra MBP producen citoquinas Th1, incluyendo IL-2, TNF- α e IFN- γ , que facilitan la migración de células inflamatorias en el sistema nervioso central y exacerba las respuestas inflamatorias que destruyen la mielina en EM. Los agentes terapéuticos comunes para EM incluyen, pero no están limitados a, beta interferones (por ejemplo, Avones, Rebif, etc.), glatirámero, corticoesteroides, relajantes musculares (por ejemplo, tizanidina, baclofeno, etc.) y medicaciones para reducir la fatiga (por ejemplo, amantadina, modafinil, etc.). En un estudio reciente, se demostró que la expresión ectópica del autoantígeno neural de la proteína básica de la mielina protegía de neuroinflamación autoinmunitaria en un modelo de ratón de esclerosis múltiple. La protección de autoinmunidad estaba mediada por células T reguladoras CD4+CD25+ específicas de MBP, como se demostró por la capacidad de estas células para prevenir la enfermedad cuando se transfirieron de forma adoptiva en otros ratones autoinmunitarios y por supresión de la proliferación de células T CD4+CD25+ convencionales después de estimulación específica de antígeno con proteína básica de la mielina *in vitro* (Luth et al., The Journal of Clinical Investigation 118(10): 3403-3410, 2008).

Psoriasis y artritis psoriásica

La artritis psoriásica es una enfermedad autoinmunitaria crónica caracterizada por la inflamación de la piel (psoriasis) y articulaciones (artritis). La psoriasis es una afección de la piel común que afecta al 2% de la población blanca en los Estados Unidos y se caracteriza por áreas elevadas, rojas de inflamación de la piel con escamas. La psoriasis con frecuencia afecta los extremos de los codos y rodillas, el cuero cabelludo, el ombligo, y alrededor de las áreas genitales o ano. Aproximadamente el 10% de los pacientes que tienen psoriasis también desarrollan una inflamación asociada de sus articulaciones. La artritis psoriásica se caracteriza como una enfermedad reumática sistémica que también puede causar inflamación en tejidos del cuerpo lejos de las articulaciones diferentes de la piel, tal como en los ojos, corazón, pulmones, y riñones. La artritis psoriásica comparte muchas características con varias otras afecciones artríticas, tal como espondilitis anquilosante, artritis reactiva (anteriormente, síndrome de

Reiter), y artritis asociada con la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. Todas estas afecciones pueden causar inflamación en la columna vertebral, articulaciones, ojos, boca, y otros órganos. En vista de sus similitudes y tendencia a causar inflamación de la columna vertebral, estas afecciones se denominan colectivamente "espondiloartropatías".

5 Actualmente, hay tres tipos básicos de tratamientos para artritis psoriásica: terapia tópica, fototerapia y terapia sistémica. El tratamiento inicial generalmente comprende la aplicación directa de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tópicos a áreas alrededor de las articulaciones afectadas. Otros agentes terapéuticos tópicos incluyen corticosteroides (por ejemplo, clobetasol, fluocinolona, betametasona, etc.), derivados de vitamina D-3 (por ejemplo, calcipotrieno, etc., alquitrán de hulla (DHS Tar, Doak Tar, Theraplex T, etc.), antralina (Dithranol, Anthra-Derm, Drithocrme, etc.) o retinoides (por ejemplo, Tazarotene). En algunos casos, se usa fototerapia para tratar las indicaciones de psoriasis de la enfermedad. La luz ultravioleta (UV) ralentiza la producción de células de la piel y reduce la inflamación. La terapia de UV-B habitualmente se combina con uno o más tratamientos tópicos y puede ser extremadamente eficaz para tratar psoriasis en placa de moderada a grave. La terapia con UV-B habitualmente se combina con la aplicación tópica de corticosteroides, calcipotrieno, tazaroteno o cremas o pomadas que calman y suavizan la piel. PUVA es otro tipo de fototerapia que combina un fármaco psoraleno, tal como metoxsaleno, con terapia de luz ultravioleta A (UV-A). Los fármacos psoralenos hacen la piel más sensible a la luz y el sol y se toman por la boca varias horas antes de terapia de luz UV-A.

20 Para artritis psoriásica grave, a los pacientes se les puede administrar agentes terapéuticos sistémicos. Estos fármacos se inician en general solo después de que tanto el tratamiento tópico como la fototerapia hayan fracasado. Los agentes terapéuticos sistémicos pueden incluir, pero no están limitados a psoralenos (por ejemplo, Metoxsaleno, trioxsaleno, etc.), etanercept, metotrexato, ciclosporina, alefacept, adalimumab, e infliximab, medicación antipalúdica (por ejemplo, hidroxiquina, oro inyectable y oro auranofin oral, sulfasalazina, leflunomida, etc.), bloqueantes de TNF (por ejemplo, etanercept, infliximab, adalimumab, etc.), inhibidores de IL-12 e IL-23 (por ejemplo, ustekinumab) y corticosteroides.

Artritis reumatoide

30 La artritis reumatoide (AR) es un trastorno crónico que lo más comúnmente causa inflamación y daño tisular en las articulaciones (artritis) y vainas del tendón y se asocia con anemia. También puede producir inflamación difusa en los pulmones, pericardio, pleura, y la esclerótica del ojo, y también lesiones nodulares, lo más común en tejido subcutáneo bajo la piel. La artritis reumatoide se caracteriza como una enfermedad autoinmunitaria que causa trastornos sistémicos, pero principalmente afecta a los tejidos sinoviales. Autoanticuerpos hacia Fc de IgG, conocidos como factores reumatoides (RF), y anticuerpos hacia péptidos citrulinados (ACPA) son un sello de la artritis reumatoide. Aunque el mecanismo no se ha esclarecido por completo, se piensa que la manifestación de la enfermedad implica interacción célula B-célula T anómala, con presentación de antígenos por las células B a las células T a través de HLA-DR para provocar la producción de autoanticuerpos RF y ACPA. La inflamación es dirigida después por productos o bien de células B o de células T que estimulan la liberación de TNF y otras citoquinas.

40 Los síntomas artríticos de la artritis reumatoide se deben a sinovitis, es decir, la inflamación de la membrana sinovial que recubre las articulaciones y vainas de tendón. Las articulaciones se hinchan, se vuelven sensibles y calientes, y la rigidez previene su uso. Con el tiempo, la AR casi siempre afecta a múltiples articulaciones (poliartritis). Lo más comúnmente, las articulaciones pequeñas de las manos, pies y columna vertebral cervical están afectadas, pero articulaciones mayores como el hombro y la rodilla también pueden estar implicadas. La sinovitis puede producir anclaje de tejido con pérdida de movimiento y erosión de la superficie de la articulación, que produce deformidad y pérdida de función.

50 Como no hay cura, el tratamiento para AR se dirige a reducir la inflamación en las articulaciones para aliviar el dolor y prevenir o ralentizar el daño a las articulaciones. Las medicaciones comunes usadas para tratar artritis reumatoide incluyen: AINE (por ejemplo, ibuprofeno, naproxeno sódico, inhibidores de Cox-2, etc.), esteroides (por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, etc.), fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (por ejemplo, hidroxiquina, oro inyectable y oro auranofin oral, sulfasalazina, minociclina y metotrexato), inmunosupresores (por ejemplo, leflunomida, azatioprina, ciclosporina, ciclofosfamida, etc.), inhibidores de TNF-alfa (por ejemplo, tanercept, infliximab, adalimumab, etc.), ankinra, abatacept y rituximab.

Miocarditis

60 La miocarditis es una enfermedad inflamatoria del miocardio con una amplia gama de presentación clínica. Se diagnostica por criterios histológicos, inmunológicos e inmunológicos establecidos. La miocarditis se caracteriza como un infiltrado inflamatorio del miocardio con necrosis y/o degeneración de miocitos adyacentes. Habitualmente se manifiesta en una persona sana de otra manera y puede producir insuficiencia cardiaca progresiva rápida (y con frecuencia letal) y arritmia. En el marco clínico, la miocarditis es sinónimo de cardiomiopatía inflamatoria.

65 La miocarditis está producida por una amplia variedad de organismos infecciosos, trastornos autoinmunitarios, y agentes exógenos, con predisposición genética y medioambiental. Se presume que la mayoría de los casos están

causados por una ruta común de lesión mediada por autoinmunidad, aunque los efectos citotóxicos directos del agente causante y los daños debido a la expresión de citoquinas en el miocardio pueden desempeñar algún papel en la etiología de miocarditis. El daño miocárdico tiene una fase aguda y crónica. En la fase aguda, la destrucción de miocitos es una consecuencia directa del agente causal, lo que produce citotoxicidad celular y liberación de citoquinas, que contribuye al daño y disfunción miocárdicos. Durante la fase crónica, hay destrucción continuada de miocitos que está mediada por un mecanismo autoinmunitario, con expresión anómala asociada de antígeno leucocitario humano (HLA) en miocitos. En general, el tratamiento de miocarditis tanto aguda como crónica se dirige a reducir la congestión y mejorar la hemodinámica cardiaca en la insuficiencia cardiaca. El tratamiento de la insuficiencia cardiaca sigue la misma pauta de tratamiento independientemente de la causa subyacente, incluyendo la administración de inhibidores de ACE (por ejemplo, enalapril, etc.), bloqueantes beta-adrenérgicos, vasodilatadores (por ejemplo, nitroglicerina, nitroprusiato sódico, etc.), y diuréticos (por ejemplo, furosemida, etc.). Se ha mostrado que la terapia inmunosupresora intensiva (por ejemplo, corticosteroides, azatioprina, ciclosporina, muromonab-CD3/OKT3, etc.) tiene algún beneficio solo en estudios clínicos a pequeña escala en el tratamiento de miocarditis de células gigantes.

Hepatitis autoinmunitaria

La hepatitis autoinmunitaria se puede desarrollar después de infecciones víricas, incluyendo hepatitis aguda A, hepatitis B, sarampión o virus de Epstein-Barr. El Epstein-Barr es uno de los virus humanos más comunes y ligado a un número de trastornos, incluyendo mononucleosis. En hepatitis autoinmunitaria, el sistema inmunitario del huésped, que normalmente ataca virus, bacterias y otros patógenos, en su lugar se dirige al hígado. Esto puede producir inflamación crónica y daño grave a las células del hígado. Se han identificado dos formas principales de hepatitis autoinmunitaria. La hepatitis autoinmunitaria de tipo 1 con frecuencia se desarrolla de forma repentina y es el tipo más común de la enfermedad. Aunque se puede producir en cualquiera a cualquier edad, la mayoría de los afectados son mujeres jóvenes. Aproximadamente la mitad de las personas con hepatitis autoinmunitaria de tipo 1 tienen otros trastornos autoinmunitarios, tal como tiroiditis, artritis reumatoide, o colitis ulcerosa. También es probable que su sangre contenga anticuerpos contra tejido hepático, Aunque los adultos pueden desarrollar hepatitis autoinmunitaria de tipo 2, es más común en chicas jóvenes y con frecuencia se produce con otros problemas autoinmunitarios.

Los métodos de tratar la hepatitis autoinmunitaria se dirigen a inhibir la respuesta autoinmunitaria y ralentizar la evolución de la enfermedad. Para alcanzar esto, los médicos habitualmente recetan una alta dosis inicial del fármaco corticosteroide prednisona para suprimir el sistema inmunitario. Tan pronto como las señales y síntomas mejoran, la medicación se reduce a la mínima dosis posible que controle la enfermedad. Aunque los pacientes pueden experimentar remisión unos pocos años después de iniciar el tratamiento, la enfermedad habitualmente vuelve cuando el fármaco se retira. Prednisona, especialmente cuando se toma a largo plazo, puede producir una amplia gama de efectos secundarios graves. Por tanto, azatioprina, otra medicación inmunosupresora, algunas veces se usa junto con prednisona. Esto ayuda a disminuir la cantidad de prednisona necesaria, reduciendo sus efectos secundarios.

Artritis de Lyme crónica

La patología de la enfermedad de Lyme está causada por la respuesta inmunitaria del huésped a infección con la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. *B. burgdorferi* induce una respuesta inmunitaria que puede producir síntomas en varios órganos, con poca evidencia de invasión bacteriana. Estudios de la artritis de Lyme han mostrado que la artritis se asocia con ciertos factores inmunológicos, incluyendo la producción de citoquinas proinflamatorias y la formación de complejos inmunitarios, y también factores genéticos, tal como el antígeno leucocitario humano (HLA)-DR4 y HLA-DR2. Aproximadamente el 10% de los pacientes con artritis intermitente como resultado de la infección desarrollan una artritis crónica. Esta afección puede durar varios años y puede desarrollarse a una artritis destructiva. En general, la enfermedad de Lyme se trata con antibióticos ambulatorios tal como doxiciclina, amoxicilina, eritromicina, ceftriaxona, cefuroxima, y cloranfenicol. Sin embargo, los pacientes afectados con artritis crónica se pueden tratar con agentes inmunosupresores.

Cardiomiopatía dilatada

La cardiomiopatía dilatada (CMD) es una enfermedad del músculo del corazón caracterizada por dilatación ventricular y función sistólica alterada. La CMD es una causa principal de insuficiencia cardiaca y arritmia. El diagnóstico de cardiomiopatía dilatada idiopática se asigna a pacientes con disfunción y dilatación sistólica ventricular izquierda en ausencia de cualquier otra causa documentada. Se presume que la cardiomiopatía dilatada idiopática tiene un origen multifactorial, incluyendo mecanismos autoinmunitarios. En pacientes con CMD, se han identificado una gran variedad de autoanticuerpos que reaccionan contra antígenos cardiacos. Los agentes terapéuticos para CMD habitualmente afectan las funciones fisiológicas del corazón, incluyendo inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (por ejemplo, captopril, analapril, lisinopril, etc.), bloqueantes del receptor de angiotensina (por ejemplo, losartan, valsartan, etc.), diuréticos (por ejemplo, furosemida, bemetanida, ácido etacrínico, torsemida, etc.), acetazolamida, inhibidores de aldosterona (por ejemplo, espironolactona, eplerenona,

vasopresina, etc.), inotropo (por ejemplo, digoxina, etc.), bloqueantes β -adrenérgicos (por ejemplo, bisoprolol, succinato de metoprolol, carvedilol, etc.).

Dermatomiositis juvenil

La dermatomiositis juvenil (DMJ) es una enfermedad autoinmunitaria que produce vasculitis que se manifiesta en niños; es el homólogo pediátrico de la dermatomiositis. En DMJ, el sistema inmunitario del cuerpo ataca los vasos sanguíneos a lo largo de todo el cuerpo, produciendo inflamación llamada vasculitis. Otras formas de miositis juvenil son polimiositis juvenil y miositis de cuerpos de inclusión juvenil, que son extremadamente raras y no son tan comunes en niños como en adultos. La vasculitis causada por la DMJ se manifiesta predominantemente en dos maneras: un sarpullido púrpura rosáceo con frecuencia asociado con depósitos de calcio bajo la piel e inflamación muscular. La terapia para dermatomiositis se dirige a minimizar ambos aspectos del trastorno. Además, algunos pacientes pueden necesitar tratamiento para otras manifestaciones o complicaciones sistémicas. Los tratamientos comunes para DMJ incluyen la administración sistémica de glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, etc.), agentes inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato, azatioprina, micofenolato, sirolimus, rituximab, etc.), inmunoglobulina intravenosa a alta dosis (por ejemplo, gamimune, gammagard, sandoglobulina, etc.), agentes antipalúdicos (por ejemplo, hidroxicloroquina, fosfato de cloroquina, etc.), y bloqueantes de canales de calcio (por ejemplo, diltiazem, etc.).

Síndrome de Sjogren

El síndrome de Sjogren es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la producción anómala de autoanticuerpos en la sangre que se dirigen contra varios tejidos del cuerpo. Esta enfermedad autoinmunitaria particular presenta inflamación en ciertas glándulas del cuerpo. La inflamación de las glándulas que producen lágrimas (glándulas lacrimales) produce producción disminuida de agua para lágrimas y sequedad del ojo. La inflamación de las glándulas que producen la saliva en la boca (glándulas salivares, incluyendo las glándulas parótidas) produce boca seca y labios secos. Los agentes terapéuticos actuales para el síndrome de Sjogren incluyen la administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, corticosteroides, fármacos antipalúdicos (por ejemplo, hidroxicloroquina, etc.), pilocarpina, cevimeлина, ciclosporina, e inmunosupresores (por ejemplo, ciclofosfamida, metotrexato, micofenolato, azatioprina, etc.).

Artritis idiopática juvenil

Artritis idiopática juvenil (AIJ) es el término usado para describir inflamación artrítica de la membrana sinovial, el recubrimiento de las articulaciones, con inicio antes de los 16 años de edad. Previamente llamada artritis reumatoide juvenil, el nombre se ha cambiado para reflejar la diferencia entre las formas juvenil y adulta de artritis. La AIJ de inicio oligoarticular (pauciarticular) (40-60% de los casos) es común en niñas con inicio aproximadamente a la edad de 2 años. Están implicados cuatro o menos articulaciones durante los primeros 6 meses de la enfermedad (con frecuencia asimétrica). El inicio oligoarticular comúnmente implica las rodillas y, con menos frecuencia, los tobillos y muñecas. Aproximadamente el 75% de estos pacientes dan positivo para anticuerpos antinucleares. La AIJ de inicio poliarticular (20-40%) también es común en niñas con inicio pico observado a la edad de 3 años. Implica 5 o más articulaciones durante los primeros 6 meses de la enfermedad y comúnmente implica las articulaciones pequeñas de la mano y, con menos frecuencia, las articulaciones mayores de la rodilla, tobillo o muñeca. La artritis asimétrica puede ser aguda o crónica y puede ser destructiva en el 15% de los pacientes. Los síntomas sistémicos, incluyendo anorexia, anemia y retraso en el crecimiento, son moderados. Aproximadamente el 40% de estos pacientes dan positivo para autoanticuerpos. La AIJ de inicio sistémico (10-20%) se produce con igual frecuencia en niños y niñas y puede aparecer a cualquier edad. La poliartritis simétrica está presente y puede ser destructiva en el 25% de los pacientes. Pueden estar implicadas las manos, muñecas, pies, tobillos, codos, rodillas, caderas, hombros, columna vertebral cervical, y mandíbula. El inicio sistémico se asocia con fiebre, sarpullido macular, leucocitosis, linfadenopatía, y hepatomegalia. Pericarditis, pleuritis, esplenomegalia, y dolor abdominal se observan de forma menos común. Los agentes terapéuticos actuales para AIJ incluyen corticosteroides (por ejemplo, acetato de prednisolona, triamcinolona acetona, prednisona, etc.), cicloplégicos (por ejemplo, ciclopentanolato, bromhidrato de homatropina, etc.), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, indometacina, naproxeno, ibuprofeno, ketorolaco, diclofenaco, etc.), inmunosupresores (por ejemplo, etanercept, metotrexato, ciclosporina, ciclofosfamida, clorambucilo, etc.), inhibidores del factor de necrosis tumoral (por ejemplo, adalimumab, infliximab, etc.), inmunomoduladores (por ejemplo, abatacept, etc.).

Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica de causa desconocida que afecta múltiples sistemas de órganos. El curso clínico está marcado por las remisiones y recaídas espontáneas. Las anomalías inmunológicas, especialmente la producción de un número de anticuerpos antinucleares, son otra característica prominente de esta enfermedad. Autoanticuerpos, complejos inmunitarios circulantes, y linfocitos T, contribuyen todos a la expresión de la enfermedad. Los sistemas de órganos afectados incluyen la dermis, membranas serosas, renal, sistema nervioso central, hematológico, musculoesquelético, cardiovascular, pulmonar, endotelio vascular, y gastrointestinal. Los agentes terapéuticos actuales para LES incluyen salicilatos no acetilados

(por ejemplo, trisalicilato de colina y magnesio, etc.), fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antipalúdicos (por ejemplo, hidroxiquina, etc.), glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, etc.), agentes inmunosupresores/citotóxicos (por ejemplo, ciclofosfamida, azatioprina, etc.). Otro tratamiento para LES incluye técnicas de eliminación de células B, por ejemplo, anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, rituximab, ofatumumab, IMMU-106, GA-101, etc.), anticuerpos anti-CD22 (por ejemplo, epratuzumab), bloqueantes y antagonistas de TNF- α e IL-6 e inhibidores de la activación del complemento (por ejemplo, eculizumab).

Enfermedad intestinal inflamatoria

El término enfermedad intestinal inflamatoria cubre un grupo de trastornos en los que los intestinos se inflaman, y en general se cree que resulta de una reacción autoinmunitaria contra tejido intestinal. Se describen dos tipos principales de EII: colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Como el nombre sugiere, la colitis ulcerosa está limitada al colon. Aunque la enfermedad de Crohn puede implicar cualquier parte del aparato digestivo desde la boca al ano, de forma más común afecta al intestino delgado y/o el colon. Tanto la colitis ulcerosa como la enfermedad de Crohn habitualmente son variables en la intensidad y gravedad de la enfermedad. Cuando hay inflamación grave, se considera que la enfermedad está en una fase activa. Cuando el grado de inflamación se reduce o está ausente, el paciente habitualmente no tiene síntomas y se considera que está en remisión. Un factor/agente desconocido desencadena el sistema inmunitario del cuerpo para producir una reacción inflamatoria en el tracto intestinal que sigue sin control. Como resultado de la reacción inflamatoria, la pared intestinal se daña produciendo diarrea sanguinolenta y dolor abdominal. Los factores que pueden encender el sistema inmunitario del cuerpo incluyen un agente infeccioso, una respuesta inmunitaria a antígenos exógenos (por ejemplo, proteína de leche de vaca), o un proceso autoinmunitario. Como los intestinos están continuamente expuestos a agentes que pueden causar reacciones inmunitarias. Se piensa que la enfermedad resulta de un fallo del cuerpo de apagar las respuestas inmunitarias normales. Se usan diferentes grupos de fármacos para el tratamiento de pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria incluyendo, pero no limitado a, aminosalicilatos (por ejemplo, sulfasalacina, mesalamina, olsalacina, balsalacida, etc.), corticosteroides (por ejemplo, metilprednisolona, hidrocortisona, prednisona, prednisolona, budesónida, dexametasona, etc.), modificadores inmunitarios (por ejemplo, 6-mercaptopurina, azatioprina, etc.), agentes anti-factor de necrosis tumoral (por ejemplo, infliximab, etc.), y antibióticos (por ejemplo, metronidazol, ciprofloxacina, etc.). Para alivio sintomático, a los pacientes se les administran agentes antidiarreicos, antiespasmódicos, y supresores de ácido.

Policondritis

La policondritis recidivante (PR) es una afección inflamatoria grave, episódica y progresiva que implica estructuras cartilaginosas, predominantemente las de las orejas, nariz, y árbol laringotraqueobronquial. Otras estructuras afectadas pueden incluir los ojos, sistema cardiovascular, articulaciones periféricas, piel, oído medio e interno, y sistema nervioso central. La etiología de esta enfermedad rara es desconocida; sin embargo, la patogénesis se ha caracterizado como autoinmunitaria. La evidencia para una etiología autoinmunitaria incluye hallazgos patológicos de células T infiltrantes, la presencia de complejos antígeno-anticuerpo en cartílago afectado, respuestas celular y humoral contra colágeno de tipo II y otros antígenos de colágeno, y la observación de que pautas inmunosupresoras con la mayor frecuencia suprimen la enfermedad. La especificidad de lesión autoinmunitaria hacia tejidos cartilaginosos ha llevado a investigadores a identificar que están presentes autoanticuerpos contra colágeno específico de cartílago de tipos II, IX y XI en el 30-70% de los pacientes con PR. No se han publicado ensayos controlados de terapia para PR. Por tanto, el fin de los métodos de tratamiento actuales es reducir los síntomas actuales y conservar la integridad de las estructuras cartilaginosas. Los agentes terapéuticos comunes para PR incluyen, pero no están limitados a, administración de corticosteroides (por ejemplo, prednisona, etc.), fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (por ejemplo, metotrexato, etc.), agentes antiinflamatorios (por ejemplo, dapsona, etc.), inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (por ejemplo, infliximab, etanercept, etc.), e inmunoestimulantes/inhibidores de interleuquina 1 (por ejemplo, anakinra, etc.).

Pénfigo

Pénfigo es un grupo raro de enfermedades ampollas autoinmunitarias que afectan la piel y membranas mucosas. En pénfigo, se forman autoanticuerpos contra desmogleína, una familia de proteínas cadherinas (DSG1, DSG2, DSG3, y DSG4) que unen células epidérmicas adyacentes a través de puntos de unión llamados desmosomas. Cuando los autoanticuerpos atacan las desmogleínas, las células se separan unas de otras y la epidermis se vuelve "despegada", un fenómeno llamado acantolisis. Esto produce ampollas que se desprenden y se vuelven llagas. En algunos casos, estas ampollas pueden cubrir un área significativa de la piel. Hay tres tipos de pénfigo que varían en gravedad: pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo y pénfigo paraneoplásico. Si no se trata el pénfigo puede ser letal debido a infección abrumadora de las llagas. El tratamiento más común es la administración de esteroides orales, especialmente prednisona. Los efectos secundarios de los corticosteroides pueden requerir el uso de fármacos reductores de esteroides o adyuvantes. El inmunosupresor CellCept (ácido micofenólico) está entre los que se usan. La gamma globulina intravenosa (IVIG, por ejemplo, gamimune, gammagrad, sandoglobulina, etc.) puede ser útil en casos graves, especialmente pénfigo paraneoplásico. Los casos leves algunas veces responden a la aplicación de esteroides tópicos. Recientemente, se encontró que rituximab, un anticuerpo anti-CD20, mejora casos graves de otra forma intratables de pénfigo vulgar. Si se diagnostica pénfigo vulgar con enfermedad pulmonar, algunas se usa

una mezcla de fármacos inmunosupresores en un intento de parar la rápida evolución de bronquiolitis obliterante, incluyendo solumedrol, ciclosporina, azatioprina y talidomida. Si las lesiones de la piel se infectan, se pueden recetar antibióticos.

5 *Miastenia grave*

La miastenia grave (MG) es una enfermedad neuromuscular que produce debilidad muscular fluctuante y fatigabilidad. Es un trastorno autoinmunitario en el que la debilidad está causada por anticuerpos circulantes que bloquean los receptores de acetilcolina en unión neuromuscular post-sináptica, inhibiendo el efecto estimulante del neurotransmisor acetilcolina. Algunos autoanticuerpos alteran la capacidad de acetilcolina de unirse a los receptores. Otros producen la destrucción de los receptores, ya sea por fijación del complemento o induciendo a la célula muscular a que elimine los receptores mediante endocitosis. El sello de la miastenia grave es la fatigabilidad. Los músculos se vuelven progresivamente más débiles durante periodos de actividad y mejoran después de periodos de descanso. Los músculos que controlan el movimiento del ojo y el párpado, expresión facial, masticación, habla, y deglución son especialmente susceptibles. Los músculos que controlan la respiración y movimientos del cuello y extremidades también pueden estar afectados. En crisis miasténicas se produce una parálisis de los músculos respiratorios, necesiéndose respiración asistida para mantener la vida. La MG se trata terapéuticamente con inhibidores de colinesterasas (por ejemplo, endrofonio piridostigmina, neostigmina, etc.) o inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, ciclosporina, etc.) y, en casos seleccionados, timentomía. Altas dosis de corticosteroides (por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, etc.) se usan comúnmente para suprimir la autoinmunidad. Los broncodilatadores (por ejemplo, albuterol, salbutamol, ipatropio, glucopirrolato, etc.) pueden ser útiles en superar el broncoespasmo asociado con una crisis colinérgica.

25 *Tiroiditis de Hashimoto*

La tiroiditis de Hashimoto (TH) o tiroiditis linfocítica crónica es una enfermedad autoinmunitaria donde las células T atacan el tejido del tiroides. Aunque los específicos subyacentes de la destrucción por el sistema inmunitario de células del tiroides no se entienden claramente, se han identificado varios autoanticuerpos en pacientes de TH, incluyendo anticuerpos contra peroxidasa tiroidea, tiroglobulina y receptores de TSH. Fisiológicamente, estos autoanticuerpos producen la destrucción gradual de los folículos de la glándula del tiroides. Los síntomas de la tiroiditis de Hashimoto pueden incluir hipotiroidismo, ganancia de peso, depresión, manía, fatiga, ataques de ansiedad, bradicardia, taquicardia, colesterol alto, hipoglucemia reactiva, estreñimiento, migrañas, pérdida de memoria, infertilidad y pérdida de pelo. El tratamiento de elección para TH es sustitución de hormonas tiroideas, y el fármaco administrado con más frecuencia es levotiroxina sódica, habitualmente durante toda la vida del paciente. El fin de la terapia es restablecer un estado clínica y bioquímicamente eutiroides. Un tratamiento popular es el uso combinado de liotironina y levotiroxina en un esfuerzo para mimetizar estrechamente la fisiología de hormonas tiroideas.

40 *Enfermedad de Graves*

La enfermedad de Graves (también conocida como enfermedad de Basedow o enfermedad de Graves-Basedow; EG) es un trastorno del tiroides caracterizado por bocio, exoftalmia, piel de "cáscara de naranja", e hipertiroidismo. Esta enfermedad está causada por una reacción autoinmunitaria mediada por anticuerpo contra el receptor para la hormona estimulante del tiroides, tiroglobulina y hacia hormonas tiroideas, pero el desencadenante para esta reacción aún se desconoce. Estos anticuerpos causan hipertiroidismo porque se unen al receptor de TSH causando activación crónica. El receptor de TSH se expresa en las células foliculares de la glándula tiroides, y el resultado de la estimulación crónica es una producción anormalmente alta de hormonas tiroideas (T3 y T4). Esto a su vez produce los síntomas clínicos de hipertiroidismo, y el agrandamiento de la glándula tiroides visible como bocio. Los autoanticuerpos se unen a los músculos extraoculares y producen hinchamiento detrás del globo ocular. La piel de "cáscara de naranja" se ha explicado por la infiltración de anticuerpos debajo de la piel, que produce una reacción inflamatoria y posteriores placas fibrosas. La mayoría de los pacientes de la EG se tratan con agentes antitiroideos, tal como tioamidas (por ejemplo, propiltiouracilo y metimazol), que inhiben la organificación del yoduro y procesos de acoplamiento para prevenir la síntesis de hormonas tiroideas. Otros agentes terapéuticos para EG incluyen bloqueantes beta-adrenérgicos (por ejemplo, propanolol, atenolol, metoprolol, etc.), yodos (por ejemplo, yoduro de potasio; solución lugol, diatrizoato sódico, ácido yopanoico, etc.), secuestrantes de ácidos biliares (por ejemplo, colestiramina, etc.), antiarrítmicos (por ejemplo, amiodarona, etc.), y glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, dexametasona, etc.).

60 *Enfermedad de Addison*

La enfermedad de Addison (también conocida como insuficiencia suprarrenal crónica, hipocortisolismo o hipocorticism) es un trastorno endocrino raro en el que la glándula suprarrenal produce cantidades insuficientes de hormonas esteroideas (glucocorticoides y con frecuencia mineralocorticoides). Se puede desarrollar en niños, así como en adultos, y se puede producir como el resultado de un gran número de causas subyacentes. La destrucción autoinmunitaria de la corteza suprarrenal (con frecuencia debida a anticuerpos contra la enzima 21-hidroxilasa) es una causa común de la enfermedad de Addison en adolescentes y adultos. Esto puede ser aislado o estar en el

contexto de síndrome poliendocrino autoinmunitario (APS de tipo 1 o 2). Los síntomas más comunes son fatiga, debilidad muscular, pérdida de peso, vómitos, diarrea, dolor de cabeza, sudoración, cambios de humor y personalidad y dolores articulares y musculares. Una “crisis de Addison” o “crisis suprarrenal” es una constelación de síntomas que indican insuficiencia suprarrenal grave y puede ser letal si no se trata. Los síntomas característicos de la crisis Addisoniana incluyen: dolor penetrante repentino en las piernas, región lumbar, o abdomen; vómitos graves y diarrea que producen deshidratación; baja presión sanguínea; pérdida de consciencia/síncope; hipoglucemia; confusión; psicosis; letargia grave; y convulsiones. El tratamiento de la enfermedad de Addison implica reemplazar, o sustituir, las hormonas que las glándulas suprarrenales no producen. El cortisol se sustituye por vía oral con comprimidos de hidrocortisona, un glucocorticoide sintético, tomado una o dos veces al día. Si la aldosterona también es deficiente, se sustituye con dosis orales de un mineralocorticoide llamado acetato de fludrocortisona, que se toma una vez al día. Durante una crisis Addisoniana, la baja presión sanguínea, baja glucosa en sangre y altos niveles de potasio pueden ser potencialmente mortales. La terapia estándar implica inyecciones intravenosas de hidrocortisona, solución salina y dextrosa.

15 **Enfermedad ocular inflamatoria**

En algunas implementaciones, las células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación y/o agonistas de SAP se pueden usar para tratar, prevenir, o reducir la gravedad de una enfermedad ocular inflamatoria (véase, por ejemplo, Sugita *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2009; Sugita *et al.* J Immuno. 183(8): 5013-22, 2009; Gregerson *et al.* J Immunol. 183(2) 814-22, 2009; Matta *et al.* Am J Pathol. 173(5): 1440-54, 2008; Siemasko *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 49(12): 5434-40, 2008; Caspi, R. Immunol Res. 42(1-3): 41-50, 2008; Nanke *et al.* Mod Rheumatol. 18(4): 354-8, 2008; Agarwal *et al.* J Immunol. 180(8): 5423-9, 2008; Ng *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 48(11): 5122-7, 2007; y Silver *et al.* J. Immunol. 179(8): 5146-58, 2007). En particular, las células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación y/o agonistas de SAP se pueden usar para tratar, prevenir o reducir la gravedad de uveítis y/o uveorretinitis (véase, por ejemplo, Commodaro *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; Sun *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 51(2): 816-21, 2010; Yeh *et al.* Arch Ophthalmol, 127(4): 407-13, 2009; y Ke *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 49(9): 3999-4007). Por ejemplo, las composiciones de la divulgación se pueden usar para tratar uveítis anterior granulomatosa, resultante de una infección (por ejemplo, HSV, VZV, etc.), cáncer, o trastorno autoinmunitario (por ejemplo, granulomatosis de Wegener); uveítis anterior no granulomatosa, particularmente en asociación con queratitis, escleritis, atrofia del iris, artralgia o cáncer; uveítis intermedia, resultante de infección, cáncer, artritis reumatoide juvenil, esclerosis múltiple, sarcoidosis, pars planitis, vitritis o uveítis periférica; uveítis posterior, particularmente en asociación con hemorragia retinal, desprendimiento de retina neurosensorial, retinitis focal, edema de disco óptico, o vasculitis retinal; o complicaciones resultantes de uveítis (por ejemplo, desprendimiento de retina, desprendimiento coroidal, opacificación vítrea, glaucoma, queratopatía calcífica en forma de banda, o cataratas). En ciertos aspectos, las células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación y/o agonistas de SAP se pueden usar para tratar, prevenir o reducir la gravedad de enfermedades del ojo seco incluyendo, por ejemplo, deficiencia de lágrimas acuosa (por ejemplo, Sjogrens), disfunción de producción de lágrima evaporativa (por ejemplo, sarcoide), así como trastornos estructurales y exógenos (por ejemplo, queratoconjuntivitis límpica). (Véase, por ejemplo, Chauhan *et al.* J Immunol. 182(3): 1247-52, 2009). En ciertos aspectos, las células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación y/o agonistas de SAP se pueden usar para tratar, prevenir o reducir la gravedad de trastornos de conjuntivitis alérgica (véase, por ejemplo, Sumi *et al.* Int Arch Allergy Immunol. 148(4): 305-10, 2009; Niederkorn J. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 8(5): 472-6, 2008; y Fukushima *et al.* Allergol Int. 57(3): 241-6, 2008). En ciertos aspectos, las células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación y/o agonistas de SAP se pueden usar para tratar, prevenir o reducir la gravedad de enfermedades oculares inflamatorias asociadas con trasplante de córnea (véase, por ejemplo, Jin *et al.* Invest Ophthalmol vis Sci. 51(2): 816-21, 2010; y Chauhan *et al.* J Immunol. 182(1): 143-53, 2009). En ciertos aspectos, las células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación y/o agonistas de SAP se pueden usar para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad ocular inflamatoria asociada con un trastorno neoplásico. En ciertos aspectos, las células T reguladoras generadas por los métodos de la divulgación y/o agonistas de SAP se pueden usar para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad ocular inflamatoria asociada con un trastorno congénito.

Agentes terapéuticos autoinmunitarios

55 *Agonistas de SAP*

Un aspecto de la divulgación proporciona agonistas de SAP útiles en el tratamiento de varios trastornos, en particular trastornos autoinmunitarios. Los agonistas de SAP abarcan todos los compuestos y composiciones que aumentan o mimetizan de otra manera la señalización de SAP endógeno, incluyendo compuestos que aumentan la actividad de SAP.

(i) *P amiloide sérico humano*

En ciertas implementaciones, un agonista de señalización de SAP es un polipéptido SAP o variante del mismo. En ciertas implementaciones, un polipéptido SAP es SAP que comprende cinco protómeros SAP humanos (SEQ ID NO: 1). El término “protómero SAP” se pretende que se refiera a un polipéptido que es al menos el 60%, al menos el

70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 99% o el 100% idéntico al protómero SAP humano, determinado usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (*Comp. App. Biosci.*, 6:237-245 (1990)). En una implementación específica, los parámetros empleados para calcular el porcentaje de identidad y similitud de un alineamiento de aminoácidos comprenden: Matriz=PAM 150, k-tupla=2, penalización por mal emparejamiento=1, penalización por unión=20, longitud de grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, penalización por hueco=5, y penalización por tamaño de hueco=0,05. El término "protómero SAP" abarca fragmentos funcionales y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de los anteriores. En general, se diseñará un protómero SAP que es soluble en soluciones acuosas a temperaturas, niveles de pH y osmolaridad biológicamente relevantes. Los protómeros que se asocian de forma no covalente para formar SAP pueden tener idénticas secuencias de aminoácidos y/o modificaciones postraduccionales o, alternativamente, los protómeros individuales pueden tener diferentes secuencias y/o modificaciones.

Algunos aspectos de la divulgación se refieren a polipéptidos, o proporcionan métodos terapéuticos para emplear esos polipéptidos, en donde dichos polipéptidos se definen, al menos en parte, respecto a una secuencia de referencia. Según esto, tales polipéptidos pueden tener un cierto porcentaje de residuos de aminoácidos que no son idénticos respecto a una secuencia de referencia. En algunas formas de realización, los residuos no idénticos tienen propiedades químicas similares a los residuos a los que no son idénticos. Los grupos que tienen propiedades similares incluyen los siguientes aminoácidos: E, D, N y Q; H, K y R; Y, F y W; I, L, V, M, C y A; y S, T, C, P y A.

En algunas implementaciones, los residuos que no son idénticos son los que no están evolutivamente conservados entre la secuencia de referencia y una secuencia ortóloga en al menos una especie evolutivamente relacionada, tal como en especies en el mismo orden. En el caso de una secuencia de referencia de vertebrados, los aminoácidos que se pueden mutar en una forma de realización preferida son los que no están conservados entre la secuencia de referencia y la secuencia ortóloga en otra especie de vertebrado. Por ejemplo, si se dice que un polipéptido usado en un método de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a SAP humana (SEQ ID NO: 1), entonces dicho polipéptido puede tener residuos no idénticos en esas posiciones en las que la SAP humana y la de otro vertebrado se diferencian. La figura 1 representa SAP humana alineada frente a dos secuencias SAP de mamíferos y una aviar. Los residuos no sombreados indican residuos que se diferencian de la secuencia de SAP humana.

Los polipéptidos que comparten al menos el 95% de identidad con SEQ ID NO: 1 incluyen polipéptidos que tienen sustituciones conservadoras en estas áreas de divergencia. Típicamente vistas como sustituciones conservadoras son las sustituciones, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile, intercambio de los residuos de hidroxilo Ser y Thr, intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu, sustitución entre los residuos de amida Asn y Gln, intercambio de los residuos básicos Lys y Arg y sustituciones entre los residuos aromáticos Phe, Tyr. Se puede encontrar orientación adicional respecto a qué cambios de aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silenciosos en Bowie *et al.*, *Science* 247:1306-1310 (1990).

Los polipéptidos SAP típicamente comprenden polímeros que son al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, o la menos el 99% idénticos a SEQ ID NO: 1.

En algunas implementaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden SAP, o un fragmento funcional del mismo. En algunas implementaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una variante de SAP. La secuencia de aminoácidos de una variante de SAP se puede diferenciar de SEQ ID NO: 1 en una o más sustituciones conservadoras. Como se usa en el presente documento, "sustituciones conservadoras" son residuos que son física o funcionalmente similares a los residuos de referencias correspondientes, es decir, una sustitución conservadora y su residuo de referencia tienen tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares incluyendo la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservadoras preferidas son las que cumplen los criterios definidos para una mutación puntual aceptada en Dayhoff *et al.*, *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:345-352 (1978 & Sup.). Los ejemplos de sustituciones conservadoras son sustituciones en los siguientes grupos: (a) valina, glicina; (b) glicina, alanina; (c) valina, isoleucina, leucina; (d) ácido aspártico, ácido glutámico; (e) asparragina, glutamina; (f) serina, treonina; (g) lisina, arginina, metionina; y (h) fenilalanina, tirosina. Se puede encontrar orientación adicional respecto a qué cambios de aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silenciosos en Bowie *et al.*, *Science* 247:1306-1310 (1990).

Las variantes y fragmentos de SAP que retienen función biológica son útiles en las composiciones farmacéuticas y métodos descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, una variante o fragmento de SAP se une a FcγRI, FcγRIIA y/o FcγRIIB. En algunas formas de realización, una variante o fragmento de SAP se usa para tratar o prevenir un trastorno o afección autoinmunitaria.

En implementaciones específicas, las composiciones que contienen SAP, variantes de SAP o fragmentos funcionales de SAP pueden ser operables para subir la concentración de SAP en localizaciones diana hasta aproximadamente al menos 0,5 µg/ml. Un fragmento funcional de SAP es una porción del polipéptido SAP que retiene actividad SAP nativa. En seres humanos, se ha administrado previamente SAP radiomarcada con ¹²⁵I para estudiar pacientes con amiloidosis. En los tratamientos, se administraron aproximadamente 600 µg de SAP a un ser

humano adulto. Según esto, la administración de aproximadamente 600 µg de SAP de forma sistémica a un ser humano adulto es segura. Dosis mayores también pueden ser seguras en las condiciones apropiadas.

(ii) *Anticuerpos anti-FcγR como agonistas de SAP*

En un aspecto, se proporcionan uno o más compuestos que mimetizan la señalización de SAP. En algunas implementaciones, los agonistas de la señalización de SAP son anticuerpos anti-FcγR, en donde los anticuerpos se seleccionan de una clase de anticuerpos anti-FcγRI, anti-FcγRIIA y anti-FcγRIII que son capaces de unirse a FcγRI, FcγRIIA o FcγRIII, respectivamente. Los anticuerpos anti-FcγR son anticuerpos IgG que se unen a los receptores por la porción Fc de anticuerpos IgG (FcγR). Los anticuerpos anti-FcγR se unen a través de su región variable, y no a través de su región constante (Fc). Los anticuerpos anti-FcγR pueden incluir cualquier isotipo de anticuerpo. Los anticuerpos anti-FcγR se pueden además entrecruzar o agregar con o sin anticuerpos adicionales u otros medios. Este proceso inicia los sucesos de señalización intracelular consistente con activación de FcγR. En algunas formas de realización, el agonista de señalización de SAP puede ser un FcγR entrecruzado.

Se pueden usar composiciones que contienen anticuerpos anti-FcγRI, anticuerpos anti-FcγRII y/o anticuerpos anti-FcγRIII para suprimir trastornos de hipersensibilidad en localizaciones inapropiadas.

En implementaciones específicas, las composiciones que contienen aproximadamente 1,0 µg/ml de anticuerpos anti-FcγR pueden ser eficaces para inhibir trastornos autoinmunitarios en aproximadamente el 50%. En otras implementaciones, las composiciones pueden contener una cantidad suficiente para administrar 1,0 µg/ml de anticuerpos anti-FcγR al tejido diana.

Los anticuerpos anti-FcγR se pueden administrar en una dosis de aproximadamente 1,0 µg/ml, en una cantidad suficiente para administrar 1,0 µg/ml de anticuerpos anti-FcγR al tejido diana, o en otra dosis suficiente para inhibir trastornos autoinmunitarios sin producir una cantidad indeseable de muerte celular en el paciente.

(iii) *Dominios Fc agregados y anticuerpos que contienen Fc*

En algunas implementaciones, los agonistas de señalización de SAP son IgG entrecruzadas o agregadas. Las IgG entrecruzadas o agregadas pueden incluir cualquier IgG capaz de unirse al FcγR diana a través de su región Fc, siempre que al menos dos de tales anticuerpos IgG estén físicamente conectados entre sí.

Las IgG entrecruzadas o agregadas pueden incluir anticuerpos enteros o una porción de los mismos, preferiblemente la porción funcional en la supresión de trastornos autoinmunitarios. Por ejemplo, pueden incluir cualquier porción de anticuerpo capaz de entrecruzar FcγR. Esto puede incluir anticuerpos agregados o entrecruzados o fragmentos de los mismos, tal como anticuerpos enteros agregados o entrecruzados, fragmentos F(ab')₂, y posible incluso fragmentos Fc.

La agregación o entrecruzamiento de anticuerpos se puede lograr por cualquier método conocido, tal como agregación por calor o química. Cualquier nivel de agregación o entrecruzamiento puede ser suficiente, aunque la agregación aumentada puede producir supresión del trastorno autoinmunitario aumentada. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, tal como anticuerpos producidos de células de hibridoma. Las composiciones y métodos pueden emplear mezclas de anticuerpos, tal como mezclas de múltiples anticuerpos monoclonales, que pueden estar entrecruzados o agregados a anticuerpos similares o diferentes.

Se pueden usar composiciones que contienen IgG entrecruzadas o agregadas para suprimir los trastornos autoinmunitarios en localizaciones inapropiadas.

En otras implementaciones específicas, las composiciones pueden contener tan poco como 0,1 µg/ml de IgG entrecruzada o agregada. La IgG entrecruzada o agregada se puede administrar en una cantidad suficiente para administrar al menos 0,1 µg/ml de IgG al tejido diana, o en otra dosis suficiente para inhibir trastornos autoinmunitarios sin producir una cantidad indeseable de muerte celular en el paciente.

(iv) *Peptidomimético de SAP*

En ciertas implementaciones, los agonistas de SAP incluyen peptidomiméticos. Como se usa en el presente documento, el término "peptidomimético" incluye péptidos químicamente modificados y moléculas similares a péptidos que contienen aminoácidos no naturales, peptoides y similares. Los métodos para identificar un peptidomimético se conocen bien en la técnica e incluyen el cribado de bases de datos que contienen bibliotecas de potenciales peptidomiméticos. Por ejemplo, la Cambridge Structural Database contiene una colección de más de 300.000 compuestos que tienen estructuras cristalinas conocidas (Allen et al., Acta Crystallogr. Section B, 35:2331 (1979)). Donde no está disponible una estructura cristalina de la molécula diana, se puede generar una estructura usando, por ejemplo, el programa CONCORD (Rusinko et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci. 29:251 (1989)). Otra base de datos, la Available Chemicals Directory (Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro Calif.),

contiene aproximadamente 100.000 compuestos que están comercialmente disponibles y también se pueden hacer búsquedas para identificar potenciales peptidomiméticos de polipéptidos SAP.

(v) *Actividad SAP aumentada*

En algunas implementaciones, un agonista de SAP aumenta la actividad SAP. La actividad SAP se puede aumentar aumentando la concentración de SAP, por ejemplo, aumentando la transcripción de SAP, aumentando la traducción, aumentando la secreción de SAP, aumentando la estabilidad del ARN de SAP, aumentando la estabilidad de la proteína SAP o disminuyendo la degradación de la proteína SAP. La actividad SAP también se puede aumentar aumentando específicamente la "concentración libre" de SAP, o más bien la forma sin unir, por ejemplo, disminuyendo la unión endógena de SAP.

(iv) *Entrecruzadores de FcγR*

En algunas implementaciones, se pueden usar proteínas de dominio de andamiaje basadas en fibronectina como agonistas de SAP para entrecruzar los FcγR. Las proteínas de dominio de andamiaje basadas en fibronectina pueden comprender el dominio de fibronectina de tipo III (Fn3), en particular, un décimo dominio de fibronectina tipo III (¹⁰Fn3). Para entrecruzar FcγR, se pueden generar multímeros de dominios Fn3 de unión a FcγR como se describe en la patente en EE UU No. 7.115.396.

Los dominios de fibronectina de tipo III (Fn3) comprenden, en orden del extremo N al extremo C, una lámina beta o de tipo beta, A; un bucle AB; una lámina beta o de tipo beta, B; un bucle, BC; una lámina beta o de tipo beta, C; un bucle CD; una lámina beta o de tipo beta, D; un bucle, DE; una lámina beta o de tipo beta, E; un bucle, EF; una lámina beta o de tipo beta, F; un bucle, FG; y una lámina beta o de tipo beta G. Los bucles BC, DE y FG son tanto estructural como funcionalmente análogos a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las inmunoglobulinas. Los dominios Fn3 se pueden diseñar para unirse a casi cualquier compuesto alterando la secuencia de uno o más de los bucles BC, DE y FG. Los métodos para generar unidores específicos se han descrito en la patente en EE UU No. 7.115.396, que divulga unidores de TNFα de alta afinidad, y la publicación en EE UU No. 2007/0148126, que divulga unidores de VEGFR2 de alta afinidad. Un ejemplo de proteínas de andamiaje basadas en fibronectina son Adnectins™ (Adnexus, Bristol-Myers Squibb R&D Company).

En algunas implementaciones, el agonista de SAP es un aptámero. Para entrecruzar multímeros de FcγR, se deben generar multímeros de aptámeros que se unen a FcγR.

Los aptámeros son oligonucleótidos, que pueden ser sintéticos o naturales, que se unen a una molécula diana particular, tal como una proteína o metabolito. Típicamente, la unión es mediante interacciones diferentes del emparejamiento de bases clásico de Watson-Crick. Los aptámeros representan una clase prometedora de agentes terapéuticos actualmente en desarrollo preclínico y clínico. Como los agentes biológicos, por ejemplo, péptidos o anticuerpos monoclonales, los aptámeros son capaces de unirse específicamente a dianas moleculares y, mediante la unión, inhibir la función diana. Un aptámero típico tiene 10-15 kDa de tamaño (es decir, 30-45 nucleótidos), se une a su diana con afinidad subnanomolar y distingue entre dianas muy relacionadas (por ejemplo, típicamente no se unirá a otras proteínas de la misma familia génica) (Griffin, et al. (1993), *Gene* 137(1): 25-31; Jenison, et al. (1998), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8(4): 265-79; Bell, et al. (1999), *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35(9): 533-42; Watson, et al. (2000), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10(2): 63-75; Daniels, et al. (2002), *Anal. Biochem.* 305(2): 214-26; Chen, et al. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(16): 9226-31; Khati, et al. (2003), *J. Virol.* 77(23): 12692-8; Vaish, et al. (2003), *Biochemistry* 42(29): 8842-51).

Los aptámeros tienen un número de características atractivas para su uso como agentes terapéuticos. Además de alta afinidad y especificidad por la diana, los aptámeros han mostrado poca o ninguna toxicidad o inmunogenicidad en ensayos estándar (Wlotzka, et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(13): 8898-902). En efecto, se han optimizado varios aptámeros terapéuticos y se ha avanzado a través de fases variables de desarrollo preclínico, incluyendo análisis farmacocinético, caracterización de eficacia biológica en modelos celular y de enfermedad animal, y evaluación de farmacología de seguridad preliminar (Reyderman and Stavchansky (1998), *Pharmaceutical Research* 15(6): 904-10; Tucker et al., (1999), *J. Chromatography B.* 732: 203-212; Watson, et al. (2000), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10(2): 63-75).

Un método adecuado para generar un aptámero para una diana de interés es con el proceso titulado "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial" ("SELEX™", por sus siglas en inglés). El proceso SELEX™ es un método para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión muy específica a moléculas diana y se describe en, por ejemplo, la solicitud de patente en EE UU No. de serie 07/536.428, presentada el 11 de junio, 1990, ahora abandonada, la patente en EE UU No. 5.475.096 titulada "Ligandos Ácidos Nucleicos", y la patente en EE UU No. 5.270.163 (Véase también el documento WO 91/19813) titulada "Ligandos Ácidos Nucleicos". Cada ligando ácido nucleico identificado por SELEX™ es un ligando específico de un compuesto o molécula diana determinado. El proceso SELEX™ se basa en la percepción única que los ácidos nucleicos tienen capacidad suficiente para formar una variedad de estructuras bi- y tridimensionales y suficiente versatilidad química disponible en sus monómeros para actuar como ligandos (formar pares de unión específicos) con virtualmente

5 cualquier compuesto químico, sea monomérico o polimérico. Moléculas de cualquier tamaño pueden servir como dianas. El método SELEX™ aplicado a la aplicación de unión de alta afinidad implica la selección de una mezcla de oligonucleótidos candidatos en iteraciones por etapas de unión, separación y amplificación, usando el mismo esquema general de selección, para alcanzar virtualmente cualquier criterio deseado de afinidad de unión y selectividad. Empezando de una mezcla de ácidos nucleicos, que preferiblemente comprende un segmento de secuencia aleatorizada, el método SELEX™ incluye etapas de poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión, separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido específicamente a las moléculas diana, disociar los complejos ácido nucleico-diana, amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos ácido nucleico-diana para dar una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos, después reiterar las etapas de unión, separación, disociación y amplificación a través de tantos ciclos como se desee para dar ligandos ácidos nucleico de alta afinidad muy específicos para la molécula diana. La Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial, "SELEX™" es un método para hacer un ligando ácido nucleico para cualquier diana deseada, como se describe, por ejemplo, en las patentes en EE UU No. 5.475.096 y 5.270.163, y el documento PCT/US91/04078, cada uno de los cuales se incorpora específicamente en el presente documento mediante referencia.

15 En algunas implementaciones, los agonistas de SAP son Nanobodies®. Los Nanobodies® son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpo que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada naturales. La tecnología Nanobody® se desarrolló originalmente después del descubrimiento de los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). De forma importante, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido estable que porta la capacidad de unión a antígeno entera del anticuerpo de cadena pesada original. Estos dominios VHH recientes con sus propiedades estructurales y funcionales únicas forman la base de una nueva generación de anticuerpos terapéuticos.

Preparaciones y formulaciones farmacéuticas

30 En algunas implementaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos una glucovariante de SAP en una formulación que es adecuada para la administración a un paciente en necesidad de ello. La población de células T para uso en la composición se puede generar por los métodos descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, al menos el 70, 80, 90 o 100% de las células de la composición son células T reguladoras.

35 En algunas implementaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos una glucovariante de SAP en combinación con uno o más soportes, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones tal como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; hidratos de carbono tal como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos; manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tal como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tal como EDTA; adyuvantes y conservantes. En algunas implementaciones, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para tratar o prevenir un trastorno autoinmunitario en un sujeto humano.

45 En algunas implementaciones, la composición de la presente invención contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de células T reguladoras en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes activos. En ciertos aspectos, el agente activo comprende al menos una citoquina (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-10, TGF-β y/o IL-15). En ciertos aspectos, el agente activo es uno o más agonistas de SAP. En ciertas formas de realización, el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar enfermedades autoinmunitarias.

50 La composición farmacéutica que comprende células T reguladoras se administra a un sujeto en necesidad de ello de una manera apropiada a la enfermedad que se va a tratar y/o prevenir. La dosis y frecuencia de administración se determinarán por tales factores como el estado del paciente y el tipo y/o gravedad de la enfermedad del paciente. Las dosis apropiadas también se pueden determinar por ensayos clínicos. Una "cantidad eficaz" de la composición la puede determinar un médico con consideración de las diferencias individuales en edad, peso, gravedad de la enfermedad, estado del paciente, vía de administración y cualquier otro factor relevante para el tratamiento del paciente. En general, una composición farmacéutica que comprende células T reguladoras se puede administrar a una dosis de aproximadamente 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros en estos intervalos. La composición de la invención también se puede administrar múltiples veces a estas dosis. La dosis y pauta de tratamiento óptimas para un paciente particular la puede determinar fácilmente un experto en la materia de medicina siguiendo al paciente para signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

60 Las células se pueden administrar usando técnicas de infusión que se usan comúnmente en inmunoterapia, y se pueden administrar a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, o por inyección intravenosa (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. Med.). Las composiciones de la presente invención preferiblemente se formulan para la administración intravenosa.

65

En ciertas implementaciones, los métodos descritos en el presente documento implican la administración de una terapia anti-autoinmunitaria a un sujeto. Los agentes terapéuticos se pueden formular de una manera convencional usando uno o más soportes o excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, los agentes terapéuticos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables se pueden formular para administración mediante, por ejemplo, inyección (por ejemplo, SubC, IM, IP), inhalación o insuflación (sea a través de la boca o de la nariz) o administración oral, yugal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral o rectal. En ciertas formas de realización, los agentes terapéuticos se pueden administrar localmente, en el sitio donde las células diana están presentes, es decir, de un tejido, órgano o fluido específico (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, masa tumoral, etc.).

Los agentes terapéuticos se pueden formular para una variedad de modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada. Se pueden encontrar en general técnicas y formulaciones en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. Para administración parenteral, la inyección es preferida, incluyendo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para inyección, los compuestos se pueden formular en soluciones líquidas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tal como solución de Hank o solución de Ringer. Además, los compuestos se pueden formular en forma sólida y redisolver o suspender inmediatamente antes del uso. También se incluyen formas liofilizadas. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos se pueden administrar a células por una variedad de métodos que conocen los expertos en la materia incluyendo, pero no restringido a, encapsulación en liposomas, por iontoforesis, o por incorporación en otros vehículos, tal como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tal como agentes aglutinantes (por ejemplo almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, fécula de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tal como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleaginosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral se pueden formular adecuadamente para dar liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración por inhalación (por ejemplo, administración pulmonar), los agentes terapéuticos se pueden administrar convenientemente en forma de una presentación en espray aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelante adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

En los métodos, los compuestos farmacéuticos también se pueden administrar por rutas intranasal o intrabronquial incluyendo insuflación, polvos y formulaciones en aerosol (para ejemplos de inhalantes de esteroides, véase Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacol. 35:1187-1193; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75:107-111). Por ejemplo, se pueden colocar formulaciones en aerosol en propelantes presurizados aceptables, tal como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. También se pueden formular como fármacos para preparaciones no presurizadas tal como en un nebulizador o un atomizador. Típicamente, tal administración es en un tampón farmacológicamente aceptable acuoso.

Los agentes terapéuticos se pueden formular para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar tales formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tal como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes del uso.

Además, los agentes terapéuticos también se pueden formular como una preparación en depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los agentes terapéuticos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite adecuado) o

resinas de intercambio iónico, o como derivados apenas solubles, por ejemplo, como una sal apenas soluble. La fórmula de liberación controlada también incluye parches.

5 En ciertas implementaciones, los compuestos descritos en el presente documento se pueden formular para administración al sistema nervioso central (SNC) (revisado en Begley, *Pharmacology & Therapeutics* 104: 29-45 (2004)). Los enfoques convencionales para la administración de fármacos al SNC incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad por un molécula de superficie de células endotelial en combinación con un agente que es él mismo incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica en un intento de explotar una de las rutas de transporte endógenas de la barrera hematoencefálica; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes solubles en agua a soportes de lípido o colesterol); y la desorganización transitoria de la integridad de la BHE por alteración hiperosmótica (resultante de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

20 En ciertas implementaciones, los agentes terapéuticos se incorporan a una formulación tópica que contiene un soporte tópico que en general es adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier tal material conocido en la técnica. El soporte tópico se puede seleccionar de modo que proporcione la composición en la forma deseada, por ejemplo, como una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, solución, o similar, y puede estar compuesto de un material de origen natural o sintético. Es preferible que el soporte seleccionado no afecte de forma adversa al agente activo u otros componentes de la formulación tópica. Los ejemplos de soportes tópicos adecuados para uso en el presente documento incluyen agua, alcoholes y otros solventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite de vaselina, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras, y similares.

30 Las composiciones farmacéuticas (incluyendo preparaciones cosméticas) pueden comprender desde aproximadamente el 0,00001 al 100% tal como desde el 0,001 al 10% o desde el 0,1% al 5% en peso de uno o más agentes terapéuticos descritos en el presente documento. En ciertas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el intervalo desde aproximadamente el 0,25% en peso al 75% en peso de la formulación, preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente el 0,25% en peso al 30% en peso de la formulación, más preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente el 0,5% en peso al 15% en peso de la formulación, y lo más preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente el 1,0% en peso al 10% en peso de la formulación.

40 Las afecciones del ojo se pueden tratar o prevenir por, por ejemplo, inyección sistémica, tópica, intraocular de agentes terapéuticos o por inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libera los agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos se pueden administrar en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de modo que el compuesto se mantenga en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre las regiones corneal e interna del ojo, como, por ejemplo, la cámara anterior, conjuntiva, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/ciliar, lente, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una pomada, aceite vegetal o un material encapsulante. Alternativamente, los compuestos se pueden inyectar directamente en el humor vítreo y acuoso. En una alternativa adicional, los compuestos se pueden administrar de forma sistémica, tal como por infusión o inyección intravenosa, para el tratamiento del ojo.

Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento se pueden almacenar en un entorno sin oxígeno según métodos en la técnica.

50 Los métodos para administrar compuestos de ácidos nucleicos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Akhtar et al., 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; y *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, 1995; Sullivan et al., Publicación PCT No. WO 94/02595). Estos protocolos se pueden utilizar para la administración de virtualmente cualquier compuesto de ácido nucleico. Los compuestos de ácido nucleico se pueden administrar a células mediante una variedad de métodos conocidos para los expertos en la materia, incluyendo, pero no restringidos a, encapsulación en liposomas, por iontoforesis, o por incorporación en otros vehículos, tal como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas. Alternativamente, la combinación ácido nucleico/vehículo se administra de forma local por inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. Otras rutas de administración incluyen, pero no están limitadas a oral (forma de comprimido o píldora) y/o administración intratecal (Gold, 1997, *Neuroscience*, 76, 1153-1158). Otros enfoques incluyen el uso de varios sistemas de transporte y soporte, por ejemplo, mediante el uso de conjugados y polímeros biodegradables. Para una revisión exhaustiva sobre estrategias de administración de fármacos, véase Ho et al., 1999, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 1, 336-343 y Jain, *Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities*, Decision Resources, 1998 y Groothuis et al., 1997, *J. NeuroVirol.*, 3, 387-400. Se proporcionan descripciones más detalladas de la distribución y administración de ácidos nucleicos en Sullivan et al., anteriormente, Draper et al., documento PCT WO93/23569, Beigelman et al., Publicación PCT No. WO99/05094, y Klimuk et al., Publicación PCT No. WO99/04819.

Se pueden administrar nucleótidos antisentido, tal como ARNip, a células cancerosas usando una variedad de métodos. Se pueden usar péptidos penetradores de células (CPP) que tienen la capacidad de transportar moléculas "carga" unidas al citosol (véase, Juliano, *Ann N Y Acad Sci.* Oct 2006;1082:18-26). En ciertas formas de realización, se usa un sistema de administración de oligonucleótidos mediado por atelocolágeno (Hanai et al. *Ann N Y Acad Sci.* Oct 2006;1082:9-17). Se puede usar una formulación LPD (complejo liposoma-polición-ADN) para administrar ARNip a células tumorales (Li et al. *Ann N Y Acad Sci.* Oct 2006;1082:1-8). También se puede usar el acomplejamiento de ARNip con la polietilenimina (PEI) para administrar ARNip a células (Aigner, *J Biomed Biotechnol.* 2006;2006(4):71659). El ARNip también se puede acomplejar con nanopartículas de poliisohexilcianoacrilato recubiertas con quitosano (PIHCA) para administración *in vivo*. (Pille et al., *Hum Gene Ther.* Oct 2006;17(10):1019).

La presente divulgación se refiere además al uso de cualquier agente identificado por la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno o una afección autoinmunitaria en un paciente, por ejemplo, el uso de un agonista de SAP en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección autoinmunitaria. En algunos aspectos, cualquier agente identificado en la presente divulgación se puede usar para hacer una preparación farmacéutica para el uso en tratar o prevenir una enfermedad o afección autoinmunitaria.

Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la invención anteriormente descrita, así como para exponer las mejores maneras contempladas para llevar a cabo varios aspectos de la invención.

Ejemplificación

Ejemplo 1

La enfermedad de las vías respiratorias alérgica crónica inducida por conidios de *A. fumigatus* se caracteriza por hiperreactividad de vías respiratorias, inflamación pulmonar, eosinofilia, hipersecreción de moco, hiperplasia de células caliciformes y fibrosis subepitelial. Ratones C57BL/6 se sensibilizaron similarmente a una preparación comercialmente disponible de antígenos solubles de *A. fumigatus* como se ha descrito previamente (Hogaboam *et al.* *The American Journal of Pathology.* 2000; 156: 723-732). Siete días después de la tercera exposición intranasal, cada ratón recibió $5,0 \times 10^6$ conidios de *A. fumigatus* suspendidos en 30 μ l de PBS Tween 80 (0,1%, vol/vol) por vía intratraqueal.

En los puntos temporales del día 15 y 30 (Fig. 2A y 2B, respectivamente), se analizaron grupos de cinco ratones tratados con SAP o control (PBS) para cambios en la hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR). La hipersensibilidad bronquial se evaluó después de una exposición intratraqueal con conidios de *A. fumigatus* usando un pletismógrafo Buxco™ (Buxco, Troy, NY). Brevemente, se usó pentobarbital sódico (Butler Co., Columbus, OH; 0,04 mg/g de peso corporal de ratón) para anestesiarse a los ratones antes de su intubación y la respiración se llevó a cabo con un respirador de bomba Harvard (Harvard Apparatus, Reno NV). Una vez se estableció la resistencia basal de las vías respiratorias, se introdujeron 420 mg/kg de metacolina en cada ratón a través de la vena de la cola caudal, y la hipersensibilidad de las vías respiratorias se siguió durante aproximadamente 3 minutos. El aumento pico en la resistencia de las vías respiratorias se registró después. En los puntos temporales de día 15 y 30 (Fig. 2A y 2B, respectivamente), grupos de cinco ratones tratados con SAP o control (PBS) se anestesiaron con pentobarbital sódico y se analizaron para cambios en AHR. SAP redujo significativamente la cantidad de AHR en respuesta a la exposición intravenosa de metacolina.

Ejemplo 2

Se sensibilizaron ratones C57BL/6 de forma similar a una preparación comercialmente disponible de antígenos solubles de *A. fumigatus* como se ha descrito anteriormente. Los animales se trataron *in vivo* con hSAP o PBS control durante las dos últimas semanas del modelo. En los puntos temporales de día 15 y 30 (Fig. 3A y 3B, respectivamente), se analizaron grupos de cinco ratones para cambios en la producción de citoquinas. Se aislaron células de bazo de los animales 15 o 30 después de la exposición a conidios intratraqueal, se estimularon con antígeno de aspergillus, y se trataron *in vitro* con hSAP. Los cultivos de esplenocitos se cuantificaron (pg/ml) para la producción de IL-4, IL-5 e IFN- γ .

Ejemplo 3

Se sensibilizaron ratones C57BL/6 de forma similar a una preparación comercialmente disponible de antígenos solubles de *A. fumigatus* como se ha descrito anteriormente. El día 15, se determinó la cantidad de expresión de FoxP3 en ganglios linfáticos de drenaje pulmonar o cultivos de esplenocitos. Los ganglios linfáticos pulmonares se disecaron de cada ratón y se congelaron rápidamente en N₂ líquido o se fijaron en formalina al 10% para análisis histológico. Se tiñeron muestras histológicas de animales tratados con PBS (control) o SAP para FoxP3 (figura 4A), y se cuantificó el número de células FoxP3+ relativo a cada campo examinado (figura 4B). Se estimularon cultivos

de esplenocitos purificados con antígeno de *Aspergillus in vitro* en presencia o ausencia de SAP *in vitro* (0,1-10 µg/ml) durante 24 horas. La expresión total de FoxP3 se cuantificó usando RT-PCR en tiempo real (Figura 4C).

Ejemplo 4

5 Se examinaron los efectos de SAP *in vivo* e *in vitro* sobre IL-10 y memoria de antígeno. Se sensibilizaron y expusieron ratones con *Aspergillus fumigatus in vivo* y se trataron con control (PBS, i.p., barras abiertas) o SAP (5 mg/kg, ip.p c2d, barras rellenas) los días 15-30 tras exposición a conidios vivos. El día 30, los ratones se sacrificaron. A) Se midió IL-10 pulmonar total por luminex. B-E) Se estimularon cultivos de esplenocitos de células individuales *in vitro* con antígeno de *Aspergillus fumigatus*, en presencia o ausencia de SAP (figura 5). Se evaluaron sobrenadantes sin células para niveles de proteína de B) IL-10, C) IL-4, D) IL-5 y E) IFN-γ por ELISA. Los datos demuestran que los animales tratados con SAP (i.p., c2d, los días 15-30) tenían niveles aumentados de IL-10 en los pulmones en comparación con control de asma (PBS, c2d, los días 15-30) y los niveles eran comparables a esos en pulmón nativo no alérgico (figura 5). Los esplenocitos de ratones tratados con SAP tienen una respuesta de memoria de antígeno Th1 o Th2 reducida e IL-10 aumentada. Como también hay un incremento en la expresión de FoxP3, estos datos indican que SAP induce células T reguladoras en el marco de enfermedad alérgica de las vías respiratorias.

Se debe determinar el ámbito completo de la invención mediante referencia a las reivindicaciones.

Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1 proteína P amiloide sérica humana

HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLITPLEKPLQNFTLCFRAYS DLSRAYSLFSYNTQG
 RDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSSGIAEFWINGT
 PLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQE QDSYGGKFD RSQS FVGEIGDLYMWDSVLP
 25 ENILSAYQGTPLPANILDWQALNYEIRGYVIKPLVWV

SEQ ID NO: 2 proteína P amiloide sérica de *Gallus gallus*

QEDLYRKVFVFPREDPSDAYVLLQVQLERPLLNFVCLRSYTDLTRPHSLFSYATK
 AQDNEILLFKPKPGEYRFYVGGKYVTFRVPENRGWEHVCASWESGSGIAEFWL
 NGRPWP RKGLQKGYE V GNEAVVMLGQE QDAYGGGFDVYNSFTGEMADVHLW
 DAGLSPDKMRSAYLALRLPPAPLAWGRLRYEAKGDVVVKPRLREALGA
 30

SEQ ID NO: 3 proteína P amiloide sérica de *Bos taurus*

QTDLRGKVFVFPRESSTDHVTLITKLEKPLKNLTLCLRAYSDLSRGYSLFSYNIHS
 KDNELLVFKNGIGEYSLYIGKTKVTRATEKFPSPVHICTSWESSTGIAEFWINGK
 PLVKRGLKQGYAVGAHPKIVLGQE QDSYGGGFDKNQSF MGEIGDLYMWDSVLS
 PEEILLVYQSSSISPTILDWQALKYEIKGYVIVKPMVWG

SEQ ID NO: 4 proteína P amiloide sérica de *Cricetulus migratorius*

QTDLTGKVFVFPRESESDYVKLIPRLEKPLENFTLCFRITYTDL SRPHSLFSYNTKN
 KDNELLIYKERMGEYGLYIENVGAIVRGVEEFASPVHFCTSWESSSGIADFWVNG
 IPWVKKGLKKGYTVKTQPSIILGQE QDNYGGGFDKQS FV GEMGDLNMWDSVL
 TP EEIKSVYEGSWLEPNILDWRALNYEMSGYAVIRPRVWH

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido P amiloide sérico (SAP) para uso en tratar o prevenir un trastorno o afección autoinmunitaria en un paciente humano, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 1.
2. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 1, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a SEQ ID NO: 1.
- 10 3. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 1, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 97% idéntica a SEQ ID NO: 1.
- 15 4. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 1, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 1.
- 20 5. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 1, en donde el polipéptido SAP comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 25 6. La proteína SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína SAP aumenta el número de células FoxP3+ en el paciente.
- 30 7. El polipéptido SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el trastorno o afección autoinmunitaria se selecciona de: diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, miocarditis autoinmunitaria, pénfigo, enfermedad celiaca, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, artritis de Lyme crónica, cardiomiopatía dilatada familiar, dermatomiositis juvenil, policondritis, síndrome de Sjogren, psoriasis, artritis idiopática juvenil, enfermedad intestinal inflamatoria, y lupus eritematoso sistémico.
- 35 8. El polipéptido SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el polipéptido SAP es para administración por un modo seleccionado de: por vía tópica, por inyección, por inhalación, por liberación continua por depósito o bomba, o una combinación de los mismos.
- 40 9. El polipéptido SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el polipéptido SAP es para uso conjunto con un agente activo adicional.
- 45 10. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 8, en donde el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir el trastorno o afección autoinmunitaria.
- 50 11. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 9, en donde el agente activo adicional es una citoquina seleccionada de: IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β , IL-15, e IL-17.
- 55 12. Un polipéptido P amiloide sérico (SAP) para uso en tratar o prevenir la enfermedad del injerto contra el huésped en un paciente humano, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 1.
- 60 13. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 12, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a SEQ ID NO: 1.
- 65 14. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 12, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 97% idéntica a SEQ ID NO: 1.
15. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 12, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 1.
16. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 12, en donde el polipéptido SAP comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
17. La proteína SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en donde la proteína SAP aumenta el número de células FoxP3+ en el paciente.
18. El polipéptido SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en donde el paciente ha recibido un trasplante de órgano seleccionado de: trasplante de riñón, trasplante de corazón, trasplante de pulmón, trasplante de hígado, trasplante de páncreas, trasplante de sangre y trasplante de médula ósea.
19. El polipéptido SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en donde el polipéptido SAP es para uso conjunto con un agente activo adicional.

20. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 19, en donde el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir rechazo a injerto.
- 5 21. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 19, en donde el agente activo adicional es una citoquina seleccionada de: IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β , IL-15, e IL-17.

Figura 1

Homo sapiens	HFDLSECKVYVFPKSEVTDHVNLIIPLEKPL
Gallus gallus	QEDLYRKVYVFPREDPSDAYVLIQVQIERPL
Bos taurus	QTDLRCKVYVFPRESSTHNVTLIKLEKPL
C. migratorius	QTDLLTCKVYVFPRESSESDYVKIIPRIEKPL
Homo sapiens	DNFTICFRAYSDDLBRAYSILFSSYNTQGRDNE
Gallus gallus	LNFTVCLRSYTDLTPHSLFSSYATKAQDNE
Bos taurus	KNLFTICLFRAYSDDLBRGYSILFSSYNIHSDKDNE
C. migratorius	ENFTLLCERTYTDLBRPHSLFSSYNTKKNKDNE
Homo sapiens	LLVYKERVGEYSLYICRHKVTSAYIEKFFPA
Gallus gallus	ILLFKPKPGEYRFYVGGKYVTFRVPENRGE
Bos taurus	LLYFKNGIGEYSLYICKTAVTVRATERKFFPS
C. migratorius	LLIYKERMGEYGLYIENVGAIVRGVEEFTAS
Homo sapiens	FVETCVSWESSSTGIAEFWINGTFLVKEGLK
Gallus gallus	WERVCASSWESSGGIAEFWLNIREWPRKQLQ
Bos taurus	FVETCTSWESSSTGIAEFWINGKFLVKRGLK
C. migratorius	FVHFCTSWESSSTGIADFWVNGIFWVKKGLK
Homo sapiens	QCYFVSAQPKIVLGGQEQDNYGGKFDKSSQSF
Gallus gallus	KGYEVGNEAVVMLGGQEQDNYGGKFDKNSF
Bos taurus	GGYAVGAHFKIVLGGQEQDNYGGKFDKNSF
C. migratorius	KGYTVKTOPSIIILGGQEQDNYGGKFDKSSQSF
Homo sapiens	VGEIGDLYMWDSDVLPERNILSAYQGTPLPA
Gallus gallus	TGEMADVHLWDAGLSFDKMRSAYLALRLPP
Bos taurus	MGEIGDLYMWDSDVLSPEEIIILVYGGSSSIS
C. migratorius	VGEMGDLDNMWDSDVLTPEEIKSVYEGSWLEP
Homo sapiens	NILDWQALNYEIRQYVVIKPLVNV
Gallus gallus	APLAWGRLRYEAKSDVVFPRRLREALGA
Bos taurus	PTILDWQALKYEIKGYVIVKPMVWG
C. migratorius	NILDWRALNYEIMSGIAVLRPRVWH

Figura 2A

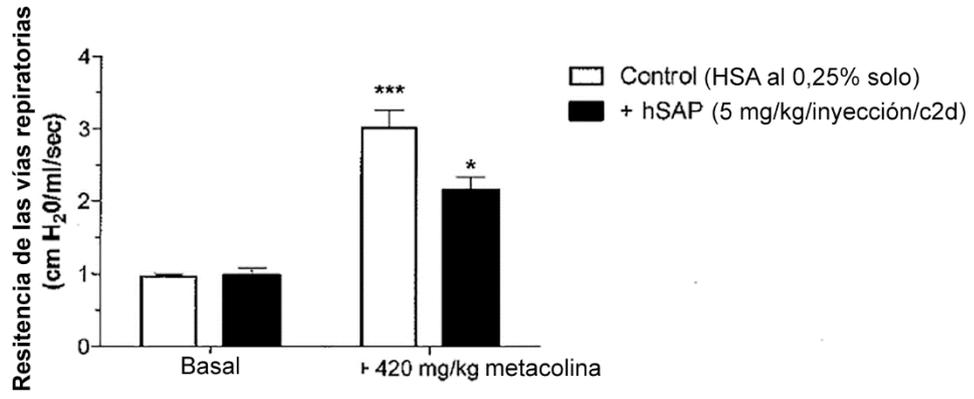


Figura 2B

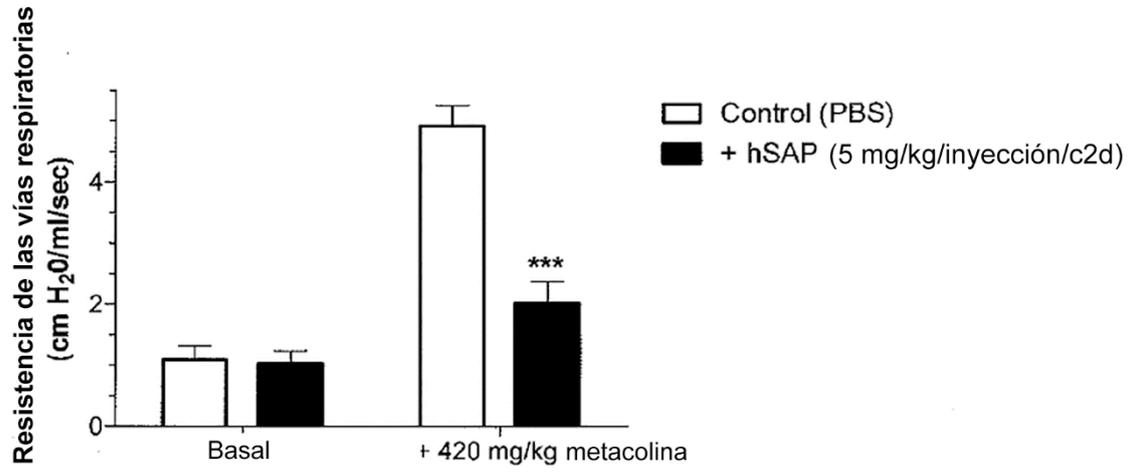


Figura 3A

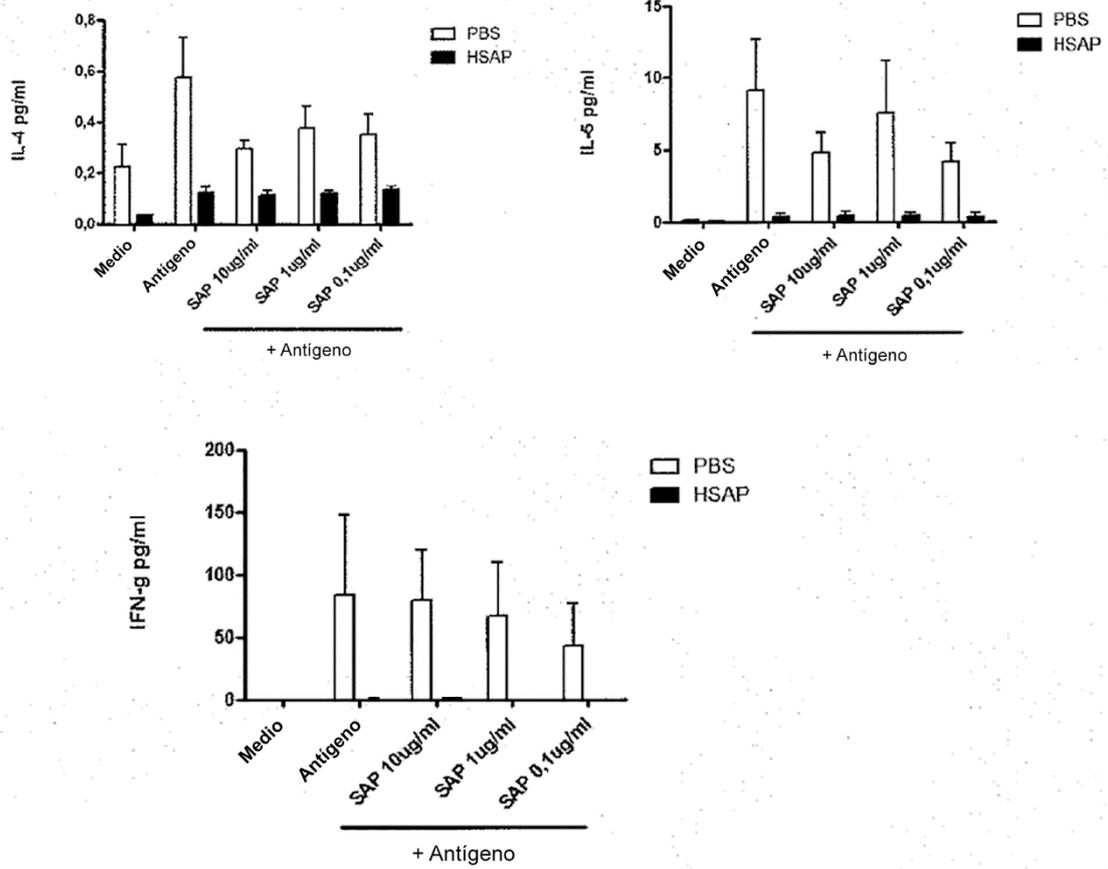


Figura 3B

B.

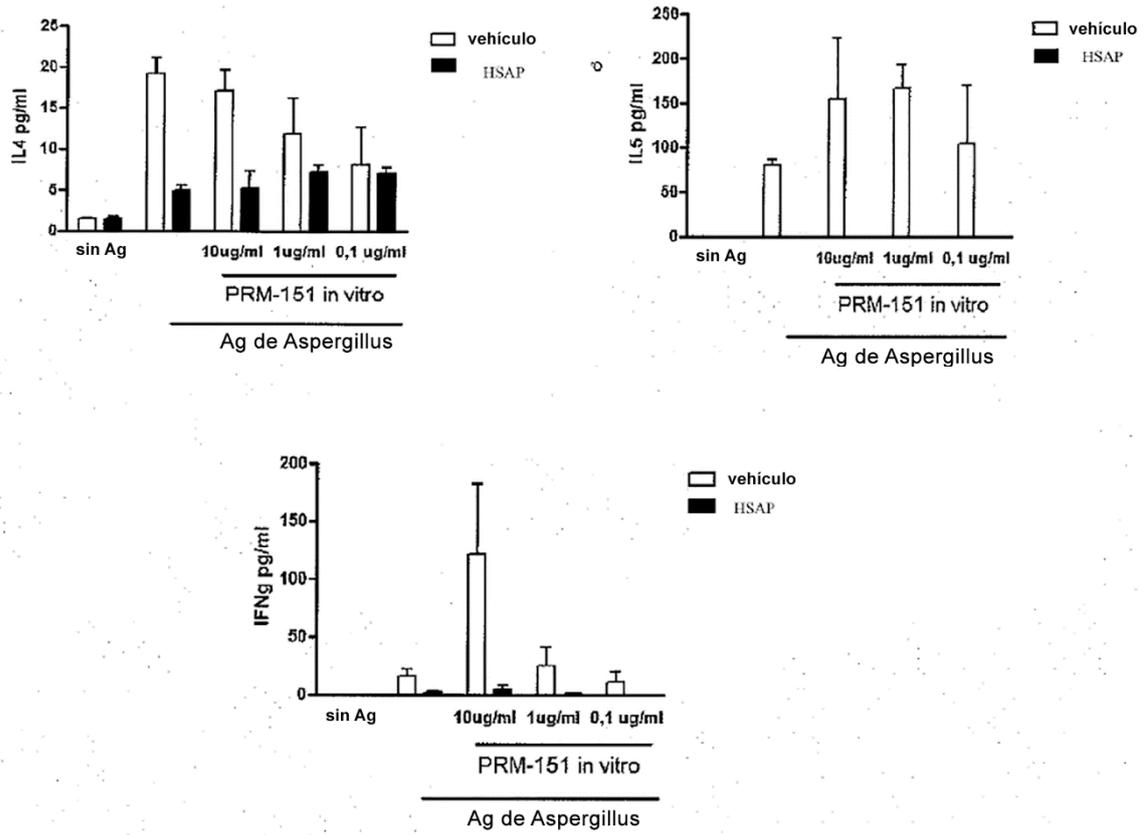


Figura 4

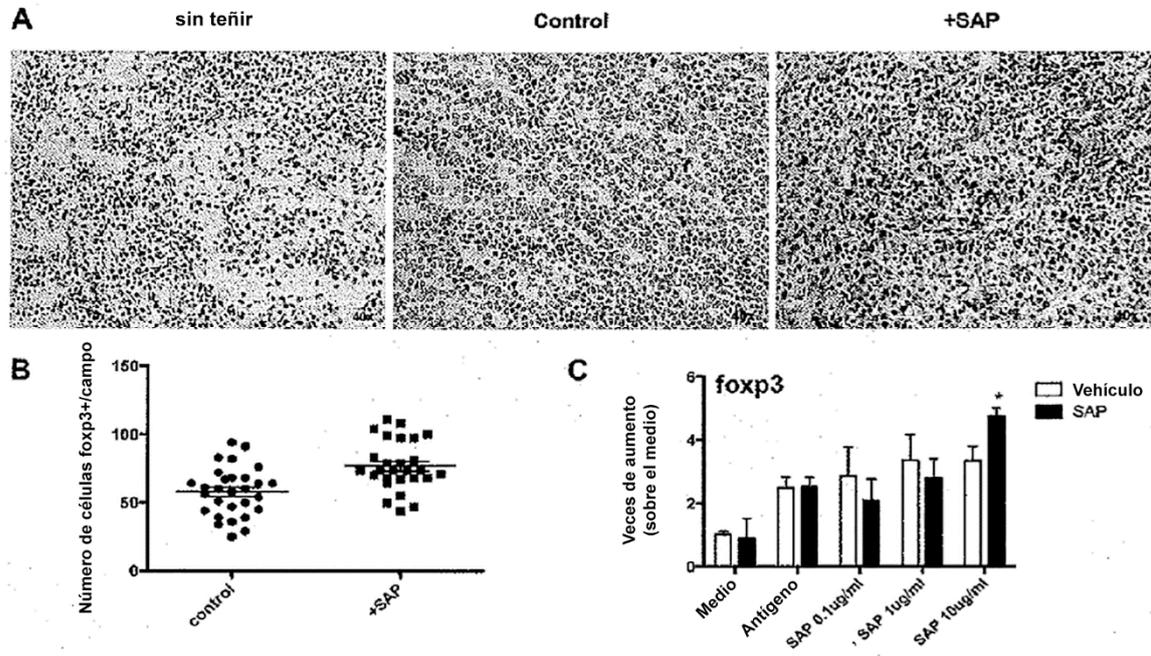


Figura 5

