

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 236**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
A61P 5/50 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2012** **PCT/AU2012/001411**
87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013** **WO13071355**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2012** **E 12850386 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 2750690**

54 Título: **Mediador soluble**

30 Prioridad:

15.11.2011 US 201161560254 P
26.09.2012 US 201261705633 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2019

73 Titular/es:

**THE WALTER AND ELIZA HALL INSTITUTE OF
MEDICAL RESEARCH (100.0%)**
Wehi 1G Royal Parade
Parkville, Melbourne, VIC 3052, AU

72 Inventor/es:

BANDALA SANCHEZ, ESTHER;
DROMEY, JAMES;
HARRISON, LEONARD CHARLES;
ZHANG, YUXIA y
RASHIDI, MARYAM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 703 236 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

Mediador soluble

Campo de la invención

La presente descripción generalmente se refiere a poblaciones celulares y mediadores solubles capaces de suprimir la activación del linfocito T, y al uso de tales poblaciones celulares y mediadores solubles para suprimir la activación del linfocito T, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por la función del linfocito T efector. La descripción también se refiere a métodos de detección de la presencia de un marcador en un sujeto, dicho marcador es indicativo de la susceptibilidad del sujeto a enfermedades o afecciones mediadas por la función del linfocito T efector.

Antecedentes de la invención

Los linfocitos T reguladores (células Treg; también conocidas como linfocitos T supresores) son subpoblaciones de los linfocitos T que conservan la homeostasis inmune y ayudan a evitar la enfermedad autoinmune (Sakaguchi et al., 2008; Shevach, 2006; Vignali et al., 2008). El interés en las células Treg está centrado predominantemente sobre las células Treg CD4⁺CD25⁺ prototípicas que están programadas por el factor de transcripción FoxP3 (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). En las poblaciones poliespecíficas restantes estas células Treg se caracterizan en el ratón tanto como células "adaptativas" inducidas como derivadas de timo, "naturales" que suprimen la activación, proliferación y funciones de otros linfocitos T (Sakaguchi et al., 2008; Shevach, 2006). Sin embargo, en sangre humana las células Treg CD4⁺ no se distinguen fácilmente por la expresión de FoxP3 (Roncarolo and Gregori, 2008; Allan et al., 2007; Gavin et al., 2006). Por tanto, se mostró que los linfocitos T CD4⁺ con marcadores de o bien células no tratadas o de memoria tienen funciones supresoras similares a pesar de la baja y alta expresión, respectivamente, de FoxP3 (Miyara et al., 2009). Otros marcadores de superficie de células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ tales como la expresión disminuida del receptor de IL-7, CD127 (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006), no son específicos a las células Treg.

A parte de la escasez de marcadores de superficie celulares específicos, los mecanismos subyacentes a la expresión por células las Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ siguen siendo controvertidos. En el ratón, se ha mostrado que la supresión *ex vivo* requiere del contacto célula-célula pero ha sido atribuido a mecanismos múltiples (Vignali et al., 2008; Shevach, 2009; Sakaguchi et al., 2009); incluso se conoce menos sobre la función de las células Treg humanas similares. Además, otros tipos de tanto células Treg CD4⁺ como CD8⁺ que difieren en los mecanismos propuestos de la función supresora se han descrito en el contexto de diversos sitios de tejido o enfermedades (Vignali et al., 2008).

Se ha mostrado que las células Treg inducidas por la administración de autoantígenos protegen frente a algunas enfermedades autoinmunes en ciertos modelos animales (revisado por von Herrath and Harrison, 2003). Por ejemplo, en el modelo de ratón diabético no obeso (NOD, del inglés "Nonobese Diabetic") de diabetes tipo 1 (DT1) se ha mostrado que células Treg CD4⁺ inducidas por autoantígenos de islote pancreático administrados tales como insulina (Bergerot et al., 1994) o ácido glutámico descarboxilasa 65 (GAD65, del inglés "Glutamic Acid Decarboxylase") (Tisch et al., 1999), o transferencia de linfocitos Treg CD4⁺ inducidos por proinsulina (Every et al., 2006) o un antígeno de islote pancreático putativo (Tang et al., 2004), protegen frente a diabetes autoinmune. Sin embargo, en estos modelos las células Treg se han estudiado en poblaciones poliespecíficas en reposo y no durante la respuesta del hospedador a un antígeno particular. Recientemente, se generaron clones de linfocito T CD4⁺ humanos específicos a proinsulina y GAD65 y los clones Treg se distinguieron por su función supresora *in vitro* (Dromey et al., 2011). Se mostró que la glucoproteína CD52 anclada a membrana de superficie celular está regulada al alza en estos clones de Treg CD4⁺ expandidos. Sin embargo, previamente no se ha caracterizado el mecanismo de la inmunosupresión.

Compendio de la invención

Los presentes inventores han identificado un mediador soluble de la supresión de célula Treg. Por consiguiente, la presente descripción proporciona uno cualquiera o más de:

- i) glucoproteína CD52 soluble,
- ii) una proteína de fusión que comprende la glucoproteína CD52 soluble como una primera proteína, y una segunda proteína;
- iii) un polinucleótido que codifica la porción de péptido de la glucoproteína CD52 soluble de la parte i) o la proteína de fusión de la parte ii);
- iv) un vector que comprende el polinucleótido de la parte iii);
- v) una célula aislada que comprende el polinucleótido de la parte iii) o el vector de la parte iv); para su uso en terapia.

En una realización preferida, la glucoproteína CD52 soluble comprende una secuencia de aminoácidos al menos 60 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de GQNDTSQTSSPS (SEQ ID NO: 3),

SQNATSQSSPS (SEQ ID NO: 4) GQATTAASGTNKNSTSTKKTPLKS (SEQ ID NO: 5), GQNSTAVTTPANKAATTAATAATTKAAATTATKTTTAVRKTPGKPPKA (SEQ ID NO: 6) o GNSTTPRMTTKKVKSATPA (SEQ ID NO: 7) y un carbohidrato. Más preferiblemente, la glucoproteína comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % idéntica, o es 100 % idéntica, a una cualquiera o más de la secuencias de aminoácidos identificadas en las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 o 7.

En un ejemplo, la glucoproteína comprende una secuencia de aminoácidos al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % idéntica, o es 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, que representa el fragmento de CD52 soluble humano.

Preferiblemente, uno cualquiera o más de la glucoproteína CD52 soluble, la proteína de fusión, el polinucleótido y el vector, está presente en una cantidad suficiente para suprimir la función del linfocito T efector y/o una respuesta inmune.

En una realización adicional, la glucoproteína CD52 soluble, proteína de fusión, polinucleótido y vector, está presente en una cantidad suficiente de modo que la supresión de la respuesta inmune da como resultado la tolerancia a al menos un antígeno tal como el autoantígeno.

En otra realización, una cualquiera o más de la glucoproteína CD52 soluble y la proteína de fusión, es capaz de suprimir la función del linfocito T efector y/o es capaz de reducir una respuesta inmune tal como una respuesta inmune a un autoantígeno.

En una realización, la composición comprende una o más de la glucoproteína CD52 soluble o la proteína de fusión, y está formulada para administración mucosa y/o transdérmica.

En una realización adicional, la composición además comprende insulina y/o un autoantígeno.

La presente descripción también proporciona una proteína de fusión que comprende glucoproteína CD52 soluble como una primera proteína, y una segunda proteína.

Preferiblemente, la glucoproteína CD52 soluble de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % idéntica, o es 100 % idéntica, a una cualquiera o más de la secuencias de aminoácidos identificadas en las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 o 7.

Preferiblemente, la proteína de fusión es capaz de suprimir la función del linfocito T efector y/o es capaz de reducir una respuesta inmune tal como una respuesta inmune a un autoantígeno. En una realización, la proteína de fusión reduce la respuesta inmune a un límite que da como resultado la tolerancia a al menos un antígeno tal como un autoantígeno.

La segunda proteína puede ser cualquier proteína capaz de incrementar la estabilidad y/o solubilidad de la glucoproteína CD52 soluble, aumentar el proceso de producción de la glucoproteína CD52 soluble por métodos recombinantes, o aumentar el efecto terapéutico de la glucoproteína CD52 soluble. En un ejemplo, la segunda proteína puede comprender un fragmento de anticuerpo, tal como un Fc.

Preferiblemente, la proteína de fusión es soluble.

La presente descripción también proporciona un polinucleótido aislado o recombinante que codifica la proteína de fusión descrita en la presente memoria.

La presente descripción también proporciona un vector que comprende el polinucleótido descrito en la presente memoria.

La presente descripción también proporciona una célula aislada que comprende el polinucleótido y/o el vector descrito en la presente memoria. La célula puede ser una célula mamífera. En un ejemplo, la célula es como la célula HEK293T. En otro ejemplo, la célula es un linfoblasto B Daudi.

Además, la presente descripción proporciona un método de producción de la proteína de fusión, que comprende expresar el polinucleótido o vector descrito en la presente memoria bajo condiciones que permiten la glucosilación.

En una realización, las condiciones que permiten la glucosilación comprenden expresar la proteína de fusión en una célula hospedadora, tal como una célula mamífera.

La presente descripción también proporciona el uso de uno cualquiera o más de:

- i) glucoproteína CD52 soluble,

- ii) una proteína de fusión que comprende la glucoproteína CD52 soluble como una primera proteína, y una segunda proteína;
- iii) un polinucleótido que codifica la porción de péptido de la glucoproteína CD52 soluble de la parte i) o la proteína de fusión de la parte ii);
- iv) un vector que comprende el polinucleótido de la parte iii);
- v) una célula aislada que comprende el polinucleótido de la parte iii) o el vector de la parte iv);
- vi) una célula CD52^{hi} aislada capaz de producir la glucoproteína CD52 soluble;
- vii) una población celular aislada que comprende una pluralidad de células CD52^{hi} capaces de producir la glucoproteína CD52 soluble;
- viii) el medio de cultivo celular, o una fracción del mismo que comprende la glucoproteína CD52 soluble, aislado de un cultivo celular que comprende la célula de la parte vi) o la población celular de la parte vii);
- ix) un agente capaz de incrementar el nivel de expresión de la glucoproteína CD52 soluble por una célula; y
- x) la composición farmacéutica de la invención,

para suprimir la función del linfocito T efector y/o reducir una respuesta inmune, tal como una respuesta inmune a un autoantígeno.

La presente descripción también proporciona un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis, en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno cualquiera o más de:

- i) glucoproteína CD52 soluble,
- ii) una proteína de fusión que comprende la glucoproteína CD52 soluble como una primera proteína, y una segunda proteína;
- iii) un polinucleótido que codifica la porción de péptido de la glucoproteína CD52 soluble de la parte i) o la proteína de fusión de la parte ii);
- iv) un vector que comprende el polinucleótido de la parte iii);
- v) una célula aislada que comprende el polinucleótido de la parte iii) o el vector de la parte iv);
- vi) una célula CD52^{hi} aislada capaz de producir la glucoproteína CD52 soluble;
- vii) una población celular aislada que comprende una pluralidad de células CD52^{hi} capaces de producir la glucoproteína CD52 soluble;
- viii) el medio de cultivo celular, o una fracción del mismo que comprende la glucoproteína CD52 soluble, aislado de un cultivo celular que comprende la célula de la parte vi) o la población celular de la parte vii);
- ix) un agente capaz de incrementar el nivel de expresión de la glucoproteína CD52 soluble por una célula; y
- x) la composición farmacéutica de la invención,

al sujeto.

En una realización, la glucoproteína CD52 soluble o proteína de fusión, se administra a un sitio mucoso o transdérmico.

La presente descripción también proporciona uno cualquiera o más de:

- i) glucoproteína CD52 soluble,
- ii) una proteína de fusión que comprende la glucoproteína CD52 soluble como una primera proteína, y una segunda proteína;
- iii) un polinucleótido que codifica la porción de péptido de la glucoproteína CD52 soluble de la parte i) o la proteína de fusión de la parte ii);
- iv) un vector que comprende el polinucleótido de la parte iii);
- v) una célula aislada que comprende el polinucleótido de la parte iii) o el vector de la parte iv);
- vi) una célula CD52^{hi} aislada capaz de producir la glucoproteína CD52 soluble;
- vii) una población celular aislada que comprende una pluralidad de células CD52^{hi} capaces de producir la glucoproteína CD52 soluble;
- viii) el medio de cultivo celular, o una fracción del mismo que comprende la glucoproteína CD52 soluble, aislado de un cultivo celular que comprende la célula de la parte vi) o la población celular de la parte vii);
- ix) un agente capaz de incrementar el nivel de expresión de la glucoproteína CD52 soluble por una célula; y
- x) la composición farmacéutica de la invención,

para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis.

Además, la presente descripción proporciona el uso de uno cualquiera o más de:

- i) glucoproteína CD52 soluble,
- ii) una proteína de fusión que comprende la glucoproteína CD52 soluble como una primera proteína, y una segunda proteína;
- iii) un polinucleótido que codifica la porción de péptido de la glucoproteína CD52 soluble de la parte i) o la proteína de fusión de la parte ii);

- iv) un vector que comprende el polinucleótido de la parte iii);
- v) una célula aislada que comprende el polinucleótido de la parte iii) o el vector de la parte iv);
- vi) una célula CD52^{hi} aislada capaz de producir la glucoproteína CD52 soluble;
- vii) una población celular aislada que comprende una pluralidad de células CD52^{hi} capaces de producir la glucoproteína CD52 soluble;
- viii) el medio de cultivo celular, o una fracción del mismo que comprende la glucoproteína CD52 soluble, aislado de un cultivo celular que comprende la célula de la parte vi) o la población celular de la parte vii);
- ix) un agente capaz de incrementar el nivel de expresión de la glucoproteína CD52 soluble por una célula; y
- x) la composición farmacéutica de la invención,

10 en la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis.

En una realización, el medicamento se formula para la administración a un sitio mucoso o transdérmico.

15 En un ejemplo, la enfermedad mediada por la función del linfocito T efector es una enfermedad autoinmune, tal como la diabetes tipo I o la artritis reumatoide. En otro ejemplo, la condición mediada por la función del linfocito T efector es un rechazo a aloinjerto o una reacción injerto-contra-huésped.

La presente descripción también proporciona un método de diagnóstico de la susceptibilidad de un sujeto a desarrollar una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis, comprendiendo el método:

20 detectar el nivel de glucoproteína CD52 soluble en una muestra tomada del sujeto; y
comparar el nivel de glucoproteína CD52 soluble detectado en la muestra tomada del sujeto con un nivel de referencia determinado a partir de uno o más sujetos sanos,
en donde un nivel inferior de glucoproteína CD52 soluble detectado en la muestra tomada del sujeto en comparación con el nivel de referencia indica que el sujeto tiene una susceptibilidad incrementada a desarrollar una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis.

25 La presente descripción también proporciona un método de diagnóstico de la susceptibilidad de un sujeto a desarrollar una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis, comprendiendo el método:

30 detectar la frecuencia de células CD52^{hi} en una muestra tomada de un sujeto; y
comparar la frecuencia de células CD52^{hi} detectada en la muestra tomada del sujeto con un nivel de referencia determinado a partir de uno o más sujetos sanos,
en donde una frecuencia inferior de células CD52^{hi} detectada en la muestra tomada del sujeto en comparación con el nivel de referencia indica que el sujeto tiene una susceptibilidad incrementada a desarrollar una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis.

35 La presente descripción también proporciona un método de diagnóstico de la susceptibilidad de un sujeto a desarrollar una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis, comprendiendo el método:

40 detectar la actividad de células CD52^{hi} en una muestra tomada de un sujeto; y
comparar la actividad de células CD52^{hi} detectada en la muestra tomada del sujeto con un nivel de referencia determinado a partir de uno o más sujetos sanos,
en donde una actividad reducida de células CD52^{hi} detectada en la muestra tomada del sujeto en comparación con el nivel de referencia indica que el sujeto tiene una susceptibilidad incrementada a desarrollar una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis.

45 En un ejemplo, la frecuencia de células CD52^{hi} se determina detectando el nivel de CD52 unido a membrana en la muestra, detectando el nivel de expresión de la proteína CD52 en la muestra, y/o detectando el nivel de expresión del ARNm de CD52 en la muestra.

En una realización, la muestra se toma de un sujeto al cual se ha administrado un antígeno.

En otra realización, la muestra se toma de un sitio de enfermedad local en el sujeto.

50 La presente descripción también proporciona un método de determinación de la idoneidad de un sujeto para entrar en un ensayo de cribado de fármaco, que comprende realizar el método de la invención e identificar el sujeto como más adecuado para entrar en un ensayo de cribado de fármaco si el sujeto tiene un nivel inferior de glucoproteína CD52 soluble, una frecuencia inferior de células CD52^{hi}, o una actividad reducida de células CD52^{hi} que la muestra de referencia. Por ejemplo, el ensayo de cribado de fármaco es un ensayo de cribado de fármaco antidiabético.

Además, la presente descripción también proporciona un método de identificación de un agente capaz de imitar la supresión de linfocito T efector, y/o la supresión de la respuesta inmune, la función de una glucoproteína CD52

soluble, comprendiendo el método determinar si un agente de ensayo suprime la función del linfocito T efector y/o una respuesta inmune.

La presente descripción también proporciona un método de identificación de un agente terapéutico potencial para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis, comprendiendo el método poner en contacto un agente de ensayo con una célula CD52^{hi} o población de célula CD52^{hi}, y detectar uno cualquiera o más del nivel de glucoproteína CD52 soluble producido por la célula o población celular, la frecuencia de células CD52^{hi} y/o la actividad de células CD52^{hi}, e identificar el agente de ensayo como un agente terapéutico potencial para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis, si el nivel de glucoproteína CD52 soluble, la frecuencia de células CD52^{hi} y/o la actividad de células CD52^{hi} se incrementa después del contacto con el agente de ensayo.

Las características de cualquier realización descrita en la presente memoria se tomarán para aplicar cambiando lo que se deba cambiar a cualquier otra realización a menos que se indique específicamente lo contrario.

La presente descripción no es para estar limitada en el alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, las cuales están destinadas al fin de solamente ejemplificación. Productos funcionalmente equivalentes, composiciones y métodos están claramente dentro del alcance de la invención, como se describe en la presente memoria.

A lo largo de esta memoria, a menos que se indique específicamente lo contrario o el contexto requiera lo contrario, la referencia a una etapa única, composición de la materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de la materia se tomarán que abarcan una y una pluralidad (es decir, una o más) de aquellas etapas, composiciones de la materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de la materia.

La invención más adelante en la presente memoria se describe por medio de los siguientes Ejemplos no limitantes y en referencia a las figuras acompañantes.

Breve descripción de los dibujos acompañantes

Figura 1: *Los clones de linfocito T supresor CD4⁺ específicos a GAD65 manifiestan mayor expresión de CD52.*

(A) Proliferación de un clon de linfocito T específico a GAD65 en presencia de un clon supresor autólogo. El GAD65 usado era ácido glutámico descarboxilasa 65 recombinante humano. Un número fijado (25.000) de células clon no Treg específicas a GAD65 (3.19) se cocultivaron con números crecientes de un clon de Treg específico a GAD65 autólogo (1.4) en presencia o ausencia de GAD65 y PBMC irradiadas (100.000) como células que presentan antígeno. Se midió la absorción de ³H-timidina después de 72 h. Los resultados (media±eem de triplicados) son representativos de pares de clon supresor y no supresor autólogos múltiples como se describió previamente (Dromey et al., 2011). (B) Los clones supresores específicos a GAD65 activados tienen mayor expresión de CD52. Los histogramas de citometría de flujo de la expresión de CD52 por clones supresores (línea continua) y no supresores (línea discontinua) específicos a GAD65 autólogos después de estimulación durante la noche por anticuerpo anti-CD3 unido a placa. La tinción por anticuerpo de control de isotipo se muestra en gris. El resultado es representativo de 3 pares de clones de 3 individuos.

Figura 2: *La alta expresión de CD52 es un marcador de linfocitos T CD4⁺ sanguíneos activados por antígeno con función supresora*

(A) Proliferación de linfocitos T CD4⁺ clasificados por FACS, estimulados por el toxoide tetánico (TT), reactivados con TT en presencia de células CD4⁺ CD52^{hi} o CD52^{lo} clasificadas y activadas por GAD65. Las células CD4⁺ activadas se generaron incubando PBMC marcadas con CFSE con o bien GAD65 o TT durante 7 días (A1). A continuación, se aislaron por FACS linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} y CD4⁺ CD52^{lo} activados por GAD65 y linfocitos T CD4⁺ activados por TT. En presencia de GAD65, la proliferación de células reactivadas por TT es suprimida por las células CD4⁺ CD52^{hi} activadas por GAD65. Se midió la absorción de ³H-timidina durante las últimas 16 h de un cultivo de 3 días (A2). Los resultados (media±eem de triplicados) son representativos de experimentos independientes sobre células de 5 individuos.

(B) Secreción de IFN-γ por linfocitos T CD4⁺ clasificados y activados por GAD65 en ausencia o presencia de GAD65. Se incubaron PBMC marcadas con CFSE con GAD65 durante 7 días y se clasificaron en linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo}. Las células clasificadas (5.000) se incubaron en placas de ELISpot con PBMC irradiadas (20.000). Los resultados (media±eem de triplicados) son representativos de experimentos independientes múltiples sobre células de 5 individuos

(C) Secreción de IFN-γ por linfocitos T CD4⁺ clasificados y activados por TT en ausencia o presencia de TT ± IL-2 (10 U/ml). Como en (B), excepto que las poblaciones de CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo} se clasificaron a partir de PBMC marcadas con CFSE activadas por TT. Los resultados son la media±eem de triplicados.

(D) Proliferación de PBMC inicialmente sometidas a agotamiento por FACS de o bien linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} o CD52^{lo} antes de la marcación con CFSE y la incubación en ausencia o presencia de GAD65 durante 7 días. Los resultados son representativos de dos experimentos.

Figura 3: *Los linfocitos T CD4⁺CD52^{hi} no están derivados de los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ en reposo.*

- 5 La secreción de IFN- γ por linfocitos T CD4⁺ clasificados y activados por TT en ausencia (barras en blanco) o presencia (barras rellenas) de TT, después del agotamiento inicial de las células CD25^{hi} de PBMC.

Figura 4: *Los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} activados por antígeno no se distinguen por marcadores de células Treg CD4⁺CD25⁺ convencionales.*

- 10 La expresión por citometría de flujo de (A) CD25, (B) FoxP3, (C) CTLA-4 superficial y (D) intracelular, (E) GITR, (F) CD127, (G) CD24 y (H) CD59 sobre linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} (línea negra) y CD52^{lo} (línea gris) divididos, seguido de incubación de PBMC con TT durante 7 días. La tinción por anticuerpo de control de isotipo se muestra como relleno gris. Los resultados son representativos de 5 individuos.

Figura 5: *La expresión del gen de CD52 es mayor en linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} en relación con linfocitos T CD4⁺ CD52^{lo}.*

- 15 La expresión de genes en linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} en relación con CD52^{lo}. Se realizó RT-PCR cuantitativa en muestras de ARN por triplicado extraídas de linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo} marcados con CFSE clasificados de tres individuos, 7 días después de la activación por GAD65. Los resultados se expresan como la media+ rango intercuartil.

Figura 6: *La expresión de CD24 no define los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} con la función supresora.*

- 20 La secreción de IFN- γ por linfocitos T CD4⁺ CD52^{lo} clasificados y activados por TT estimulados de nuevo con TT en presencia de subpoblaciones de CD52 y CD24 clasificadas y estimuladas por TT. Los resultados son la media $\pm$ em de triplicados.

Figura 7: *El contacto célula-célula no es requerido para la supresión por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi}.*

Figura 8: *La liberación de CD52 soluble justifica la supresión por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi}.*

- 25 (A) Inmunotransferencia de medios acondicionados por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} o CD52^{lo} activados por GAD65 a continuación reactivados por GAD65. Las PBMC marcadas con CFSE se incubaron con GAD65 durante 7 días y se clasificaron en linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo}. Las células clasificadas se reactivaron con GAD65 y medios recogidos después de 24 h. Los medios se concentraron 10 veces, se fraccionaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membrana de PDVF y se sometieron a transferencia con un anticuerpo policlonal de conejo para CD52. El peso molecular aproximado de la CD52 soluble nativa está indicado.

- 30 (B) Inmunotransferencia de medios acondicionados por PBMC activadas por TT +/- el inhibidor de fosfolipasa C U73122. Las PBMC marcadas con CFSE se incubaron con TT y los medios recogidos después de 1 hora se procesaron como en (A).

- 35 (C) Efecto del inhibidor de la fosfolipasa C sobre la supresión por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} activados por TT. Las PBMC marcadas con CFSE se incubaron con TT durante 7 días y se clasificaron en linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo}, los cuales, a continuación, se incubaron juntos (5.000 de cada uno) en placas de ELISpot con PBMC irradiadas (20.000) y TT $\pm$ el inhibidor de la fosfolipasa C U73122. Los resultados son la media $\pm$ em de triplicados. No hay efecto de U73122 en ausencia de TT.

- 40 (D) Efecto del anticuerpo al resto de carbohidrato de CD52 sobre la supresión por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} activados por TT. Los procedimientos eran como en (C) excepto que las células en el ensayo ELISpot se incubaron con o sin TT y o bien 10 μ g/ml de anti-CD52 (CF1D12) o anticuerpo monoclonal (IgG3) de control de isotipo. Los resultados (media $\pm$ em) son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 9: *La CD52 soluble producido a partir de células Daudi suprime directamente la proliferación de linfocito T y la función efectora.*

- 45 (A) Inmunotransferencia de medios acondicionados por líneas celulares. Los medios se concentraron 10 veces, se fraccionaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PDVF y se sometieron a transferencia con un anticuerpo policlonal de conejo para CD52

- 50 (B) Supresión de la proliferación de linfocito T por medio acondicionado por célula Daudi. Se cultivaron PBMC (200.000 células) durante 7 días en IMDM que contenían medio acondicionado por célula Daudi al 20 % con TT y o bien anticuerpo anti-CD52 (CF1D12) o de control de isotipo (10 μ g/ml). Para agotar la CD52 soluble, el medio Daudi se incubó durante la noche con anticuerpo policlonal anti-CD52 de conejo (1 μ g/ml de medio) seguido de

precipitación con proteína G-Sefarosa durante 1 hora a 4 °C. Los resultados (media±eem) son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 10: *Construcciones de ADN para la expresión en el vector de lentivirus.*

SigP=péptido señal; ECD=dominio extracelular; Strep2=etiqueta de purificación que codifica 8 aminoácidos que se une a Strep-Tactin, una estreptavidina específicamente modificada por ingeniería.

Figura 11: *La proteína de fusión a CD52 soluble suprime directamente la proliferación del linfocito T y la función efectora.*

La supresión de la proliferación del linfocito T por CD52-Fc recombinante. Se cultivaron PBMC (200.000) con TT durante 7 días (A) y se purificaron los linfocitos T CD4⁺ (200.000) con anticuerpo anti-CD3 (100 ng/ml) y anti-CD28 (200 ng/ml) durante 48 horas (B), con 4 veces el número de PBMC irradiadas en pocillos de fondo redondo de 200 µl, en presencia de proteína control de proteína Fc o CD52-Fc a las concentraciones indicadas. La absorción de ³H-timidina se midió durante las 16 horas finales de incubación. Los resultados (media±eem de triplicados) son representativos de seis experimentos independientes.

(C) Supresión de la secreción de citoquina por CD52-Fc recombinante. Los medios de PBMC activadas con TT en (C) ± 3,3 µM de proteínas CD52-Fc o Fc se muestrearon después de 48 h de incubación y se ensayaron para las citoquinas por matriz de microesferas múltiples.

(D) La supresión afectada por CD52-Fc después de la escisión del carbohidrato ligado a N. Se incubó CD52-Fc (20 µg) con o sin PNGasa F (1.000 unidades) en 20 µl de PBS durante 1 h a 37 °C, y la reacción se terminó por calentamiento a 75 °C durante 10 min. Las PBMC incubadas con TT y CD52-Fc tratada o no tratada (2,5 µM final) durante 7 días a 37 °C, y, a continuación, se midió la absorción de ³H-timidina como en (C). El panel superior muestra la determinación por SDS-PAGE y la tinción con Coomassie del descenso en tamaño de CD52-Fc después de tratamiento con PNGasa F.

Figura 12: *El carbohidrato de CD52 que se une a Siglec-10 es requerido para la función efectora de CD52 soluble.*

(A) Supresión de la activación del linfocito T por CD52-Fc ± tratamiento con neuraminidasa. Se incubó CD52-Fc (3,3 µM) con neuraminidasa (1 unidad) o tampón portador solamente en 20 µl durante 30 min a 37 °C. A continuación, se incubó PBMC con TT ± CD52-Fc tratada o no tratada con neuraminidasa (0,33 µM final) en una placa de 48 pocillos durante 1 hora a 37 °C antes de que las células no adherentes se transfirieran a una placa de ELISpot y se desarrollaron después de 24 h a 37 °C manchas de IFN-γ.

(B) Expresión de Siglec-10 sobre linfocitos T humanos después de la activación del linfocito T. Histogramas de citometría de flujo de la expresión de Siglec-10 sobre linfocitos T CD4⁺ después de la incubación de PBMC con TT o anticuerpo anti-CD3 soluble durante 4 días.

(C) Supresión de la función del linfocito T por CD52-Fc cuando se incubaba conjuntamente con anticuerpo anti-Siglec-10. Las PBMC se incubaron en una placa de ELISpot con TT y CD52-Fc (3,4 µM) y diferentes concentraciones de anticuerpo de cabra purificado por afinidad para el dominio extracelular de Siglec-10, o Fc (0,34 µM) ± anticuerpo antes de que las células no adherentes se transfirieran a una placa de ELISpot durante 24 h para el desarrollo de manchas de IFN-γ.

(D) Supresión de la función de linfocito T por CD52-Fc cuando se incubaba conjuntamente con Siglec-10-Fc recombinante soluble. Las PBMC se incubaron en una placa de 48 pocillos con TT y CD52-Fc (3,4 µM) y diferentes concentraciones de Siglec-10-Fc recombinante antes que las células adherentes se transfirieran a una placa de ELISpot durante 24 h para el desarrollo de manchas de IFN-γ.

(E) Bloqueo de Siglec-10 pero no otros Siglecs reduce la supresión del linfocito T por CD52-Fc. Los linfocitos T CD4⁺ (20.000) se incubaron en pocillos de placa de ELISpot por triplicado a 37 °C con TT, junto con CD52-Fc o FC (3,4 µM cada uno) y anticuerpos Siglec antihumanos (10 µg/ml cada uno) o Siglec 2-Fc humana recombinante (20 µg/ml), como se indica. Después de 20 h, los pocillos se lavaron y desarrollaron manchas de IFN-γ.

Figura 13: *CD52-Fc no afecta a la capacidad simuladora del linfocito T de células dendríticas sanguíneas purificadas.*

DC CD1b/c⁺ de sangre humana clasificadas por FACS se incubaron previamente con proteína CD52-Fc o Fc, se lavaron dos veces y se cocultivaron con linfocitos T CD4⁺ marcados con CFSE durante 6 días. Se determinó la frecuencia de división de linfocitos T CD4⁺ identificados como CFSE^{lo} por citometría de flujo. El resultado es representativo de dos experimentos independientes con diferentes donantes. Se obtuvieron resultados similares para DC plasmocitoide CD304⁺ y para monocitos CD14⁺ (datos no mostrados).

Figura 14: *Trasferir esplenocitos pobres en CD52^{hi} induce rápida aparición de diabetes en ratones NOD.SCID.*

Los esplenocitos totales de ratones NOD de tipo silvestre pobres en o simulados pobres en células CD52^{hi} se inyectaron intravenosamente en (A) ratones RIP.B7/NOD.SCID de 8 semanas de vida (2×10^6 células) y (B) ratones NOD machos de 8 semanas de vida irradiados (750 rad) ($1,2 \times 10^7$ células). Se hizo un seguimiento de los ratones midiendo la glucosa en orina dos veces por semana usando Diastix (Bayer) y se confirmó la diabetes por una medición de glucosa en sangre >14 mM en días consecutivos. Los resultados muestran porcentaje de supervivencia con el tiempo después de transferir las respectivas poblaciones celulares.

Figura 15: *Los linfocitos T CD3⁺ pobres en CD52^{hi} aceleran la aparición de la diabetes en ratones NOD irradiados.*

Se inyectaron ratones NOD macho de 8 semanas de vida irradiados (750 rad) con $1,2 \times 10^7$ esplenocitos o esplenocitos pobres en CD3⁺CD52^{hi} derivados de ratones NOD hembras no diabéticos de 10 semanas de vida. Se hizo un seguimiento de los ratones midiendo la glucosa en orina dos veces por semana usando Diastix (Bayer) y se confirmó la diabetes por una medición de la glucosa en sangre >14 mM en días consecutivos. Los resultados muestran (A) el porcentaje de supervivencia con el tiempo después de transferir las respectivas poblaciones celulares y (B) puntuación de insulinitis (n=4/grupo) después de 4 semanas.

Figura 16: *La frecuencia de linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} generados en respuesta a la simulación por GAD65 está afectada en diabetes tipo 1.*

La proporción de linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} extendida a partir de PBMC en respuesta a (A) GAD65 y (B) TT se muestra para individuos en las siguientes categorías: Pre-DT1 – en riesgo de diabetes tipo 1; DT1 – con diabetes tipo 1; Sano – adultos jóvenes HLA DR3 y/o DR4 libres de enfermedad; DT2 – diabetes tipo 2. La barra horizontal es la media para cada grupo. Los valores P generales para el análisis de la varianza mostrada se determinaron por la prueba de Kruskal-Wallis; la prueba de comparación múltiple de Dunn, a continuación, reveló diferencias significativas entre tanto Pre-DT1 y DT1 en comparación con Sano o DT2 a $P < 0,05$.

Figura 17: *La Supresión por células CD4⁺ CD52^{hi} generadas en respuesta a GAD65 está afectada en DT1 preclínica.*

La secreción de IFN- γ por linfocitos T CD4⁺ clasificados y activados por TT o GAD65 en ausencia (en blanco) o presencia (relleno) del antígeno. Los resultados (media $\pm$ eem de triplicados) son representativos de experimentos sobre células de seis individuos con autoanticuerpos de célula islote en riesgo de diabetes tipo 1.

Figura 18: *El Tratamiento con CD52-Fc invierte la hiperglucemia en ratones NOD con diabetes de aparición reciente.*

Se hizo un seguimiento de los niveles de glucosa en sangre en ratones NOD hembras haciendo semanalmente un análisis de la glucosa en orina y la diabetes se diagnosticó en ratones con un análisis de orina positivo por una concentración de glucosa en sangre >14 mM. En cuanto se confirmó la hiperglucemia se dio a los ratones intraperitonealmente o bien CD52-Fc o Fc, 20 μ g, seis dosis en días alternos, y, a continuación, se hizo un seguimiento de sus concentraciones de glucosa en sangre, dos veces por semana. Los resultados se muestran para dos pares de ratones que recibieron o bien CD52-Fc (A) o Fc control (B).

Figura 19: *El desarrollo de la diabetes en ratones NOD.SCID después de transferir desde ratones NOD diabéticos esplenocitos tratados ex vivo con hCD52-Fc o Fc.*

Los esplenocitos de NOD diabético tratados con CD52 Fc o Fc humanos recombinantes se inyectaron en ratones NOD.SCID. Los esplenocitos de ratones diabéticos hembras se aislaron e incubaron con o bien proteína hCD52-Fc recombinante o Fc en “tampón de CD52”. Las células se suspendieron de nuevo e inyectaron en ratones NOD.SCID machos (6 por grupo; véase Ejemplo de Métodos 18).

Figura 20: *CD52-Fc humana suprime la proliferación de linfocitos T CD4 con TCR transgénico específico a ovoalbúmina (Ova) de ratón (OT-II).*

Se incubaron esplenocitos (1×10^5) de ratones OT-II hembras de 10 semanas de vida durante 3 días en placas de 96 pocillos de fondo redondo en 200 ml de medio RPMI-1640 que contenía 5 % de FCS y las concentraciones indicadas de proteína o péptido de ova, o anticuerpo anti-CD3 (clon 2C-11), y proteína CD52-Fc o Fc humana recombinante. La absorción de ³H-timidina se midió durante las últimas 16 h de cultivo. Los resultados son la media $\pm$ eem de triplicados.

Figura 21: *Identificación por ELISA de CD52 en muestras de semen humano.*

Se muestra la absorbancia a 450 nm para CD52 soluble en diluciones en serie de muestras de semen (n=26).

Figura 22: *La CD52 derivada de semen suprime la proliferación de linfocito T humano.*

Se muestra el efecto sobre la proliferación del linfocito T (Índice de División celular; CDI) calculado a partir de la dilución del colorante CFSE en respuesta a toxoide tetánico (TT, 5 uL/ml) para dos muestras de semen (a una dilución de 1:20) sin inmunoagotamiento o sometidas a agotamiento con IgG control (“Octagam”) o IgG anti-CD52 (Campath).

Figura 23: *Proliferación de linfocito T (dilución del colorante CFSE) a toxoide tetánico: efecto del semen ± bloqueo del anticuerpo a CD52.*

Se muestra el efecto sobre la proliferación del linfocito T (CDI, calculado a partir de la dilución del colorante CFSE) en respuesta a toxoide tetánico (TT, 5 ufl/ml) para muestras de semen (1:20) ± bloqueo de anticuerpo CF1D12 (20 µg/ml).

Figura 24: *hCD52-Fc suprime la secreción de IL-1β por células THP1 en respuesta a LPS.*

Se incubaron células THP-1 con diferentes dosis de CD52-Fc o Fc control en presencia de LPS, el medio se recogió y la concentración de IL-1β se midió por ELISA.

Figura 25: *hCD52-Fc suprime la secreción de IL-1β por células THP1 en respuesta a Pam3CSK.*

Se incubaron células THP-1 con diferentes dosis de CD52-Fc o Fc control en presencia del agonista de TLR-2 Pam3CSK, los medios se recogieron y la concentración de IL-1β se midió por ELISA.

Figura 26: *hCD52-Fc (50 µg/ml) suprime la secreción de IL-1β por células THP1 diferenciadas en respuesta a alumbre.*

Se diferenciaron células THP-1 con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), se lavaron y se incubaron con CD52-Fc o Fc control. El medio se recogió y la concentración de IL-1β se midió por ELISA.

Figura 27: *mCD52-Fc suprime la secreción de IL-1β por células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón en respuesta a un rango de estímulos inmunes innatos.*

Se incubaron células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) de ratones C57/B6 con CD52-Fc o PBS de ratón (Control) en presencia de LPS, CPG o *Listeria monocytogenes*, preparadas con LPS y, a continuación, estimuladas con los agonistas de inflammasoma conocidos, urato monosódico (MSU), alumbre y nigericina. Las concentraciones de citoquina en los medios se midieron por ensayo de matriz de citoquina múltiple.

Figura 28: *El tratamiento con neuraminidasa de A. ureafaciens abole el efecto supresor de mCD52-Fc sobre la producción de IL-1β inducida por LPS por células THP-1.*

Se incubaron células THP-1 con mCD52-Fc tratada con neuraminidasa o tampón de reacción en presencia de LPS. Los medios se recogieron y la concentración de IL-1β se midió por ELISA.

Figura 29: *El tratamiento con PNGasa-F para separar el oligosacárido ligado a N abole el efecto supresor de hCD52-Fc sobre la secreción de IL-1β inducida por LPS por células THP-1*

Se usó CD52-Fc humana (300 µg) tratado con o sin PNGasa F para separar el oligosacárido ligado a N para tratar células THP-1 en presencia de LPS. Los medios se recogieron y la concentración de IL-1β se midió por ELISA.

Leyenda al listado de secuencia

SEQ ID NO: 1 Transcrito de ARNm de CD52 humana (Secuencia de referencia de NCBI: NM_001803.2)

SEQ ID NO: 2 Secuencia de aminoácidos de CD52 humana

SEQ ID NO: 3 Péptido soluble de 12 aminoácidos de CD52 humana

SEQ ID NO: 4 Péptido de CD52 soluble de mono ortólogo

SEQ ID NO: 5 Péptido de CD52 soluble de ratón ortólogo

SEQ ID NO: 6 Péptido de CD52 soluble de rata ortólogo

SEQ ID NO: 7 Péptido de CD52 soluble de perro ortólogo

SEQ ID NO: 8 Cebador F de CD52

SEQ ID NO: 9 Cebador R de CD52

SEQ ID NO: 10 Cebador F de FOXP3

SEQ ID NO: 11 Cebador R de FOXP3

SEQ ID NO: 12 Cebador F de CTLA-4

SEQ ID NO: 13 Cebador R de CTLA-4

SEQ ID NO: 14 Cebador F de GITR

SEQ ID NO: 15 Cebador R de GITR

SEQ ID NO: 16 Cebador F de CD127

SEQ ID NO: 17 Cebador R de CD127

SEQ ID NO: 18 Cebador directo (F, del inglés "Forward") de IL-2α

SEQ ID NO: 19 Cebador inverso (R, del inglés "Reverse") de IL-2α

SEQ ID NO: 20 Cebador directo de IL-27β

SEQ ID NO: 21 Cebador inverso de IL-27β

SEQ ID NO: 22 Cebador directo de IL-12α

SEQ ID NO: 23 Cebador inverso de IL-12α

SEQ ID NO: 24 Cebador 1F1
 SEQ ID NO: 25 Cebador 1R1
 SEQ ID NO: 26 Cebador 1F2
 SEQ ID NO: 27 Cebador 1R2
 5 SEQ ID NO: 28 Cebador 2F
 SEQ ID NO: 29 Cebador 2R1
 SEQ ID NO: 30 Cebador 2R2
 SEQ ID NO: 31 Cebador directo de CD52
 SEQ ID NO: 32 Cebador inverso de CD52
 10 SEQ ID NO: 33 Cebador directo de IL-2
 SEQ ID NO: 34 Cebador inverso de IL-2
 SEQ ID NO: 35 Cebador directo de IL-4
 SEQ ID NO: 36 Cebador inverso de IL-4
 SEQ ID NO: 37 Cebador directo de IL-10
 15 SEQ ID NO: 38 Cebador inverso de IL-10
 SEQ ID NO: 39 Cebador directo de IL-13
 SEQ ID NO: 40 Cebador inverso de IL-13
 SEQ ID NO: 41 Cebador directo de FoxP3
 SEQ ID NO: 42 Cebador inverso de FoxP3
 20 SEQ ID NO: 43 Cebador directo de CD127
 SEQ ID NO: 44 Cebador inverso de CD127
 SEQ ID NO: 45 Cebador directo de CTLA-4
 SEQ ID NO: 46 Cebador inverso de CTLA-4
 SEQ ID NO: 47 Cebador directo de FASLG
 25 SEQ ID NO: 48 Cebador inverso de FASLG
 SEQ ID NO: 49 Cebador directo de TGFb1
 SEQ ID NO: 50 Cebador inverso de TGFb1
 SEQ ID NO: 51 Cebador directo de TGFb2
 SEQ ID NO: 52 Cebador inverso de TGFb2
 30 SEQ ID NO: 53 Cebador directo de IFNg
 SEQ ID NO: 54 Cebador inverso de IFNg
 SEQ ID NO: 55 Cebador directo de IL-12 alfa
 SEQ ID NO: 56 Cebador inverso de IL-12 alfa
 SEQ ID NO: 57 Cebador directo de Ebi3
 35 SEQ ID NO: 58 Cebador inverso de Ebi3
 SEQ ID NO: 59 Cebador directo de RARA
 SEQ ID NO: 60 Cebador inverso de RARA
 SEQ ID NO: 61 Cebador directo de GTR
 SEQ ID NO: 62 Cebador inverso de GTR
 40 SEQ ID NO: 63 Cebador directo de GRANZMB
 SEQ ID NO: 64 Cebador inverso de GRANZMB
 SEQ ID NO: 65 Cebador directo de ALDH1A2
 SEQ ID NO: 66 Cebador inverso de ALDH1A2
 SEQ ID NO: 67 Cebador directo de ACTIN
 45 SEQ ID NO: 68 Cebador inverso de ACTIN
 SEQ ID NO: 69 Secuencia de proteína Siglec-10 humana (N.º de Acceso GenBank AF310233.1)

Descripción detallada de la invención

Técnicas y definiciones generales

50 A menos que se defina específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria se tomarán que tienen el mismo significado que lo normalmente entendido por un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genéticas moleculares, inmunología, inmunohistoquímica, química proteica y bioquímica).

A menos que se indique lo contrario, la proteína recombinante, el cultivo celular, y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y explican por la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M Glover and B.D. Hames (editores), "DNA Cloning: A Practical Approach", Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al., (editores), "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad), Ed Harlow and David Lane (editores) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (editores) "Current Protocols in Immunology", John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad).

El término “y/o”, por ejemplo, “X y/o Y” se entenderá que significa o bien “X e Y” o “X o Y” y se tomará que proporciona el soporte explícito para ambos significados o para cualquiera de los dos significados.

Como se usa en la presente memoria, el término “aproximadamente”, a menos que se indique lo contrario, se refiere a +/- 20 %, más preferiblemente +/- 10 %; más preferiblemente +/- 5 %, del valor designado. Para evitar la duda, el término “aproximadamente” seguido de un valor designado es para ser interpretado como que también abarca el propio valor designado exacto (por ejemplo, “aproximadamente 10” también abarca 10 exactamente).

A lo largo de esta memoria la palabra “comprender”, o variaciones tales “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implica la inclusión de un elemento indicado, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Como se usa en la presente memoria, el término “respuesta inmune” tiene su significado normal en la técnica, e incluye tanto la inmunidad humoral como celular. Una respuesta inmune puede estar mediada por uno o más de, activación de linfocito T, activación de linfocito B, activación de linfocito citolítico natural, activación de células que presentan antígeno (por ejemplo, linfocitos B, DC, monocitos y/o macrófagos), producción de citoquina, producción de quimiocina, expresión del marcador de superficie celular específico, en particular, expresión de moléculas coestimuladoras. En una realización preferida, la respuesta inmune que se suprime usando los métodos de la invención es al menos la función del linfocito T efector reduciendo la supervivencia, actividad y/o proliferación de este tipo celular. En otra realización preferida, la respuesta inmune que se suprime usando los métodos de la invención es al menos una o más de la función de monocito, macrófago o célula dendrítica reduciendo la supervivencia, actividad y/o proliferación de uno o más de estos tipos celulares. En una realización preferida adicional, la respuesta inmune se suprime a un límite de modo que induce tolerancia a un antígeno tal como un autoantígeno.

Como se usa en la presente memoria, “tolerancia” se refiere a un estado de inmuno insensibilidad a un antígeno específico o grupo de antígenos a los cuales un sujeto es normalmente sensible. La tolerancia inmune se consigue bajo condiciones que suprimen la reacción inmune y no es justo la ausencia de una respuesta inmune.

Como se usa en la presente memoria, los términos “que trata”, “tratar” o “tratamiento” incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente suficiente para reducir o eliminar al menos un síntoma de la enfermedad.

Como se usa en la presente memoria, los términos “que previene”, “prevenir” o “prevención” incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente suficiente para prevenir la manifestación de al menos un síntoma de la enfermedad.

Como se usa en la presente memoria, el término “que suprime” incluye que reduce en cualquier cantidad cuantificable.

Como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a un animal, por ejemplo, un mamífero. En una realización preferida, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un humano. Otras realizaciones preferidas incluyen animales de ganado tales como caballos, reses, ovejas y cabras, así como animales de compañía tales como gatos y perros.

Como se usa en la presente memoria, el término “hospedador” se refiere a cualquier organismo del cual se puede aislar CD52 soluble o en el que se puede producir CD52 soluble, por algún medio. El hospedador puede ser el organismo completo o puede ser una célula derivada del mismo. El hospedador puede ser un animal, por ejemplo, un mamífero. En una realización preferida, el hospedador es mamífero, por ejemplo, un humano. Otros hospedadores preferidos incluyen ratones, ratas, monos, hámsteres, cobayas, conejos, y cualquier animal o célula que pueda servir como un hospedador adecuado del cual se puede aislar CD52 soluble o en el que se puede producir CD52 soluble.

Como se usa en la presente memoria, los términos “ligados”, “pegados”, “conjugados”, “unidos”, “acoplados o variaciones de los mismos se usan mucho para referirse a cualquier forma de asociación covalente o no covalente que juntan una entidad a otra durante algún periodo de tiempo.

CD52 soluble

La presente descripción describe, por primera vez, la supresión de células inmunes tales como linfocitos T efectores, monocitos y células dendríticas por un fragmento de glucoproteína CD52 soluble. CD52 es una glucoproteína anclada a glucosilfosfatidilinositol (GPI) de superficie presente en la mayoría de las células linfoides, inicialmente reconocida como la diana de anticuerpos monoclonales CAMPATH que se une al complemento usados terapéuticamente para someter a agotamiento los linfocitos (Treumann et al., 1995; Xia et al., 1991; Hale, 2001). El transcrito de ARNm del gen de CD52 humana se muestra en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos traducidos se muestra en la SEQ ID NO: 2. La CD52 madura atada por su ancla de GPI comprende solamente 12 aminoácidos y un carbohidrato terminal ligado a (N) asparagina.

A menos que se indique lo contrario, los términos “glucoproteína CD52 soluble”, “CD52 soluble”, “glucoproteína soluble” y variaciones de los mismos se usan intercambiabilmente en la presente memoria.

La CD52 anclada a membrana se puede escindir (por ejemplo, enzimáticamente) para liberar un fragmento peptídico soluble que comprende la secuencia de aminoácidos **GQNDSQTSSPS** (SEQ ID NO: 3). La glucoproteína CD52 soluble descrita en la presente memoria puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos 60 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o al menos 60 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de otras secuencias de fragmento soluble de CD52 ortólogas conocidas. Por tanto, la presente descripción abarca las secuencias ortólogas del fragmento de péptido de CD52 soluble. Tales secuencias incluyen pero no se limitan a la secuencia de mono **SQNATSQSSPS** (SEQ ID NO: 4), la secuencia de ratón **GQATTAASGINKNSTSTKKTPLKS** (SEQ ID NO: 5), la secuencia de rata **GQNSTAVTTPANKAATTAAATTCAAATTATKTTTAVRKTPGKPPKA** (SEQ ID NO: 6), la secuencia de perro **GNSTTPRMTTKKVKSATPA** (SEQ ID NO: 7), y otras secuencias ortólogas fácilmente identificables a partir de las secuencias de polipéptido y polinucleótidos de CD52 conocidas.

El porcentaje de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos o polinucleótidos descritas en la presente memoria se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos y polinucleótidos se pueden comparar manualmente o usando herramientas de comparación e identificación de secuencia basadas en ordenador que emplean algoritmos tales como BLAST (del inglés “Basic Local Alignment Search Tool”; Altschul et al., 1993); véase también www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), el método de alineamiento Clustal (Higgins and Sharp, 1989) y otros, en donde los parámetros apropiados para cada comparación de secuencia específica se pueden seleccionar como se entendería por un experto en la técnica. La secuencia de aminoácidos de la porción de péptido de la glucoproteína descrita en la presente memoria puede ser al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % idéntica, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos identificadas en las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 o 7. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la porción de péptido de la glucoproteína descrita en la presente memoria puede ser 100 % idéntica a una cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas de las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 o 7.

La glucoproteína CD52 soluble aislada se puede usar para producir composiciones farmacéuticas de la invención. El término “aislado” se usa en la presente memoria para definir el aislamiento de la glucoproteína CD52 soluble de manera que está presente en una forma adecuada para la aplicación en una composición farmacéutica. Por tanto, la glucoproteína descrita en la presente memoria se aísla de otros componentes de una célula hospedadora o fluido o sistema de expresión al límite que es requerido para posterior formulación de la glucoproteína como composición farmacéutica. Por lo tanto, la glucoproteína aislada se proporciona en una forma que está básicamente libre de otros componentes de una célula hospedadora (por ejemplo, proteínas) que pueden esconder el efecto farmacéutico de la glucoproteína. Por tanto, la glucoproteína aislada puede estar libre o básicamente libre de material con el que se asocia de manera natural tal como otras glucoproteínas, polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentra en su ambiente natural, o el ambiente en el que se prepara (por ejemplo, cultivo celular) cuando tal preparación es por tecnología de ADN recombinante llevada en práctica *in vitro* o *in vivo*. La glucoproteína soluble se puede aislar de una célula hospedadora o fluido o sistema de expresión por métodos conocidos en la técnica.

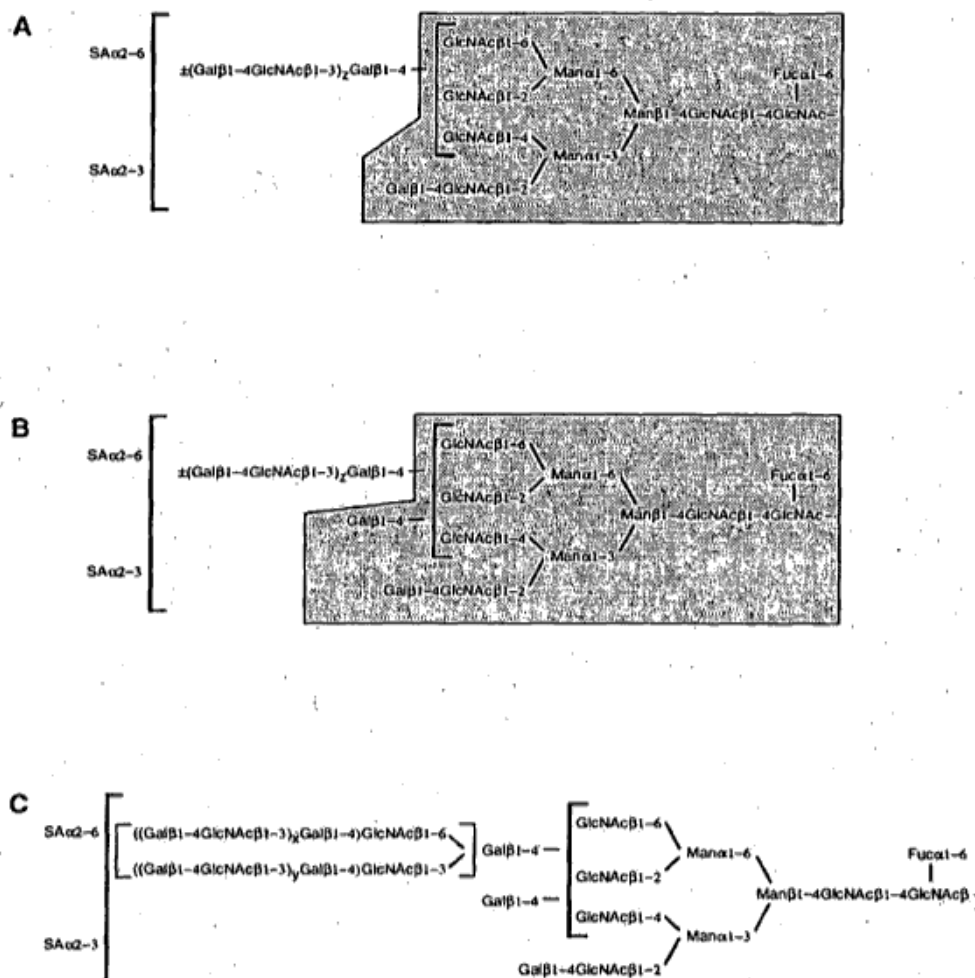
El término “soluble” se usa en la presente memoria para definir un péptido o glucoproteína que no está unido a una membrana celular. El péptido o glucoproteína soluble puede ser capaz de moverse libremente en cualquier disolvente o fluido, tal como un fluido corporal. Por ejemplo, el péptido o glucoproteína soluble puede ser capaz de circular en sangre.

El carbohidrato puede ser cualquier resto de carbohidrato pegado al fragmento de péptido de CD52 soluble. Por ejemplo, el carbohidrato puede ser cualquier resto de carbohidrato que se encuentra que está pegado a la porción extracelular de la proteína CD52 en un hospedador. Por tanto, el carbohidrato puede ser cualquier carbohidrato capaz de estar pegado a la porción extracelular de la proteína CD52 por una reacción de glucosilación conocida por tener lugar en un hospedador.

Los restos de carbohidrato presentes en una glucoproteína CD52 de origen natural se pueden identificar por métodos conocidos, tales como los descritos en Schröter et al., (1999). Tales restos de carbohidrato se pueden identificar a partir de glucoproteínas CD52 presentes en cualquier célula hospedadora que exprese CD52, y particularmente linfocitos, tales como linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, monocitos o células del tracto genital, tales como espermatozoides o células del conducto epidídimo. Por tanto, la estructura precisa del resto de carbohidrato se puede determinar aplicando métodos tales como espectrometría de masas (por ejemplo, Espectrometría de Masa de Desorción/Ionización mediante láser asistido por Matriz acoplada a Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF), cromatografía de intercambio aniónico Mono-Q, cromatografía de intercambio aniónico de alto pH (HPAEC-PAD), análisis de metilación, digestión por endo-β-galactosidasa, y otros métodos. Los N-glucanos se pueden separar de una glucoproteína CD52 de origen natural usando enzimas de escisión conocidas tales como péptido-N4-(N-acetil-β-D-glucosaminil)asparaginas amidasa F (“PNGasa F” de *Flavobacterium meningosepticum*, recombinante de *Escherichia coli*, obtenible de proveedores comerciales tales como Roche). Los N-glucanos se pueden aislar para

caracterización adicional usando métodos cromatográficos conocidos, tales como cromatografía de fase inversa C8. En un ejemplo, el carbohidrato puede comprender uno o más azúcares bi-, tri- o tetra-antenarios, los cuales pueden estar terminalmente sometidos a sialilación. Por ejemplo, el carbohidrato puede comprender uno o más azúcares tetra-antenarios. Los azúcares pueden ser ramificados o no ramificados. Los azúcares pueden comprender una fucosa proximal. Por tanto, el carbohidrato puede estar sometidos a fucosilación. Los azúcares pueden comprender una o más repeticiones de N-acetilactosamina. Por tanto, los azúcares pueden comprender unidades de polilactosamina. Además, los azúcares pueden comprender un núcleo de manosa.

El carbohidrato puede tener una o más de las estructuras descritas en Treumann et al. (1995). Por tanto, por ejemplo, el carbohidrato puede tener cualquiera de las siguientes estructuras:



Por tanto, el carbohidrato puede comprender uno o más ácidos siálicos. El uno o más ácidos siálicos puede estar localizado en cualquier porción del carbohidrato. Por ejemplo, el uno o más ácidos siálicos puede ser ácidos siálicos terminales. En un ejemplo particular, el carbohidrato puede comprender ácidos α 2-6 siálicos. Por tanto, el carbohidrato puede comprender uno o más grupos α 2-6 sialilactosa de superficie. Los uno o más ácidos siálicos pueden estar pegados a galactosa en enlace β 1-4 con N-acetilglucosamina.

La presente descripción demuestra que la glucoproteína CD52 soluble ejerce su efecto supresor al menos en parte por la unión al ácido siálico que se une a lectina-10 tipo Ig (Siglec-10), un receptor de transmembrana de superficie celular y miembro de la superfamilia de la inmunoglobulina que porta dos motivos de inhibición basados en tirosina inmunoreceptor citoplásmico (ITIM, del inglés "Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif") (Munday et al., 2001; Crocker et al., 2007). Por tanto, la glucoproteína soluble descrita en la presente memoria puede ser capaz de unirse a Siglec-10. Por ejemplo, la glucoproteína soluble descrita en la presente memoria puede comprender un resto de carbohidrato capaz de unirse a Siglec-10. En un ejemplo, el resto de carbohidrato comprende uno o más grupos α 2-6- o α 2-3-sialilactosa que son capaces de unirse a Siglec-10. Alternativamente, el resto de carbohidrato puede comprender algunos otros grupos de superficie que sean capaces de unirse a Siglec-10.

La glucoproteína soluble descrita en la presente memoria puede ser capaz de unirse a Siglec-10 derivada de cualquier especie. Por ejemplo, la glucoproteína soluble descrita en la presente memoria puede ser capaz de unirse a Siglec-10 derivada de cualquier especie de mamífero. Preferiblemente, la glucoproteína soluble descrita en la presente memoria es capaz de unirse a Siglec-10 humana. La secuencia de polipéptido de Siglec-10 humana se define en Munday et al. (2001), en N.º de acceso de GenBank AF310233.1, y en la SEQ ID NO: 69.

La glucoproteína soluble descrita en la presente memoria puede ser capaz de efectuar la señalización por el receptor de Siglec-10. Por tanto, la glucoproteína soluble descrita en la presente memoria puede ser capaz de unirse a Siglec-10 a cualquier límite suficiente para efectuar la señalización por el receptor de Siglec-10. Por tanto, el nivel preciso de unión a Siglec-10 puede variar. Los métodos para determinar si una glucoproteína dada es capaz de unirse a Siglec-10, y para determinar si una glucoproteína dada es capaz de efectuar la señalización por el receptor de Siglec-10 son conocidos en la técnica.

Más ejemplos del carbohidrato de CD52 ligado a N que la glucoproteína descrita en la presente memoria puede comprender son aquellos derivados o derivables de glucoproteínas CD52 de linfocito hospedador o glucoproteínas CD52 de célula de tracto genital.

Debido a la naturaleza compleja de muchos restos de carbohidrato de origen natural conocidos por estar ligados a la porción de proteína extracelular de CD52 humana y las muchas variaciones en estas estructuras que pueden surgir de patrones de glucosilación variantes, se entenderá que la naturaleza precisa del resto de carbohidrato presente en la glucoproteína descrita en la presente memoria puede variar. Como se indicó anteriormente, los métodos están disponibles para identificar precisamente restos de carbohidrato particulares de glucoproteínas CD52 de origen natural. Además, se puede añadir un número de diferentes restos de carbohidrato al fragmento de péptido soluble de CD52 expresando CD52 bajo condiciones de glucosilación variantes. Por ejemplo, la glucoproteína soluble descrita en la presente memoria se puede expresar en y/o aislar de linfocitos hospedadores, monocitos o células del tracto genital hospedadoras (por ejemplo, espermatozoides, o células del conducto epidídimo) o fluido seminal y, por lo tanto, puede comprender diferentes grupos de carbohidrato como resultado. Los inventores han mostrado que la CD52 soluble presente en semen humano, igualmente a la CD52 soluble liberada de linfocitos tales como linfocitos B Daudi, es capaz de suprimir la función del linfocito T y/o una respuesta inmune. Se pueden seleccionar células hospedadoras alternativas que proporcionan diferentes condiciones de glucosilación para la expresión de CD52 soluble para proporcionar formas alternativas de carbohidrato sobre la glucoproteína soluble.

El carbohidrato puede estar pegado a uno cualquiera o más aminoácidos en el péptido que es capaz de tener un resto de carbohidrato pegado al mismo. Por ejemplo, el carbohidrato puede estar pegado a uno o más restos de asparagina, serina, treonina, tirosina, hidroxilisina, hidroxiprolina, fosfoserina o triptófano si está presente en la secuencia de aminoácidos. En un ejemplo, el carbohidrato está pegado al resto de asparagina (N) en una porción de péptido que tiene una secuencia al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % idéntica, o es 100 % idéntica, a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3.

La presente descripción también proporciona variantes, mutantes, fragmentos biológicamente activos, modificaciones, análogos y/o derivados de la glucoproteína descrita en la presente memoria. Tales compuestos se pueden identificar mediante cribado de compuestos que imitan la estructura y/o función del polipéptido descrito en la presente memoria, usando métodos que incluyen cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

Función de CD52 soluble

La glucoproteína descrita en la presente memoria es preferiblemente capaz de suprimir la actividad ("función") de células inmunes incluyendo linfocitos (tales como un linfocito T) y monocitos. Por ejemplo, la glucoproteína descrita en la presente memoria es capaz de suprimir uno o más de la función de linfocito T efector, monocito, macrófago y célula dendrítica. Los linfocitos T efectores, monocitos, macrófagos y células dendríticas y sus funciones serán conocidos por un experto en la técnica.

Los linfocitos T se pueden identificar fácilmente por la presencia de cualquiera de uno o más marcadores de linfocito T conocidos en la técnica. La glucoproteína descrita en la presente memoria es capaz de reducir la proliferación de linfocito T en respuesta a la exposición a antígeno, y/o capaz de reducir la producción de citoquina de linfocito T (tal como la producción de una cualquiera o más de IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-17, G-CSF, TNF- α y otras citoquinas conocidas por ser secretadas por linfocitos T activados). Por ejemplo, CD52 soluble es capaz de reducir la producción de IFN- γ por linfocitos T.

En otro ejemplo, CD52 soluble es capaz de reducir la secreción de IL-1 β por monocitos, macrófagos y células dendríticas.

Por consiguiente, la glucoproteína descrita en la presente memoria es capaz de reducir una respuesta inmune en un hospedador. Los inventores han mostrado que la glucoproteína descrita en la presente memoria es capaz de reducir la función de linfocito T efector en respuesta a la exposición a cualquier antígeno. La función supresora no es dependiente del antígeno particular usado en la exposición. Por tanto, la glucoproteína descrita en la presente

memoria es capaz de reducir una respuesta inmune a cualquier antígeno. En un ejemplo, el antígeno es un autoantígeno.

- Se pueden usar algunos métodos conocidos de determinación de la supresión de la función del linfocito T y/o una respuesta inmune, tal como (pero no limitado a) los descritos en los ejemplos de la presente memoria. Por tanto, los métodos pueden comprender determinar el efecto de la glucoproteína descrita en la presente memoria sobre uno o más de la proliferación de linfocito T efector, monocito, macrófago y célula dendrítica y/o sobre la producción de uno cualquiera o más de IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-17, G-CSF, TNF- α , y otras citoquinas conocidas por ser secretadas por linfocitos T activados, monocitos, macrófagos o células dendríticas.

Proteínas de fusión

- La porción de péptido de la glucoproteína CD52 descrita en la presente memoria puede, por ejemplo, estar conjugada a una segunda proteína como una proteína de fusión. La segunda proteína puede ser cualquier proteína capaz de incrementar la estabilidad y/o solubilidad de la glucoproteína, de aumentar el proceso de producción de la glucoproteína por métodos recombinantes, o de aumentar el efecto terapéutico de la glucoproteína. Por tanto, la segunda proteína puede ser capaz de incrementar la semivida de la glucoproteína descrita en la presente memoria.
- La segunda proteína puede ser de cualquier longitud adecuada. En una realización, la segunda proteína puede ser relativamente corta. Por ejemplo, la segunda proteína puede consistir en cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más aminoácidos. La segunda proteína puede comprender al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 aminoácidos. La segunda proteína también puede comprender más de 10 aminoácidos. Por ejemplo, la segunda proteína puede comprender al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, o al menos 50 aminoácidos.

- En un ejemplo, la segunda proteína es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo adecuados incluyen cualquier fragmento de anticuerpo que es capaz de activar el sistema inmune. El fragmento de anticuerpo puede ser una región del fragmento cristizable (Fc) (que puede ser un polipéptido sencillo) o uno cualquiera o más dominios constantes de cadena pesada (por ejemplo, dominios C_H 2, 3 y/o 4) de una región Fc. En un ejemplo, la segunda proteína es un fragmento Fc.

- En otro ejemplo, la segunda proteína puede ser una etiqueta de purificación. Se conocen muchos ejemplos de etiquetas de purificación, e incluyen (sin limitación) una etiqueta His, etiqueta T7, etiqueta FLAG, etiqueta S, etiqueta HA, etiqueta c-Myc, DHFR, un dominio de unión a quitina, un dominio de unión a calmodulina, un dominio de unión a celulosa, una etiqueta Strep 2 (una etiqueta de purificación que codifica ocho aminoácidos que se unen a Strep-Tactin, una estreptavidina específicamente modificada por ingeniería (Schmidt and Skerra, 2007), y otros.

- La segunda proteína puede incrementar la solubilidad de la proteína expresada. Tales proteínas incluyen (sin limitación) NusA, tiorredoxina, modificador tipo ubiquitina pequeña (SUMO, del inglés "Small Ubiquitin-like Modifier"), ubiquitina y otras conocidas en la técnica.

- La segunda proteína puede incrementar la solubilidad de la proteína expresada así como aumentar los métodos de purificación. Tales proteínas incluyen (sin limitación) GST, MBP, gen 10 de T7, y otras conocidas en la técnica.

La etiqueta de purificación opcionalmente se puede separar de la proteína de fusión después de su producción. Los métodos adecuados de separación de una etiqueta de purificación de una proteína de fusión variarán dependiendo de la etiqueta de purificación particular usada. Tales métodos serán generalmente conocidos en la técnica.

- La proteína de fusión descrita en la presente memoria puede comprender una o más de cualquiera de las segundas proteínas anteriormente descritas, en cualquier combinación. Por tanto, la proteína de fusión puede comprender un fragmento de anticuerpo (tal como un Fc) y una etiqueta de purificación (tal como una etiqueta Strep 2).

Polinucleótidos

- La presente descripción además proporciona polinucleótidos aislados o recombinantes que codifican el componente de proteína de la glucoproteína CD52 soluble, o la proteína de fusión. Las secuencias de tales polinucleótidos son derivables de las secuencias de aminoácidos de la proteína CD52 y el fragmento de péptido de CD52 soluble descritos en la presente memoria y de la segunda proteína comprendida dentro de la proteína de fusión. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria también codifican una proteína CD52 de longitud completa, la cual puede, por ejemplo, ser una forma madura de la misma, o un precursor de la misma.

- El término "polinucleótido aislado" está destinado a significar un polinucleótido que generalmente se ha separado de las secuencias de polinucleótido con las que está asociado o ligado en su estado nativo. Preferiblemente, el polinucleótido aislado es al menos 60 % libre, más preferiblemente al menos 75 % libre, y más preferiblemente al menos 90 % libre de otros componentes con los que se asocia de manera natural. Además, el término "polinucleótido" se usa intercambiamente en la presente memoria con los términos "molécula de ácido nucleico", "gen" y "ARNm".

El término “recombinante” en el contexto de un polinucleótido se refiere al polinucleótido cuando está presente en una célula, o en un sistema de expresión libre de célula, en una cantidad alterada en comparación con su estado nativo. En una realización, la célula es una célula que no comprende de manera natural el polinucleótido. Sin embargo, la célula puede ser una célula que comprende un polinucleótido no endógeno que da como resultado una cantidad alterada, preferiblemente incrementada, de producción del polipéptido codificado. Un polinucleótido recombinante de la invención incluye polinucleótidos que no se han separado de otros componentes de la célula transgénica (recombinante), o sistema de expresión libre de célula, en el que está presente, y polinucleótidos producidos en tales células o sistemas libres de célula que posteriormente se separaron por purificación de al menos algunos otros componentes.

“Polinucleótido” se refiere a un oligonucleótido, un polinucleótido o cualquier fragmento del mismo. Puede ser ADN o ARN de origen genómico o sintético, de cadena doble o cadena sencilla, y combinado con carbohidrato, lípidos, proteína, u otros materiales para producir una actividad particular definida en la presente memoria.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden poseer, cuando se comparan con moléculas de origen natural (tales como polinucleótidos genómicos que codifican CD52 o un fragmento soluble de los mismos), una o más mutaciones que son deleciones, inserciones o sustituciones de restos de nucleótido. Los mutantes pueden ser o bien de origen natural (es decir, aislados de una fuente natural) o sintéticos (por ejemplo, producidos realizando mutagénesis dirigida a sitio o técnicas de barajado de ADN como se describe en líneas generales por Harayama (1998)). Por tanto, está claro que los polinucleótidos de la invención pueden ser o bien de origen natural o recombinantes.

La secuencia particular del polinucleótido se puede determinar a partir de la secuencia de péptido. Debido a la redundancia del código genético, se pueden usar secuencias diferentes para codificar el mismo péptido. Además, la secuencia de polinucleótidos se puede alterar específicamente para aumentar su expresión en una célula hospedadora particular. Tal proceso es bien conocido en la técnica como “optimización de codón”. Por tanto, el polinucleótido descrito en la presente memoria puede ser codón optimizado para aumentar la expresión en una célula hospedadora.

Vectores

El polinucleótido descrito en la presente memoria se puede insertar en un vector de nucleótidos para facilitar la expresión del componente proteico de la glucoproteína o la proteína de fusión. Por consiguiente, la presente descripción proporciona un vector que comprende un polinucleótido que codifica el componente proteico de la glucoproteína descrita en la presente memoria o la proteína de fusión descrita en la presente memoria. El vector puede ser o bien ARN o ADN, o bien procariota o eucariota, y puede ser un transposón (tal como se describe en el documento US 5.792.294), un virus o un plásmido.

Preferiblemente, el polinucleótido que codifica el componente proteico de la glucoproteína o la proteína de fusión está ligado de manera operativa a un promotor que es capaz de expresar el péptido bajo condiciones adecuadas. “Ligado de manera operativa” como se usa en la presente memoria se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN). Generalmente, se refiere a la relación funcional de un elemento regulador transcripcional a una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor está ligado de manera operativa a una secuencia codificante, tal como un polinucleótido definido en la presente memoria, si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula apropiada o sistema de expresión libre de célula. Generalmente, los elementos reguladores transcripcionales promotores que están ligados de manera operativa a una secuencia transcrita están físicamente contiguos a la secuencia transcrita, es decir, son cis-activos. Sin embargo, algunos elementos reguladores transcripcionales, tales como los potenciadores, no necesitan estar físicamente contiguos o estar localizados en proximidad cercana a las secuencias codificantes cuya transcripción aumentan.

El vector es preferiblemente un vector de expresión. Como se usa en la presente memoria, un vector de expresión es un vector de ADN o ARN que es capaz de transformar una célula hospedadora y de efectuar expresión de una molécula de polinucleótido especificada. Preferiblemente, el vector de expresión también es capaz de replicarse dentro de la célula hospedadora. Los vectores de expresión pueden ser o bien procariotas o eucariotas, y son generalmente virus o plásmidos. Los vectores de expresión descritos en la presente memoria incluyen vectores que funcionan (es decir, expresión de gen directa) en las células recombinantes descritas en la presente memoria (incluyendo en células animales) o en un sistema de expresión libre de célula adecuado.

En particular, los vectores de expresión descritos en la presente memoria pueden contener secuencias reguladoras tales como secuencias control de la transcripción, secuencias control de la traducción, orígenes de replicación, y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante o el sistema de expresión libre de célula y que controlan la expresión de moléculas de polinucleótido descritas en la presente memoria. En particular, los vectores descritos en la presente memoria pueden incluir secuencias control de la transcripción. Las secuencias control de la transcripción son secuencias que controlan la iniciación, elongación y terminación de la transcripción. Las secuencias control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan la iniciación de la transcripción, tales como las secuencias promotor, potenciador, operador y represor. Las secuencias control de la

transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia control de la transcripción que pueda funcionar en al menos una de las células recombinantes o sistemas de expresión libre de célula descritos en la presente memoria. Una diversidad de tales secuencias control de la transcripción son conocidas por los expertos en la técnica.

Los vectores descritos en la presente memoria también pueden contener (a) señales secretoras (es decir, secuencias de ácidos nucleicos de segmento señal) para posibilitar que se secreta una proteína expresada o péptido de una célula que produce el péptido y/o (b) secuencias de fusión que conducen a la expresión de péptidos descritos en la presente memoria como proteínas de fusión. Ejemplos de segmentos señal adecuados incluyen cualquier segmento señal capaz de dirigir la secreción de una glucoproteína o proteína de fusión descrita en la presente memoria. Los vectores también pueden incluir secuencias intermedias y/o no traducidas de alrededor y/o dentro de la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos que codifican el péptido descrito en la presente memoria.

El polinucleótido o vector se puede expresar en una célula hospedadora o en un sistema de expresión libre de célula para producir la glucoproteína o proteína de fusión descrita en la presente memoria. Tal expresión se puede realizar, por ejemplo, en una célula mamífera, un sistema de expresión de baculovirus, un sistema de expresión fúngico (el cual se puede seleccionar para permitir la glucosilación de la proteína expresada).

La célula hospedadora puede ser cualquier célula capaz de producir la glucoproteína o proteína de fusión descrita en la presente memoria. Por tanto, en un ejemplo, la célula hospedadora es capaz de permitir la glucosilación del componente proteico de la glucoproteína descrita en la presente memoria. Las células hospedadoras adecuadas pueden ser fácilmente identificadas por el experto en la técnica, e incluyen, por ejemplo, células animales, tales como células mamíferas. En un ejemplo, la célula hospedadora es una célula CHO, una célula de mieloma (tal como las células de mieloma de ratón NS-O o SP2-O) o una célula HEK293T. En otro ejemplo, la célula hospedadora es un linfoblasto B Daudi (Hu et al., 2009).

Además, el polinucleótido o vector se puede introducir en una célula hospedadora para la administración a un sujeto. Por tanto, la composición farmacéutica descrita en la presente memoria puede comprender una célula que comprende el polinucleótido o vector descrito en la presente memoria. La célula puede ser una célula aislada. La célula es preferiblemente una célula recombinante. Por tanto, la célula preferiblemente se somete a transfección con un polinucleótido o vector descrito en la presente memoria. Se puede usar cualquier célula hospedadora adecuada para la administración a un sujeto. En un ejemplo, la célula puede ser una célula tomada del sujeto a tratar. Por tanto, la célula puede ser una célula autóloga. Por consiguiente, se pueden tomar una o más células de un sujeto, se puede introducir un polinucleótido o vector como se describe en la presente memoria en la célula del sujeto, y, a continuación, se puede administrar la célula al mismo sujeto. En un ejemplo, la célula puede ser un linfocito, tal como un linfocito T, tal como un linfocito T CD4⁺. Los métodos para tomar una muestra de célula adecuada de un sujeto a este respecto serán conocidos en la técnica. Cuando la célula a usar es un linfocito, los métodos pueden incluir linfocitaféresis. Igualmente se pueden usar otras células hospedadoras adecuadas, las cuales no necesitan necesariamente ser derivadas del sujeto a tratar. La expresión del polinucleótido o vector en la célula preferiblemente da como resultado la producción y/o secreción de la glucoproteína descrita en la presente memoria.

La transformación de un polinucleótido en una célula hospedadora se puede llevar a cabo por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Las técnicas de transformación incluyen, pero no se limitan a, transfección, electroporación, microinyección, lipofección y adsorción. Una célula recombinante puede seguir siendo unicelular o puede convertir en un tejido, órgano o un organismo multicelular. Las moléculas de polinucleótido transformadas como se describe en la presente memoria pueden seguir siendo extracromosómicas o pueden integrarse en uno o más sitios dentro de un cromosoma de la célula transformada (es decir, recombinante) de tal manera que se conserva su capacidad de ser expresadas.

Las células hospedadoras adecuadas para transformarse incluyen cualquier célula que se puede transformar con un polinucleótido como se describe en la presente memoria. Las células hospedadoras pueden ser o bien endógenamente (es decir, de manera natural) capaces de producir polinucleótidos de la presente invención o pueden dejar de ser capaces de producir tales polipéptidos después de ser transformadas con al menos una molécula de polinucleótido como se describe en la presente memoria.

Las tecnologías de ADN recombinantes se pueden usar para mejorar la expresión de una molécula de polinucleótido transformada manipulando, por ejemplo, el número de copias de la molécula de polinucleótido dentro de una célula hospedadora, la eficacia con la que aquellas moléculas de polinucleótido se transcriben, la eficacia con la que los transcritos resultantes se someten a traducción, y la eficacia de las modificaciones después de la traducción. Las técnicas recombinantes útiles para incrementar la expresión de moléculas de polinucleótido como se describe en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, moléculas de polinucleótido que se unen de manera operativa a plásmidos de número de copia alta, integración de la molécula de polinucleótido en uno o más cromosomas de la célula hospedadora, además de las secuencias de estabilidad vector a plásmidos, sustituciones o modificaciones de las señales control de la traducción (por ejemplo, promotores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de señales control de la traducción (por ejemplo, sitios de unión a ribosoma, secuencias Shine-Dalgarno), modificación de moléculas de polinucleótido como se describen en la presente memoria para corresponder al uso de codón de la célula hospedadora, y la delección de las secuencias que desestabilizan los transcritos.

La célula hospedadora se puede cultivar bajo condiciones eficaces para producir la glucoproteína o proteína de fusión. Una vez que se expresa en la célula hospedadora, la glucoproteína o proteína de fusión se puede aislar por métodos convencionales conocidos en la técnica. Por tanto, en una realización, una glucoproteína aislada o proteína de fusión como se describe en la presente memoria se produce cultivando una célula capaz de expresar la glucoproteína o proteína de fusión bajo condiciones eficaces para producir la glucoproteína o proteína de fusión, y aislar la glucoproteína o proteína de fusión. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero no se limitan a, medios eficaces, biorreactores, temperatura, pH y condiciones de oxígeno que permiten la producción de glucoproteína o proteína de fusión, y en particular, que permiten la glucosilación. Un medido eficaz se refiere a cualquier medio en el que una célula se cultiva para producir una glucoproteína o proteína de fusión como se describe en la presente memoria. Tal medio generalmente comprende un medio acuoso que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. Las células hospedadoras se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas Petri. El cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiado para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

También se puede usar cualquier sistema de expresión libre de célula adecuado para la expresión del polinucleótido descrito en la presente memoria. Los sistemas de expresión libres de célula adecuados incluyen aquellos que permiten la glucosilación del componente proteico de la glucoproteína o proteína de fusión. Tales condiciones pueden ser determinadas por un experto en la técnica.

La glucoproteína descrita en la presente memoria también se puede producir induciendo la expresión de CD52 en una célula hospedadora aislada y aislando la glucoproteína CD52 soluble producida por la célula hospedadora. Por tanto, la glucoproteína se puede producir usando una célula que produce de manera natural CD52 soluble. Las células adecuadas serán identificables para el experto en la técnica e incluyen (sin limitación) linfocitos, células del área de tracto genital (tales como espermatozoides), linfoblastos B Daudi (Hu et al., 2009), células K562 y otras. Líneas celulares adicionales capaces de producir de manera natural CD52 soluble se pueden identificar por cribado de la secreción de CD52 soluble. Por tanto, las células cancerosas se pueden cribar por su capacidad de secretar CD52 soluble.

Los métodos de producción de la glucoproteína descrita en la presente memoria a partir de una célula hospedadora aislada que produce de manera natural CD52 soluble pueden comprender estimular la célula hospedadora para producir mayores niveles de CD52 soluble. Esto se puede conseguir, por ejemplo, poniendo en contacto la célula hospedadora con un antígeno. Se puede usar cualquier antígeno. En un ejemplo, el antígeno es un autoantígeno, tal como GAD65. En otro ejemplo, el antígeno es toxoide tetánico.

Los métodos de producción de la glucoproteína descrita en la presente memoria a partir de una célula hospedadora aislada que produce de manera natural CD52 soluble también pueden comprender seleccionar una célula que expresa de manera natural CD52 y poner en contacto la célula con una enzima capaz de escindir la porción extracelular de CD52 unido a membrana para liberar CD52 soluble. Las enzimas adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen fosfolipasas tales como fosfolipasa C.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar sobre células aisladas o poblaciones celulares de un tamaño suficiente para producir la cantidad deseada de CD52 soluble.

Células CD52^{hi}

La presente descripción también proporciona células aisladas y poblaciones celulares que presentan altos niveles de expresión de CD52. Por "alto (*high*)" se quiere decir que los niveles de expresión de CD52 son relativamente altos en comparación con los niveles de expresión de CD52 en una población dada de células. La población dada de células puede ser, por ejemplo, una población de linfocitos. La población de linfocito puede comprender células Treg y células no Treg. Además, la población de linfocito puede haberse puesto en contacto con un antígeno para estimular la actividad del linfocito. Alternativamente, la población de células puede ser células del tracto genital, tal como espermatozoides. Por el contrario, las células CD52^{lo} presentan niveles relativamente bajos de CD52 en relación con una población dada de células.

En un ejemplo, se puede determinar que una célula es una célula CD52^{hi} (del inglés, CD52^{high}) si el nivel de expresión de CD52 en esa célula cae dentro de los niveles de expresión de CD52 máximos de 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % en una población de células. Preferiblemente, una célula CD52^{hi} tiene un nivel de expresión dentro del máximo de 10 % de la expresión de CD52 observada en una población de células.

En un ejemplo, se puede determinar que una célula es una célula CD52^{lo} (del inglés CD52^{low}(bajo)) si el nivel de expresión de CD52 en esa célula cae dentro de los niveles de expresión de CD52 mínimos del 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % en una población de células. Preferiblemente, una célula CD52^{lo} tiene un nivel de expresión dentro del mínimo de 10 % de la expresión de CD52 observada en una población de células.

La célula CD52^{hi} se puede aislar de la población de células a partir de las que se identifica. Alternativamente, una población de células CD52^{hi} se pueden aislar de la población celular inicial de la que se identifican las células

CD52^{hi}. Por tanto, las poblaciones celulares descritas en la presente memoria se pueden enriquecer con células CD52^{hi}.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona una población celular aislada que comprende una pluralidad de células CD52^{hi}. Las células CD52^{hi} pueden comprender al menos 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70%, 80%, 90 % o 95 % de la población celular enriquecida total.

Las células CD52^{hi} aisladas y las poblaciones de células CD52^{hi} descritas en la presente memoria son capaces de producir la glucoproteína CD52 soluble descrita en la presente memoria.

Las células aisladas y las poblaciones celulares además se pueden definir por la presencia de uno o más marcadores celulares adicionales. En un ejemplo, las células CD52^{hi} son células CD4⁺CD52^{hi}. Alternativamente las células CD52^{hi} son células CD8⁺CD52^{hi}. Marcadores adicionales que caracterizan estas células incluyen uno cualquiera o más de proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducida por glucocorticoide (GITR, del inglés "Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor"), CD127, ligando Fas (FasL, del inglés "Fas Ligand" o CD95L), receptor de esfingosina-1-fosfato (S1PR, del inglés "Sphingosine-1-Phosphate Receptor"), la glucoproteína anclada a GPI CD24, CD25, FoxP3, CTLA-4, y otros marcadores, en cualquier combinación. Los inventores han encontrado que los niveles de expresión de GITR, CD127, Fas L, S1PR y CD24 pueden ser mayores en células Treg CD52^{hi} en comparación con células CD52^{lo}. Por lo tanto, estos marcadores se pueden usar para definir más una célula CD52^{hi} o una población de célula de CD52^{hi} como se describe en la presente memoria.

Además, la función de una célula dada se puede usar para definir una célula CD52^{hi} o una población de célula CD52^{hi} como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, se puede usar la capacidad de una célula que expresa CD52 para reducir la función del linfocito T efector como se describe en la presente memoria para identificar una célula CD52^{hi} o una población de célula CD52^{hi}.

Medio de cultivo celular

Las células CD52^{hi} o una población de célula CD52^{hi} como se describe en la presente memoria se puede cultivar para producir el medio que comprende la glucoproteína soluble descrita en la presente memoria. Las condiciones de cultivo adecuadas estarán claras para el experto en la técnica. Las células cultivadas además se pueden inducir para incrementar su nivel de expresión de CD52 soluble por cualquier método adecuado, incluyendo poner en contacto las células con antígeno.

Tratamiento celular ex vivo

La descripción de la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende células, preferiblemente células inmunes, y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde las células se han tratado ex vivo con uno cualquiera o más de:

- i) glucoproteína CD52 soluble,
- ii) una proteína de fusión que comprende la glucoproteína CD52 soluble como una primera proteína, y una segunda proteína;
- iii) un polinucleótido que codifica la porción de péptido de la glucoproteína CD52 soluble de la parte i) o la proteína de fusión de la parte ii);
- iv) un vector que comprende el polinucleótido de la parte iii);
- v) una célula aislada que comprende el polinucleótido de la parte iii) o el vector de la parte iv);
- vi) una célula CD52^{hi} aislada capaz de producir la glucoproteína CD52 soluble;
- vii) una población celular aislada que comprende una pluralidad de células CD52^{hi} capaces de producir la glucoproteína CD52 soluble;
- viii) el medio de cultivo celular, o una fracción del mismo que comprende la glucoproteína CD52 soluble, aislado de un cultivo celular que comprende la célula de la parte vi) o la población celular de la parte vii); y
- ix) un agente capaz de incrementar el nivel de expresión de la glucoproteína CD52 soluble por una célula;

Las células de la composición pueden ser, por ejemplo, sangre completa o una fracción celular de la misma tal como células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés "Peripheral Blood Mononuclear Cell").

Tales células tratadas ex vivo se pueden usar en la presente invención, por ejemplo, para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis.

En una realización, las células son autólogas con respecto al sujeto al que se administrarán. En otra realización, las células son alogénas.

Composiciones farmacéuticas

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera o más de la glucoproteína CD52 soluble, la proteína de fusión, el polinucleótido, el vector, la célula, las poblaciones celulares y el

medio celular descritos en la presente memoria, y cualquier agente capaz de incrementar el nivel de expresión de CD52 en una célula, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Un portador farmacéuticamente aceptable incluye un portador adecuado para su uso en la administración a animales, tales como mamíferos y al menos preferiblemente seres humanos. En un ejemplo, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o estatal o enumerado en la farmacopea americana u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, excipiente, o vehículo con el que se administra el compuesto terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

Las composiciones terapéuticas se pueden preparar mezclando los compuestos deseados que tienen el grado apropiado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales ("Remington's Pharmaceutical Sciences", 16^o edición, Osol, A. ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas, soluciones acuosas o suspensiones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son preferiblemente no tóxicos a recipientes a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como Tris, HEPES, PIPES, fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol bencílico o butílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabenos; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albumina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG). Ejemplos adicionales de tales portadores incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como albumina de suero humano, sustancias tampón tales como glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicérido parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales, o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona y sustancias basadas en celulosa.

Una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria se formula para ser compatible con su ruta prevista de administración. Ejemplos de rutas de administración incluyen parental (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intratecal), mucosa (por ejemplo, oral, rectal, intranasal, bucal, vaginal, respiratoria), enteral (por ejemplo, oralmente, tal como por comprimidos, cápsulas o gotas, rectalmente) y transdérmica (tópica, por ejemplo, epicutánea, por inhalación, intranasal, gotas de ojos, vaginal). Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica, enteral o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para la inyección, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilenodiaminotetraacético; tampones tales acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede meter en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiple de vidrio o plástico.

La administración transdérmica se lleva a cabo exponiendo el agente terapéutico a la piel de un paciente durante un periodo de tiempo prolongado. Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar administración controlada de un agente farmacéutico al cuerpo (véase, por ejemplo, "Transdermal and Topical Drug Delivery: From Theory to Clinical Practice", Williams (ed), Pharmaceutical Press, UK (2003); "Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives", Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989)). Por ejemplo, se puede preparar un parche adhesivo sencillo de un material de refuerzo y un adhesivo de acrilato. El agente terapéutico y cualquier potenciador se formulan dentro la solución de moldeado adhesiva y se deja mezclar a fondo. La solución se moldea directamente sobre el material de refuerzo y el disolvente de moldeado se evapora en un horno, dejando una película adhesiva. Se puede unir el papel antiadherente para completar el sistema.

Alternativamente, se puede emplear un parche de matriz de poliuretano para administrar el agente terapéutico. Las capas de este parche comprenden un refuerzo, una matriz fármaco/potenciador de poliuretano, una membrana, un adhesivo, y un papel antiadherente. La matriz de poliuretano se prepara usando un prepolímero de poliuretano de curado a temperatura ambiente. La adición de agua, alcohol y complejo al prepolímero da como resultado la formación de un elastómero firme pegajoso que se puede moldear directamente sobre el material de refuerzo.

Una realización adicional de esta invención utilizará un parche de matriz de hidrogel. Generalmente, la matriz de hidrogel comprenderá alcohol, agua, fármaco y varios polímeros hidrófilos. Esta matriz de hidrogel se puede incorporar dentro de un parche transdérmico entre el refuerzo y la capa adhesiva.

Para los sistemas de administración pasiva, la tasa de liberación generalmente se controla por una membrana colocada entre el reservorio y la piel, mediante difusión a partir de un dispositivo monolítico, o por la propia piel que sirve como una barrera que controla la tasa en el sistema de administración (véase, los documentos US 4.816.258; 4.927.408; 4.904.475; 4.588.580; 4.788.062). La tasa de administración dependerá, en parte, de la naturaleza de la membrana. Por ejemplo, la tasa de administración a través de las membranas dentro del cuerpo es generalmente mayor que a través de las barreras dérmicas.

Los materiales de membrana permeables adecuados se pueden seleccionar basándose en el grado deseado de permeabilidad, la naturaleza del complejo, y las consideraciones mecánicas en relación con la construcción del dispositivo. Materiales de membrana permeables ilustrativos incluyen una amplia variedad de polímeros naturales y sintéticos, tales como polidimetilsiloxanos (gomas de silicona), copolímero de etilenovinilacetato (EVA), poliuretanos, copolímeros poliuretano-poliéter, polietilenos, poliamidas, polivinilcloruros (PVC), polipropilenos, policarbonatos, politetrafluoroetilenos (PTFE), materiales celulósicos, por ejemplo, triacetato de celulosa y nitrato/acetato de celulosa, e hidrogeles, por ejemplo, 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA).

Otros productos pueden estar contenidos en el dispositivo, tales como otros componentes convencionales de productos terapéuticos, dependiendo de las características de dispositivo deseadas. Por ejemplo, las composiciones según la invención también pueden incluir uno o más conservantes o agentes bacteriostáticos, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, clorocresol, cloruros de benzalconio, y similares. Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener otros principios activos tales como agentes antimicrobianos, particularmente anticuerpos, anestésicos, analgésicos y agentes antipruríticos.

Otra realización de esta invención proporciona la administración tópica de la composición farmacéutica. Este régimen de tratamiento es adecuado o bien para la administración sistemática del agente farmacéutico o para la terapia localizada, es decir, directamente a tejido patológico o deseado. Las preparaciones tópicas se pueden preparar combinando el complejo agente farmacéutico-modificador químico con diluyentes y portadores farmacéuticos convencionales comúnmente usados en formulaciones tópicas secas, líquidas, en crema y aerosol. El ungüento y las cremas se pueden, por ejemplo, formular con una base acuosa o aceitosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Tales bases pueden incluir agua y/o un aceite tal como parafina líquida o un aceite vegetal tal como aceite de cacahuete o aceite de ricino. Los agentes espesantes que se pueden usar según la naturaleza de la base incluyen parafina suave, estearato de aluminio, alcohol cetosteárilico, propilenglicol, polietilenglicoles, lanolina, lanolina hidrogenada, cera de abeja y similares. Las lociones se pueden formular con una base acuosa o aceitosa y, en general, también pueden incluir uno o más de los siguientes: agentes estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, agentes colorantes, perfumes y similares. Los polvos se pueden formular con la ayuda de cualquier base en polvo adecuada, por ejemplo, talco, lactosa, almidón y similares. Las gotas se pueden formular con una base acuosa o base no acuosa también comprendiendo uno o más agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes solubilizadores y similares.

Las formas farmacéuticas para la administración tópica incluyen polvos, pulverizadores, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El principio activo se puede mezclar bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con algunos conservantes, tampones o propulsores que pueden ser requeridos. Los ungüentos, pastas, cremas y geles también pueden contener excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos. Los polvos y pulverizadores también pueden contener excipientes tales como lactosa, talco, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los pulverizadores además pueden contener propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

La administración mucosa de fármaco (por ejemplo, gastrointestinal, sublingual, bucal, nasal, pulmonar, vaginal, corneal, y membranas oculares) proporciona una entrada eficaz de sustancias activas a la circulación sistémica y reduce el metabolismo inmediato por la flora de la pared intestinal e hígado (véase, por ejemplo, Lee, 2001; Song et al., 2004; Hearnden et al., 2012). Las formas farmacéuticas de fármaco transmucosas (por ejemplo, comprimido, supositorio, ungüento, gel, pomadas, cremas, pesario, membrana y polvo) generalmente se mantienen en contacto con la membrana mucosa y se desintegran y/o disuelven rápidamente para permitir la inmediata absorción sistémica.

Para la administración a las membranas bucales o sublinguales, generalmente se usará una formulación oral, tal como pastilla para chupar, comprimido, o cápsula. El método de producción de estas formulaciones es conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, la adición del complejo agente farmacéutico-modificador químico a un comprimido preproducción; compresión fría de un relleno inerte, un aglutinante, y o bien un complejo agente farmacéutico-modificador químico o una sustancia que contiene el complejo (como se describe en el documento US 4.806.356) y la encapsulación.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Se pueden meter en cápsulas de gelatina o comprimir en comprimidos. Con el propósito de administración terapéutica oral, el principio activo se incorpora con los excipientes y se usa en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones

- orales también se pueden preparar usando un portador fluido para su uso como enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se agita y expectora o traga. Se pueden incluir agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, o aroma a naranja.
- 10 Otra formulación oral es una que se puede aplicar con un adhesivo, tal como el derivado de celulosa, hidroxipropil celulosa, a la mucosa oral, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.940.587. Esta formulación adhesiva bucal, cuando se aplica a la mucosa bucal, permite la liberación controlada del complejo agente farmacéutico-modificador químico en la boca y a través de la mucosa bucal.
- 15 Para la administración a las membranas nasales y/o pulmonares, generalmente se empleará una formulación en aerosol. El término "aerosol" incluye cualquier fase suspendida transmitida por gas del complejo agente farmacéutico-modificador químico que es capaz de ser inhalado dentro de los bronquiolos o fosas nasales. Específicamente, el aerosol incluye una suspensión transmitida por gas de gotitas de los compuestos de la presente invención, ya que se puede producir en un inhalador o nebulizador de dosis medida, o en un pulverizador de vapor. El aerosol también incluye una composición en polvo seco del complejo agente farmacéutico-modificador químico suspendido en aire u otro gas portador, la cual se puede administrar por inhalación a partir de un dispositivo inhalador.
- 20 Para la administración mucosa o transdérmica, se pueden usar en la formulación los penetrantes apropiados a la barrera a penetrar. Tales penetrantes generalmente son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración mucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico.
- 25 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando soluble en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacterioestática, Cremophor™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés "Phosphate Buffered Saline"). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida hasta el punto en el que existe fácil capacidad de administrar en jeringuilla. Debe ser estable bajo las condiciones de producción y almacenamiento y se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador es un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se mantiene, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y similares. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se ocasiona incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- 30 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el principio activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes anteriormente enumerados, como se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los anteriormente enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de la preparación son secado en vacío y liofilización los cuales producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril del mismo.
- 40 Un vehículo farmacéuticamente aceptable se entiende que designa un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica que no causa efectos secundarios y que hace posible, por ejemplo, facilitar la administración del principio activo, incrementar su vida y/o su eficacia en el cuerpo, incrementar su solubilidad en la solución o alternativamente aumentar su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y serán adaptados por los expertos en la técnica según la naturaleza y el modo de administración del principio activo elegido.
- 50 Las composiciones farmacéuticas a usar para la administración *in vivo* deberían ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o después de la liofilización y la reconstitución. La composición se puede almacenar en forma liofilizada o en solución si se administra sistémicamente. Si es en forma liofilizada, generalmente se formula en combinación con otros ingredientes para la reconstitución con un diluyente apropiado en el momento de uso. Un ejemplo de una formulación líquida es una solución no conservada estéril, clara, incolora rellena en un vial de dosis única para la inyección subcutánea.
- 55

Las composiciones farmacéuticas generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. Las composiciones preferiblemente se administran parenteralmente, por ejemplo, como inyecciones intravenosas o infusiones o se administran en una cavidad corporal.

- 5 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria además pueden comprender un agente terapéutico adicional conocido por suprimir la función del linfocito T efector y/o una respuesta inmune.

En una realización, la composición además comprende insulina.

En otra realización, la composición comprende además un autoantígeno. Ejemplos de autoantígenos útiles en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, los enumerados en la Tabla 1 (Lernmark, 2001).

- 10 Tabla 1. Autoantígenos recombinantes o purificados reconocidos por autoanticuerpos asociados con trastornos autoinmunes humanos.

Autoantígeno	Enfermedad autoinmune
A. Autoinmunidad específica a célula u órgano	
Receptor de Acetilcolina	Miastenia gravis
Actina	Hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria
Translocador de nucleótido de adenina (ANT, del inglés "Adenine Nucleotide Translocator")	Cardiomiopatía dilatada, miocarditis
β -Adrenoreceptor	Cardiomiopatía dilatada
L-aminoácido aromático descarboxilasa	Síndrome poliendocrino autoinmune tipo I (SPA-I)
Receptor de asialoglicoproteína	Hepatitis autoinmune
Proteína de incremento de permeabilidad/bactericida (Bpi)	Vasculitis fibrosis quística
Receptor sensible a calcio	Hipoparatiroidismo adquirido
Enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol (CYP11a)	SPA-I
cadena α_3 de colágeno tipo IV	Síndrome de Goodpasture
Desmina de citocromo P450 2D6 (CYP2D6)	Hepatitis Autoinmune
Desmina	Enfermedad de Crohn, enfermedad de arteria coronaria
Desmogleina 1	Pénfigo foliáceo
Desmogleina 3	Pénfigo vulgar
F-actina	Hepatitis autoinmune
gangliósidos GM	Síndrome de Guillain-Barré
Glutamato descarboxilasa (GAD65)	Diabetes tipo 1, síndrome de la persona rígida
Receptor de glutamato (GLUR, del inglés "Glutamate Receptor")	Encefalitis de Rasmussen
H/K ATPasa	Gastritis autoinmune
17- α -Hidroxilasa (CYP17)	SPA-I
21-Hidroxilasa (CYP21)	Enfermedad de Addison
IA-2 (ICA512)	Diabetes tipo 1
Insulina	Diabetes tipo 1, síndrome hipoglucémico de insulina

	(enfermedad de Hirata)
Autoantígeno	Enfermedad autoinmune
Receptor de insulina	Resistencia a insulina Tipo B, acantosis, lupus eritematoso sistémico (LES)
Factor tipo I intrínseco	Anemia perniciosa
Antígeno asociado a la función de leucocito (LFA-1, del inglés "Leukocyte Function-associate Antigen")	Artritis de Lyme resistente a tratamiento
Glucoproteína asociada a mielina (MAG, del inglés "Myelin-Associate Glycoprotein")	Polineuropatía
Proteína básica de mielina	Esclerosis múltiple, enfermedades de desmielinación
Glucoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG, del inglés "Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein")	Esclerosis múltiple
Miosina	Fiebre reumatoide
p-80-Coilina	Dermatitis atópica
Complejo-E2 de piruvato deshidrogenasa (PDC-E2, del inglés "Pyruvate Dehydrogenase Complex-E2")	Cirrosis biliar primaria
Simportador de yoduro sódico (NIS, del inglés "Sodium Iodide Symporter")	Enfermedad de Graves, hipotiroidismo autoinmune
SOX-10	Vitiligo
Proteína compartida con tiroides y músculo ocular	Oftalmopatía asociada a tiroides
Tiroglobulina	Tiroiditis autoinmune
Peroxidasa tiroidea	Tiroiditis de Hashimoto autoinmune
Receptor de tirotropina	Enfermedad de Graves
Transglutaminasa de tejido	Enfermedad celiaca
Coactivador p75 de transcripción	Dermatitis atópica
Triptófano hidroxilasa	SPA-I
Tirosinasa	Vitiligo, melanoma metastático
Tirosina hidroxilasa	SPA-I
B. Autoinmunidad sistémica	
ACTH	Deficiencia de ACTH
Aminoacil-tARN histidil sintetasa	Miositis, dermatomiositis
Aminoacil-tARN sintetasa (varias)	Polimiositis, dermatomiositis
Cardiolipina	LES
Anhidrasa carbónica II	LES, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica
Colágeno (tipos múltiples)	Artritis reumatoide (AR), LES, esclerosis sistémica progresiva
Proteínas asociadas a centrómero	Esclerosis sistémica
ATPasa estimulada por nucleosoma dependiente de ADN	Dermatomiositis

Autoantígeno	Enfermedad autoinmune
Fibrilarina	Escleroderma
Fibronectina	LES, AR, morfea
Glucosa-6-fosfato isomerasa	AR
B32-Glicoproteína I (β 32-GPI)	Síndrome antifosfolípido primario
Golgin (95, 97, 160, 180)	Síndrome de Sjögren, LES, AR
Proteína de choque térmico	Diversos trastornos inmuno-relacionados
Proteína hemidesmosómica 180	Penfigoide ampoloso, herpes gestationis, penfigoide cicatrizal

Métodos de tratamiento

La glucoproteína CD52 soluble, la proteína de fusión, el polinucleótido, el vector, la célula, las poblaciones celulares, el medio celular y la composición farmacéutica descritos en la presente memoria, y cualquier agente capaz de incrementar el nivel de expresión de CD52 en una célula, se pueden usar para suprimir la función del linfocito T efector, inflamación o sepsis. Por tanto, la glucoproteína CD52 soluble, la proteína de fusión, el polinucleótido, el vector, la célula, las poblaciones celulares, el medio celular y la composición farmacéutica descritos en la presente memoria, y cualquier agente capaz de incrementar el nivel de expresión de CD52 en una célula, se pueden usar para tratar cualquier enfermedad o afección mediada por los linfocitos T efectores, implicando inflamación o sepsis.

En un ejemplo, la enfermedad o afección mediada por los linfocitos T efectores puede ser una enfermedad autoinmune, rechazo a aloinjerto, una reacción injerto-contra-huésped, o una enfermedad alérgica. El término "enfermedad autoinmune" se refiere a cualquier enfermedad en la que el cuerpo produce una respuesta inmunógeno (es decir, del sistema inmune) a algún constituyente de su propio tejido. Las enfermedades autoinmunes se pueden clasificar en aquellas en las que predominantemente está afectado un órgano (por ejemplo, anemia hemolítica y tiroiditis autoinmune), y aquellas en las que el proceso de la enfermedad autoinmune se dispersa a través de muchos tejidos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico). La enfermedad autoinmune puede ser (pero no se limita a) una cualquiera o más de diabetes mellitus dependiente de insulina (o diabetes tipo 1), síndrome autoinmune de insulina, artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis de Lyme crónica, lupus, esclerosis múltiple, enfermedad de intestino inflamatorio incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, enfermedad tiroidea autoinmune, miocarditis autoinmune, hepatitis autoinmune, pénfigo, enfermedad de antimembrana basal tubular (riñón), cardiomiopatía dilatada familiar, síndrome de Goodpasture, síndrome de Sjogren, miastenia gravis, insuficiencia poliendocrina, vitiligo, neuropatía periférica, síndrome poliglandular autoinmune tipo I, glomerulonefritis aguda, hipoparatiroidismo idiopático de aparición en adulto (AOIH, del inglés "Adult-Onset Idiopathic Hypoparathyroidism), alopecia total, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, enfermedad de Addison, síndrome de berilio crónico, espondilitis anquilosante, dermatomiositis juvenil, policondritis, escleroderma, enteritis regional, ileítis distal, enteritis granulomatosa, ileítis regional, e ileítis terminal, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, anemia aplásica autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Behcet, enfermedad celiaca, hepatitis activa crónica, síndrome de CREST, dermatomiositis, cardiomiopatía dilatada, síndrome de eosinofilia-mialgia, epidermólisis ampollar adquirida (EAA), arteritis de célula gigante, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain-Barré, hemocromatosis, púrpura de Henoch-Schonlein, nefropatía de IgA idiopática, síndrome autoinmune de insulina, artritis reumatoide juvenil, síndrome de Lambert-Eaton, dermatosis de IgA lineal, miocarditis, narcolepsia, vasculitis necrotizante, síndrome del lupus eritematoso neonatal (LEN), síndrome nefrótico, penfigoide, pénfigo, polimiositis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis, glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP), síndrome de Reiter, síndrome de persona rígido, enfermedad del intestino inflamatorio, osteoartritis, tiroiditis y otros. En un ejemplo, la enfermedad autoinmune es diabetes tipo I. En otro ejemplo, la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide. En otro ejemplo, la afección es un rechazo a injerto o una reacción injerto-contra-huésped. Por tanto, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender administrar una cualquiera o más de la glucoproteína CD52 soluble, la proteína de fusión, el polinucleótido, el vector, la célula, las poblaciones celulares, el medio celular, el agente y la composición farmacéutica a un receptor de trasplante.

La enfermedad alérgica puede ser (pero no se limita a) una cualquiera o más de una alergia alimenticia, alergia transmitida por el aire, alergia al ácaro del polvo de casa, alergia a gato, o alergia al veneno de la abeja, u otra alergia.

La inflamación puede surgir como respuesta a una lesión o estimulación anormal causada por un agente físico, químico o biológico. Una reacción de inflamación puede incluir las reacciones locales y los cambios morfológicos

resultantes, la destrucción o separación del material perjudicial tal como un organismo infeccioso, y las repuestas que conducen a reparación y cura.

La inflamación se da en trastornos inflamatorios. El término “inflamatorio” cuando se usa en referencia a un trastorno se refiere a un proceso patológico que es causado por, resultante de, o como resultado de la inflamación que es inapropiada o que no se resuelve de la manera normal. Los trastornos inflamatorios pueden ser sistémicos o estar localizados en tejidos u órganos particulares. Se sabe que la inflamación se da en muchos trastornos (algunos de los cuales son enfermedades autoinmunes) que incluyen, pero no se limitan a, respuesta inflamatoria sistémica (RIS); Enfermedad de Alzheimer (y afecciones y síntomas asociados que incluyen: neuroinflamación crónica, activación glial; microglía aumentada; formación de placa neurítica; esclerosis lateral amiotrófica (ELA), artritis (y afecciones y síntomas asociados que incluyen, pero no se limitan a: inflamación de articulación aguda, artritis inducida por antígeno, artritis asociada a tiroiditis linfocítica crónica, artritis inducida por colágeno, artritis juvenil, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis inducida por prognosis y *streptococcus*, espondiloartropatías, y artritis de gota), asma (y afecciones y síntomas asociados, incluyendo: asma bronquial; enfermedad de las vías aéreas obstructivas crónicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma juvenil y asma ocupacional); enfermedades cardiovasculares (y afecciones y síntomas asociados, incluyendo aterosclerosis, miocarditis autoinmune, hipoxia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de arteria coronaria, cardiomiopatía y disfunción celular cardíaca, incluyendo: activación de célula de músculo liso aórtico, apoptosis de célula cardíaca e inmunomodulación de la función de la célula cardíaca); diabetes (y afecciones asociadas, incluyendo diabetes autoinmune, diabetes dependiente de insulina (Tipo I), periodontitis diabética, retinopatía diabética, y nefropatía diabética); inflamaciones gastrointestinales (y afecciones y síntomas relacionados, incluyendo enfermedad celíaca, osteopenia asociada, colitis crónica, enfermedad de Crohn, enfermedad de intestino inflamatorio y colitis ulcerosa); úlceras gástricas; inflamaciones hepáticas tales como tipos víricos y otros de hepatitis, cálculos biliares de colesterol y fibrosis hepática; infección por VIH (y afecciones asociadas, incluyendo respuestas degenerativas, respuestas neurodegenerativas, y Enfermedad de Hodgkin asociada a VIH); Síndrome de Kawasaki (y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo el síndrome del nodo linfático mucocutáneo, linfadenopatía cervical, lesiones de la arteria coronaria, edema, fiebre, leucocitos incrementados, anemia leve, descamación de la piel, sarpullido, rojez conjuntiva, trombocitosis); nefropatías (y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo nefropatía diabética, fase final de la enfermedad renal, glomerulonefritis aguda y crónica, nefritis intersticial aguda y crónica, nefritis lúpica, síndrome de Goodpasture, supervivencia a hemodiálisis y lesión de reperfusión isquémica renal); enfermedades neurodegenerativas o afecciones neuropatológicas (y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo neurodegeneración aguda, inducción de IL-1 en el envejecimiento y enfermedad neurodegenerativa, plasticidad inducida por IL-1 de neuronas hipotálamicas e hipersensibilidad al estrés crónico, mielopatía); oftalmopatías (y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo retinopatía diabética, oftalmopatía de Graves, inflamación asociada con la lesión corneal o infección incluyendo ulceración corneal, y uveitis), osteoporosis (y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo la incidencia de pérdida o fractura de hueso alveolar, femoral, radial, vertebral o de muñeca, pérdida de hueso postmenopáusico, incidencia de fractura o tasa de pérdida de hueso), otitis media (adulto o pediátrica); pancreatitis o ascitis pancreática; enfermedad periodontal (y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo adultas, de aparición temprana y diabéticas); enfermedades pulmonares, incluyendo enfermedad de pulmón crónica, sinusitis crónica, enfermedad de membrana de hialina, hipoxia y enfermedad pulmonar en SMSL; restenosis de injertos coronarios u otros vasculares; reumatismo incluyendo artritis reumatoide, cuerpos de Aschoff reumatoideos, enfermedades reumáticas y miocarditis reumática; tiroiditis incluyendo tiroiditis linfocítica crónica; infecciones del tracto urinario incluyendo prostatitis crónica, síndrome del dolor pélvico crónico y urolitiasis; enfermedades inmunológicas, incluyendo enfermedades autoinmunes, tales como alopecia aerata, miocarditis autoinmune, enfermedad de Graves, oftalmopatía de Graves, Liqueur escleroso, esclerosis múltiple, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, enfermedades del tiroides (por ejemplo, bocio y struma linfomatoso (tiroiditis de Hashimoto, bocio linfadenóide); lesión de pulmón (lesión del pulmón hemorrágica aguda, síndrome de Goodpasture, reperfusión isquémica aguda), disfunción miocárdica, causada por contaminantes laborales y ambientales (por ejemplo, susceptibilidad a silicosis del síndrome de aceite tóxico), trauma por radiación, y eficacia de las respuestas de cura de herida (por ejemplo, heridas de quemadura o térmicas, heridas crónicas, heridas quirúrgicas y lesiones del cordón espinal), septicemia, respuesta a la fase aguda (por ejemplo, respuesta febril), respuesta inflamatoria general, respuesta a fatiga respiratoria aguda, respuesta inflamatoria sistémica aguda, cura de herida, adhesión, respuesta inmuno-inflamatoria, respuesta neuroendocrina, desarrollo de fiebre y resistencia, respuesta a la fase aguda, respuesta al estrés, susceptibilidad a la enfermedad, estrés del movimiento repetido, codo de tenista, y manejo y respuesta al dolor.

Los métodos del tratamiento pueden comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una cualquiera o más de la glucoproteína CD52 soluble, la proteína de fusión, el polinucleótido, el vector, la célula, las poblaciones celulares, el medio celular, o la composición farmacéutica descritos en la presente memoria, o cualquier agente capaz de incrementar el nivel de expresión de CD52 en una célula, a un sujeto en necesidad de lo mismo

La “cantidad terapéutica eficaz” se puede determinar por un médico y puede variar de un paciente a otro, dependiendo de factores tales como edad, peso, género y otros factores.

Métodos diagnósticos

Basándose en los descubrimientos de los inventores de que CD52 soluble es un mediador de la función de Treg, la presente descripción también proporciona métodos de determinación de la susceptibilidad de un sujeto a cualquier enfermedad o afección mediada por los linfocitos T efectores, inflamación o sepsis como se describe en la presente memoria. Los métodos diagnósticos se pueden basar en la detección de una cualquiera o más del nivel de CD52 soluble, la frecuencia de células CD52^{hi} y la función de las células CD52^{hi} en una muestra tomada del sujeto.

El nivel de CD52 soluble se puede determinar por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el nivel de CD52 soluble se puede determinar por inmunoensayo, usando anticuerpos que se unen a CD52 soluble. Los anticuerpos adecuados incluyen el anticuerpo monoclonal de rata humanizado CAMPATH-1G, los anticuerpos monoclonales de ratón marcados con fluorescente para CD52 humana (tal como CF1D12), anticuerpo policlonal de conejo para CD52 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) y otros.

La frecuencia de células CD52^{hi} se puede detectar, por ejemplo, detectando el nivel de CD52 unida a membrana celular en la muestra, detectando el nivel de expresión de proteína CD52 en la muestra, y/o detectando el nivel de expresión de ARNm de CD52 en la muestra.

La función de las células CD52^{hi} se puede determinar usando cualquier método adecuado, incluyendo cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

Los métodos diagnósticos se pueden realizar sobre cualquier muestra adecuada tomada del sujeto. En un ejemplo, la muestra se toma de un sujeto de mamífero tal como un sujeto humano, y puede originarse de un número de fuentes, incluyendo, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PMBC), producto sanguíneo de leucoféresis o aféresis, médula ósea, sangre umbilical, hígado, timo, biopsia de tejido, tumor, tejido de nodo linfático, tejido linfático asociado a intestino, tejido de nodo linfático asociado a mucosa, tejido de bazo, o cualquier otro tejido linfático, o de cualquier sitio de enfermedad, incluyendo el páncreas. En una realización preferida, la muestra celular se origina de PBMC de una muestra de sangre obtenida de la sangre periférica de un sujeto.

Los métodos diagnósticos pueden comprender detectar el nivel de una cualquiera o más de CD52 soluble, la frecuencia de células CD52^{hi} y la función de las células CD52^{hi} en una muestra que comprende PMBC que se han puesto en contacto con un antígeno. Por tanto, los métodos pueden comprender una etapa de puesta en contacto de la muestra con un antígeno. En un ejemplo, el antígeno puede ser un autoantígeno.

En una aplicación particular de los métodos diagnósticos descritos en la presente memoria, se pueden determinar el nivel de CD52 soluble, la frecuencia de células CD52^{hi} y/o la función de las células CD52^{hi} para identificar la idoneidad de un sujeto para entrar en un ensayo de cribado de fármaco. Por tanto, si un sujeto presenta un nivel inferior de glucoproteína CD52 soluble, una frecuencia inferior de células CD52^{hi}, y/o una función disminuida de las células CD52^{hi}, ese sujeto se puede identificar como particularmente adecuado para la inclusión en un ensayo de cribado para un fármaco destinado a usarse en el tratamiento de cualquier enfermedad o afección mediada por los linfocitos T efectores, inflamación, o sepsis, como se describe en la presente memoria. En un ejemplo, el cribado se puede realizar para identificar fármacos antidiabéticos putativos (en particular, fármacos anti-diabetes tipo 1).

Los métodos diagnósticos descritos en la presente memoria además pueden comprender una etapa de determinación de un nivel de referencia de CD52 soluble, de la frecuencia de células CD52^{hi} y/o de la función de las células CD52^{hi} de una muestra tomada de uno o más sujetos sanos. Alternativamente, se puede predeterminar el nivel de referencia. Comparar el nivel de CD52 soluble, la frecuencia de células CD52^{hi} y/o la función de las células CD52^{hi} en una muestra tomada de un sujeto al nivel de referencia puede indicar la susceptibilidad del sujeto a cualquier enfermedad o afección mediada por linfocitos T efectores, inflamación, o sepsis, como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, si el nivel de CD52 soluble, la frecuencia de células CD52^{hi} y/o la función de las células CD52^{hi} en la muestra tomada de un sujeto es inferior al nivel de referencia, ese sujeto se puede considerar que es más susceptible a desarrollar una enfermedad o afección mediada por linfocitos T efectores, inflamación o sepsis, como se describe en la presente memoria. Una diferencia mayor entre el nivel de muestra y el nivel de referencia puede indicar una mayor susceptibilidad del sujeto a desarrollar una enfermedad o afección mediada por los linfocitos T efectores, inflamación o sepsis, como se describe en la presente memoria. Se apreciará que los valores exactos que indican un riesgo incrementado de un sujeto a desarrollar una enfermedad o afección mediada por los linfocitos T efectores, inflamación, o sepsis, variará dependiendo de un número de factores que incluyen la enfermedad o afección particular que está diagnosticada, la muestra usada para el diagnóstico, la población de individuos sanos usados para preparar el nivel de referencia, y otros factores como será entendido por un experto en la técnica.

La presente descripción también proporciona un método de cribado para un agente capaz de suprimir la función del linfocito T efector y/o una respuesta inmune, comprendiendo el método poner en contacto una célula o población celular descrita en la presente memoria (por ejemplo, una célula o población de célula CD52^{hi}) con agente de ensayo y posteriormente detectar el nivel de CD52 soluble, la frecuencia de células CD52^{hi} y/o la función de las células CD52^{hi}, en donde un nivel mayor de glucoproteína CD52 soluble, una mayor frecuencia de células CD52^{hi}, y/o una función aumentada de las células CD52^{hi} después de poner en contacto con el agente de ensayo indica que el agente de ensayo puede ser potencialmente adecuado para su uso como agente capaz de suprimir la función del linfocito T efector y/o una respuesta inmune.

En otra realización, la presente descripción también proporciona un método de identificación de un agente capaz de imitar la supresión del linfocito T efector, y/o la supresión del sistema inmune, función de una glucoproteína CD52 soluble, comprendiendo el método poner en contacto una célula o población celular descrita en la presente memoria (por ejemplo, una célula o población de célula CD52^{hi}) con un agente de ensayo y detectar posteriormente el nivel de CD52 soluble, la frecuencia de células CD52^{hi} y/o la función de las células CD52^{hi}, en donde un nivel menor de glucoproteína CD52 soluble, una frecuencia menor de células CD52^{hi}, y/o una función reducida de las células CD52^{hi} después de poner en contacto con el agente de ensayo indica que el agente de ensayo es capaz de imitar la supresión del linfocito T efector, y/o la supresión del sistema inmune, la función de una glucoproteína CD52 soluble.

A continuación, la invención se describirá más en referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Procedimientos experimentales

Donantes de sangre

Se obtuvo sangre venosa metida en tubos de heparina sódica con consentimiento informado y aprobación por el Comité Ético de Investigación en Humanos a partir de 5 adultos jóvenes sanos (3 hombres, 2 mujeres) y un hombre adulto joven en riesgo de DT1, todos conocidos por tener respuestas de linfocito T en sangre a GAD65. Todos los donantes habían sido vacunados para toxoide tetánico. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en Ficoll/Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia), se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de tonicidad humana y se suspendieron de nuevo en medio de Dulbecco modificado de Iscove (Gibco, Melbourne, Australia) que contenía suero humano inactivado por calor, agrupado al 5 %, aminoácidos no esenciales 100 mM, glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M (medio de Dulbecco modificado de Iscove [IMDM, del inglés "Iscove's modified Dulbecco's médium"] completo).

Anticuerpos y otros reactivos

Los reactivos y los proveedores son los siguientes: anticuerpos monoclonales de ratón marcados con fluorescente para CD52 humana (clon CF1D12) y CD24 (clon SN3) (Caltag), FoxP3, GTR, ICOS, CD25, CD127 y Siglec-10 humana (clon 5G6) (Biolegend, San Diego, CA, USA); IgG3 de ratón (Caltag); anticuerpo policlonal de conejo para CD52 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón de caballo conjugado con HRP (Cell Signaling, Arundal, QLD, Australia); reactivo ECL (GE Healthcare, Rydalmere, NSW, Australia), anticuerpo monoclonal de rata humanizado (CAMPATH-1G) a CD52 (Bayer Healthcare, Pymble, NSW, Australia), anticuerpos monoclonales de ratón para IFN- γ humano (Mabtech, Sídney, NSW, Australia), y IL-10Ra (clon 37607), anti-TGF- β R2 humano de cabra y anticuerpo de cabra purificado por afinidad para Siglec-10 humana y Siglec-10-Fc humana recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN); IL-2 (NCIBRB Preclinical Repository, Rockville, MD); péptido de CD52 humana sintético (GL Biochem, Shanghai); indometacina, nitro-L-arginina metiléster, 1-metil-d1-triptófano, SCH58261 (antagonista del receptor de adenosina A2A) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA); neuraminidasa (*C. perfringens* tipo V) (Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia); ^3H -timidina (ICN, Sídney, Australia); transwells Corning Costar de 0,4 μm (Crown Scientific, Minto, NSW, Australia); Proteína G y A-Sefarosa (WEHI Monoclonal Lab, Bundoora, Victoria Australia), inhibidores de fosfolipasa C (U7322) y D (1,10-fenantrolina) (Sigma-Aldrich Pty. Ltd. NSW, Australia), fosfolipasa C (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), PNGasa F (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), Strep-Tactin Sefarosa (IBA GmbH Göttingen, Alemania). El toxoide tetánico (TT) fue proporcionado generosamente por CSL (Parkville, Victoria, Australia). GAD65 recombinante producido en Baculovirus y purificado como se describió (Bach et al., 1997) se adquirió del Dr. Peter Van Endert, Hôpital Necker, París. La concentración de endotoxina de la solución madre de GAD65, medida por ensayo de lisado de Limulus (BioWhittaker, Walkerville, MD, USA), era de 1,2 EU/mg/ml. TT y GAD65 se usaron a concentraciones de 10 unidades de floculación de Lyons (ufl)/ml y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente, a menos que se indique lo contrario. Las citoquinas y el receptor- α de IL-2 soluble (CD25) se ensayaron en medios por matrices de microesferas MAP Milliplex (Abacus ALS, Brisbane, Australia).

Análisis estadístico

Los replicados se expresaron como media $\pm$ eem. Las significancia entre grupos se determinó por la prueba t de Student desapareada (2 colas), usando GraphPad Prism versión 3,0cx para Macintosh (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Ejemplo 1: Análisis de clones de linfocito T CD4⁺ específicos a GAD65

Métodos

Se descongelaron y cultivaron clones de linfocito T CD4⁺ específicos a GAD65, previamente generados y cribados para la función supresora específica a GAD65, como se describió (Dromey et al., 2011). Inicialmente, los clones supresores y no supresores se cribaron para marcadores superficiales frente a una matriz de anticuerpos de fase sólida (Medsaic Ptd Ltd, Sídney, Australia) (Belov et al., 2003). Los clones (1×10^6) se tomaron directamente del

cultivo y se analizaron en reposo o después de la estimulación durante 24 h con anti-CD3 unido a placa (5 µg/ml). Para el fenotipado por citometría de flujo, las células se tiñeron sobre hielo con las concentraciones apropiadas de anticuerpos marcados. Se combinó la tinción para FoxP3 intracelular y CTLA-4 intracelular.

Resultados

- 5 El cribado de los pares de clones supresores y no supresores autólogos para diferencias en el fenotipo de superficie usando una matriz de anticuerpo CD reveló que los clones supresores activados se encontraron consecuentemente que tenían mayor expresión de CD52, un resultado que se confirmó por citometría de flujo (véase Figura 1). Por tanto, CD52 se identificó como un marcador potencial de células Treg.

Ejemplo 2: Análisis de linfocitos T CD4⁺CD52^{hi} en sangre

10 Métodos

Se cultivaron PBMC teñidas con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE) en IMDM en placas de fondo redondo de 96 pocillos, sin o con GAD65 o TT, a 2×10^5 en 200 µl en replicados de seis. Después de 7 días, los replicados se agruparon, lavaron en PBS con BSA al 0,1 % y se tiñeron sobre hielo con anticuerpos anti-CD4-PE, -PECy7 o -APC y CD52-PE humanos (clon CF1D12). Las células CD4⁺ CFSE^{tenue} viables (propidio-yodo negativo) que se habían sometido a división en respuesta a GAD65 se clasificaron en un FACSAria (BD Biosciences, North Ryde, NSW, Australia) en fracciones con la expresión de CD52 más alta a la más baja, y células únicas clonadas como se describió (Dromey et al., 2011). Posteriormente, en respuesta a GAD65 o TT, poblaciones de CD52^{hi} y CD52^{lo} correspondientes, respectivamente, al máximo de 10 % y al mínimo de 10 % de la expresión de CD52 sobre las células CD4⁺ no divididas se clasificaron para estudio adicional. Estos puntos de corte se eligieron debido a que la mayoría de los clones supresores específicos a GAD65 generados eran a partir del máximo de 10 % de células CD52⁺ (véase Tabla 1).

Al usar PBMC del mismo donante durante 4 semanas consecutivas, el coeficiente de interensayo de la variación de la relación de CD52^{hi} y CD52^{lo} en respuesta a GAD65 era del 21,8 %. Las PBMC en reposo se clasificaron en células CD4⁺CD52^{hi} y CD52^{lo}, y también se recogieron las no clasificadas como control. En experimentos separados, antes de la marcación con CFSE, las PBMC se sometían a agotamiento de células CD25⁺ por selección AutoMACS (Miltenyi Biotec); se usaron anticuerpos monoclonales emparejados a isotipo para "agotamientos" de control.

La función de las células CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo} activadas por GAD65 o TT se analizó de dos maneras. Primero, se cocultivaron células CD52^{hi} o CD52^{lo} clasificadas con linfocitos T CD4⁺ activados por TT a una relación 1:1 (1×10^4 /pocillo) en 6 pocillos de una placa de 96 pocillos. Cada pocillo también contenía 5×10^4 PBMC autólogas irradiadas como APC y TT para estimular la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ activados por TT. Se añadió GAD65 a 3 de los 6 pocillos para estimular de nuevo las células clasificadas. Como control, las PBMC irradiadas también se cultivaron con o sin GAD65. Después de 48 h, se añadió ³H timidina (37 kBq) a cada pocillo, y las células se recolectaron 16 h después. Segundo, las células CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo} clasificadas (5 a 20.000 cada una) se cultivaron solas o en combinación en una relación 1:1 en 6 pocillos replicados de una placa de ELISpot de 96 pocillos (Millipore PVDF MultiScreen HTS) que contenía anticuerpo anti-IFN-γ previamente unido. Cada pocillo también contenía cuatro veces el número de PBMC autólogas irradiadas como APC. Se añadió GAD65 o TT a 3 de los 6 pocillos para estimular de nuevo las células clasificadas. Después de 24 h, las células se separaron lavando y se desarrollaron manchas por incubación con el segundo anticuerpo biotinilado, seguido de estreptavidina-alcalina fosfatasa y reactivo de color BCIP/NBT. Los resultados se expresaron como manchas de IFN-γ/5.000 células CD4⁺.

40 Resultados

Se encontró que una mayoría (22/29, 76 %) de los clones supresores específicos a GAD65 eran derivados de linfocitos T CD4⁺ activados por GAD65 con la mayor expresión de CD52 (máximo 10 %) (Tabla 1). Por tanto, los clones supresores parecían estar derivados de linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} sanguíneos primarios en lugar de ser un artefacto de las condiciones de clonación.

45 Tabla 1: Clones supresores derivados de linfocitos T CD4⁺ activados por GAD65 fraccionados según la expresión de CD52*

Fracción CD52 ⁺	Número de clones generados	Clones supresores específicos a GAD65 (%)
Máximo 5 %	86	9 (10,5)
Máximo 10 %	94	13 (13,8)
Máximo 20 %	87	5 (5,7)
Mínimo 80 %	60	2 (3,3)

* Las PBMC de un individuo sano conocido por tener linfocitos T reactivos por GAD65 se marcaron con CFSE y se incubaron con GAD65 durante 7 días. De cada fracción de CD52⁺, 240 células CD4⁺ CFSE^{tenue} viables (propidio-

yodo negativo) únicas que se habían sometido a división se clasificaron por FACS en pocillos de placas de 96 pocillos y se clonaron como se describió previamente (Dromey et al., 2001).

†Correspondiente a la expresión de CD52 sobre linfocitos T CD4⁺ no divididos.

Ya que la mayoría de los clones supresores CD4⁺ específicos a GAD65 se derivaban de células divididas con expresión de CD52 correspondiente al máximo de 10 % sobre las células CD4⁺ no divididas este umbral se podía usar para definir una población de CD4⁺ CD52^{hi} después de la activación. Cuando se reactivaban con GAD65, las células CD4⁺ CD52^{hi} pero no CD52^{lo} clasificadas suprimieron la proliferación de linfocitos T CD4⁺ específicos a TT autólogos (Figura 2A). Para asegurar que esa supresión fuera específica para células CD52^{hi} y no debido al método de su selección de células CD4⁺ activadas con GAD65 se clasificaron para la alta expresión de otras dos glucoproteínas ancladas a GPI, CD24 y CD59, así como para CD62L, HLA-DR, CD80 e ICOS, pero estas poblaciones no suprimieron la proliferación de linfocitos T específicos a TT (datos no mostrados).

Las diferencias funcionales entre las células CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo} clasificadas después de la reactivación con GAD65 también se demostraron por ensayo ELISpot. Una proporción menor de células CD52^{hi} que de CD52^{lo} secretó IFN-γ y la adición de células CD52^{hi} a CD52^{lo} redujo el número de células secretoras de IFN-γ en respuesta a la reactivación [comparar CD52^{hi}+CD52^{lo} (p<0,002) con células CD52^{lo}+CD52^{lo} (p<0,0002) en la Figura 2B]. La supresión no era única a linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} activados por GAD65 y también se observaron cuando se usó toxoide tetánico (TT) como el antígeno de activación (Figura 2C). Debido a que las respuestas del linfocito T a TT eran más fuertes, estudios posteriores mayormente emplearon TT como antígeno. El suplemento con una concentración baja de IL-2 (10 U/ml) incrementó el número de tanto células secretoras de IFN-γ CD52^{hi} como CD52^{lo} en respuesta a la reactivación, pero no alteraron la supresión por células CD52^{hi} (Figura 2C). Las células CD4⁺ CD52^{hi} que se clasificaron a partir de PBMC poliespecíficas no activadas presentaron supresión normalmente significativa, débil de linfocitos T activados por GAD65 o TT (datos no mostrados). Sin embargo, después de la activación de antígeno, las células CD4⁺ CD52^{hi} supresoras lo más probable eran derivadas de células CD4⁺ CD52^{hi} preexistentes debido a que el agotamiento de estas células a partir de las PBMC en reposo incrementó la respuesta de linfocitos T residuales a GAD65 (Figura 2D).

Ejemplo 3: Los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} eran distintos de las células Treg CD4⁺CD25⁺

Métodos

Se marcaron PBMC con anticuerpo anti-CD25α y sometieron a agotamiento de células CD25^{hi} en una columna AutoMACS (84 % en comparación con el “agotamiento” del anticuerpo de control de isotipo). A continuación, las células se marcaron con CFSE y se incubaron con TT durante 7 días antes de ser clasificadas en células CD52^{hi} y CD52^{lo}, se reactivaron por TT y se analizaron por ensayo ELISpot.

Resultados

Después del agotamiento de células CD25^{hi}, la proporción de células CD4⁺ CD52^{hi} divididas en respuesta a TT incrementó (18,1 % frente a 11,8 % con agotamiento de control) pero su función supresora después de la reactivación con TT siguió igual (Figura 3). Por tanto, las células CD4⁺ CD52^{hi} supresoras no parecen estar derivadas de la población de linfocitos T CD4⁺CD25⁺.

Ejemplo 4: Análisis fenotípico de linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi}

Métodos

La expresión por citometría de flujo de (A) CD25α, (B) FoxP3, (C) CTLA-4 de superficie y (D) intracelular, (E) GITR, (F) CD127, (G) CD24 y (H) CD59 sobre linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} (línea negra) y CD52^{lo} (línea gris) divididos, después de incubación de PBMC con TT durante 7 días. La tinción por anticuerpo de control de isotipo se muestra como relleno gris. Los resultados son representativos de 5 individuos.

Resultados

Las células Treg CD4⁺CD25⁺ tienen alta expresión de CD25, FoxP3, CTLA-4 y proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoide (GITR) (Sakaguchi et al., 2008; Shevach, 2006) y baja expresión de CD127 (Seddiki et al., 2006; Liu et al., 2006). Por el contrario, excepto la mayor expresión de GITR, los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} tenían expresión similar de CD25, FoxP3 y CTLA-4, y consecuentemente mayor expresión de CD127, en comparación con linfocitos T CD4⁺ CD52^{lo} (Figura 4). La expresión de la glucoproteína anclada a GPI, CD24, estructuralmente relacionada con CD52 (Tone et al., 1999), era mayor sobre linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} pero esto no era el caso para CD59 anclado a GPI (Figura 4) o CD73, o para CD103, CD40, integrina β7, ICOS y PD-1 (datos no mostrados). Por tanto, los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} son una población novedosa de células supresoras que no se caracterizan por la expresión de marcadores usados para definir células Treg CD4⁺CD25⁺ humanas, y que se detectan en el contexto de la activación por antígeno, implicando que contribuyen a la homeostasis de linfocito T durante la división de linfocito T.

Ejemplo 5: Análisis de la expresión génica de linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi}

Métodos

Se investigó la expresión del gen de CD52 y de los genes de proteínas encontradas que tienen expresión incrementada sobre linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} por RT-PCR a tiempo real cuantitativa. Los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo} marcados con CFSE se clasificaron a partir de tres individuos, 7 días después de la activación por GAD65. El ARN total se extrajo de las células con el Mini Kit RNAeasy (Qiagen, Melbourne, Australia), se trató con ADNasa libre de ARNasa (Qiagen) y se cuantificó con el Bioanalizador Agilent 2100. El ADNc se sometió a transcripción inversa a partir de 10 ng de ARN/reacción. Los cebadores para PCR, diseñados con el programa informático PrimerExpress y sintetizados por Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia), eran:

CD52 F: CAA ACT GGA CTC TCA GGA CAA A (SEQ ID NO: 8)
 CD52 R: CAA CTG AAG CAG AAG AGG TGG A (SEQ ID NO: 9)
 FOXP3 F: ATG GTT TCT GAA GAA GGC AAA C (SEQ ID NO: 10)
 FOXP3 R: GGA CTA CTT CAA GTT CCA CAA CA (SEQ ID NO: 11)
 CTLA-4 F: AAC CTA CAT GAT GGG GAA TGA G (SEQ ID NO: 12)
 CTLA-4 R: TTA CAT AAA TCT GGG TTC CGT T (SEQ ID NO: 13)
 GITR F: GGG AAA TTC AGT TTT GGC TTC (SEQ ID NO: 14)
 GITR R: ACA GCG TTG TGG GTC TTG TT (SEQ ID NO: 15)
 CD127 F: CCT TTT GAC CTG AGT GTC GTC T (SEQ ID NO: 16)
 CD127 R: CGT CCA TTT GTT TTC ATC CTT T (SEQ ID NO: 17)

La mezcla maestra de PCR SYBR Green en polvo era de "Applied Biosystems". Las muestras por triplicado de ADNc se sometieron a 40 ciclos de amplificación en un instrumento ABI Prism 7900, según el protocolo del fabricante. La expresión del ARNm, normalizada a la expresión de β -actina endógena, se cuantificó por el método de umbral crítico (Uc) comparativo según la fórmula $2^{-\Delta\Delta U_c}$, como se describe en el ABI User Bulletin 2 (docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04303859.pdf).

Resultados

Coherente con el análisis de expresión por citometría de flujo, los transcritos de CD52, CD127 y GITR eran mayores en las células CD52^{hi} que en las células CD52^{lo} (Figura 5).

Ejemplo 6: La supresión por células CD52^{hi} no está influida por el nivel de expresión de CD24

Métodos

Para analizar la expresión de la glucoproteína anclada a GPI CD24 estructuralmente relacionada, las PBMC marcadas con CFSE se incubaron con TT durante 7 días y se clasificaron en linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi}CD24^{lo}, CD52^{hi}CD24^{hi}, CD52^{lo}CD24^{lo} y CD52^{lo}CD24^{hi}. Cada población (5.000 células) se incubó con células que responden (5.000) CD52^{lo} clasificadas y PBMC irradiadas (20.000) y se analizaron por ensayo ELISpot. Los resultados son la media $\pm$ em de triplicados.

Resultados

La expresión de la glucoproteína anclada a GPI, CD24, estructuralmente relacionada con CD52 (Tone et al., 1999), eran mayor sobre linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi}. Aunque los linfocitos T CD4⁺ CD24^{hi} activados con antígeno, distintos a los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi}, no eran supresores eran importantes para determinar si CD24 definía mejor los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} con función supresora. Las PBMC activadas por TT se clasificaron en cuatro poblaciones de CD4⁺ distintas según tanto la expresión de CD52 como CD24 y, a continuación, se ensayaron para la función supresora después de la reactivación con TT. Esto reveló que la supresión por células CD52^{hi} no estaba influida por la expresión de CD24 (Figura 6).

Ejemplo 7: La función de Treg CD52^{hi} no requiere contacto célula-célula

Métodos

La absorción de ³H-timidina (cpm) por células CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo} clasificadas y activadas por TT o bien combinadas o separadas por un transwell de 0,4 μ m semipermeable y reactivadas con TT. Las PBMC marcadas con CFSE se incubaron con TT durante 7 días y se clasificaron en células CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo}. Las células clasificadas (100.000 cada una) se incubaron con PBMC autólogas irradiadas (400.000) y TT en placas de 48 pocillos; en presencia del transwell ambos compartimentos contenían PBMC irradiadas y TT. La absorción de ³H-timidina por células en el compartimento del fondo se midieron después de 48 h.

Resultados

La función supresora de los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} activados por antígeno se retuvo a través de un transwell sin contacto célula-célula (Figura 7). Por tanto, la presente descripción demuestra que la supresión de Treg CD4⁺ CD52^{hi} está mediada al menos en parte por un mediador soluble. Como se trata en Vignali et al. (2008), las citoquinas inhibitoras se han investigado previamente como posibles mediadores solubles de la supresión de Treg, aunque los resultados han sido no concluyentes y la percepción general ha mantenido que el contacto célula-célula es esencial para la función supresora de Treg. Los resultados descritos en la presente memoria sugirieron que los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} o bien eliminaban un factor soluble requerido para la función de los linfocitos T que responden o producían un factor soluble que suprimía los linfocitos T que responden.

Ejemplo 8: Análisis de IL-2 en la función de Treg CD52^{hi}

Métodos

El papel de IL-2 se investigó en un número de experimentos que incluyen el uso de RT-PCR a tiempo real cuantitativa para determinar los niveles de expresión. En el análisis por RT-PCR cuantitativa, el ARN total se extrajo de células con el Mini Kit RNAeasy (Qiagen, Melbourne, Australia), se trató con ADNasa libre de ARNasa (Qiagen) y se cuantificó con el Bioanalizador Agilent 2100. El ADNc se sometió a transcripción inversa a partir de 10 ng de ARN/reacción. Los cebadores para PCR, diseñados con el programa informático PrimerExpress y sintetizados por Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia), eran:

IL-2 α '5 TACAGGATGCAACTCCTGTCTT (SEQ ID NO: 18),
'3 GCTCCAGTTGTAGCTGTGTTT (SEQ ID NO: 19);
IL-27 β '5 GCTGTTCTCCATGGCTCCCTAC (SEQ ID NO: 20),
'3 GTCGGGCTTGATGATGTGCT (SEQ ID NO: 21);
IL-12 α '5 CTCCAGAAGGCCAGACAACTC (SEQ ID NO: 22),
'3 CCAATGGTAAACAGGCCTCCAC (SEQ ID NO: 23).

La mezcla maestra de PCR SYBR Green en polvo era de Applied Biosystems. El ADNc se sometió a 40 ciclos de amplificación en un instrumento ABI Prism 7900, según el protocolo del fabricante. La expresión de ARNm, normalizada a la expresión de β -actina endógena, se cuantificó por el método de umbral crítico (Uc) comparativo según la fórmula $2^{-\Delta\Delta U_c}$, como se describe en el "ABI User Bulletin 2" (docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04303859.pdf).

Resultados

El consumo o degradación de IL-2 por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} se consideró un mecanismo poco probable de supresión por varias razones: i) la IL-2 exógena no superó la supresión (Figura 2C); ii) la RT-PCR cuantitativa reveló que la expresión del gen de IL-2 era realmente mayor en células CD52^{hi}; por tanto, 24 h después de la reactivación por GAD65 la expresión del ARNm de IL-2 α en células CD52^{hi} en relación con CD52^{lo} era de $1,54 \pm 0,15$ (media $\pm$ eem, n=3); iii) la concentración de IL-2 en el medio de células CD52^{hi} era mayor que para células CD52^{lo}, tanto en reposo ($89,5 \pm 4,82$ frente a $64,9 \pm 3,10$ pg/ml) como después de la reactivación con GAD65 ($138,7 \pm 4,16$ frente a $82,4 \pm 1,78$ pg/ml) (media $\pm$ eem, n=3; P=0,02, ensayo de Kruskal-Wallis); iv) en los medios en los que se midió IL-2, el receptor- α de IL-2 soluble (CD25) era indetectable (datos no mostrados). Por tanto, se pensó que la eliminación de IL-2 era un mecanismo poco probable de supresión de Treg CD52^{hi}.

Ejemplo 9: Análisis de otros mediadores putativos de la función de Treg CD52^{hi}

A continuación, se encontró que la supresión de Treg era igual en presencia de agentes que el bloqueo de la acción o producción de los factores informados para mediar la supresión por células Treg CD4⁺ (Sakaguchi et al., 2008, 2009; Shevach, 2006, 2009; Vignali et al., 2008). Estos anticuerpos monoclonales neutralizantes incluidos para IL-10R α o TGF- β RII individualmente o en combinación (10 μ g/ml cada uno), el inhibidor de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) indometacina (20 μ M) (el cual bloquea la producción de prostaglandina E2), el inhibidor de la pan óxido nítrico sintasa N(G)-monometil-L-arginina (800 μ M) (el cual bloquea la producción de óxido nítrico), el inhibidor de la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO) 1-metil-d1-triptófano (200 μ M) (el cual bloquea la producción de metabolitos de triptófano inhibidores) y el antagonista del receptor de la adenosina A2A SCH58261 (20 μ M) (el cual bloquea la acción de la adenosina) (datos no mostrados). Recientemente, se mostró que una novedosa citoquina supresora, IL-35, un heterodímero de IL-27 β (EBi3) y subunidades de IL-12 α (p35), son secretadas por células Treg CD4⁺CD25⁺ (las cuales también requerían contacto célula-célula para la supresión) (Collison et al., 2007). IL-35 era incapaz de ser medido directamente debido a que los anticuerpos para IL-35 o su receptor no estaban disponibles. Sin embargo, 24 h después de la reactivación por GAD65 la expresión de ARNm de IL-27 β y IL-12 α era menor en células CD4⁺ CD52^{hi} que CD52^{lo} ($0,423 \pm 0,188$ frente a $1,38 \pm 0,224$; media $\pm$ eem, n=3), indicando que es poco probable que IL-35 justifique la supresión por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi}.

Ejemplo 10: CD52 soluble es un mediador de la supresión de Treg CD52^{hi}

Métodos

Se incubaron PBMC marcadas con CFSE con GAD65 durante 7 días y se clasificaron en linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo}. Las células clasificadas se reactivaron con GAD65 y los medios se recogieron después de 24 h. Los medios se concentraron 10 veces, se fraccionaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PDVF y se sometieron a transferencia con un anticuerpo policlonal de conejo para CD52 para detectar la presencia de CD52 soluble en los medios.

A continuación, se analizó el inhibidor de la fosfolipasa C U73122 como un inhibidor potencial de la producción de CD52 soluble. Las PBMC marcadas con CFSE se incubaron con TT durante 7 días y se clasificaron en linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi}. Las células clasificadas se reactivaron con TT y los medios se recogieron después de 24 h y se sometieron a inmunotransferencia como anteriormente. Por separado, las PBMC marcadas con CFSE se incubaron con TT durante 7 días y se clasificaron en linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo}, los cuales a continuación se incubaron juntos (5.000 de cada uno) en placas de ELISpot con PBMC irradiadas (20.000) y TT ± inhibidor de fosfolipasa C U73122. Los resultados eran la media ± eem de triplicados.

Además, se analizó el anticuerpo al resto de carbohidrato de CD52 como otro inhibidor potencial de la supresión por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} activados con TT. Los procedimientos eran como se describieron anteriormente para el inhibidor de la fosfolipasa C U73122 excepto que las células en el ensayo ELISpot se incubaron con o sin TT y o bien 10 µg/ml de anti-CD52 (CF1D12) o anticuerpo monoclonal de control de isotipo (IgG3). Los resultados (media ± eem) son representativos de tres experimentos independientes.

Resultados

La inmunotransferencia reveló que CD52 estaba presente en el medio de los linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} que se habían dividido en respuesta a GAD65, e incrementado en cantidad después de su reactivación por GAD65 (Figura 8A). Se encontró el mismo resultado con TT como antígeno y el inhibidor de la fosfolipasa C, U73122, añadido antes de la reactivación con TT redujo la cantidad de CD52 en el medio (Figura 8B). Además, la inhibición de la fosfolipasa C invirtió la supresión por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} de una manera dependiente de la dosis (Figura 8C). El anticuerpo monoclonal CF1D12, que interactúa con el carbohidrato terminal en el péptido de CD52 (Hale, 2001), previno la supresión por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} de CD52^{lo} (Figura 8D). Juntos, estos descubrimientos indicaron que la supresión por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} era debido a la CD52 soluble, revelado por la escisión de la fosfolipasa en respuesta a la estimulación por antígeno.

Ejemplo 11: Análisis adicional de la función efectora de CD52 soluble

Considerando una fuente más abundante de CD52 soluble nativa se postuló que CD52 se podría liberar espontáneamente de algunas líneas celulares, tales como la línea de linfoblasto B Daudi en la que la biosíntesis de GPI es defectuosa debido a una deficiencia del producto del gen *PIGY* (Hu et al., 2009).

Métodos

Se recogieron los medios de células CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo} clasificadas 24 horas después de la reactivación de las células con GAD65 o TT. Los medios de las líneas celulares (Daudi, Raji, Jurkat y K562) se recogieron y concentraron 10 veces por liofilización. Las muestras se fraccionaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Después del bloqueo con leche desnatada al 5 % la membrana se incubó con anticuerpo policlonal de conejo para CD52 (1 µg/ml), se lavó, incubó con anticuerpo de cabra anti-IgG con peroxidasa de rábano picante de conejo y se visualizó por quimioluminiscencia aumentada.

Por separado, se cultivaron PBMC (200.000 células) durante 7 días en IMDM que contenía medio acondicionado a célula Daudi al 20 % con TT y o bien anticuerpo anti-CD52 (CF1D12) o de control de isotipo (10 µg/ml). Para agotar la CD52 soluble, el medio Daudi se incubó durante la noche con anticuerpo policlonal anti-CD52 de conejo (1 µg/ml de medio) seguido de precipitación con proteína G-Sefarosa durante 1 h a 4 °C. Los resultados (media ± eem) son representativos de tres experimentos independientes.

Resultados

El cribado de varias líneas celulares reveló la presencia de CD52 en los medios de cultivo de células Daudi y K562 (Figura 9A). El medio Daudi suprimió la proliferación activada por TT de las PBMC y la supresión se invirtió o bien por anticuerpo CF1D12 o por inmunoagotamiento (confirmado por inmunotransferencia) de CD52 (Figura 9B), demostrando que la supresión del linfocito T era debido a CD52 en el medio. CD52 era soluble y no estaba presente en exosomas o partículas de membrana debido a que la supresión no estaba afectada por la centrifugación del medio a 100.000xg durante 30 min (datos no mostrados).

Ejemplo 12: Replicación de la función efectora de CD52 soluble con CD52-Fc

Métodos

Para explorar más la función inmunosupresora de la CD52 soluble, se clonó la CD52 de superficie celular maduro en un vector de lentivirus como proteína de fusión en estructura con el fragmento Fc de la inmunoglobulina G y una secuencia de la etiqueta Strep C-terminal para la purificación. Se clonó una construcción solamente de Fc como control. Las construcciones se expresaron de manera estable en células Daudi o transitoriamente en células HEK293T y las proteínas recombinantes solubles se purificaron del medio por elución con destiobiotina de la resina con Estreptactina.

El esquema para construir ADN que codifican las proteínas de fusión se muestra en la Figura 10. Un fragmento Fc de IgG1 humana mutada (Armour et al., 2003) juntado a la secuencia del péptido señal (SigP) de CD52 se generó por PCR. Esto incluía un conector GGSGG flexible y dos sitios de escisión para las proteasas de Precisión y Factor Xa entre el fragmento SigP y Fc, y una secuencia de la etiqueta Strep II para purificación (Schmidt and Skerra, 2007) en los terminales del fragmento Fc. Los cebadores, como se designa en la Figura 10, usados para generar y clonar construcciones de Fc, eran:

1F1: GAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATCGAAGGTCGTGGTG (SEQ ID NO: 24);

1R1: TCATTTTTCGAAGTGCAGGTGGCTCCAGGCGCTTTTACCCGGAGACAG
(SEQ ID NO: 25);

1F2: GGGGGTTCCGGGGGACTGGAAGTTCTGTTC (SEQ ID NO: 26);

1R2: CTTGATATCGAATTCTCATTTTTCGAAGTGC (SEQ ID NO: 27);

2F: CGCTGTTACGGATCCCCACCATGAAGCGCTTCCTC (SEQ ID NO: 28);

2R1: TCCACCGCTACCTCCTGAGGGGCTGCTGGT (SEQ ID NO: 29);

2R2: TCCACCGCTACCTCCTGAGAGTCCAGTTTG (SEQ ID NO: 30).

Se generó por PCR una construcción de CD52-Fc que comprendía el SigP de CD52 y el dominio extracelular (ECD, del inglés "Extracellular Domain") juntados al fragmento Fc. Los cebadores usados eran: 2F, 2R1, 1F2 y 1R2. Los productos de PCR se digirieron con *Bam*HI/*Eco*RI y se ligaron en el vector de lentivirus FTGW (Herold MJ et al., 2008). Los clones también se verificaron por secuenciación. Las partículas de lentivirus se produjeron por transfección mediada por CaPO₄ de células HEK293T sembradas en placas de 6 cm con 10 µg de ADN vector junto con tres plásmidos auxiliares (pMDLRRE, pRSV-REV, y pVSV-g). El medio de cultivo celular que contenía virus se recogió 48 h después de la transfección y se pasó a través de un filtro de 0,45 µm. Se usó un milímetro para la transducción de 1x10⁶ células Daudi cultivadas en medios DME complementadas con FCS al 10 %, aminoácidos no esenciales 100 mM, glutamina 2 mM y 2-Mercaptoetanol 5x10⁻⁵ M. Las células se cribaron para la mayor expresión de proteína por tinción intracelular y citometría de flujo. Las proteínas CD52-Fc o Fc control se purificaron del medio por cromatografía de afinidad de una etapa sobre resina con Estreptactina y elución con destiobiotina 2,5 M en Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la diálisis, SDS-PAGE reveló bandas teñidas con azul Coomassie sencillas de tamaño previsto cuya especificidad se confirmó por transferencia Western.

Ensayos para los efectos de las proteínas de fusión recombinantes

Se incubaron PBMC (2x10⁵ células/pocillo) o linfocitos T CD4⁺ purificados (5x10⁴ células/pocillo) en suero humano agrupado inactivado por calor al 5 % con medio IMDM completo en placas de 96 pocillos de fondo redondo con o sin 10 uL/ml de TT y diferentes concentraciones de proteínas CD52Fc o Fc, en un volumen total de 200 µl, a 37 °C en aire con CO₂ al 5 % durante hasta 7 días. Se añadió ³H-timidina (1 µCi/pocillo) y después de unas 18 h más las células se recogieron y se midió la radioactividad incorporada en ADN por recuento por centelleo. El medio se muestreó por ensayo de citoquinas después de 48 h de incubación. Las células dendríticas (DC, del inglés "Dendritic Cell") se aislaron de PBMC como se describió (Mittag et al., 2011). En resumen, las PBMC primero se enriquecieron con DC por agotamiento por esfera magnética de células marcadas con anticuerpos para marcadores de linaje (CD3, CD19, CD56). A continuación, las células se tiñeron con anticuerpos fluorescentes para HLA-DR, CD11c, CD1b/c, CD304 y CD14 y se clasificaron por flujo para purificar DC convencional CD1b/c+HLA-DR+CD11c+, DC plasmacitoide CD304+HLA-DR+CD11c- y monocitos CD14+CD16-CD11c+. Las DC purificadas se incubaron previamente con proteína CD52-Fc o Fc a 3,3 µM durante 30 min a 37 °C y se lavaron dos veces. A continuación, se diluyeron en serie a partir de 6.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con linfocitos T CD4⁺ marcados con CFSE (5x10⁴/pocillo) aislados de un donante diferente. Después de 6 días, la respuesta del linfocito T alógeno se midió como frecuencia de división de células CFSE^{lo} determinadas por citometría de flujo.

Como se describió anteriormente, las PBMC (200.000) se cultivaron con TT durante 7 días y se purificaron linfocitos T CD4⁺ (20.000) con anticuerpo anti-CD3 (100 ng/ml) y anti-CD28 (200 ng/ml) durante 48 h, con 4 veces el número de PBMC irradiadas en pocillos de fondo redondo de 200 µl, en presencia de proteína control de proteína Fc o CD52-Fc a las concentraciones indicadas. La absorción de ³H-timidina se midió durante las 16 h finales de la incubación. Los resultados (media±eem de triplicados) son representativos de seis experimentos independientes.

Los medios de las PBMC activadas con TT $\pm$ 3,3 μ M de proteínas CD52-Fc o Fc se muestrearon después de 48 h de incubación y se ensayaron para citoquinas por matriz de microesferas múltiple.

Se incubó CD52-Fc (20 μ g) con o sin PNGasa F (1.000 unidades) en 20 μ l de PBS durante la noche a 37 °C para escindir el carbohidrato ligado a N, y la reacción terminó por calentamiento a 75 °C durante 10 min. Específicamente, PNGasa F escinde los oligosacáridos ligados a asparagina entre dos subunidades de N-acetilglucosamina inmediatamente adyacentes al resto de asparagina para generar un carbohidrato truncado con un resto de N-acetilglucosamina que queda en la asparagina. Las PBMC se incubaron con TT y CD52-Fc tratada o no tratada (final 2,5 μ M) durante 7 días a 37 °C, y, a continuación, se midió la absorbancia de 3 H-timidina como anteriormente.

Resultados

Con las PBMC, la respuesta proliferativa de los linfocitos T a TT fue suprimida por CD52-Fc de una manera dependiente a la dosis (Figura 11A), y CD52-Fc suprimió la secreción de citoquinas que tipifican diferentes linajes de linfocito T (Figura 11C). El efecto de CD52-Fc sobre la función del linfocito T era directa debido a que suprimió la proliferación de linfocitos T CD4⁺ purificados en respuesta al enlace cruzado del receptor del linfocito T con el anticuerpo anti-CD3 y la estimulación conjunta con anticuerpo anti-CD28 (Figura 11B). La evidencia de que CD52-Fc no requería células que presenten antígeno para la supresión de linfocito T se obtenía mostrando que la exposición de las células dendríticas purificadas a CD52-Fc no afectaba a su capacidad de suscitar una respuesta de linfocito T alógena (Figura 13).

Como se muestra (Figura 8D), la capacidad del anticuerpo CF1D12 de bloquear la supresión por CD52 nativa implicó que la supresión se puede mediar por el resto de carbohidrato de CD52. Para examinar su papel en CD52-Fc recombinante, se escindió el carbohidrato ligado a N con la endoglucosidasa PNGasa F. Esto redujo el peso molecular de CD52-Fc de aproximadamente 48 a aproximadamente 30 kDa como se predice a partir de la pérdida del carbohidrato y se redujo su efecto supresor (Figura 11D), confirmando el papel del resto de carbohidrato en la mediación del efecto supresor de la CD52 soluble.

Ejemplo 13: Análisis adicional de la función de carbohidrato de CD52

Métodos

Para explorar más el papel del resto de carbohidrato de CD52 en la mediación de la supresión de linfocito T, se incubó CD52-Fc (3,3 μ M) con neuraminidasa (1 unidad) o tampón portador solamente en 20 μ l durante 30 min a 37 °C, como se recomienda por el proveedor. A continuación, las PBMC se incubaron con TT $\pm$ CD52-Fc tratada o no tratada con neuraminidasa (final 3,4 μ M) en una placa de ELISpot y se desarrollaron después de 24 h a 37 °C manchas de IFN- γ .

Por separado, las PBMC se incubaron en una placa de ELISpot con TT y CD52-Fc (3,4 μ M) y diferentes concentraciones de anticuerpo de cabra purificado por afinidad para el dominio extracelular de Siglec-10, o Fc (3,4 μ M) $\pm$ anticuerpo, o diferentes concentraciones de Siglec-10-Fc recombinante, antes de que las células no adherentes se transfirieran a una placa de ELISpot durante 24 h antes del desarrollo de manchas de IFN- γ .

Para investigar la posibilidad de que CD52 soluble pueda actuar por otros receptores de Siglec distintos de Siglec-10, se incubaron linfocitos T CD4⁺ (20.000) en pocillos de placa de ELISpot por triplicado a 37 °C con TT, junto con CD52-Fc o Fc (3,4 μ M cada uno) y anticuerpos anti-Siglec humana (10 μ g/ml cada uno) o Siglec 2-Fc humana recombinante (20 μ g/ml), como se indica en la Figura 12E. Después de 20 h, los pocillos se lavaron y desarrollaron manchas de IFN- γ .

Resultados

El tratamiento con neuraminidasa para separar los ácidos siálicos terminales redujo la supresión por CD52-Fc (Figura 12A). Se propone que la estructura de polilactosamina compleja del carbohidrato de CD52 termina en ácidos α 2-6 y posiblemente α 2-3 siálicos que decoran galactosa en el enlace β 1-4 con N-acetilglucosamina (Treumann et al., 1995). Esta secuencia de sialósido es reconocida por ácido siálico humano que se une a lectina-10 similar a Ig (Siglec-10), un receptor de transmembrana de superficie celular y miembro de la superfamilia de inmunoglobulina que porta dos motivos de inhibición basados en tirosina inmunoreceptora citoplasmática (ITIM) (Munday et al., 2001; Crocker et al., 2007). Aunque Siglec-10 no se ha detectado sobre linfocitos T de ratón (Crocker et al., 2007) y algunos otros Siglecs no se expresan sobre los linfocitos T humanos (Nguyen et al., 2006) encontramos que Siglec-10 se expresó sobre linfocitos T CD4⁺ humanos y se reguló al alza por activación (Figura 12B). Particularmente, la supresión de la función del linfocito T por CD52-Fc se redujo o bien por anticuerpo al dominio extracelular de Siglec-10 (Figuras 12C, 12E) o por Siglec-10-Fc recombinante soluble (Figura 12D). Las mismas concentraciones de Siglec-10-Fc también redujeron la supresión por linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} (datos no mostrados), indicando que tanto CD52 recombinante como nativa reconoce Siglec-10. La supresión de linfocito T por CD52-Fc no se redujo al mismo límite por anticuerpos para otros Siglecs distintos de Siglec-10 o por Siglec 2-Fc humana recombinante. Estos descubrimientos muestran que la supresión por CD52 se podrían justificar al menos en parte por su interacción con Siglec-10.

Ejemplo 14: Los linfocitos T CD52^{hi} protegen frente a enfermedad autoinmune

Materiales y métodos

Ratones

- 5 Se criaron ratones C57/B16, NODLt y RIP.B7/NODSCID y se mantuvieron en el "Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research". Los ratones transgénicos TCR restringidos a la clase I específica a OVA (Hogquist et al., 1993) y los ratones transgénicos TCR restringidos a la clase II específica a OVA (Barnden et al., 1998) han sido previamente descritos. Los ratones indicador de Foxp3^{GFP} se proporcionaron por el Dr Yifan Zhang.

Reactivos, Anticuerpos y Citometría de flujo

- 10 Las células se cultivaron en medios RPMI complementados con FCS al 10 %, 1:100 complemento GIBCO™ GlutaMAX™-I (Invitrogen), 1:1.000 2-mercaptoetanol (Sigma), 1:100 NEAA (gibco). Los anticuerpos anti-CD52 monoclonales se obtuvieron de MBL International, clon BTG-2, conjugación con PE o no marcados. El anticuerpo anti-CD52 policlonal se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology, Inc (sc27555) por análisis de transferencia Western. Los anticuerpos anti-CD4 monoclonales (L3T4, clon GK1.5) y anti-CD8a (Ly-2, clon 53-6.7) se obtuvieron de eBioscience. El Anti-CD25 (clon 3c7) se obtuvo de BioLegend. El anticuerpo CD3-FITC, el kit de tinción FoxP3 se obtuvo de eBioscience. Los anticuerpos monoclonales anti-CD3 (clon 2c11), anti-CD28 (clon 37.51) y de control de isotipo eran de WEHI Monoclonal Antibody Lab. Los análisis por citometría de flujo se hicieron en un FACSaria con el programa informático Diva FACS. Las células se clasificaron con un clasificador celular MoFlow (Cytomation, Fort Collins, CO).

Aislamiento de célula

- 20 Se extrajeron los bazo y se pasaron a través de una malla de 70 µm, se trataron con tampón de lisis de eritrocito y se lavaron. Para la activación de las células, los esplenocitos se cultivaron sobre placa unida a anti-CD3 (2 µg/ml) más anti-CD28 soluble (1 µg/ml) durante 3 días. Los esplenocitos OTI u OTII se incubaron con 0,5 µg/ml de OTI o 5 µg/ml de péptido OTII durante 4 días antes de analizarse. Para los experimentos de clasificación celular, se marcaron esplenocitos no tratados o activados de ratones C57/B16, OTI u OTII, NODLt o Foxp3-GFP con o bien CD3-FITC (eBioscience), CD4-APC (eBioscience), CD8-APC (eBioscience) y CD52-PE (MBL International). Las células marcadas se separaron con un Citómetro MoFlow y la pureza era de aproximadamente 95 %. Las células aisladas o bien se usaron para la purificación de ARN, para los ensayos de proliferación de linfocito T o en experimentos *in vivo*.

Ensayos de proliferación

- 30 Se cultivaron linfocitos T CD4⁺CD52^{hi} o CD8⁺CD52^{hi} no tratados o activados (2x10⁴, en experimentos transwell 1x10⁵) con linfocitos T CD4⁺CD52^{lo} o CD8⁺CD52^{lo} a una proporción de 1:1 y se estimularon con 1 µg/ml de anti-CD3 soluble (2c11) más (8x10⁴, en experimento transwell 4x10⁵) APC agotadas de linfocito T irradiadas (dosis de irradiación 2.000 rad). Transwells 0,4 µM (Corning, insertos de transwell de membrana de policarbonato N° de Cat. 3413) se colocaron entre las células. En los experimentos de bloqueo, se añadió 15 µg/ml de anti-CD52 (IgG2a de rata, MBL International) o control de isotipo. Los ensayos de proliferación se realizaron durante 72 h en placas de fondo redondo de 96 pocillos en un volumen final de 200 µl de medio RPMI que contenía suero bovino fetal al 10 %. Se añadió 1 µCi/pocillo de [³H] timidina durante las últimas 10 horas del experimento y la incorporación de timidina se midió por recuento de centelleo. Alternativamente, las células que responden marcadas con CFSE se usaron como lectura para la proliferación. Los esplenocitos no tratados o los linfocitos T CD4⁺CD52^{lo} o CD8⁺CD52^{lo} se suspendieron de nuevo en PBS templado + BSA al 0,1 % a un número celular de 10x10⁶ por ml. Se añadió 5 µM de CFSE y se suspendió de nuevo rápidamente. Las células se incubaron a 37 grados durante 5 min antes de lavarse 3 veces con tampón frío que contenía al menos 10 % de BSA o FCS. Las células que responden marcadas con CFSE se incubaron con linfocitos T CD4⁺CD52^{hi} o CD8⁺CD52^{hi} (más controles adicionales) durante hasta 7 días y se analizaron usando el FACSaria.

Ensayo de dos colores

- 45 Los linfocitos T CD4⁺CD52^{hi} o CD8⁺CD52^{hi} se tiñeron con el marcador de división celular PKH.26 (Sigma) según las recomendaciones de los fabricantes. En resumen, se suspendieron de nuevo hasta 1x10⁷ células en Diluyente C (proporcionadas por el kit) y se mezclaron con 2 µM de PKH.26 durante 4 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con tampón que contenía al menos 10 % de FCS. Los linfocitos T CD4⁺CD52^{lo} o CD8⁺CD52^{lo} que responden se tiñeron con CFSE como se describió anteriormente. Las células se cultivaron solas o juntas durante 4 a 6 días.

RT-PCR a tiempo real

- 55 El ARN total se preparó a partir de linfocitos T clasificados usando el kit RNeasy de Qiagen. El ADNc se sintetizó usando cebadores oligo-dT (Qiagen, 0,4 µg/µl) y la transcriptasa inversa M-MLV (4.000 U, Applied Biosystems), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. La RT-PCR a tiempo real se realizó en una máquina cicladora

5 ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) usando el Kit de PCR Quantitect SYBR Green (Qiagen, N° de Cat. 204143) y los cebadores específicos optimizados para amplificar 100 a 150 pb de fragmentos de diferentes genes. Se fijó un umbral en la parte lineal de la curva de amplificación y el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral se calculó para cada gen. La expresión de ARNm relativa se determinó mediante normalización a un gen de referencia (b-Actina o RPS9).

Las secuencias de cebador son:

CD52

DIREC - GTT GTG ATT CAG ATA CAA ACA GGA (SEQ ID NO: 31)

INV - AGG TAT TGG CAA AGA AGA GGA A (SEQ ID NO: 32)

IL-2

DIREC - TCA AGC TCC ACT TCA AGC TCT AC (SEQ ID NO: 33)

INV - CCT GTA ATT CTC CAT CCT GCT C (SEQ ID NO: 34)

IL-4

DIREC - TGA GAG AGA TCA TCG GCA TTT T (SEQ ID NO: 35)

INV - CTC TCT GTG GTG TTC TTC GTT G (SEQ ID NO: 36)

IL10

DIREC - TCG GAA ATG ATC CAG TTT TAC C (SEQ ID NO: 37)

INV - ATC CTG AGG GTC TTC AGC TTC (SEQ ID NO: 38)

IL-13

DIREC - GAG-CTG-AGC-AAC-ATC-ACA-CAA (SEQ ID NO: 39)

INV - AATCCAGGGCTACACAGAACC (SEQ ID NO: 40)

FoxP3

DIREC - ATG-TTC-GCC-TAC-TTC-AGA-AAC-C (SEQ ID NO: 41)

INV - CAA-ATT- CAT- CTA- CGG-TCC-ACA-C (SEQ ID NO: 42)

CD127

DIREC - GCC CAC CAG AAA CAG TTA GAA G (SEQ ID NO: 43)

INV - AGT CAG GGG ACC TAG AGG AAA G (SEQ ID NO: 44)

CTLA-4

DIREC - AGT TTC CTG GTC ACT GCT GTT T (SEQ ID NO: 45)

INV - TTT TCA CAT TCT GGC TCT GTT G (SEQ ID NO: 46)

FASLG

DIREC - CGG-TGG-TAT-TTT-TCA-TGG-TTC-T (SEQ ID NO: 47)

INV - TGA-TAC-TTT-AAG-GCT-TTG-GTT-GG (SEQ ID NO: 48)

TGFb1

DIREC - TAT TGC TTC AGC TCC ACA GAG A (SEQ ID NO: 49)

INV - CAG ACA GAA GTT GGC ATG GTA G (SEQ ID NO: 50)

TGFb2

DIREC - TAA GAG GGA TCT TGG ATG GAA A (SEQ ID NO: 51)

INV - CTG AGG ACT TTG GTG TGT TGA G (SEQ ID NO: 52)

IFNg

DIREC - CAA-AAG-GAT-GGT-GAC-ATG-AAA-A (SEQ ID NO: 53)

INV - TTG CTG TTG CTG AAG AAG GTA G (SEQ ID NO: 54)

IL-12 alfa

DIREC - TCA CGC TAC CTC CTC TTT TTG G (SEQ ID NO: 55)

INV - CAT CTG TGG TCT TCA GCA GGT TT (SEQ ID NO: 56)

Ebi3

DIREC - CCT TCC CGG ACA TCT TCT CTC T (SEQ ID NO: 57)

INV - GCA ATA CTT GGC ATG GGG TTT (SEQ ID NO: 58)

RARA

DIREC - GGA CAA GAA CTG CAT CAT CAA C (SEQ ID NO: 59)

INV - GCT TGG GTG CCT CTT TCT TC (SEQ ID NO: 60)

GITR

DIREC - CCT-AGG-TCA-GCC-GAG-TGT-AGT-T (SEQ ID NO: 61)

INV - CAC-ATA-TGC-ACC-TTT-CTT-TTG-G (SEQ ID NO: 62)

GRANZMB

DIREC - TCC TTA TTC GAG AGG ACT TTG TG (SEQ ID NO: 63)

INV - CTG GGT CTT CTC CTG TTC TTT G (SEQ ID NO: 64)

ALDH1A2

DIREC - ACA GGA GAG CAA GTG TGT GAA G (SEQ ID NO: 65)

INV - TCC ACA CAG AAC CAA GAG AGA A (SEQ ID NO: 66)

ACTIN

DIREC - GAT CTG GCA CCA CAC CTT CT (SEQ ID NO: 67)

INV - GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA (SEQ ID NO: 68)

Transferencia adoptiva de esplenocitos pobres en CD52^{hi} en receptores NOD

Se inyectaron intravenosamente esplenocitos totales pobres en CD52^{hi} o esplenocitos pobres en linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ o CD8⁺CD52^{hi} en ratones receptores. Los ratones receptores eran o bien ratones NOD machos irradiados (ratones NOD machos de 8 semanas de vida, dosis de irradiación de 750 rad, 4 horas antes de transferir de 1 a 1,2x10⁷ células) o ratones RIP.B7/NOD.SCID de 8 semanas de vida, recibiendo 2x10⁶ células. Se hizo un seguimiento de las señales de diabetes en los ratones midiendo la glucosa en orina 3 veces por semana usando Diastix de Bayer. Si la glucosa en orina supera los 20 mM, se mide la glucosa en sangre. Los ratones se designan diabéticos si las lecturas de la glucosa en sangre consecutivas están por encima de 20 mM de glucosa.

Puntuación de insulitis

4 semanas después de la transferencia adoptiva de las células los ratones se sacrificaron. Se extrajeron los páncreas y se fijaron durante la noche en solución de Bouin y, a continuación, se transfirieron a etanol al 70 %. Los páncreas fijados se incrustaron en bloques de parafina, se cortaron un mínimo de 12 secciones de 8 µm al menos 150 µm de separación. Las secciones se tiñeron con hematoxilín-eosina y se evaluaron para la incidencia y la gravedad de insulitis en microscopía de luz independientemente por dos investigadores. Se observaron un mínimo de 10 islotes de cada ratón y se valoró el grado de infiltración de célula mononuclear usando la siguiente clasificación: 0=no infiltración; 1=infiltrado periductal; 2=infiltrado periislote; 3=infiltrado intraislote; 4=destrucción de célula beta.

10 Resultados

Transferir linfocitos esplénicos pobres en CD52^{hi} de ratones NOD de 8 semanas de vida en ratones NOD.scid conduce a aparición rápida de la diabetes; las células no sometidas a agotamiento no tenían efecto (Figura 14). Transferir linfocitos T CD3⁺ pobres en CD52^{hi} aceleró la aparición de la diabetes, pero no era tan eficaz como el agotamiento de las células CD52^{hi} de linfocito total (Figura 15). Por tanto, se mostró que los linfocitos CD52^{hi} protegen frente a diabetes autoinmune.

15 Ejemplo 15: La frecuencia de linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} generados en respuesta a la simulación por GAD65 está afectada en la diabetes tipo 1

Métodos

20 Las PBMC teñidas con CFSE se cultivaron con GAD65 o TT durante 7 días antes de la determinación de la frecuencia de linfocito T CD4⁺ CD52^{hi} por análisis por citometría de flujo.

Resultados

25 Los individuos con y en riesgo de diabetes tipo 1 tienen menos linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} que los individuos sanos en respuesta a GAD65 pero no TT (Figura 16). La barra horizontal es la media para cada grupo. Los valores P totales para el análisis de varianza se determinaron por el ensayo Kruskal-Wallis; a continuación, el ensayo de comparación múltiple de Dunn reveló las diferencias significativas entre tanto Pre-DT1 como DT1 en comparación con Sano o DT2 a P<0,05.

Ejemplo 16: La supresión del linfocito T por células CD4⁺ CD52^{hi} generadas en respuesta a GAD65 está afectada en la diabetes tipo 1 preclínica

Métodos

30 Se incubaron PBMC marcadas con CFSE de individuos con autoanticuerpos de célula islote en riesgo de diabetes tipo 1 con GAD65 durante 7 días y se clasificaron en linfocitos T CD4⁺ CD52^{hi} y CD52^{lo} según los métodos descritos en la presente memoria. Las células clasificadas (5.000) se incubaron en placas de ELISpot con PBMC irradiadas (20.000).

Resultados

35 Como se muestra en la Figura 17, la función supresora de las células CD4⁺ CD52^{hi} generadas en respuesta a GAD65 está afectada en comparación con la función supresora de las células CD4⁺ CD52^{hi} generadas en respuesta a TT. Los resultados son representativos de 6 sujetos en riesgo. Por tanto, la función supresora de la célula CD4⁺ CD52^{hi} está afectada en DT1 preclínica.

Ejemplo 17: CD52 soluble reduce drásticamente los niveles de glucosa en sangre en ratones NOD

40 Métodos

Se hizo un seguimiento de ratones NOD hembra analizando semanalmente la glucosa en orina y la diabetes se diagnosticó en ratones con análisis de orina positivo por una concentración de glucosa en sangre >14 mM. En cuanto se confirmó la hiperglucemia se tomó de los ratones o bien CD52-Fc o Fc, 20 µg interperitonealmente, seis dosis en días alternos, y, a continuación, se hizo un seguimiento de sus concentraciones de glucosa en sangre dos veces por semana.

45

Resultados

Se mostró que CD52-Fc soluble reduce los niveles de glucosa en sangre (Figura 18). Como se muestra, la administración de CD52-Fc tenía un efecto rápido y significativo para reducir los niveles de glucosa en sangre, demostrando la idoneidad de CD52 soluble como compuesto terapéutico para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la diabetes tipo 1.

50

Ejemplo 18: Desarrollo de diabetes en ratones NOD.SCID después de transferir desde ratones NOD diabéticos esplenocitos tratados *ex vivo* con hCD52-Fc o Fc

Métodos

- 5 Se inyectaron 5×10^6 esplenocitos de NOD diabéticos tratados con rhCD52 Fc o Fc en ratones NOD.SCID. Se aislaron esplenocitos de ratones diabéticos hembra y se incubaron con o bien 50 ug/ml de proteína CD52-Fc humana recombinante o Fc durante 1,5 h en "tampón de CD52" (solución salina tamponada con Tris+2 mM de $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$ +glucosa 5 mM+1 % de suero de ratón). Las células se suspendieron de nuevo en PBS y 1×10^7 células se inyectaron en ratones NOD.SCID machos (12 por grupo).

Resultados

- 10 El tratamiento de los esplenocitos de ratones NOD diabéticos *ex vivo* con CD52-Fc dio como resultado un incremento en la supervivencia libre de diabetes en ratones NOD.SCID en los que se implantaron los esplenocitos tratados (Figura 19). Esto es otra evidencia más del uso terapéutico de CD52 soluble para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la diabetes tipo 1.

Ejemplo 19: CD52-Fc humana suprime células OT-II de ratón

15 Métodos

- Los linfocitos T CD4 con TCR transgénico específico a Ovoalbúmina (Ova) (OT-II) son un modelo conveniente para ensayar la supresión inmune puesto que aproximadamente la mitad de los linfocitos T CD4 son específicos a ovoalbúmina y las respuestas del linfocito T son, por lo tanto, fuertes y predecibles. Se incubaron esplenocitos (1×10^5) de ratones OT-II hembras de 10 semanas de vida durante 3 días en placas de 96 pocillos de fondo redondo en 200 ml de medio RPMI-1640 que contenía FCS al 5 % y las concentraciones indicadas en la Figura 20 de proteína o péptido de ova, o anticuerpo anti-CD3 (clon 2C-11), y proteína CD52-Fc humana recombinante o Fc. La absorción de 3H -timidina se midió durante las últimas 16 h de cultivo. Los resultados son la media $\pm$ eem de triplicados.

Resultados

- 25 Como se muestra en la Figura 20, CD52 redujo significativamente la proliferación de linfocito T en respuesta a la estimulación por proteína o péptido de ova de una manera dependiente de la dosis, produciendo más evidencia del potencial terapéutico de CD52 soluble en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Ejemplo 20: La CD52 soluble derivada de fluido seminal suprime la proliferación del linfocito T humano

Métodos

- 30 Se identificó CD52 en muestras de semen humano usando el siguiente protocolo de ELISA. Inicialmente, se centrifugó el fluido seminal (FS) a 500 g durante 5 min para sedimentar el esperma, se confirmó por inspección microscópica del sobrenadante. Se usó anticuerpo anti-CD52 humana (Biolegend N°338202) como el agente de captura (1:100 en PBS; 50 μ l/pocillo durante la noche; 4 °C). Los pocillos se lavaron 3 veces en PBS-Tween al 0,01 %, seguido de 3 veces en PBS. Se usó una solución de BSA al 5 %/PBS (BSA Sigma A7906) para bloquear los pocillos (200 μ l/pocillo, 1 h a temperatura ambiente (TA)). El lavado se realizó como anteriormente. Los pocillos en blanco se incluyeron como controles. Las muestras de semen se diluyeron en BSA al 5 %/PBS y se añadieron a 50 μ l/pocillo. Las muestras se incubaron en los pocillos durante 3 h a TA. El lavado se realizó como anteriormente. Para la detección, se usó Campath AcM-HPR a 1:1.000 en BSA al 5 %/PBS (100 μ l/pocillo; 1 h a TA). El lavado se realizó como anteriormente. Se añadió 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y la lectura de las placas era a 450 nm.
- 35
- 40 El inmunoagotamiento de CD52 se realizó según el siguiente protocolo. Se colocaron 200 μ l de Proteína G-Sefarosa en alícuotas en 2 tubos Eppendorf, seguido de lavado x2 con 1 ml de PBS, siendo descargado el sobrenadante. Se añadió 5 mg de AcM Campath a un Eppendorf y 5 mg de "Octagam" (inmunoglobulina humana agrupada) al otro. Los tubos se hicieron girar durante 1,5 h a 4 °C seguido de lavado x3 con 1 ml de PBS cada uno. Los sobrenadantes se descargaron. Se añadió 500 μ l de PBS, se mezcló el pocillo y las mezclas se dividieron equitativamente en 5x tubos Eppendorf para cada muestra. Los tubos que contenían Campath y Octagam se centrifugaron y se descargaron los sobrenadantes. Las muestras de semen se añadieron a los tubos apropiados (5x diferentes muestras de semen), es decir, 160 μ l de semen + 160 μ l de PBS seguido de rotación durante la noche a 4 °C. Los tubos se centrifugaron y los sobrenadantes se recogieron para su uso en ensayos de linfocito T a 1:20 (ya diluido 1:2 por lo tanto 1:10 en el ensayo).
- 45
- 50 La proliferación del linfocito T en respuesta al antígeno (TT) en las PBMC de los donantes sanos se midió por dilución del colorante CFSE (Mannering et al., 2003). Las células marcadas con CFSE (2×10^5 /pocillo, 100 μ l) se cultivaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos en replicados de 6 con medio solo o con TT $\pm$ AcM anti-CD52 CF1D12 (concentración final 20 μ g/ml). Lo segundo se añadió o bien a las 0 o 20 h, el último momento para permitir la iniciación de la activación de los linfocitos T dado que se mostró que el receptor para CD52 soluble, Siglec-10, se

regulaba al alza por activación (Figura 12B). Las células no teñidas también se incluyeron y se usaron para fijar las compensaciones en el citómetro de flujo. El índice de división celular (CDI, del inglés “Cell Division Index”) se calculó como la relación del número de células CD4⁺ CFSE^{tenue} divididas por 20.000 células CD4⁺ CFSE^{brillante} no divididas en presencia de antígeno al número de células CD4⁺ CFSE^{tenue} por 20.000 de CD4⁺ CFSE^{brillante} no divididas en ausencia de antígeno.

Resultados

La Figura 21 ilustra la presencia de CD52 soluble en 26 muestras de semen durante diluciones en serie. Generalmente, el semen contiene altos niveles de CD52 soluble que sacan por titulación durante varias diluciones logarítmicas.

Como se muestra en la Figura 22, el antígeno (TT) solo incrementó drásticamente la proliferación de linfocito T (véase las barras “No semen” en la Figura 22). Sin embargo, este efecto se reducía significativamente en presencia de semen (véase “TT” para las muestras de semen N° 1 y N° 15 en la Figura 22). Una ronda única de inmunoagotamiento de CD52 usando el anticuerpo anti-CD52 Campath invirtió parcialmente el efecto inhibitor del semen (véase las barras “Campath+TT” para las muestras de semen N° 1 y N° 15 en la Figura 22). No se vio inversión significativa con las muestras sometidas a inmunoagotamiento de IgG control.

Como se muestra en la Figura 23, el antígeno (TT) solo incrementó drásticamente la proliferación de linfocito T (véase las barras “No semen” en la Figura 23). La adición de anticuerpo anti-CD52 CF1D12 incrementó más la proliferación de linfocito T. Sin embargo, en presencia de semen, la proliferación de linfocito T se redujo drásticamente (véase “TT” para las muestras de semen N° 14, N° 20 y N° 22 en la Figura 23). Por tanto, los incrementos de semen no estimularon y disminuyeron la proliferación estimulada por antígeno. Además el anticuerpo anti-CD52 CF1D12 invirtió parcialmente el efecto inhibitor del semen.

Por tanto, CD52 soluble derivada de semen alcanzó el mismo efecto supresor sobre la función del linfocito T efector (ilustrado en este Ejemplo por la proliferación de linfocito T) como CD52 soluble derivada de linfocito, demostrando que los restos de carbohidrato alternativos pueden estar presentes en la glucoproteína soluble descrita en la presente memoria sin disminuir su función inhibitora.

Ejemplo 21: Efectos de CD52-Fc sobre monocitos

Métodos y resultados

Se cultivaron células THP-1 (línea celular de leucemia monocítica aguda humana) en medio RPMI-1640 complementado con FCS al 10 %, glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol 50 µM. Las células se sembraron a 2x10⁵/pocillo en IMDM que contenía suero humano inactivado por calor, agrupado al 5%, aminoácidos no esenciales 100 mM, glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol 50 µM (medio IP5) a 37 °C bajo CO₂ al 5 %.

Las células se incubaron con diferentes dosis de CD52-Fc o Fc control en presencia de LPS (100 ng/ml) durante 24 h. El medio se recogió y la concentración de IL-1β se midió por ELISA. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 24.

En un experimento adicional, las células se incubaron con diferentes dosis de CD52-Fc o Fc control en presencia del agonista de TLR-2 Pam3CSK (100 ng/ml) durante 24 h. A continuación, los medios se recogieron y la concentración de IL-1β se midió por ELISA. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 25.

Las células THP-1 también se diferenciaron durante 3 h con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 500 nM. A continuación, las células se lavaron y sembraron a 2x10⁵/pocillo en medio IP-5 y se incubaron durante la noche a 37 °C bajo CO₂ al 5 %. A la siguiente mañana el medio se cambió y las células se incubaron con CD52-Fc o Fc control (50 µg/ml) en presencia de alumbre (100 µg/ml) durante 16 horas. El medio se recogió y la concentración de IL-1β se midió por ELISA. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 26.

Se diferenció la médula ósea de ratones C57/B6 de 10 semanas de vida durante 7 días en el factor estimulante de la colonia de granulocito-macrófago (10 ng/ml) en medio KDS-RPMI-10 % de FCS. Las células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC, del inglés “Bone Marrow-derived Dendritic Cell”) se recogieron, lavaron y sembraron a 2x10⁴/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron con 40 µg/ml de CD52-Fc o PBS (control) de ratón en presencia de LPS (800 ng/ml), CPG (0,8 pM) o *Listeria monocytogenes* (8x10⁶/pocillo). Además, las células se prepararon durante 3 horas con LPS (100 ng/ml) y, a continuación, se estimularon con los agonistas de inflamasa conocidos, urato monosódico (MSU) (150 ng/ml), alumbre (150 µg/ml) y neotericina (1 µM). Después de 24 h, los medios se recogieron y las concentraciones de citoquina se midieron por ensayo de matriz de citoquina múltiple. Los resultados de este experimento que usa IL-1β se resumen en la Figura 27. Se obtuvieron resultados similares para IL-1α, TNF-α, MCP-1, IL-6, IL-9 y IL-12 (datos no mostrados).

Se incubó CD52-Fc de ratón (250 µg) con neuraminidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (2 unidades) o tampón de reacción (fosfato sódico 250 mM, pH 6,0) a 37 °C durante la noche, y la reacción terminó por calentamiento a 75 °C durante 5 minutos. Las células THP-1 se incubaron con mCD52-Fc tratada con tampón de reacción o neuraminidasa

(final 12,5 µg/ml) en presencia de LPS (100 ng/ml) durante 24 h. Los medios se recogieron y la concentración de IL-1β se midió por ELISA. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 28.

5 Se trató CD52-Fc de ratón (300 µg) con o sin PNGasa F bajo las mismas condiciones, según las instrucciones del fabricante (Biolabs Inc). La separación del oligosacárido ligado a N con reducción en el peso molecular de CD52-Fc se confirmó por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. A continuación, las soluciones de proteína se desalaron por diálisis frente a agua estéril pura. Las células THP-1 se sembraron a 2x10⁵/pocillos en medio IP5 y se incubaron con CD52-Fc tratada (final 30 µg/ml) o CD52-Fc glucosilada en presencia de 100 ng/ml de LPS durante 24 h. Los medios se recogieron y la concentración de IL-1β se midió por ELISA. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 29.

10 Conclusión

En respuesta a un rango de estímulos inflamatorios, CD52-Fc de una manera dependiente de la dosis suprimió la secreción de IL-1β por la línea de monocito THP1 humana y por células dendríticas derivadas de medula ósea de ratón. Además, como se muestra para los linfocitos T, este efecto supresor de CD52-Fc depende de su resto de oligosacárido debido a que se abrogó por tratamiento anterior de CD52-Fc con neuraminidasa para separar los ácidos siálicos terminales o con PNGasa-F para separar el propio oligosacárido ligado a N. Estos descubrimientos demuestran que los efectos supresores de CD52-Fc mostrados para los linfocitos T se extienden a otros tipos de células que participan en la inmunidad innata y, de nuevo similar a los linfocitos T, presumiblemente están mediados por el receptor Siglec.

20 La presente solicitud reivindica la prioridad del documento US 61/560.254 presentado el 15 de Noviembre de 2011 y el documento US 61/705.633 presentado el 26 de Septiembre de 2012.

Referencias

- Allan et al. (2007). *Int. Immunol.* 19: 345-354.
- Altschul et al. (1993) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Armour (2003) *Mol. Immunol.* 40: 585-93.
- Bach et al (1997) *J Autoimmun* 10:375-386.
- Barnden et al. (1998) *Immunol. Cells Biol.* 76: 34.
- Belov et al. (2003) *Proteomics* 3: 2147-2154.
- Bergerot et al. (1994) *J. Autoimmun.* 7: 655-663.
- Collison et al. (2007) *Nature* 450: 566-569.
- Crocker et al. (2007) *Nat. Rev. Immunol.* 7: 255-266.
- Dromey et al. (2011) *J. Autoimmunity* 36: 47-55.
- Every et al. (2006) *J. Immunol.* 176: 4608-4615.
- Fontenot et al. (2003) *Nat. Immunol.* 4: 330-336.
- Gavin et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 6659-6664.
- Hale (2001) *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 15: 386-91.
- Harayama (1998) *Trends Biotechnol.* 16: 76-82.
- Hearnden et al. (2012) *Ad. Drug Deliver. Rev.* 64:16-28.
- Herold et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 18507-18512.
- Higgins and Sharp (1989) *CABIOS.* 5: 151-153.
- Hogquist et al. (1993) *J. Exp. Med.* 177: 1469.
- Hori et al. (2003) *Science* 299: 1057-1061.
- Hu et al. (2009) *Exp. Hematol.* 237: 423-434.
- Lee (2001) *J. Natl. Inst. Monogr.* (2001) 29: 41-44.
- Lernmark (2001) *J Clin Invest* 108:1091-1096.
- Liu et al. (2006) *J Exp Med* 203: 1701-1711.
- Mannering et al. (2003) *J. Immunol. Meth.* 283:173-83.
- Mittag et al. (2011) *J. Immunol.* 186: 6207-17.
- Miyara et al. (2009) *Immunity* 30: 899-911.
- Munday et al. (2001) *Biochem. J.* 355: 489-497.
- Nguyen et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 7765-7770.
- Roncarolo and Gregori (2008) *Eur. J. Immunol.* 38: 925-927.
- Sakaguchi et al. (2008) *Cell* 133: 775-787.
- Sakaguchi et al. (2009) *Int. Immunol.* 21: 1105-1111.
- Schmidt and Skerra (2007) *Nat. Protoc.* 2: 1528-35.
- Schröter et al (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 29862-29873.
- Seddiki et al. (2006) *J. Exp. Med.* 203: 1693-1700.

- Shevach (2006) *Immunity* 25: 195-201.
- Shevach (2009) *Immunity* 30: 636–645.
- Song et al. (2004) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 21:195-256.
- Tang et al. (2004) *J. Exp. Med.* 199: 1455-1465.
- Tisch et al. (1999) *J. Immunol.* 163: 1178-1187.
- Tone et al. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* 1446: 334-340.
- Treumann et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 6088-6099.
- Vignali et al. (2008) *Nat. Rev. Immunol.* 8: 523-532.
- von Herrath and Harrison (2003) *Nat. Rev. Immunol.* 3: 223-232.
- Xia et al. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21: 1677-1684.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research

<120> Mediador soluble

<130> A/16/247

<150> US 61/560,254

<151> 15-11-2011

<150> US 61/705,633

<151> 26-09-2012

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 523

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ctcctggttc	aaaagcagct	aaacaaaaag	aagcctccag	acagccctga	gatcacctaa	60
aaagctgcta	ccaagacagc	cacgaagatc	ctacaaaaat	gaagcgcttc	ctcttctctc	120
tactcaccat	cagcctcctg	gttatggtac	agatacaaac	tggactctca	ggacaaaaag	180
acaccagcca	aaccagcagc	ccctcagcat	ccagcaacat	aagcggaggc	attttccttt	240
tcttcgtggc	caatgccata	atccacctct	tctgcttcag	ttgaggtgac	acgtctcagc	300
cttagccctg	tgccccctga	aacagctgcc	accatcactc	gcaagagaat	cccctccatc	360
tttgggaggg	gttgatgcca	gacatcacca	ggttgtagaa	gttgacaggc	agtgccatgg	420
gggcaacagc	caaaataggg	gggtaatgat	gtaggggcca	agcagtgccc	agctgggggt	480
caataaagtt	acccttgtag	ttgcaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaa		523

<210> 2

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly	Gln	Asn	Asp	Thr	Ser	Gln	Thr	Ser	Ser	Pro	Ser
1				5				10			

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 4

Ser Gln Asn Ala Thr Ser Gln Ser Ser Pro Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 24
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5
Gly Gln Ala Thr Thr Ala Ala Ser Gly Thr Asn Lys Asn Ser Thr Ser
1 5 10 15
Thr Lys Lys Thr Pro Leu Lys Ser
20

10 <210> 6
<211> 46
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

15 <400> 6
Gly Gln Asn Ser Thr Ala Val Thr Thr Pro Ala Asn Lys Ala Ala Thr
1 5 10 15
Thr Ala Ala Ala Thr Thr Lys Ala Ala Thr Thr Ala Thr Lys Thr
20 25 30
Thr Thr Ala Val Arg Lys Thr Pro Gly Lys Pro Pro Lys Ala
35 40 45

20 <210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> Canis familiaris

<400> 7
Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Met Thr Thr Lys Lys Val Lys Ser Ala
1 5 10 15
25 Thr Pro Ala

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador CD52-F

35 <400> 8
caaactggac tctcaggaca aa 22

<210> 9
<211> 22
40 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador CD52-R

45 <400> 9
caactgaagc agaagagggtg ga 22

<210> 10
50 <211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
55 <223> cebador FOXP3-F

<400> 10
 atggtttctg aagaaggcaa ac 22
 5 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> cebador FOXP3-R
 <400> 11
 ggactacttc aagtccaca aca 23
 15 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> cebador CTLA-4 F
 <400> 12
 aacctacatg atggggaatg ag 22
 25 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> cebador CTLA-4 R
 <400> 13
 ttacataaat ctgggtccg tt 22
 35 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> cebador GITR-F
 45 <400> 14
 gggaaattca gtttggtt c 21
 50 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> cebador GITR-R
 <400> 15
 acagcgttgt ggtcttgtt 20
 60 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> cebador CD127 F

<400> 16
 ccttttgacc tgagtgtcgt ct 22

 5 <210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> cebador CD127 R

 <400> 17
 cgtccatttg ttttcacct tt 22

 15 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> cebador directo alfa IL2

 <400> 18
 tacaggatgc aactcctgtc tt 22
 25
 <210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> cebador inverso alfa IL2

 <400> 19
 35 gctccagttg tagctgtgtt tt 22

 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador directo beta IL2

 45 <400> 20
 gctgttctcc atggctccct ac 22

 <210> 21
 <211> 20
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso beta IL2
 55
 <400> 21
 gtcgggcttg atgatgtgct 20

 <210> 22
 60 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> cebador directo alfa IL12

<400> 22
 ctccagaagg ccagacaaac tc 22

 5 <210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> cebador inverso alfa IL12

 <400> 23
 ccaatggtaa acaggcctcc ac 22

 15 <210> 24
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> cebador 1F1

 <400> 24
 gaagttctgt tccaggggcc catcgaaggt cgtggtg 37
 25 <210> 25
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> cebador 1R1

 <400> 25
 35 tcatttttcg aactgcgggt ggctccaggc gctttaccc ggagacag 48

 <210> 26
 <211> 30
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 1F2

 45 <400> 26
 gggggttcg ggggactgga agttctgttc 30

 <210> 27
 <211> 30
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 1R2
 55
 <400> 27
 cttgatatcg aattctcatt ttccaactg 30

 <210> 28
 60 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> cebador 2F

<400> 28
 cgctgttacg gatccccacc atgaagcgct tcctc 35

 5 <210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> cebador 2R1

 <400> 29
 tccaccgcta cctcctgagg ggctgctggt 30

 15 <210> 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> cebador 2R2

 <400> 30
 tccaccgcta cctcctgaga gtccagtttg 30

 25 <210> 31
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> cebador directo CD52

 <400> 31
 35 gttgtgattc agatacaaac agga 24

 <210> 32
 <211> 22
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso CD52

 45 <400> 32
 aggtattggc aaagaagagg aa 22

 <210> 33
 <211> 23
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador directo IL-2

 55 <400> 33
 tcaagctcca ctcaagctc tac 23

 <210> 34
 60 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> cebador inverso IL-2

<400> 34
 cctgtaattc tccatcctgc tc 22

 5 <210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> cebador directo IL-4

 <400> 35
 tgagagagat catcgccatt tt 22

 15 <210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> cebador inverso IL-4

 <400> 36
 ctctctgtgg tgttctcgt tg 22
 25
 <210> 37
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> cebador directo IL-10

 <400> 37
 35 tcggaaatga tccagtttta cc 22

 <210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso IL-10

 45 <400> 38
 atcctgaggg tcttcagctt c 21

 <210> 39
 <211> 21
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador directo IL-13
 55
 <400> 39
 gagctgagca acatcacaca a 21

 <210> 40
 60 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> cebador inverso IL-13

<400> 40
 aatccagggc tacacagaac c 21
 5 <210> 41
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> cebador directo FOX3P
 <400> 41
 atgttcgcct acttcagaaa cc 22
 15 <210> 42
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> cebador inverso FOXP3
 <400> 42
 caaattcatc tacggtccac ac 22
 25 <210> 43
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> cebador directo CD127
 <400> 43
 gccaccaga aacagttaga ag 22
 35 <210> 44
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> cebador inverso CD127
 45 <400> 44
 agtcagggga cctagaggaa ag 22
 50 <210> 45
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> cebador directo CTLA-4
 <400> 45
 agttcctgg tcactgctgt tt 22
 60 <210> 46
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> cebador inverso CTLA-4

<400> 46
 ttttcacatt ctggctctgt tg 22

 5 <210> 47
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> cebador directo FASLG

 <400> 47
 cgggtgtatt ttcatgtgtct 22

 15 <210> 48
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> cebador inverso FASLG

 <400> 48
 tgatacttta aggcttgggt tgg 23
 25
 <210> 49
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> cebador directo TGFb1

 <400> 49
 35 tattgcttca gctccacaga ga 22

 <210> 50
 <211> 22
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso TGFb1

 45 <400> 50
 cagacagaag ttggcatggt ag 22

 <210> 51
 <211> 22
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador directo TGFb2
 55
 <400> 51
 taagagggat ctggatgga aa 22

 <210> 52
 60 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> cebador inverso TGFb2

<400> 52
 ctgaggactt tgggtgttg ag 22

5 <210> 53
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> cebador directo IFNg

<400> 53
 caaaaggatg gtgacatgaa aa 22

15 <210> 54
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> cebador inverso IFNg

<400> 54
 ttgctgttc tgaagaaggt ag 22

25 <210> 55
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> cebador directo alfa IL-12

<400> 55
 tcacgctacc tcctctttt gg 22

35 <210> 56
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> cebador inverso alfa IL-12

45 <400> 56
 catctgtgtg cttcagcagg tt 23

50 <210> 57
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> cebador directo Ebi3

<400> 57
 ccttccgga catctctct ct 22

60 <210> 58
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> cebador inverso Ebi3

<400> 58
 gcaataacttg gcatggggtt t 21
 5 <210> 59
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> cebador directo RARA
 <400> 59
 ggacaagaac tgcacatca ac 22
 15 <210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> cebador inverso RARA
 <400> 60
 gcttgggtgc ctcttcttc 20
 25 <210> 61
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> cebador directo GTR
 <400> 61
 35 cctaggtcag ccgagtgtag tt 22
 <210> 62
 <211> 22
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso GTR
 45 <400> 62
 cacatatgca ccttctttt gg 22
 <210> 63
 <211> 23
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador directo GRANZB
 55 <400> 63
 tccttattcg agaggacttt gtg 23
 <210> 64
 60 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> cebador inverso GRANZB

<400> 64
 ctgggtcttc tctgttctt tg 22

 5 <210> 65
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> cebador directo ALDH1A

 <400> 65
 acaggagagc aagtgtgtga ag 22

 15 <210> 66
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> cebador inverso ALDH1A2

 <400> 66
 tccacacaga accaagagag aa 22
 25
 <210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> cebador directo ACTIN

 <400> 67
 35 gatctggcac cacaccttct 20

 <210> 68
 <211> 20
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso ACTIN

 45 <400> 68
 ggggtgttga aggtctcaaa 20

 <210> 69
 <211> 697
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 69

Met Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gly Ser Gln Ala
 1 5 10 15
 Met Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro
 20 25 30
 Glu Gly Leu Cys Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln
 35 40 45
 Asp Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp Phe Lys Ala Val
 50 55 60
 Thr Glu Thr Thr Lys Gly Ala Pro Val Ala Thr Asn His Gln Ser Arg
 65 70 75 80
 Glu Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu Thr Gly Asp Pro
 85 90 95
 Ala Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala Gln Met Gln Asp
 100 105 110
 Glu Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser Tyr Val Arg Tyr
 115 120 125
 Asn Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr Ala Leu Thr Gln
 130 135 140
 Lys Pro Asp Val Tyr Ile Pro Glu Thr Leu Glu Pro Gly Gln Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ile Cys Val Phe Asn Trp Ala Phe Glu Glu Cys Pro Pro Pro
 165 170 175
 Ser Phe Ser Trp Thr Gly Ala Ala Leu Ser Ser Gln Gly Thr Lys Pro
 180 185 190
 Thr Thr Ser His Phe Ser Val Leu Ser Phe Thr Pro Arg Pro Gln Asp
 195 200 205
 His Asn Thr Asp Leu Thr Cys His Val Asp Phe Ser Arg Lys Gly Val
 210 215 220
 Ser Val Gln Arg Thr Val Arg Leu Arg Val Ala Tyr Ala Pro Arg Asp
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Ser Ile Ser Arg Asp Asn Thr Pro Ala Leu Glu Pro Gln
 245 250 255
 Pro Gln Gly Asn Val Pro Tyr Leu Glu Ala Gln Lys Gly Gln Phe Leu
 260 265 270
 Arg Leu Leu Cys Ala Ala Asp Ser Gln Pro Pro Ala Thr Leu Ser Trp
 275 280 285
 Val Leu Gln Asn Arg Val Leu Ser Ser Ser His Pro Trp Gly Pro Arg
 290 295 300
 Pro Leu Gly Leu Glu Leu Pro Gly Val Lys Ala Gly Asp Ser Gly Arg
 305 310 315 320
 Tyr Thr Cys Arg Ala Glu Asn Arg Leu Gly Ser Gln Gln Arg Ala Leu
 325 330 335
 Asp Leu Ser Val Gln Tyr Pro Pro Glu Asn Leu Arg Val Met Val Ser
 340 345 350
 Gln Ala Asn Arg Thr Val Leu Glu Asn Leu Gly Asn Gly Thr Ser Leu
 355 360 365
 Pro Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Cys Leu Val Cys Val Thr His Ser
 370 375 380
 Ser Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Gln Arg Gly Gln Val Leu Ser
 385 390 395 400
 Pro Ser Gln Pro Ser Asp Pro Gly Val Leu Glu Leu Pro Arg Val Gln
 405 410 415
 Val Glu His Glu Gly Glu Phe Thr Cys His Ala Arg His Pro Leu Gly
 420 425 430
 Ser Gln His Val Ser Leu Ser Leu Ser Val His Tyr Ser Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Gly Pro Ser Cys Ser Trp Glu Ala Glu Gly Leu His Cys Ser Cys
 450 455 460
 Ser Ser Gln Ala Ser Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp Trp Leu Gly Glu
 465 470 475 480
 Glu Leu Leu Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asp Ser Phe Glu Val Thr Pro
 485 490 495
 Ser Ser Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ser Ser Leu Ser Leu His Gly Gly
 500 505 510
 Leu Ser Ser Gly Leu Arg Leu Arg Cys Glu Ala Trp Asn Val His Gly
 515 520 525
 Ala Gln Ser Gly Ser Ile Leu Gln Leu Pro Asp Lys Lys Gly Leu Ile
 530 535 540
 Ser Thr Ala Phe Ser Asn Gly Ala Phe Leu Gly Ile Gly Ile Thr Ala
 545 550 555 560
 Leu Leu Phe Leu Cys Leu Ala Leu Ile Ile Met Lys Ile Leu Pro Lys
 565 570 575
 Arg Arg Thr Gln Thr Glu Thr Pro Arg Pro Arg Phe Ser Arg His Ser
 580 585 590
 Thr Ile Leu Asp Tyr Ile Asn Val Val Pro Thr Ala Gly Pro Leu Ala
 595 600 605
 Gln Lys Arg Asn Gln Lys Ala Thr Pro Asn Ser Pro Arg Thr Pro Leu
 610 615 620
 Pro Pro Gly Ala Pro Ser Pro Glu Ser Lys Lys Asn Gln Lys Lys Gln
 625 630 635 640
 Tyr Gln Leu Pro Ser Phe Pro Glu Pro Lys Ser Ser Thr Gln Ala Pro
 645 650 655
 Glu Ser Gln Glu Ser Gln Glu Glu Leu His Tyr Ala Thr Leu Asn Phe
 660 665 670
 Pro Gly Val Arg Pro Arg Pro Glu Ala Arg Met Pro Lys Gly Thr Gln
 675 680 685
 Ala Asp Tyr Ala Glu Val Lys Phe Gln
 690 695

REIVINDICACIONES

1. Uno cualquiera o más de:

- i) glucoproteína CD52 soluble,
- ii) una proteína de fusión que comprende la glucoproteína CD52 soluble como una primera proteína, y una segunda proteína;
- iii) un polinucleótido que codifica la porción de péptido de la glucoproteína CD52 soluble de la parte i) o la proteína de fusión de la parte ii);
- iv) un vector que comprende el polinucleótido de la parte iii);
- v) una célula aislada que comprende el polinucleótido de la parte iii) o el vector de la parte iv);

para su uso en terapia.

2. La glucoproteína CD52 soluble para el uso de la reivindicación 1, en donde la glucoproteína CD52 soluble comprende la secuencia de aminoácidos **GQNDTSQTSSPS** (SEQ ID NO: 3) o **GQATTAASGTNKNSTSTKKTPLKS** (SEQ ID NO: 5), y un carbohidrato.

3. La glucoproteína CD52 soluble, la proteína de fusión, el polinucleótido, el vector o la célula para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha terapia comprende tratar o prevenir una enfermedad autoinmune o inflamación.

4. La glucoproteína CD52 soluble, la proteína de fusión, el polinucleótido, el vector o la célula para el uso de la reivindicación 3, en donde la enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1.

5. La glucoproteína CD52 soluble o la proteína de fusión para el uso de cualquier reivindicación precedente en donde la glucoproteína CD52 soluble o la proteína de fusión se administra a un sitio mucoso o transdérmico.

6. Un método *in vitro* de diagnóstico de la susceptibilidad de un sujeto a desarrollar una enfermedad autoinmune o inflamación, comprendiendo el método:

detectar el nivel de glucoproteína CD52 soluble en una muestra tomada del sujeto; y
comparar el nivel de glucoproteína CD52 soluble detectado en la muestra tomada del sujeto con un nivel de referencia determinado a partir de uno o más sujetos sanos,
en donde el nivel inferior de glucoproteína CD52 soluble detectado en la muestra tomada del sujeto en comparación con el nivel de referencia indica que el sujeto tiene una susceptibilidad incrementada a desarrollar una enfermedad autoinmune o inflamación.

7. El método de la reivindicación 6, en donde la muestra se toma de un sujeto al cual se ha administrado un antígeno.

8. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde la muestra se toma de un sitio de un sitio de enfermedad local en el sujeto.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1.

10. Un método de determinación de la idoneidad de un sujeto para entrar en una prueba de cribado, que comprende realizar el método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 e identificar el sujeto que es más adecuado para entrar en una prueba de cribado de fármaco si el sujeto tiene un nivel inferior de glucoproteína CD52 soluble que la muestra de referencia, cuando la prueba de cribado del fármaco es una prueba de cribado de fármaco antidiabético, una prueba de cribado para un fármaco destinado a usarse en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamación, o un cribado realizado para identificar fármacos antidiabéticos putativos.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el cribado es para identificar fármacos anti-diabetes tipo 1.

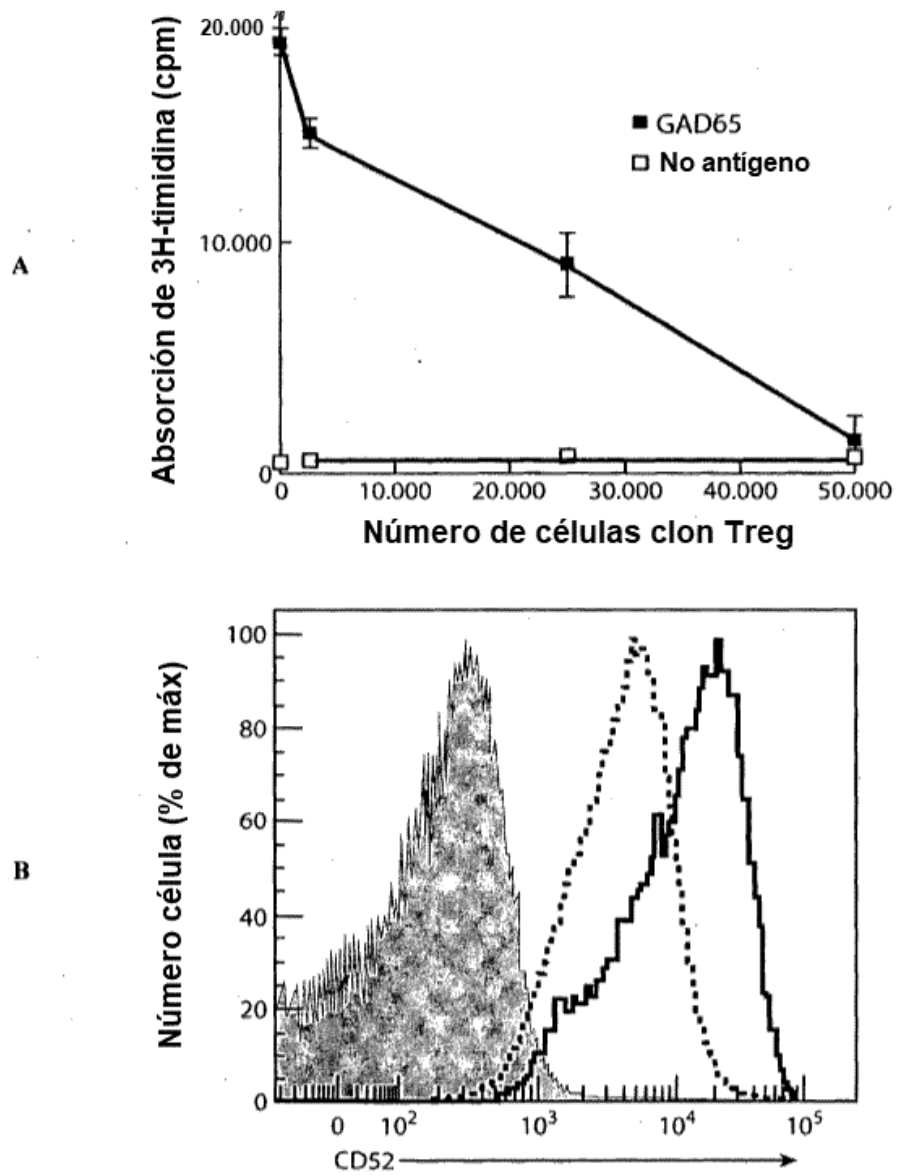


Figura 1

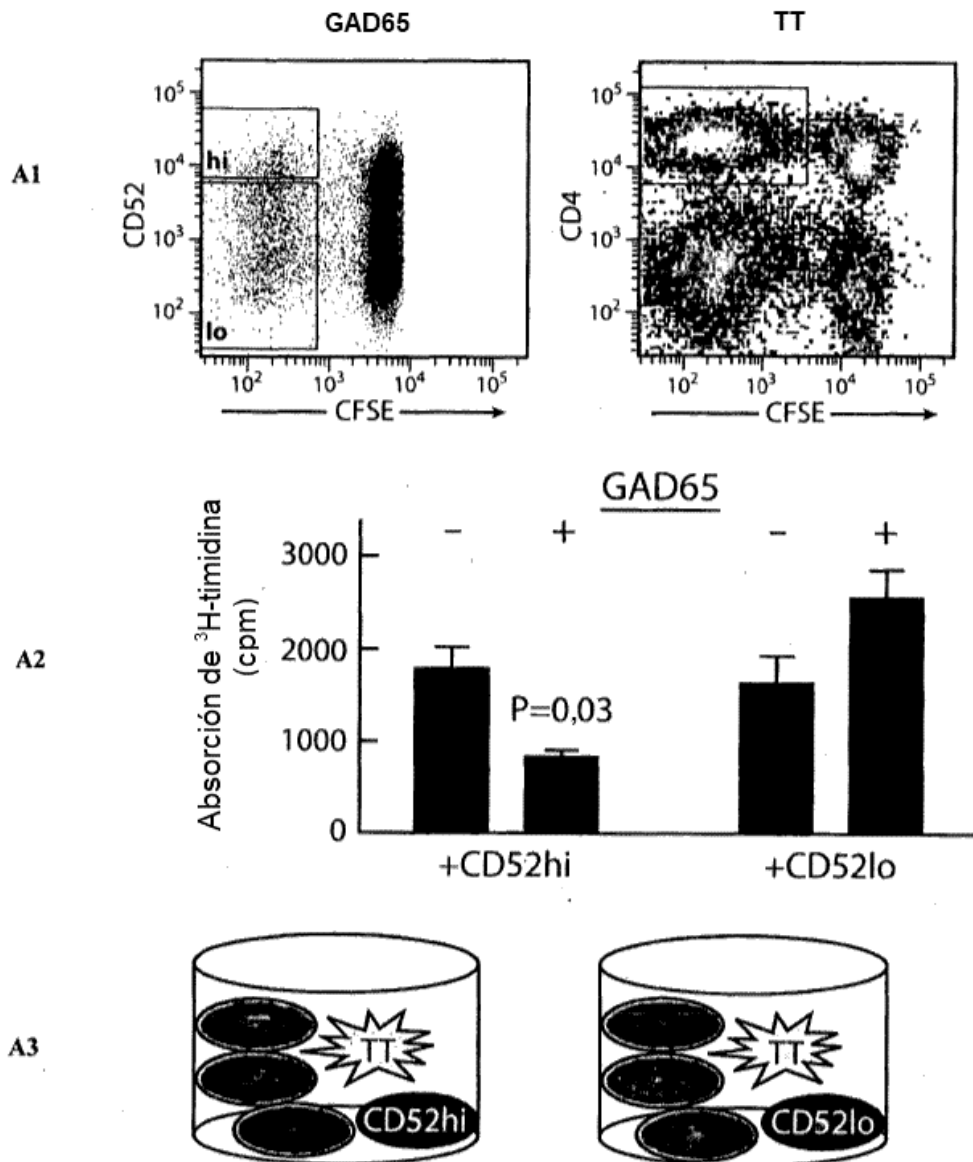


Figura 2A

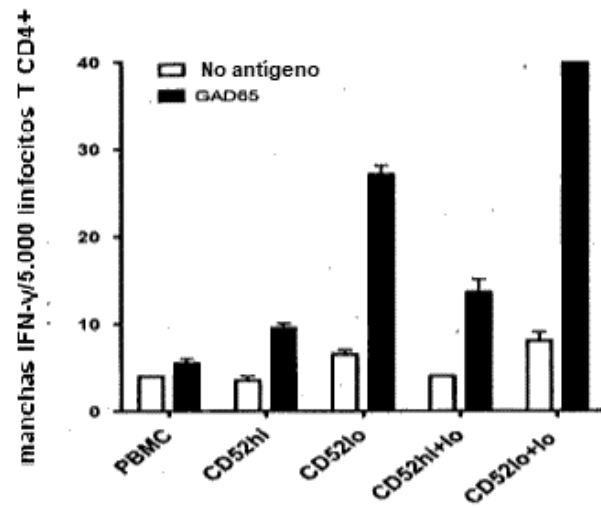


Figura 2B

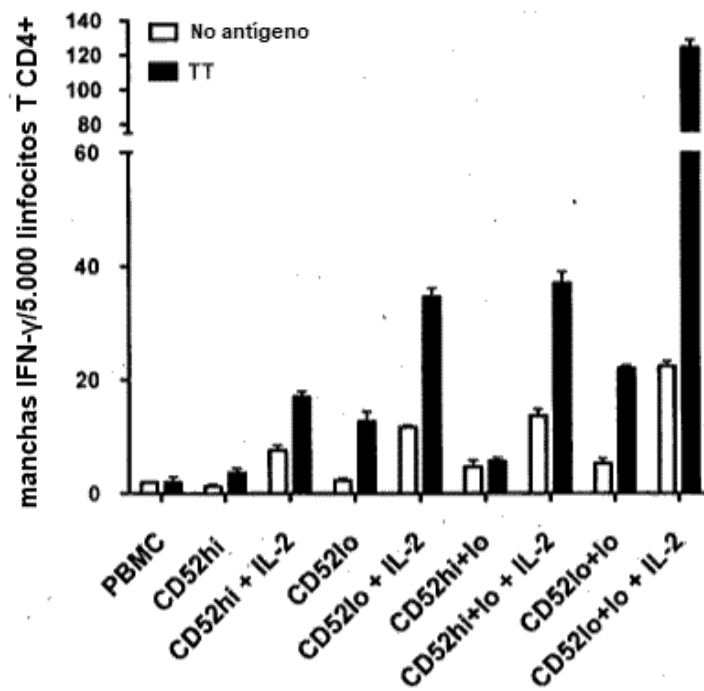


Figura 2C

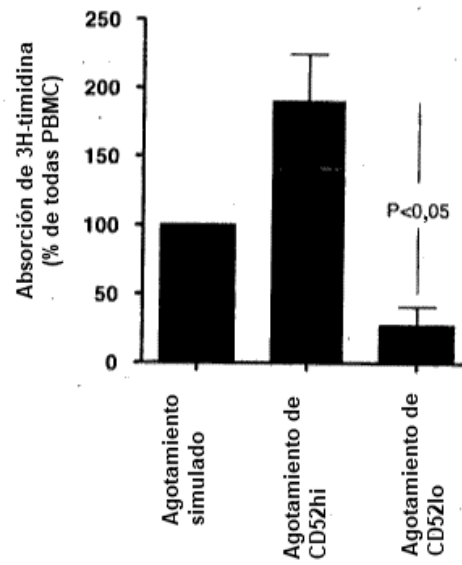


Figura 2D

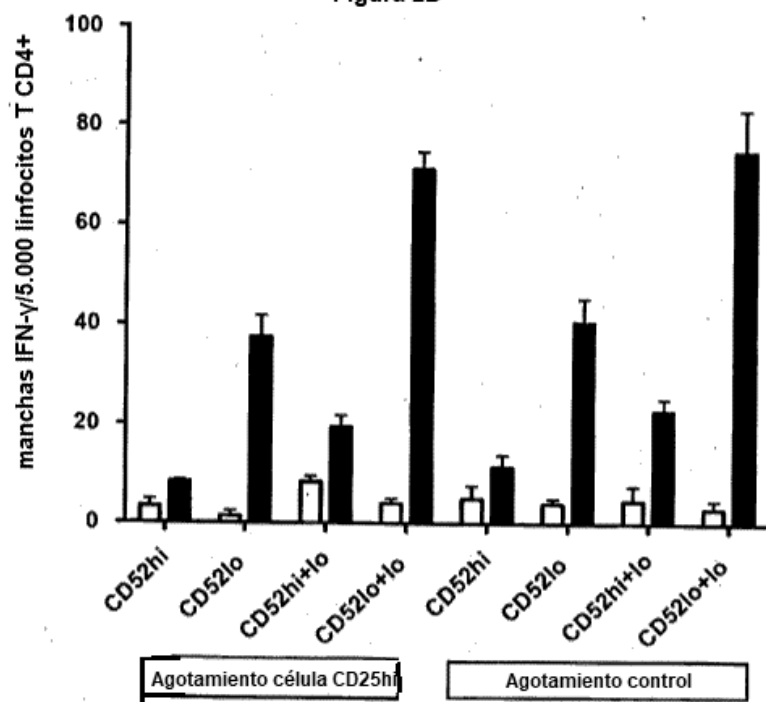


Figura 3

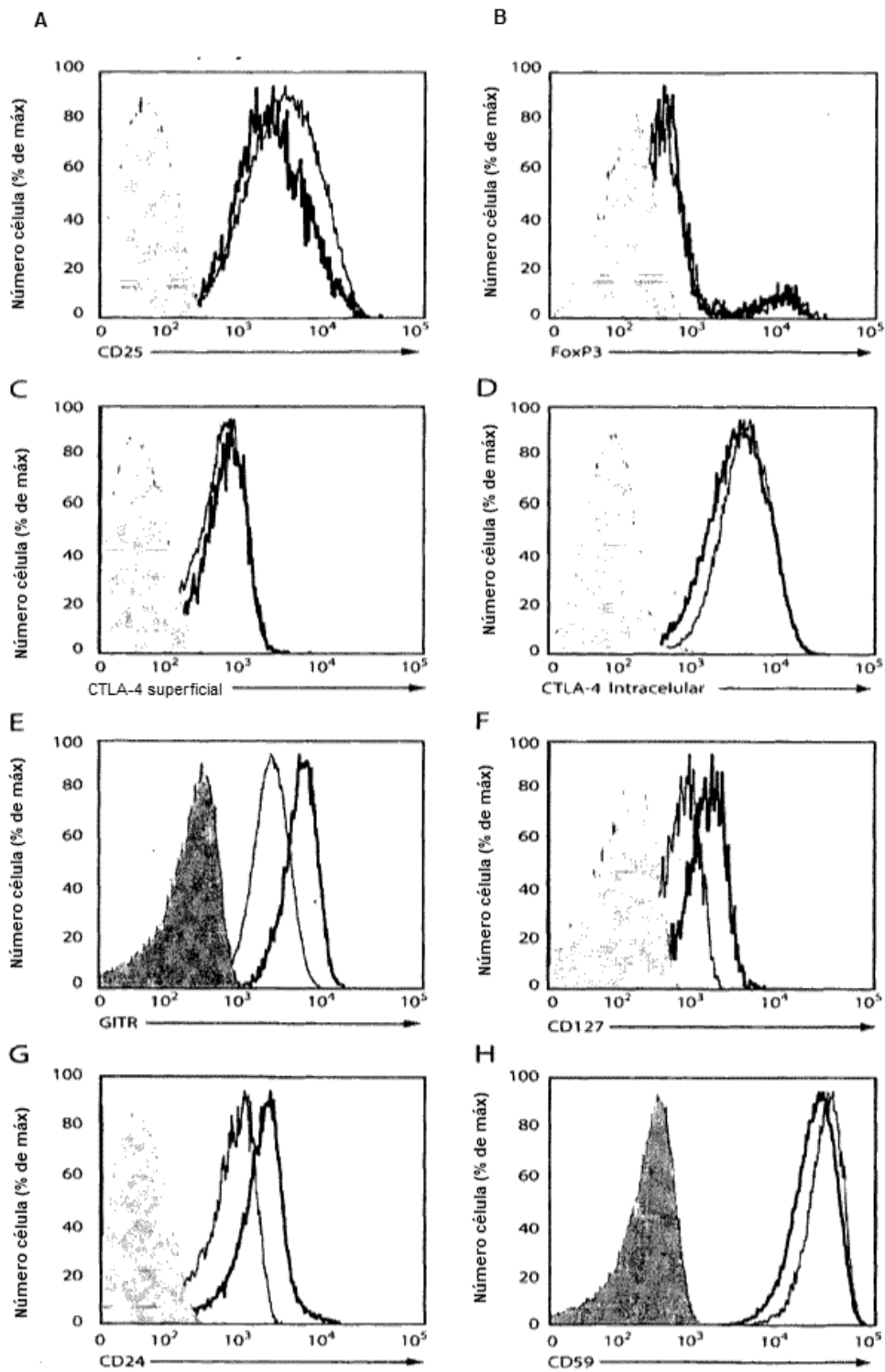


Figura 4

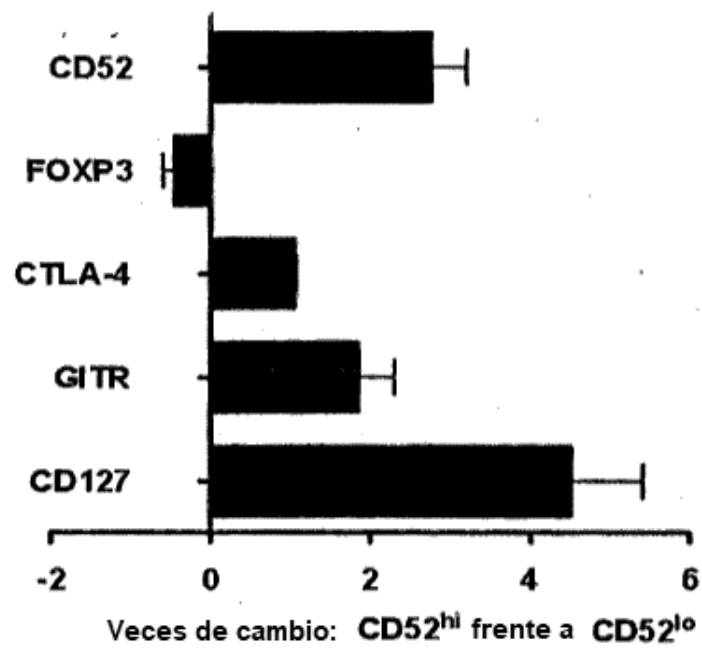


Figura 5

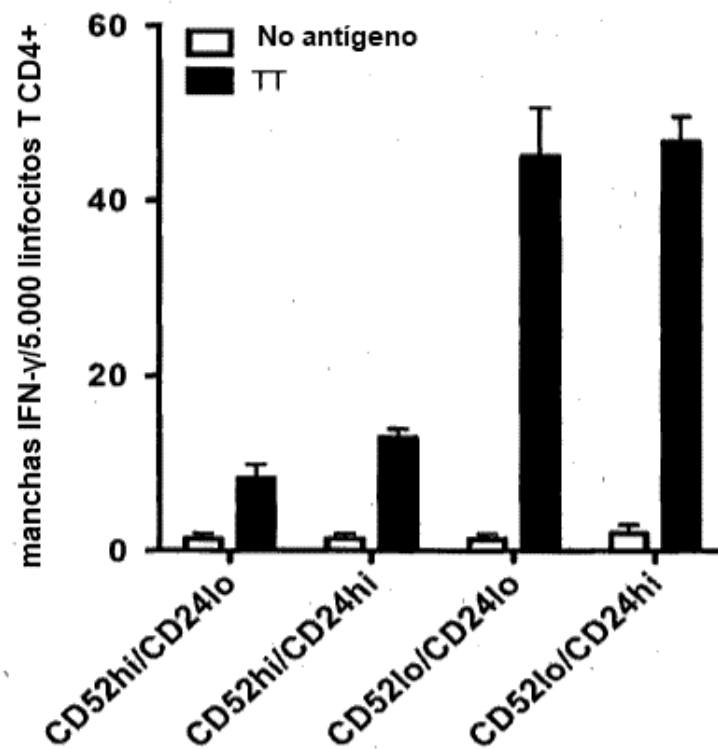


Figura 6

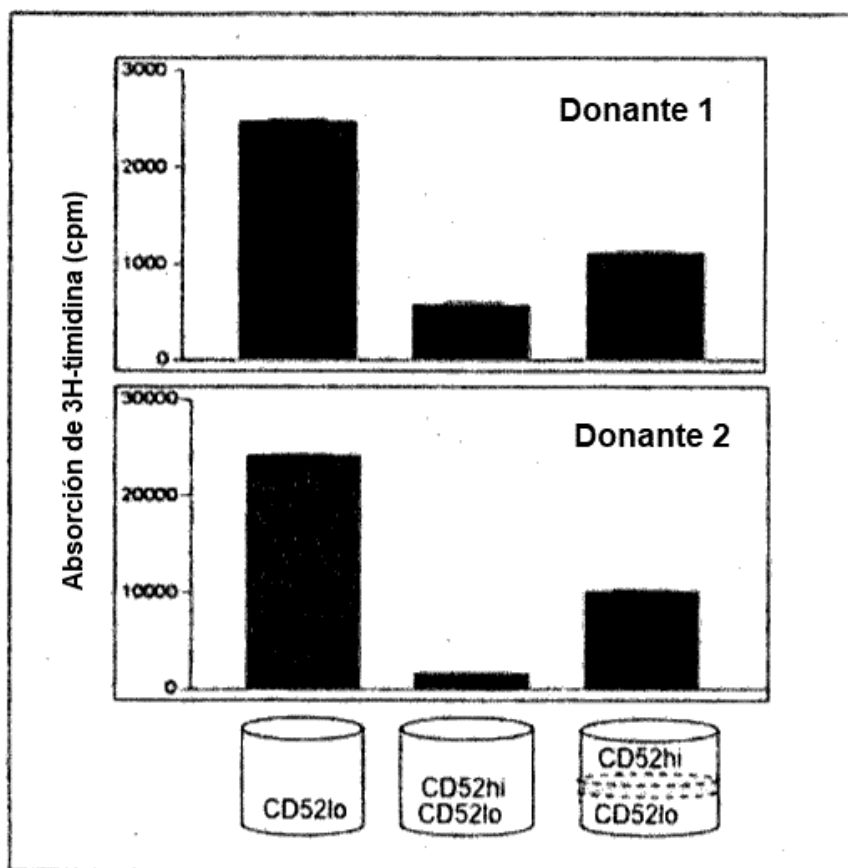


Figura 7

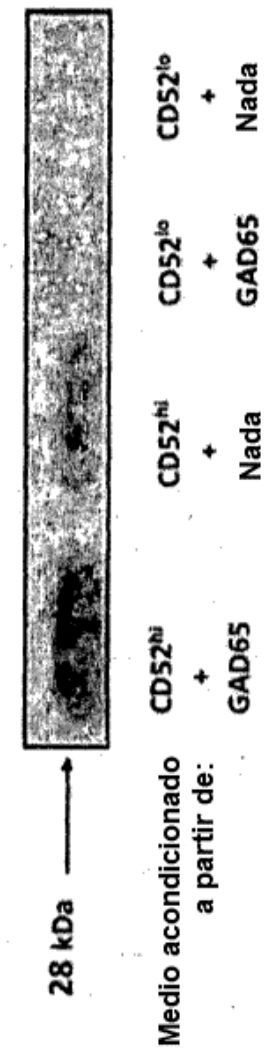


Figura 8A

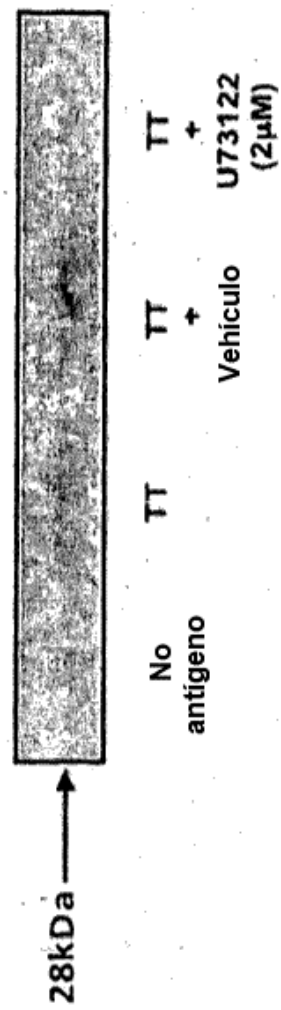


Figura 8B

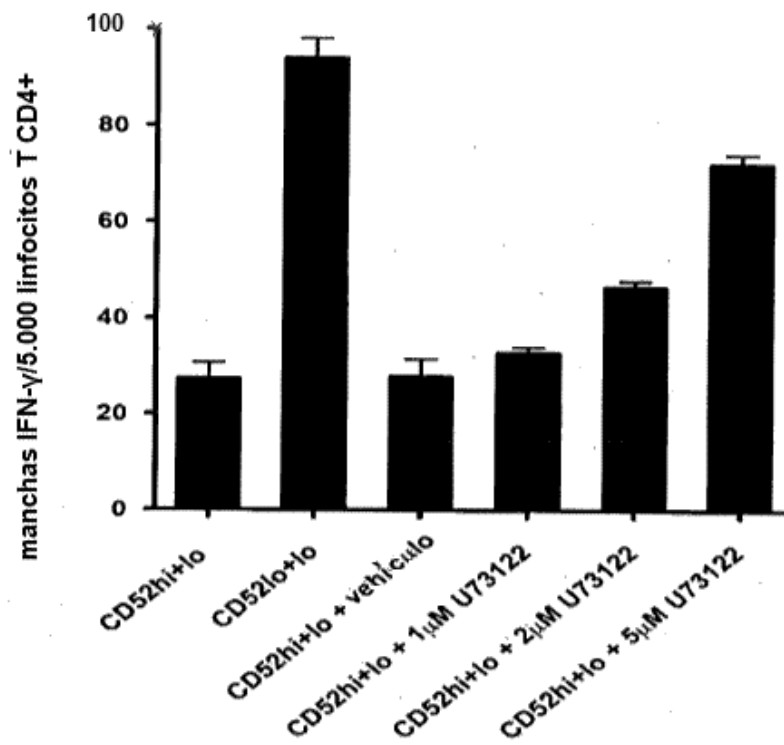


Figura 8C

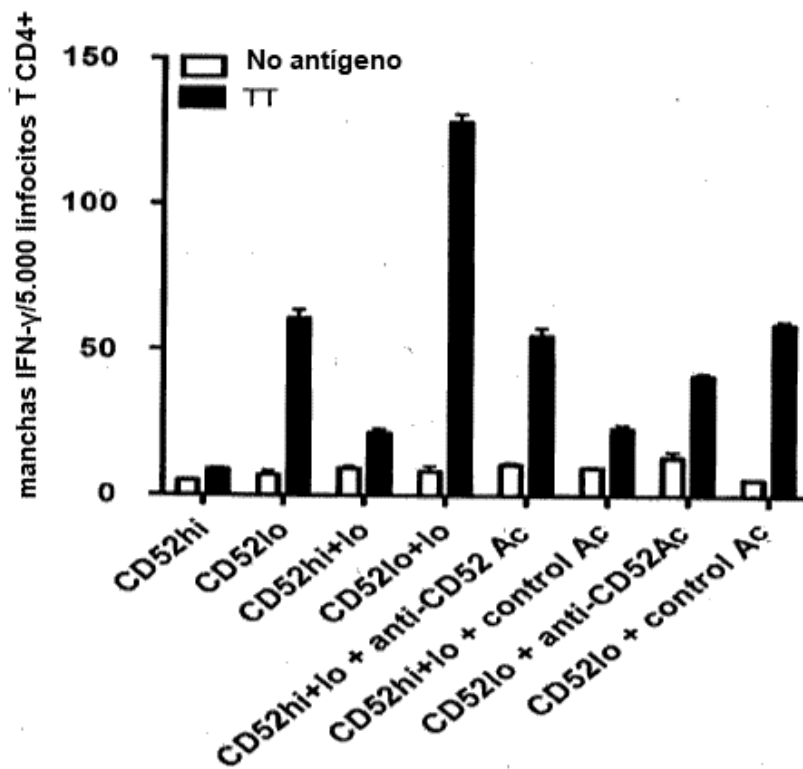


Figura 8D

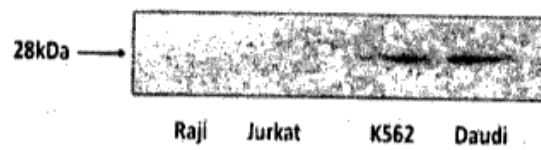


Figura 9A

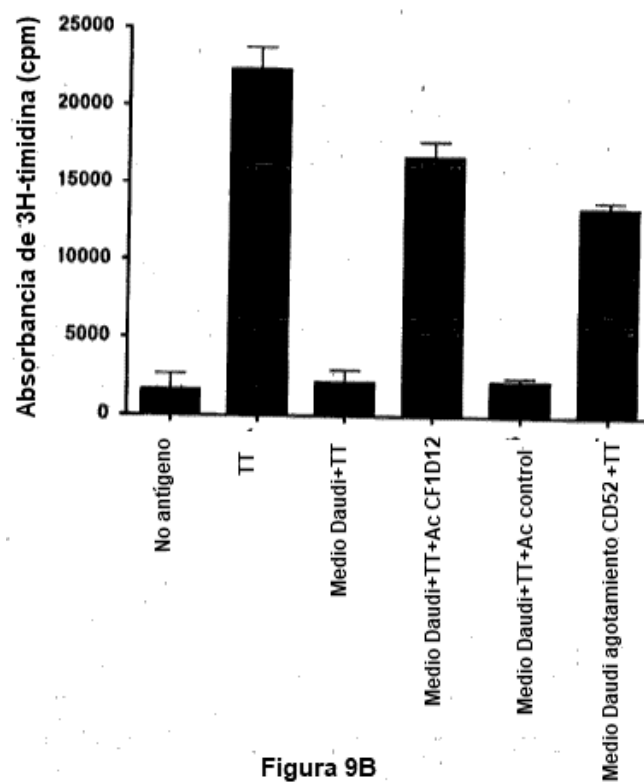


Figura 9B

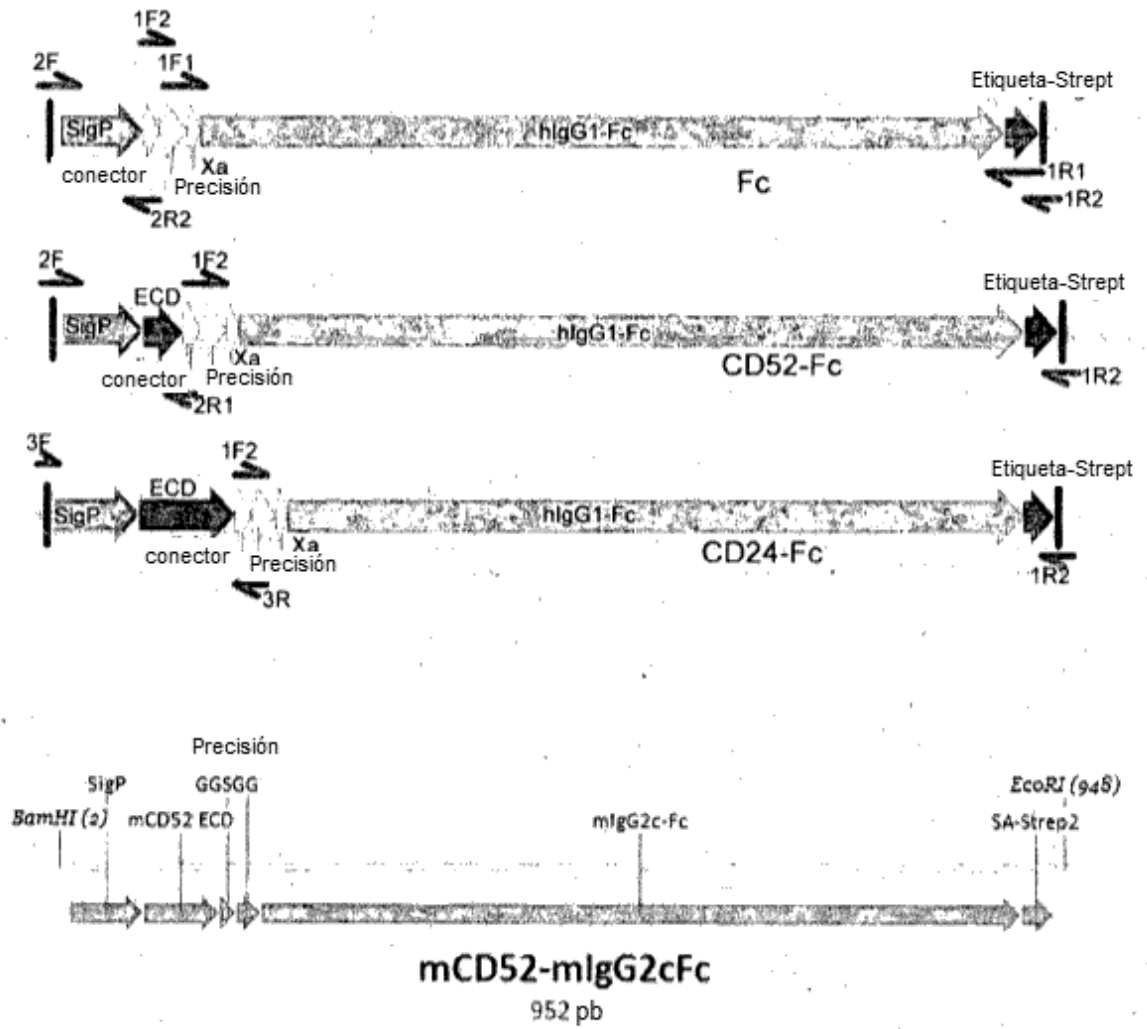


Figura 10

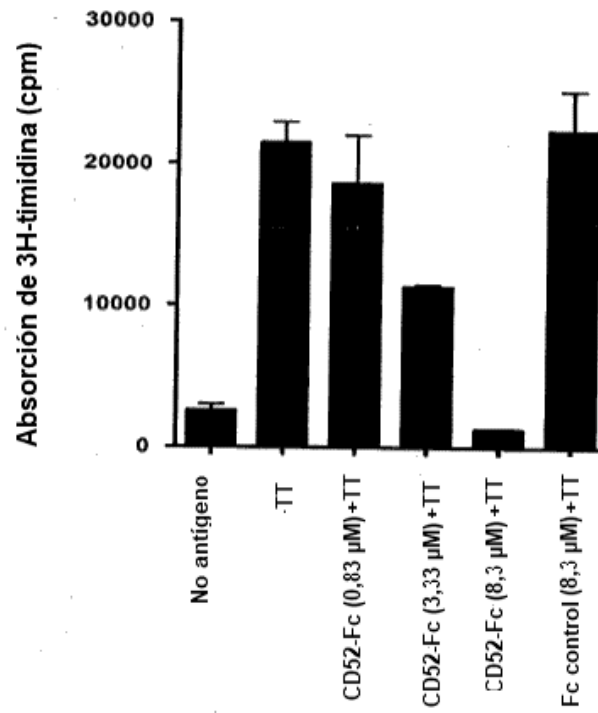


Figura 11A

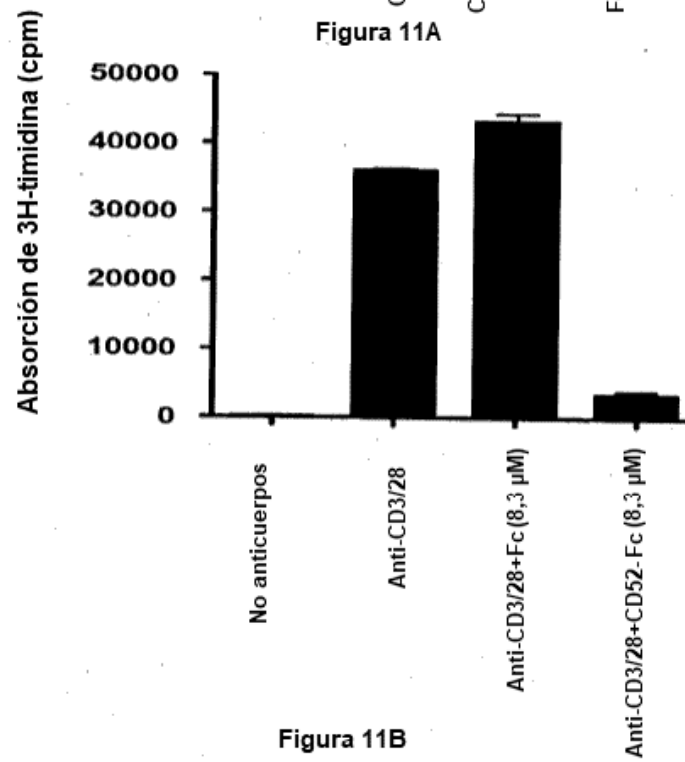


Figura 11B

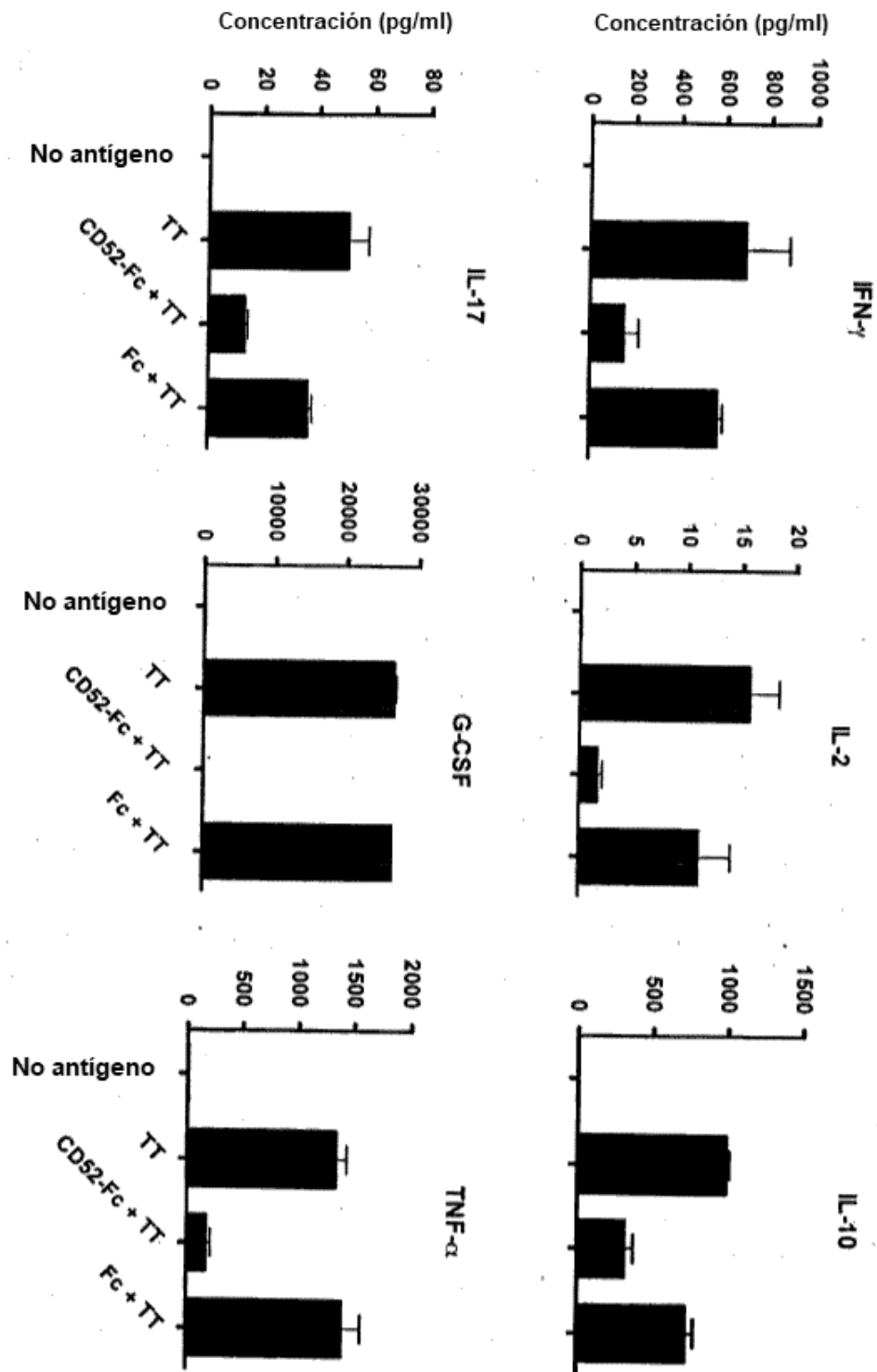


Figura 11C

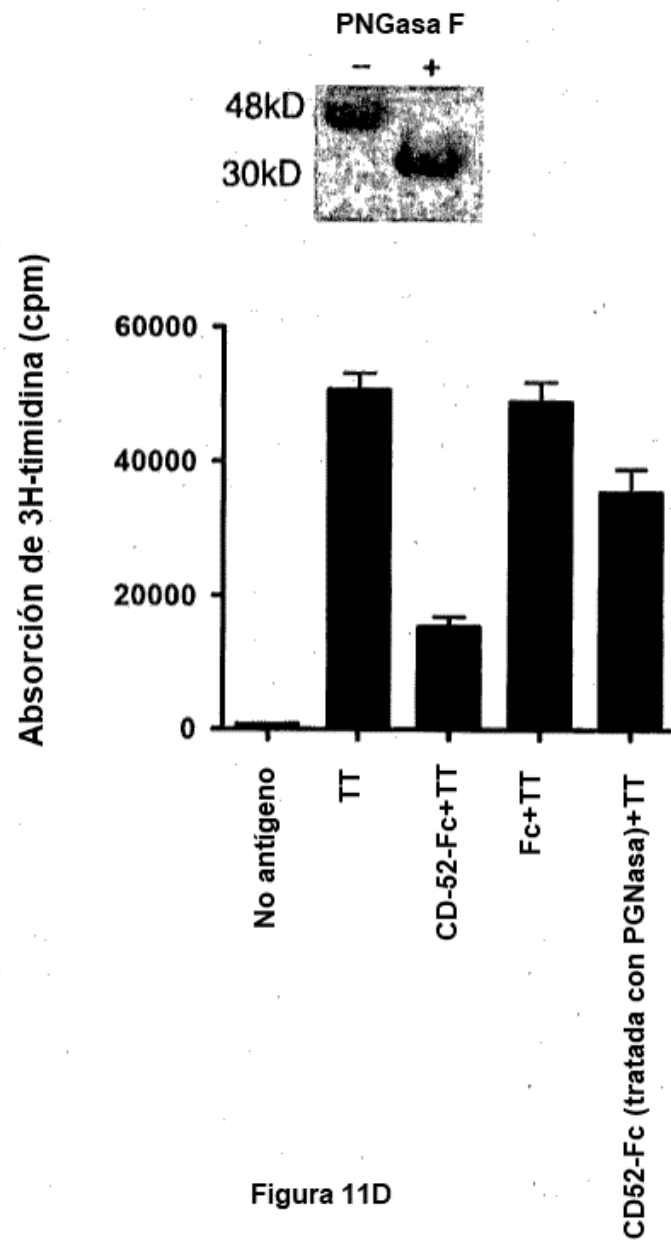


Figura 11D

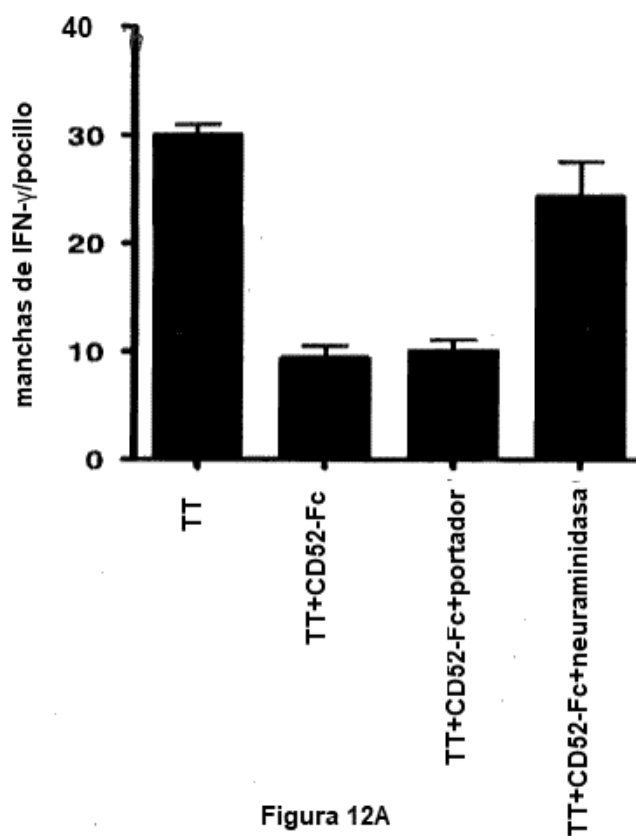


Figura 12A

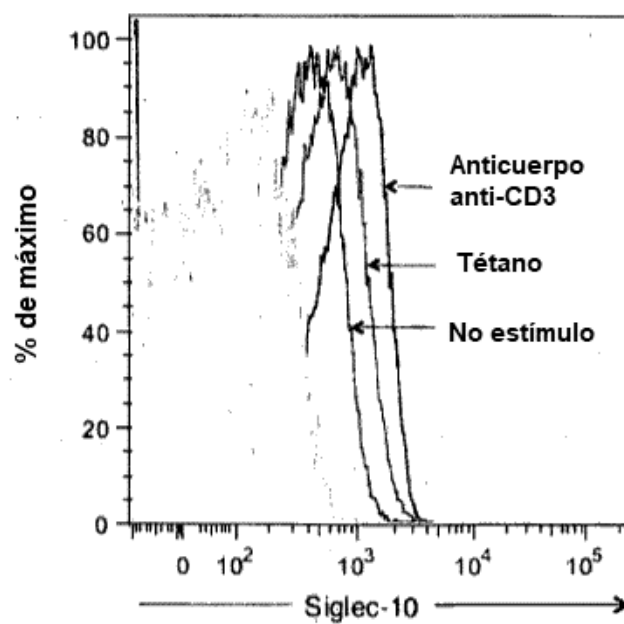


Figura 12B

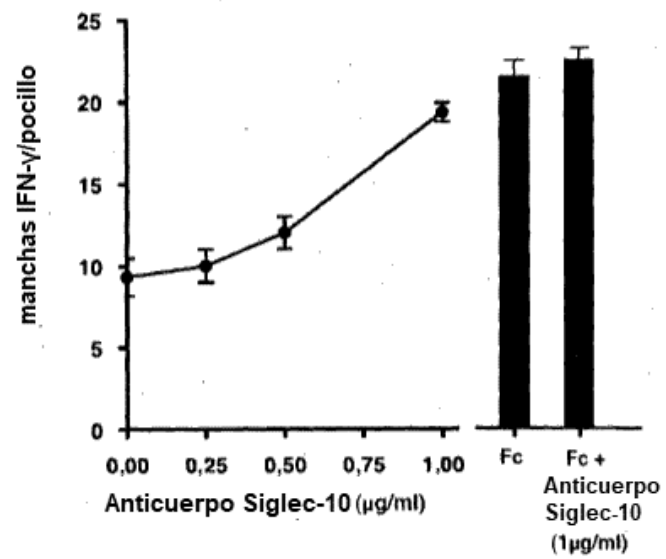


Figura 12C

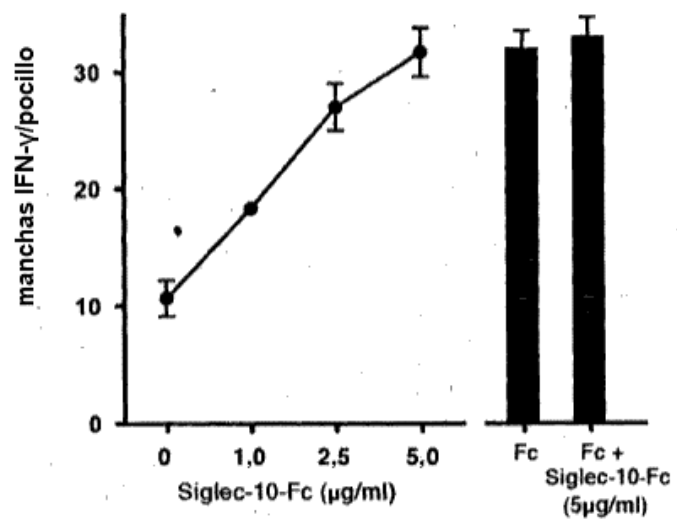


Figura 12D

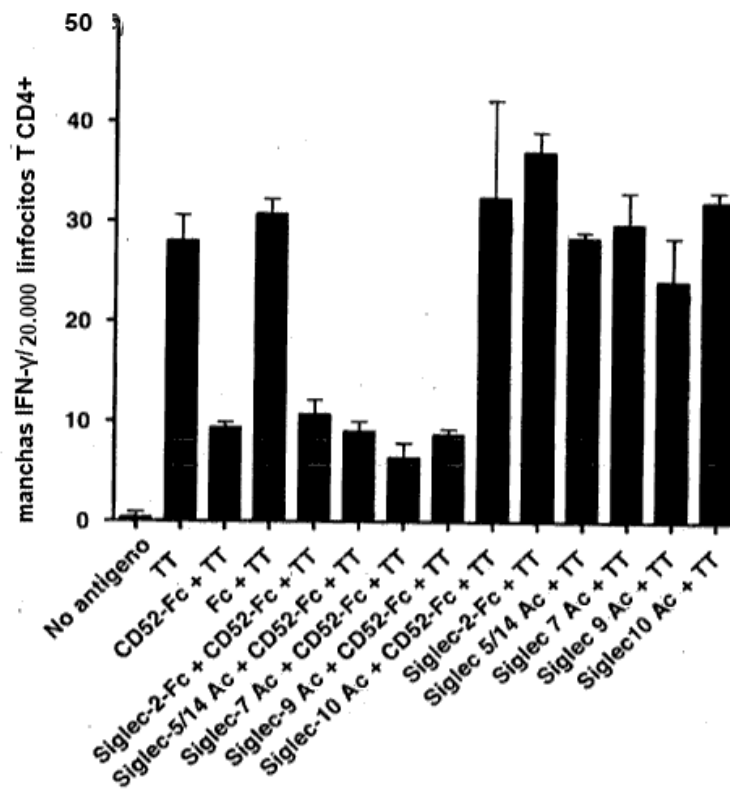


Figura 12E

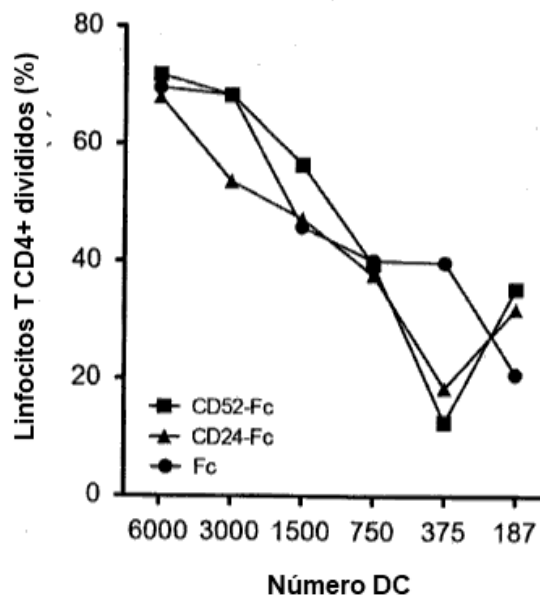


Figura 13

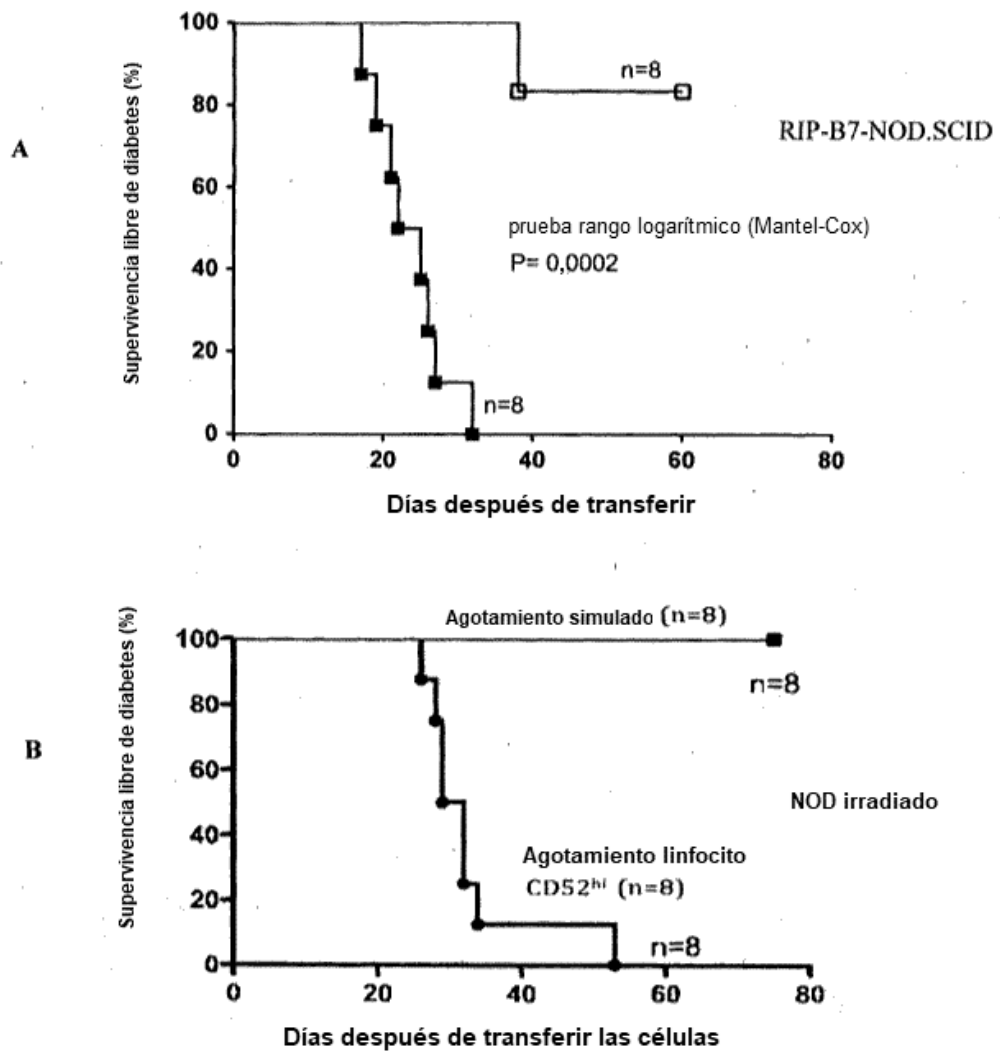
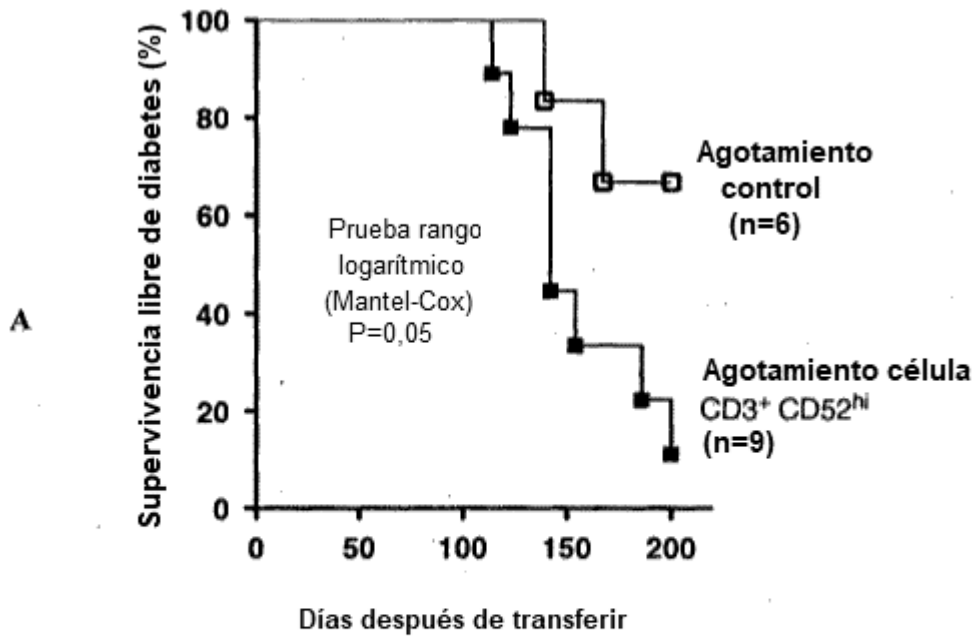
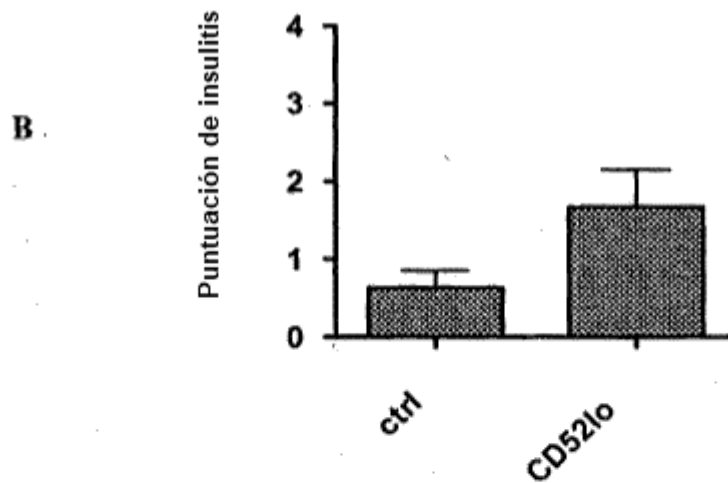


Figura 14



Puntuación de insulitis de NOD machos inyectados con linfocitos T $CD3^+$ o linfocitos $CD3^+ CD52^{lo}$ después de 4 semanas



La puntuación de insulitis se determinó como sigue:
 0=no infiltración,
 1=infiltrado periductal,
 2=infiltrado periislole,
 3=infiltrado intrainislole,
 4=destrucción célula beta

Figura 15

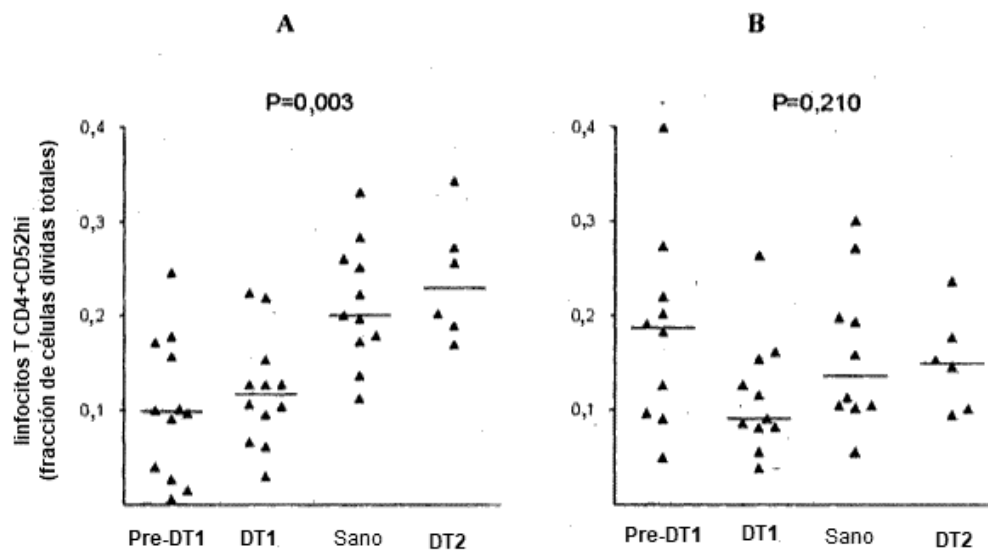


Figura 16

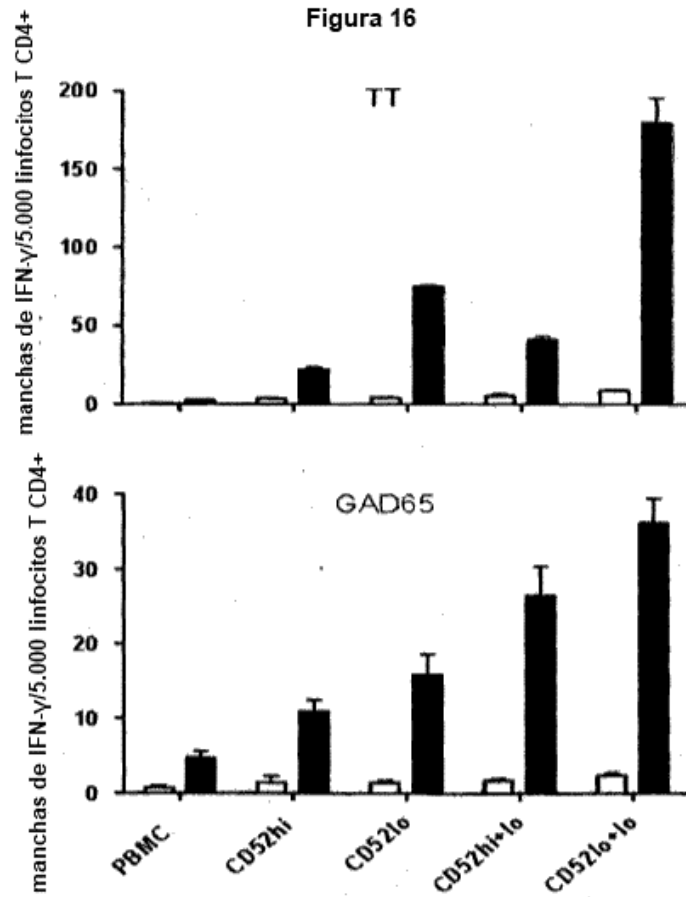


Figura 17

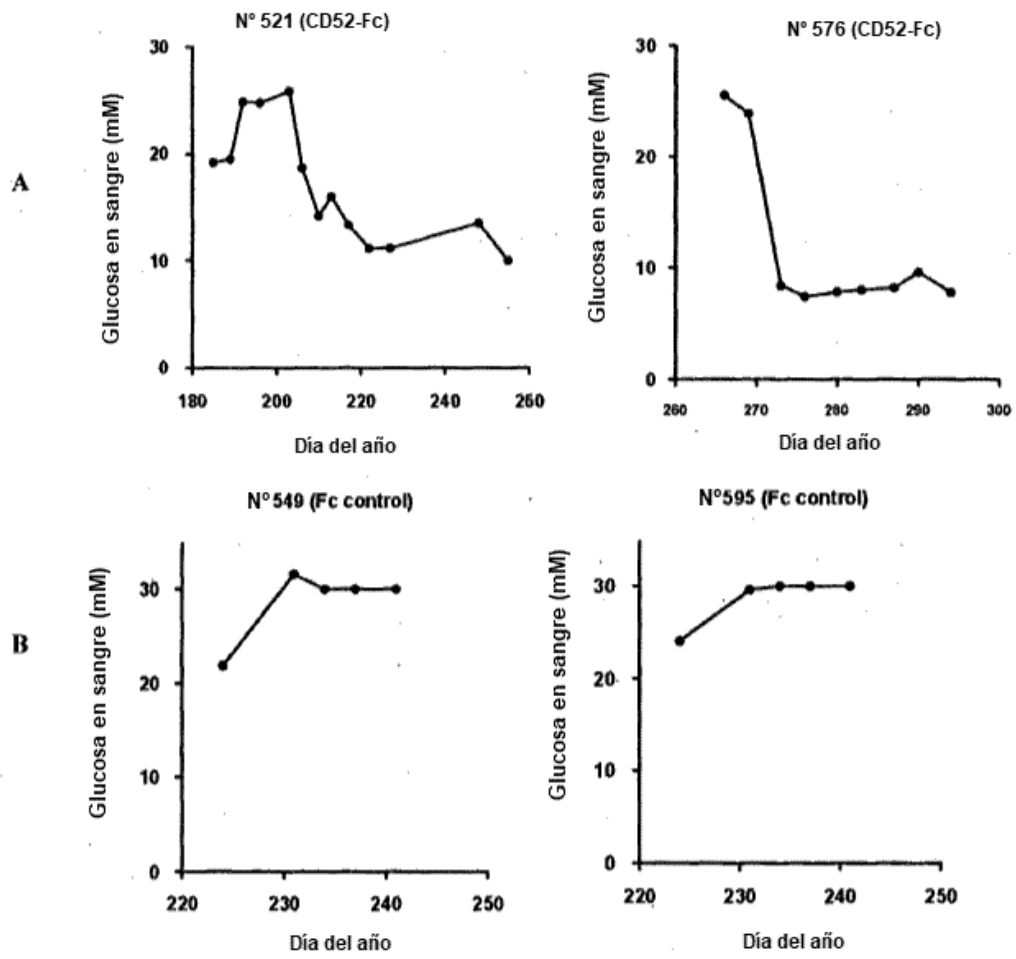


Figura 18

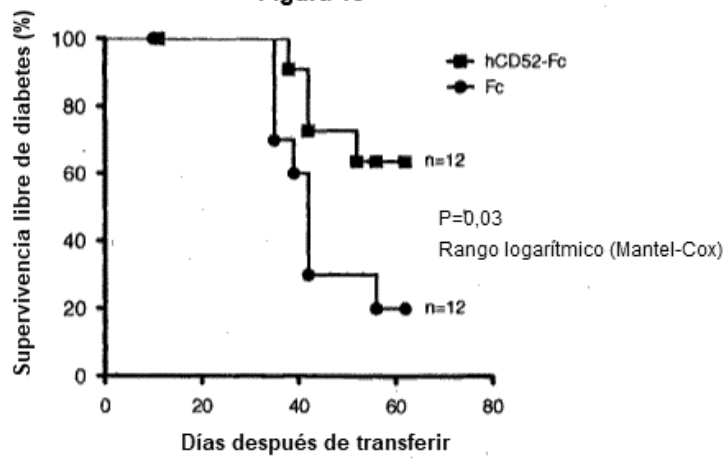


Figura 19

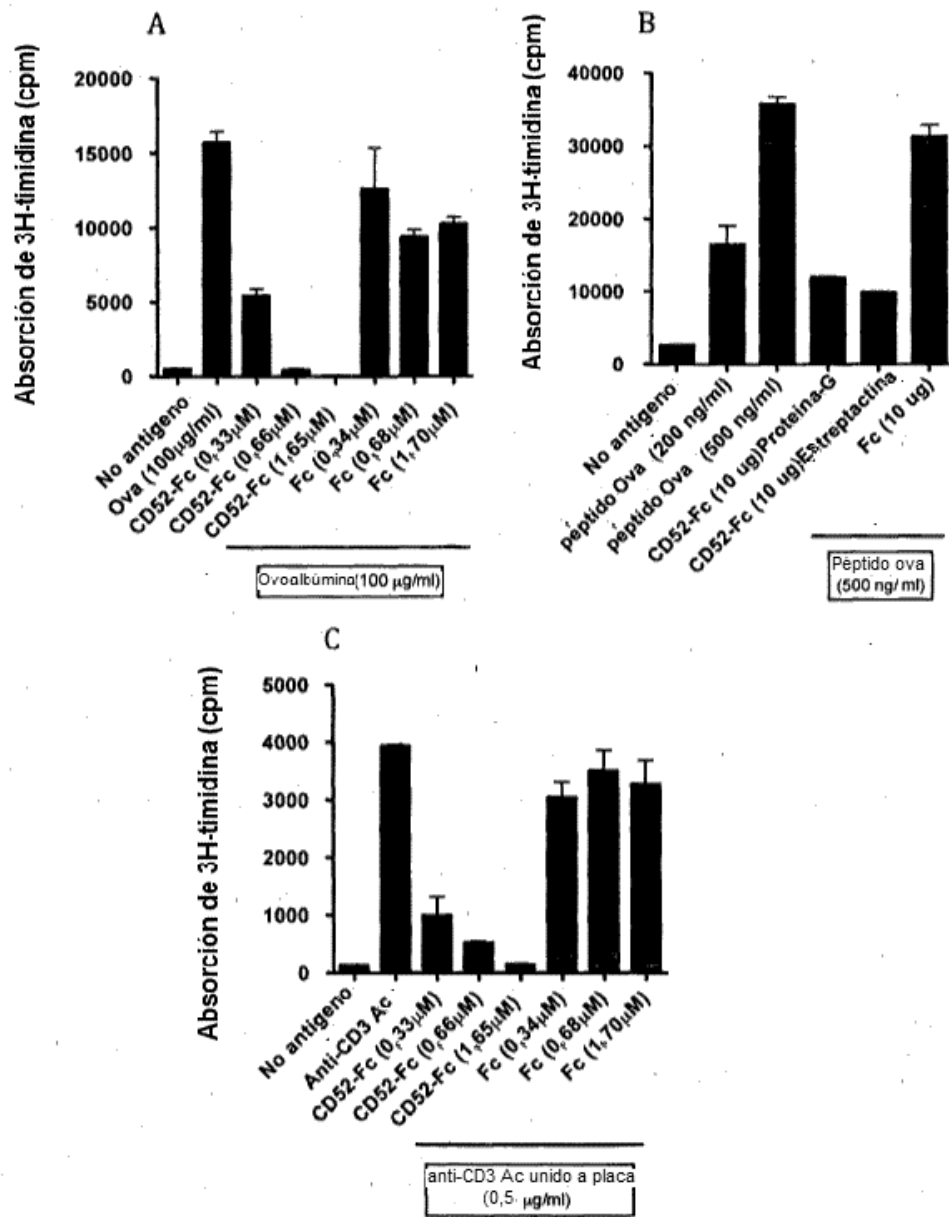


Figura 20

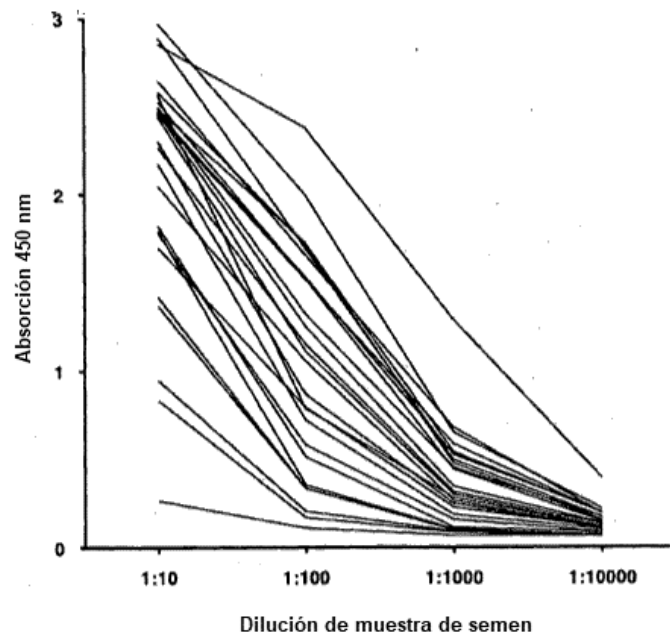


Figura 21

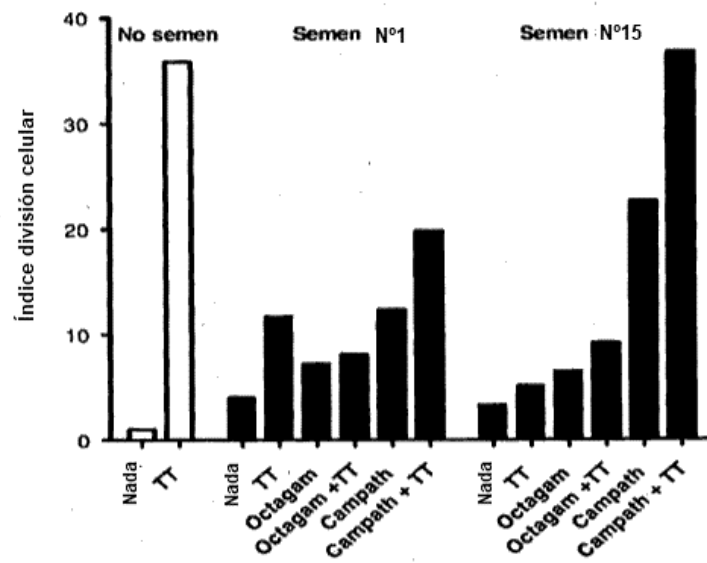


Figura 22

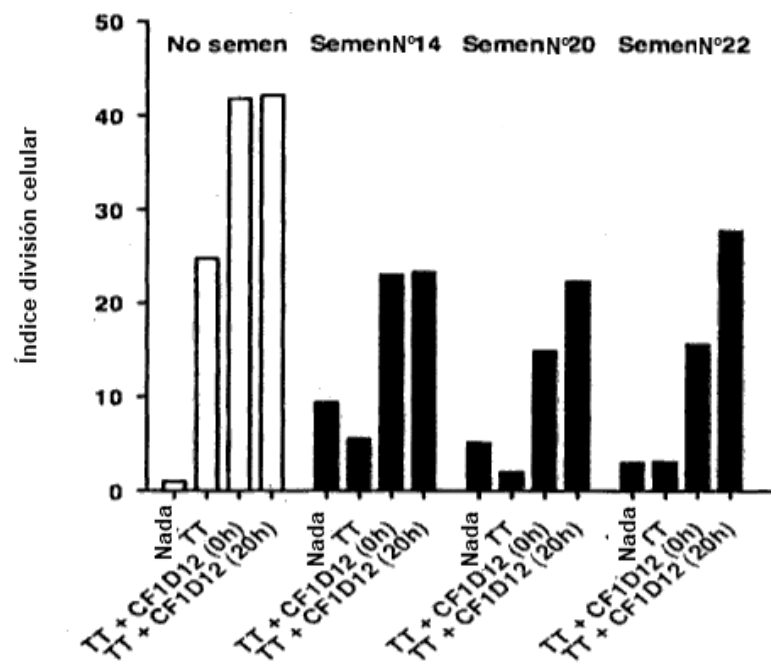


Figura 23

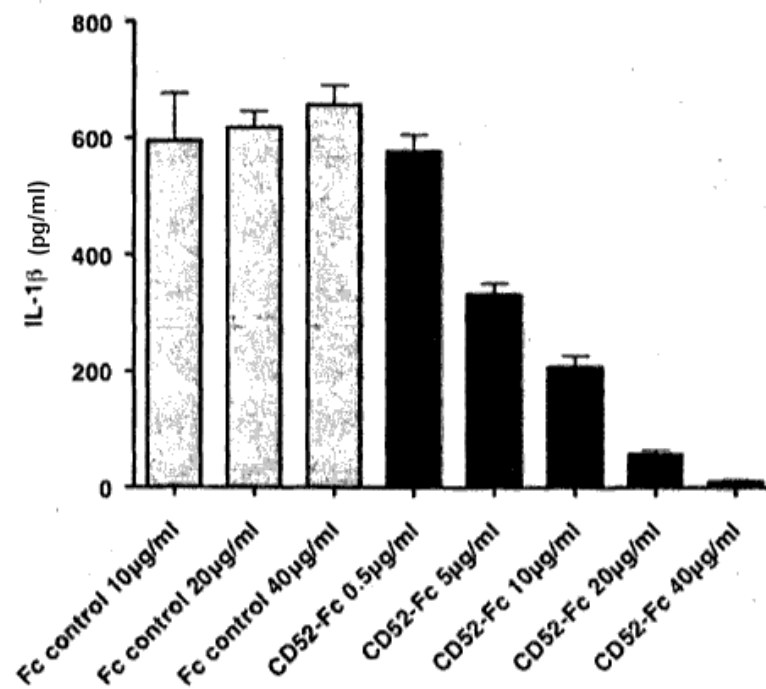


Figura 24

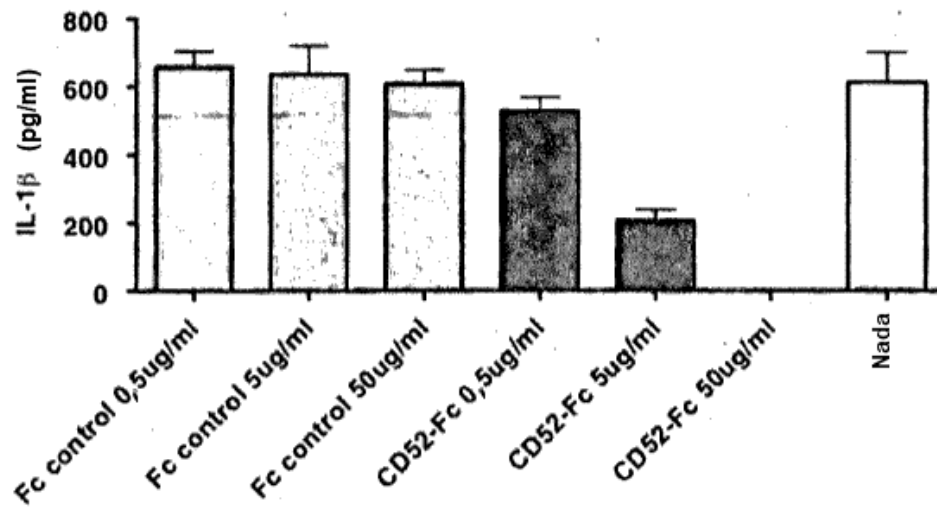


Figura 25

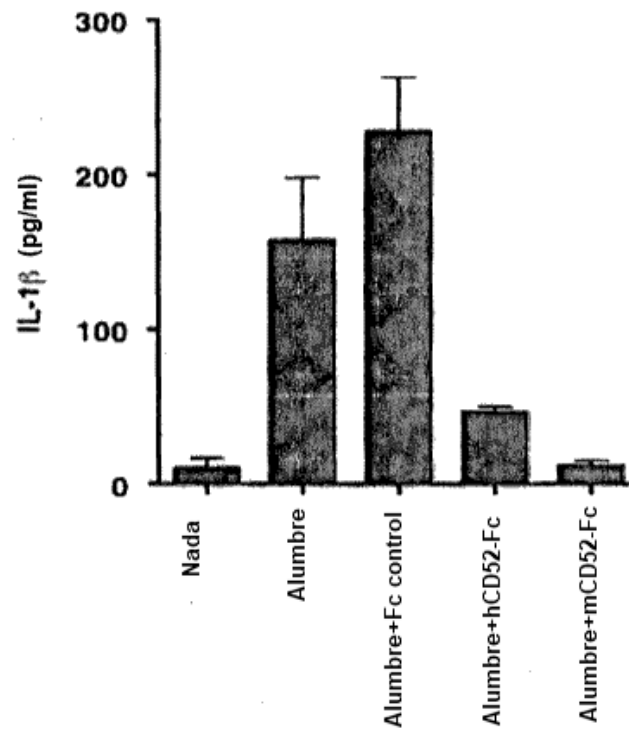


Figura 26

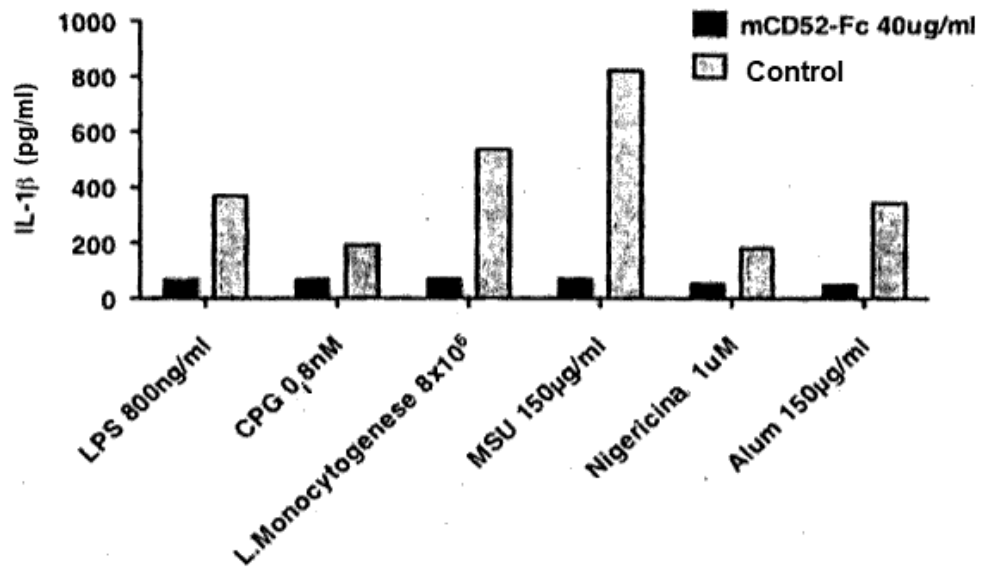


Figura 27

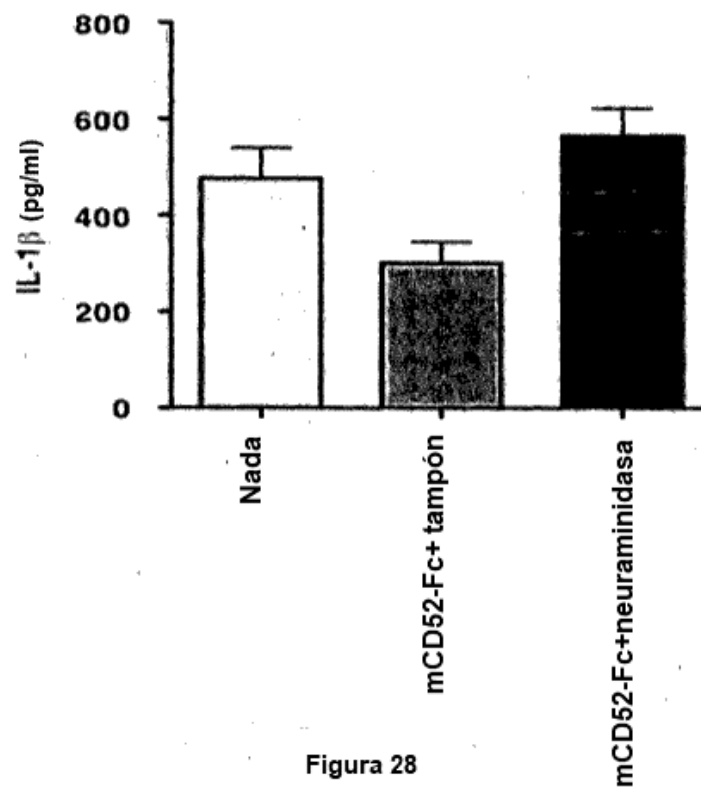


Figura 28

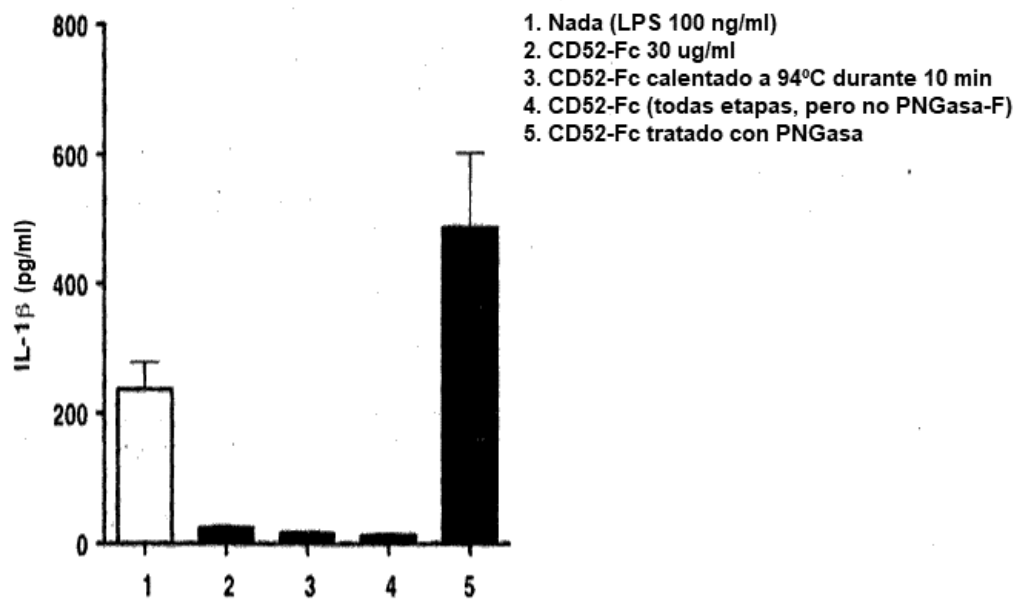


Figura 29