

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 450**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2003 PCT/US2003/00187**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2003 WO03057243**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2003 E 03710635 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 1469879**

54 Título: **Diagnóstico y terapia de trastornos autoinmunes inflamatorios mediados por anticuerpos**

30 Prioridad:

03.01.2002 US 38509
06.05.2002 US 140003

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2019

73 Titular/es:

**LOS ANGELES BIOMEDICAL RESEARCH
INSTITUTE AT HARBOR-UCLA MEDICAL
CENTER (50.0%)
Building N-14, 1124 West Carson Street
Torrance, CA 90502-2064, US y
TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SMITH, TERRY, J. y
CRUIKSHANK, WILLIAM, W.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 727 450 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

Diagnóstico y terapia de trastornos autoinmunes inflamatorios mediados por anticuerpos

Antecedentes de la invención

5 Esta invención se refiere en general a la medicina molecular y a trastornos autoinmunes y, más específicamente, a la identificación de un receptor de autoantígeno que media la infiltración de células T.

10 El sistema inmunológico es una red complicada de células y moléculas que normalmente trabajan para defender el cuerpo y eliminar las infecciones causadas por bacterias, virus y otros microbios invasores. Si una persona padece una enfermedad autoinmune, el sistema inmunológico se ataca a sí mismo de manera errónea, atacando las células, los tejidos y los órganos del propio cuerpo de una persona. Una colección de células y moléculas del sistema inmunológico en un sitio diana se conoce en general como inflamación.

15 Hay muchos tipos diferentes de enfermedades autoinmunes que afectan el cuerpo de diferentes maneras. Por ejemplo, la reacción autoinmune en la esclerosis múltiple se dirige contra el cerebro y contra el intestino en la enfermedad de Crohn. En otras enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, los tejidos y órganos afectados pueden variar entre individuos con la misma enfermedad. En última instancia, el daño a ciertos tejidos por el sistema inmunológico puede ser permanente, como ocurre con la destrucción de las células productoras de insulina del páncreas en la diabetes mellitus tipo 1.

20 Si bien la incidencia de la mayoría de las enfermedades autoinmunes individuales es rara, como grupo, las enfermedades autoinmunes afectan a millones de estadounidenses. La mayoría de las enfermedades autoinmunes afectan con más frecuencia a las mujeres que a los hombres; en particular, afectan a las mujeres en edad laboral y durante su edad fértil.

25 En una serie de enfermedades autoinmunes que incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Graves (EG), la artritis reumatoide (AR), la miastenia grave, la diabetes resistente a la insulina (Tipo I), los anticuerpos contra los receptores de la membrana celular dan lugar a reacciones de hipersensibilidad al receptor que alteran la función celular como resultado de la unión del anticuerpo a los receptores de membrana, que pueden tener un efecto estimulante o de bloqueo. Por ejemplo, en modelos animales de miastenia grave, la producción de anticuerpos por inmunización al receptor de acetilcolina ha provocado la fatiga muscular típica y la debilidad observada en seres humanos afectados, donde se ha demostrado que este anticuerpo está presente en el suero y en las membranas musculares y, además, evita la unión de la acetilcolina producida de forma endógena a su receptor, evitando así la activación muscular. De manera similar, en algunos pacientes diabéticos con resistencia extrema a la insulina, se ha demostrado que los anticuerpos contra los receptores de insulina evitan la unión de la insulina a su receptor.

35 Un aspecto importante de la enfermedad de Graves se refiere a la presencia en la mayoría de los pacientes de IgG detectables dirigidas contra el receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR). Estos anticuerpos pueden poseer actividades estimulantes o de bloqueo y, según el tipo de predominio, pueden provocar una actividad excesiva o insuficiente de la glándula tiroides. Si bien se ha establecido el papel central de estos anticuerpos para provocar una alteración de la hormonogénesis tiroidea y el agrandamiento de las glándulas, se han presentado pocas evidencias directas para implicar a las Ig anti-TSHR en las manifestaciones extra-tiroideas de la enfermedad de Graves. Las manifestaciones extra-tiroideas de la enfermedad de Graves involucran la infiltración de los tejidos conectivos de la órbita y la piel de la parte inferior de la pierna, procesos que se conocen como oftalmopatía asociada al tiroides (OAT) y dermatopatía, respectivamente. Estos procesos extra-tiroideos implican la remodelación de tejidos, incluida la deposición de hialuronano, un glicosaminoglicano no sulfatado sintetizado por fibroblastos activados. Los tejidos orbitales en la OAT a menudo se inflaman drásticamente. Las células inmunocompetentes, incluidas las células T CD4+ y CD8+, los mastocitos y las células B, se infiltran en el tejido orbital, sintetizan y exportan mediadores como las citoquinas, que activan los fibroblastos. La discordancia temporal entre el inicio del hipertiroidismo y el desarrollo de OAT también indica que diferentes factores causales subyacen a los aspectos glandulares frente a los no glandulares de la enfermedad de Graves. Se ha avanzado poco para establecer las bases de la OAT y, como resultado, la terapia actual es en gran medida inespecífica e inadecuada.

45 La identidad del autoantígeno que media las manifestaciones extra-tiroideas, en particular, la oftalmopatía asociada al tiroides (OAT) y la dermatopatía, en las cuales el tejido conjuntivo de la órbita y la espinilla, respectivamente, se someten a remodelaciones extensas conducidas por linfocitos T reclutados pueden proporcionar una valiosa información para otras enfermedades autoinmunes que implican el reconocimiento del mismo autoantígeno. Para la enfermedad de Graves, el mecanismo a través del cual las células inmunocompetentes son dirigidas a los tejidos afectados es fundamental para comprender y, en última instancia, para desarrollar terapias que aborden las manifestaciones tanto glandulares como no glandulares de la enfermedad de Graves.

55 Pritchard J. et al. (2002), *Journal of Immunology*, 168: 942-950, describe que los fibroblastos producen IL-16 y RANTES en respuesta a las EG-IgG.

Weightman et al. (1993), *Autoimmunity*, 16: 251-257 describe que existen sitios de unión a IGF-1 en los fibroblastos. Se explica que el IGF-1 se une al IGF-1R, así como a las proteínas de unión al IGF.

Por lo tanto, existe la necesidad de identificar un autoantígeno que sea reconocido por las inmunoglobulinas endógenas y que medie las respuestas autoinmunes. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

Resumen de la invención

5 La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para usar en un método para reducir la gravedad de una enfermedad autoinmune seleccionada entre la enfermedad de Graves, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la colitis ulcerosa, la esclerodermia y la enfermedad de Crohn, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a un receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R), inhibe la interacción entre el IGF-1R y la inmunoglobulina G anti-IGF-1R autoinmune endógena, e inhibe la activación por parte de dicha inmunoglobulina G autoinmune endógena de fibroblastos.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra (A) mayor actividad de quimiotácticos de linfocitos T tras la adición de suero de la enfermedad de Graves no fraccionado a monocapas de fibroblastos obtenidas de la órbita, el tejido conectivo subcutáneo y el tiroides; y (B) niveles elevados del quimiotáctico IL-16 en medio de fibroblastos de fibroblastos tratados con suero de la enfermedad de Graves.

La figura 2 muestra que la inducción de la actividad quimiotáctica de las células T en los fibroblastos por el suero de la enfermedad de Graves es atribuible a la IgG y específica a los donantes con la enfermedad de Graves.

20 La figura 3 muestra la relación (A) entre la quimiotaxis T dependiente de IL-16 y los niveles de proteína IL-16 provocados por el tratamiento de los fibroblastos de la enfermedad de Graves con EG-IgG; y (B) entre la actividad quimiotáctica de células T provocada en los fibroblastos de la enfermedad de Graves por EG-IgG y los niveles séricos de anticuerpo anti-receptor de TSH.

La figura 4 muestra que la EG-IgG induce la síntesis *de novo* de IL-16 en los fibroblastos de la enfermedad de Graves.

25 La figura 5 muestra que la inducción de (A) la migración de células T dependientes de IL-16 y (B) la proteína IL-16 por EG-IgG en los fibroblastos de la enfermedad de Graves depende de la actividad de la caspasa-3.

La figura 6 muestra que EG-IgG activa rápidamente la fosforilación de p70^{s6k} Thr³⁸⁹ en los fibroblastos de la enfermedad de Graves.

30 La figura 7 muestra que está ausente la inducción de la actividad quimiotáctica de las células T en los fibroblastos obtenidos de (A) donantes afectados por la enfermedad de Graves es específica de las EG-IgG y es dependiente de IGF-1R; (B) los donantes afectados con artritis reumatoide son específicos de AR-IgG y son dependientes de IGF-1R, y (C) los donantes afectados con osteoartritis, una afección inflamatoria del tejido conectivo sin un componente autoinmune.

35 La figura 8 muestra la inducción dependiente de IGF-1R de la proteína (A) IL-16 y la proteína RANTES por EG-IgG en los fibroblastos de la enfermedad de Graves; y (B) proteína IL-16 y proteína RANTES por AR-IgG en los fibroblastos de AR.

La figura 9 muestra que la inducción de la actividad quimiotáctica de las células T en los fibroblastos por el suero es atribuible a la IgG, específica para los donantes con la enfermedad de Graves, y reducida en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IL-16 y anticuerpos neutralizantes anti-RANTES.

40 La figura 10 muestra la inducción de la proteína (A) IL-16 y la proteína RANTES por EG-IgG, el análogo de IGF-1 des(1-3), y la falta de inducción por el análogo de IGF-1 [Leu24] IGF-1; y (B) la actividad quimiotáctica de las células T en los fibroblastos de la enfermedad de Graves es atribuible a EG-IgG y se señala a través del IGF-1R *per se* en lugar de a través de proteínas de unión accesorias (IGFBP).

45 La figura 11 muestra cuatro cepas de fibroblastos normales tratadas con IGF-1 o IL-1β durante 24 horas y posteriormente se analiza la actividad promotora de la migración de las células T (A); y (B) para el contenido de IL-16 y RANTES en los respectivos ELISA.

La figura 12 muestra que el bloqueo de IGF-1R está asociado con una atenuación casi completa de las respuestas provocadas por EG-IgG.

50 La figura 13 muestra la expresión de un mutante IGF-1R dominante negativo (DN) en fibroblastos EG que puede bloquear los efectos de EG-IgG en la actividad quimiotáctica de células T (17A) y la expresión de la proteína IL-16 (barra negra sólida) y RANTES (barra blanca) (17B). Los cultivos confluentes de fibroblastos de un paciente con EG se transfectaron de forma transitoria con un plásmido que contenía el mutante IGF-1R DN designado 486/STOP o vector vacío (como control) como se describe en el presente documento. Los cultivos se trataron a continuación con EG-IgG (100 ng/ml) o nada (control) durante 24 h. Los medios se recolectaron y analizaron para determinar la

actividad migratoria de células T sin (barra negra sólida) o con anti-IL-16 (barra blanca) o anti-RANTES (barra a rayas blancas y negras) que neutralizan los Abs (5 µg/ml) o la expresión de la proteína IL-16 y RANTES. Los datos migratorios se expresan como porcentaje comparado con la migración no estimulada (aleatoria), designado como 100 %. (*) representa una migración estadísticamente diferente en presencia de Abs neutralizantes (panel A) o producción de proteínas (panel B) con una confianza del 5 %.

La figura 14 muestra la inducción de la quimiotaxis de células T dependiente de IL-16 y dependiente de RANTES en cinco muestras de sueros obtenidas de una sola cepa de fibroblastos de la enfermedad de Graves y el efecto de añadir anticuerpos anti-IGF-1R que bloquearon estas inducciones.

La figura 15 muestra una tabla en donde se enumeran los efectos de la IgG en la síntesis de IL-16 y RANTES y la producción de quimiotácticos de linfocitos T.

^a ensayo de quimiotaxis de linfocitos de medio de fibroblastos tratados con IL-1β (10 ng/ml), EG-IgG (100 ng/ml) o IgG (100 ng/ml) de donantes sin enfermedad tiroidea conocida. La actividad quimiotáctica se expresa como un porcentaje del control, cuyos niveles de actividad se encontraron en cultivos de fibroblastos no tratados con IL-β o IgG. Las actividades dependientes de IL-16 y RANTES se definen como las diferencias en las quimiotaxis observadas en muestras sin y con los respectivos anticuerpos neutralizantes. Los datos en la figura 15 se expresan como media ± SD de tres determinaciones independientes. La migración >135 % fue significativa con un límite de confianza del 5 %.

^b Límites de detección, 20 pg/ml.

^c Límites de detección, 15 pg/ml.

^d ND, no detectado.

La figura 16 muestra una tabla con los efectos de la rapamicina y la dexametasona sobre la síntesis de IL-16 y RANTES y la actividad de migración de linfocitos T provocada por la IgG en los fibroblastos de pacientes con enfermedad de Graves.

^a Las capas confluentes de fibroblastos se trataron con nada, EG-IgG (100 ng/ml) sin o con rapamicina (20 nM) o dexametasona (10 nM) durante 24 h. El medio acondicionado a continuación se sometió al ensayo de migración de células T, como se describe en el presente documento. Sin o con Abs neutralizantes anti-IL-16 (10 µg/ml) y/o anti-RANTES- (5 µg/ml). Otra alícuota de medio se sometió a los ELISA específicos de citoquinas descritos. Los datos se expresan como las medias ± SD de tres determinaciones independientes.

^b La migración se expresa como un porcentaje del control, cuyos niveles de actividad se encontraron en cultivos de fibroblastos no tratados. La migración de >135 % fue significativa con un límite de confianza del 5 %.

^c Límites de detección, 20 pg/ml.

^d Límites de detección, 15 pg/ml.

La figura 17 muestra la visualización de IGF-1R en fibroblastos normales (control) y EG y el desplazamiento de ¹²⁵I-IGF-1 y la unión de Ab anti-IGF-1Rα por EG-IgG. El panel A muestra la visualización de la superficie celular de IGF-1R en fibroblastos normales y EG según lo determinado por la unión de Ab anti-IGF-1Rα conjugado con FITC, evaluada mediante citometría de flujo. El panel B muestra la expresión de IGF-1Rb en siete cepas de fibroblastos por análisis de transferencia Western. El panel C muestra el desplazamiento de unión de ¹²⁵I-IGF-1 con concentraciones crecientes de IGF-1 sin marcar, Des 1,3, IGF-1, EG-IgG e IgG de control (N-IgG). El panel D muestra el desplazamiento de la unión de anti-IGF-1Ra conjugado con FITC por N-IgG (paneles de la izquierda) o EG-IgG (paneles de la derecha) en los fibroblastos EG (paneles superiores) y Control (normal) (paneles inferiores), según se evaluó por citometría de flujo. Cada panel representa un experimento representativo de al menos tres experimentos separados, todos con resultados similares.

La figura 18 muestra los efectos de IL-1β, IGF-1 y EG-IgG sin o con Ab anti-IGF-1R, 1H7 sobre la actividad quimiotáctica de las células T (18A) y la expresión de proteínas IL-16 (barra negra sólida) y RANTES (barra blanca) (18B) en fibroblastos de donantes con EG. Los cultivos se trataron con IL-1β (10 ng/ml), IGF-1 (10 nM), EG IgG (100 ng/ml) sin o con Ab 1H7 (5 mg/ml) o un control de isotipo (5 mg/ml) durante 24 h y a continuación los medios se sometieron a ensayos de migración de células T o ensayos ELISA específicos como se describe en este documento. Las muestras utilizadas para el análisis de quimiotaxis se trataron sin Ab (barra negra sólida) o bien con Abs neutralizantes anti-IL-16 (clon 14.1, 5 µg/ml) (barra blanca) o anti-RANTES (5 µg/ml) (barra a rayas blancas y negras), como se indica. Los datos migratorios se expresan como un porcentaje en comparación con la migración no estimulada (aleatoria), designada como 100 %. (*) representa una migración estadísticamente diferente en presencia de Abs neutralizantes (panel 18A) o producción de proteínas (panel 18B) con una confianza del 5 %.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se dirige a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso en un método para reducir la gravedad de una enfermedad autoinmune seleccionada entre la enfermedad de Graves, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la colitis ulcerosa, la esclerodermia y la enfermedad de Crohn, en donde se une el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo a un receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R), inhibe la interacción entre el IGF-1R y la inmunoglobulina G anti-IGF-1R autoinmune endógena, e inhibe la activación de dicha inmunoglobulina G autoinmune endógena de los fibroblastos en dicha enfermedad.

Una sustancia que inhibe la afluencia mediada por fibroblastos de células inmunocompetentes a tejidos afectados puede ser, por ejemplo, una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena; una sustancia que inhibe la interacción entre una molécula quimiotáctica y su receptor; o una sustancia que neutraliza al menos un tipo de quimiotáctico. Además, una sustancia que inhibe la entrada de linfocitos T a los tejidos afectados puede ser, por ejemplo, una sustancia que inhibe la interacción entre el autoantígeno IGF-1R, que puede estar localizado en un fibroblasto o en cualquier otro tipo de célula, por ejemplo, un linfocito y una inmunoglobulina G (IgG) específica de la enfermedad endógena; una sustancia que inhibe la interacción entre una molécula quimiotáctica y su receptor; o una sustancia que neutraliza al menos un tipo de molécula quimiotáctica. Una sustancia que inhibe la afluencia de linfocitos T a los tejidos afectados también puede ser, por ejemplo, cualquier agente que interfiera con la cascada de señalización que se encuentra corriente abajo del receptor del autoantígeno y que da lugar al reclutamiento de quimiotácticos o a la actividad o expresión de cualquier molécula que se activa como consecuencia de la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena.

En el presente documento también se describen métodos para diagnosticar o predecir la susceptibilidad a una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos en un individuo sospechoso de padecer dicha enfermedad y métodos para identificar una sustancia que puede modular la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R) es un autoantígeno reconocido por inmunoglobulinas endógenas específicas de la enfermedad y, tras la activación, puede inducir el reclutamiento de linfocitos T mediante la liberación de una o más moléculas quimiotácticas, por ejemplo, RANTES o IL-16. El IGF-1R que sirve como autoantígeno puede estar localizado, por ejemplo, en fibroblastos como se describe en este documento, pero también puede estar localizado en otros tipos de células, incluso en los propios linfocitos T.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad efectiva" es una cantidad predeterminada calculada para conseguir el efecto terapéutico deseado, por ejemplo, para alterar la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena u otra actividad biológica, lo que resulta en una reducción de la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. La dosis requerida variará con el tratamiento particular y con la duración del tratamiento deseado; sin embargo, se anticipa que para el tratamiento terapéutico se usarán dosis de entre aproximadamente 10 microgramos y aproximadamente 1 miligramo por kilogramo de peso corporal por día. Puede ser particularmente ventajoso administrar dicha sustancia en un depósito o en una forma de larga duración, tal como se describe en el presente documento. Una cantidad terapéuticamente efectiva normalmente es una cantidad de una sustancia que, cuando se administra en una composición fisiológicamente aceptable, es suficiente para conseguir una concentración plasmática de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, preferiblemente de aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml, más preferiblemente de al menos aproximadamente 2 µg/ml y generalmente de 5 a 10 µg/ml. Los anticuerpos terapéuticos pueden administrarse en cantidades proporcionalmente apropiadas según las prácticas conocidas en esta técnica.

Tal como se usa en el presente documento, "reducción de la gravedad" pretende referirse a una detención, disminución o reversión de los signos y síntomas, indicadores fisiológicos, manifestaciones secundarias, marcadores bioquímicos o indicadores metabólicos asociados con una enfermedad autoinmune particular. Los síntomas de una enfermedad autoinmune dependen del órgano o tejido en particular atacado por el sistema inmunitario del hospedador y pueden incluir, por ejemplo, remodelación de tejidos, hinchazón de las articulaciones, alteraciones neurológicas, neuroinflamación, inflamación gastrointestinal, inflamación de la piel, disminución de la liberación de insulina en la diabetes Tipo 1, cortisol y aldosterona reducidos en insuficiencia suprarrenal autoinmune. Los marcadores bioquímicos de una enfermedad autoinmune pueden incluir, por ejemplo, inmunoglobulinas específicas de la enfermedad.

El método de la invención es útil para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, la enfermedad de Graves, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la colitis ulcerosa, la esclerodermia y la enfermedad de Crohn, al inhibir la interacción entre el IGF-1R y la inmunoglobulina G endógena autoinmune anti-IGF-1R.

Como se describe en este documento, el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R), una tirosina quinasa, representa un autoantígeno que se expresa en las células de fibroblastos e inicia la activación de fibroblastos y la posterior cascada de eventos que resultan en el reclutamiento de células inmunocompetentes. Las

secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de IGF-1R se describen, por ejemplo, por Ullrich et al., EMBO J 5 (10): 2503-2512 (1986). El IGF-1R también se expresa en tipos de células distintos a los fibroblastos, como, por ejemplo, en los propios linfocitos, donde puede servir de manera similar como mediador del reclutamiento e infiltración de linfocitos T.

5 Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF)-1 e IGF-2 poseen similitudes estructurales con la proinsulina. Los IGF son sintetizados en gran parte por el hígado en respuesta a la hormona del crecimiento y desempeñan importantes funciones paracrinas en una variedad de tejidos. El IGF-1 existe en gran parte unido a proteínas de unión y ejerce sus acciones biológicas a través de una asociación con el receptor de IGF-1 (IGF-1R), un receptor de tirosina quinasa de superficie (Adams et al., Cell Mol Life Sci. 57: 1050-1093 (2000)). El IGF-1R se parece al receptor de insulina y media las actividades que promueven el crecimiento tanto de IGF-1 como de IGF-2.

10 La secuencia de aminoácidos y la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos del receptor de tirosina de superficie IGF-1R humano están disponibles públicamente, por ejemplo, en la base de datos NCBI Genbank con los números de acceso CAA28030 y X04434, respectivamente. El IGF-1R maduro tiene una secuencia de 1367 aminoácidos como se describe por Ullrich et al., EMBO J. 5 (10): 2503-2512 (1986). Este receptor involucra una familia de proteínas sustrato del receptor de insulina que a su vez interactúan con las proteínas quinasas activadas por mitógenos. El IGF-1R se ha implicado en la patogénesis del crecimiento y trastornos neoplásicos.

15 Esta invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que IGF-1R desempeña un papel directo en la patogénesis de la autoinmunidad humana. Se sabe que muchos tipos diferentes de células expresan IGF-1R, incluidos los del linaje de fibroblastos. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden ponerse en práctica con orquestación mediada por IGF-1R de una respuesta autoinmune independientemente de si el IGF-1R está presente en fibroblastos o en otro tipo de células, por ejemplo, monocitos o macrófagos.

20 El método de la invención es útil para el tratamiento de la enfermedad de Graves, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la colitis ulcerosa, la esclerodermia y la enfermedad de Crohn.

25 Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad autoinmune" se refiere a un trastorno que se produce debido a la autoinmunidad, una enfermedad que es causada por una respuesta inmune al cuerpo del propio paciente. La autoinmunidad es una etiología, lo que significa que es una causa de enfermedad y las enfermedades autoinmunes se clasifican según su etiología común. Los resultados de una reacción autoinmune varían y van desde la fiebre hasta la destrucción de diversos tipos de tejidos, como los vasos sanguíneos, el cartílago, la mielina y la piel. La autoinmunidad puede afectar a cualquier órgano del cuerpo, por ejemplo, el cerebro, la piel, los riñones, los pulmones, el hígado, el corazón, el intestino y el tiroides. Por lo tanto, la enfermedad autoinmune es anatómicamente diversa y la expresión clínica de la enfermedad depende del sitio afectado. La inflamación resultante y el daño tisular pueden causar insuficiencia renal, problemas respiratorios, función cardíaca anormal, dolor, deformidad, delirio y muerte. Las enfermedades autoinmunes pueden afectar los tejidos conectivos, que son aquellos tejidos que se unen a diversos tejidos y órganos.

30 Una gran cantidad de afecciones casi con seguridad tienen una causa o componente autoinmune, que incluye, por ejemplo, la enfermedad de Graves, la artritis reumatoide (AR), la diabetes dependiente de insulina (tipo I), la alopecia areata, la espondilitis anquilosante, el síndrome antifosfolípido, la enfermedad de Addison autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampollar, cardiomiopatía, dermatitis-celiaca, síndrome de disfunción inmune por fatiga crónica (CFIDS, por sus siglas en inglés), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, Guillain-barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopenia idiopática (PTI), nefropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus, enfermedad de Ménière, enfermedad de tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgaris, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de Stiff-Man, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vilitigo, granulomatosis de Wegener.

35 Varias enfermedades autoinmunes se caracterizan por la presencia de anticuerpos patógenos específicos que interactúan con el fibroblasto para mediar en una o más manifestaciones de la enfermedad particular como se describe, por ejemplo, para la AR por Matsumoto et al., Science 286: 1732 (1999); y para la enfermedad de Graves por Pritchard et al., J. Immunol. 168: 942-950 (2002). Por ejemplo, en la enfermedad de Graves, las inmunoglobulinas endógenas específicas (EG-IgG) reconocen y se unen al IGF-1R para activar los fibroblastos que, como resultado, expresan y liberan las moléculas quimiotácticas de linfocitos T RANTES e IL-16.

40 El IGF-1 ejerce múltiples acciones sobre el crecimiento y el metabolismo como lo describen Adams et al., *supra* (2000) y Grimberg y Cohen, J. Cell Physiol. 183: 1-9 (2000). Como se describe en el presente documento, el IGF-1R se parece al receptor de insulina y puede mediar las actividades que promueven el crecimiento de la insulina, así como el IGF-1 y el IGF-2. El IGF-1R comprende dos subunidades, se presenta en la superficie celular como dímeros unidos por disulfuro y presenta estados de unión de afinidad alta y baja y cooperatividad negativa. La señalización

celular implica reordenamientos de dominio en lugar de oligomerización. El IGF-1R se ha implicado en la patogénesis del crecimiento y trastornos neoplásicos. El IGF-1R activado funciona como un inhibidor de la apoptosis y su sobreexpresión ofrece protección contra la muerte celular. Sin embargo, antes de la presente divulgación, el IGF-1R no había sido implicado en el ámbito de la autoinmunidad humana.

5 En el presente documento también se describen métodos para reducir la gravedad de las anomalías del crecimiento, así como las alteraciones en la homeostasis de la glucosa, que son consecuencia de la capacidad de la EG-IgG para iniciar la señalización aguas abajo a través del IGF-1R en una amplia variedad de tipos celulares, sin limitarse a células del linaje de fibroblastos. Por ejemplo, los niños con EG a menudo experimentan un crecimiento lineal acelerado asociado con la maduración epifisaria precoz como lo describen LaFranchi y Hanna, "Graves' disease in the neonatal period and childhood" en las páginas 989-997 de *The Thyroid* (8ª edición, Braverman y Utiger eds., Lippincott, Filadelfia 2000). El impacto de la EG activa en la homeostasis de la glucosa se reconoce en la materia según lo descrito por Moller et al., *Clin. Endocrinol* 44: 453-359 (1996). La modulación de la activación de IGF-1R por una inmunoglobulina endógena, por ejemplo, IgG, en el contexto de cualquiera de las vías metabólicas relevantes para el Receptor de IGF-1 puede ser útil para reducir la gravedad de una afección que es el resultado de las interacciones entre el autoantígeno IGF-1R y la inmunoglobulina endógena específica de la enfermedad particular.

20 Como se describe en el presente documento, el IGF-1R representa un autoantígeno que está asociado con las manifestaciones tisulares de la enfermedad de Graves en los sitios de la órbita, la piel pre-tibial y el tiroides. En particular, el IGF-1R media los componentes glandulares y extratiroideos de la enfermedad de Graves al dar lugar a la infiltración de los linfocitos T en el tejido conjuntivo. El receptor de hormona estimulante del tiroides (TSHR), que está involucrado en el componente tiroideo de la enfermedad de Graves, proporciona un ejemplo adicional de un autoantígeno involucrado en la mediación de las manifestaciones de una enfermedad autoinmune, como lo describen Laugwitz et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 93: 116 (1996).

25 La mediación de una afección asociada con el reclutamiento de linfocitos T resultante de la unión y activación de una inmunoglobulina endógena al receptor de autoantígeno IGF-1R puede involucrar IGF-1R localizado en fibroblastos, así como en otros tipos de células, por ejemplo, monocitos y macrófagos.

30 Una sustancia que es útil en los métodos de la invención para reducir la gravedad de una afección asociada con el reclutamiento e infiltración de linfocitos T mediado por fibroblastos o con el reclutamiento de linfocitos T mediado por IGF-1R donde el autoantígeno IGF-1R puede estar localizado en células que no son fibroblastos inhibe la interacción entre el autoantígeno IGF-1R, que puede estar localizado en un fibroblasto u otro tipo de célula, por ejemplo, monocitos o macrófagos, y una inmunoglobulina G específica para la enfermedad endógena (IgG).

35 Una sustancia útil en los métodos de la invención para reducir la gravedad de una afección asociada con el reclutamiento e infiltración de linfocitos T mediado por fibroblastos o con el reclutamiento de linfocitos T mediado por IGF-1R donde el autoantígeno IGF-1R puede estar localizado en una célula que no es un fibroblasto puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotipo dirigido contra la parte específica de antígeno de la secuencia de un anticuerpo específico de la enfermedad, por ejemplo, una EG-IgG o una AR-IgG. Las especificidades antigénicas se definen por las secuencias únicas (idiotopos) del sitio de combinación de antígenos y los anticuerpos anti-idiotipo reconocen estas secuencias específicas (idiotopos) del sitio de unión al antígeno específico de la enfermedad y pueden, por ejemplo, asemejarse al epítipo al cual la enfermedad IgG específica reacciona. Las sustancias descritas en este documento, que modulan la afluencia de células inmunocompetentes, se denominan colectivamente en el presente documento como sustancias moduladoras.

45 La enfermedad de Graves se caracteriza por hipertiroidismo causado por una hiperactividad generalizada de toda la glándula tiroides. La principal causa de hipertiroidismo, la enfermedad de Graves, representa un defecto básico en el sistema inmunológico, que causa la producción de inmunoglobulinas que estimulan y atacan la glándula tiroides, lo que lleva al crecimiento de la glándula y la sobreproducción de la hormona tiroidea. Además de las manifestaciones glandulares, la enfermedad de Graves también se asocia con manifestaciones extratiroideas, oftalmopatía asociada al tiroides (OAT) y dermatopatía, en las cuales los autoanticuerpos atacan los tejidos en los músculos del ojo y en la piel pretibial, respectivamente, y provocan remodelación extensa del tejido conectivo. La remodelación del tejido conectivo asociada con la OAT y la dermatopatía representa una manifestación secundaria de una afección mediada por fibroblastos asociada con la infiltración de linfocitos T, como la enfermedad de Graves, que puede aliviarse parcial o totalmente al administrar una cantidad eficaz de al menos una sustancia que inhiba la interacción entre IGF-1R y una inmunoglobulina endógena.

55 Como se ejemplifica en el presente documento, la artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune adicional que puede reducirse en gravedad administrando a un individuo una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que inhibe la interacción entre IGF-1R y la inmunoglobulina G endógena. La artritis reumatoide (AR) implica inflamación del revestimiento de las articulaciones del cuerpo, más habitualmente las articulaciones pequeñas de las manos. La inflamación y el engrosamiento del revestimiento de la articulación, denominado sinovio, pueden causar dolor, rigidez, hinchazón, calor y enrojecimiento. La articulación afectada también puede perder su forma, resultando en una pérdida de movimiento normal y, si no se controla, puede causar la destrucción de los huesos, deformidad y, eventualmente, discapacidad. En algunas personas, la AR también

puede afectar otras partes del cuerpo, como la sangre, los pulmones, la piel y el corazón. Como se describe en este documento, los anticuerpos específicos de la AR (AR-IgG) activan los fibroblastos de la AR mediante el reconocimiento y la unión al IGF-1R, que sirve como autoantígeno expresado en la superficie de los fibroblastos de AR.

5 De acuerdo con la invención, la sustancia moduladora que inhibe la interacción entre el IGF-1R y la inmunoglobulina G autoinmune endógena anti-IGF-1R es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al IGF-1R. Sin embargo, aunque no es parte de la presente invención, también se discuten otros tipos de sustancias moduladoras, como aquellas que interrumpen o impiden la interacción o pueden actuar indirectamente como, por ejemplo, un agente bloqueador que hace funcionalmente inactivo el autoantígeno receptor o inmunoglobulina. Dicha sustancia
10 moduladora inhibitoria, que es útil para poner en práctica la invención, puede efectuar una disminución en la extensión, cantidad o velocidad del receptor de autoantígeno o la expresión o actividad de inmunoglobulina; una disminución en la extensión, cantidad o velocidad de expresión o actividad de una molécula quimiotáctica o su receptor; o una disminución en la extensión, cantidad o velocidad de liberación de una molécula quimiotáctica. Una cantidad efectiva es la cantidad de una sustancia moduladora necesaria para efectuar una reducción en la extensión, cantidad o velocidad de activación de fibroblastos. Por ejemplo, una cantidad efectiva de una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena puede causar una reducción de dos veces, cinco veces, diez veces, 20 veces, 100 veces o más en la cantidad o velocidad de activación de fibroblastos. Una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una
20 inmunoglobulina endógena puede ser un agente que produce una disminución en la extensión, cantidad o velocidad de la expresión del autoantígeno receptor o que produce una disminución en la actividad del autoantígeno receptor, por ejemplo, IGF-1R. Las sustancias moduladoras inhibitorias útiles para la práctica de la invención reivindicada incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a IGF-1R, pero que no dan lugar a la activación del fibroblasto.

25 Un ejemplo de una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena es cualquier molécula que se une al autoantígeno receptor o a la inmunoglobulina endógena con suficiente afinidad para disminuir la activación del fibroblasto. Además, una sustancia moduladora inhibitoria puede ser cualquier molécula que se una a una molécula reguladora o región genética para inhibir o promover la función de la proteína reguladora o región genética y efectuar una disminución en la extensión o cantidad o velocidad de expresión o actividad del receptor. Un ejemplo de una sustancia que inhibe la interacción
30 entre el autoantígeno IGF-1R y una inmunoglobulina endógena puede incluir una molécula de ácido nucleico antisentido, un mutante de IGF-1R negativo dominante o un inhibidor de la transcripción que se une a un promotor/región reguladora 5' de IGF-1R.

Dicha sustancia moduladora puede producirse usando métodos que son generalmente conocidos en la materia, e incluyen el uso de un polipéptido del receptor de autoantígeno purificado, por ejemplo, IGF-1R, para producir anticuerpos o para seleccionar bibliotecas de compuestos, como se ha descrito anteriormente, para aquellos que se unen específicamente a un polipéptido autoantígeno correspondiente pero no activan el reclutamiento e infiltración de linfocitos T. Por ejemplo, en un aspecto, un anticuerpo que es selectivo para un polipéptido receptor de autoantígeno se puede usar directamente como antagonista, o indirectamente como un mecanismo de direccionamiento o administración para llevar un agente citotóxico o citostático a las células de fibroblastos específicas de la enfermedad que expresan el receptor de autoantígeno correspondiente. Dichos agentes pueden ser, por ejemplo, radioisótopos. Los anticuerpos pueden generarse usando métodos que son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, Ab policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena simple humanizada, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab.

45 Las moléculas antisentido biológicamente eficaces, así como las versiones mutantes negativas dominantes de un autoantígeno receptor, por ejemplo, el IGF-1R, son sustancias adecuadas para poner en práctica los métodos descritos. Las secuencias de nucleótidos antisentido, así como las secuencias que codifican un IGF-1R negativo dominante, pueden ponerse en un vector plasmídico apropiado y emplearse para inhibir la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena; o como una sustancia que previene la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados.

50 En un aspecto, se puede usar una molécula antisentido para una molécula de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, un autoantígeno receptor, una molécula quimioterapéutica, un receptor de molécula quimiotáctica, para bloquear la transcripción o traducción del ARNm correspondiente. Específicamente, las células pueden transformarse con secuencias complementarias a una molécula del ácido nucleico que codifica, por ejemplo, IGF-1R. Dichos métodos son bien conocidos en la materia, y pueden diseñarse oligonucleótidos sentido o antisentido o fragmentos más grandes, a partir de diversas ubicaciones a lo largo de las regiones codificantes o de control de secuencias que codifican polipéptidos o ácidos nucleicos del receptor de autoantígeno. Estas moléculas antisentido pueden ser ADN, derivados estables del ADN, como los fosforotioatos o metilfosfonatos, ARN, derivados estables del ARN, como el 2'-O-alkil ARN, u otros miméticos oligonucleotídicos. Las patentes de Estados Unidos 5.652.355 y 5.652.356 describen la síntesis y el efecto de las moléculas antisentido fisiológicamente estables. Por lo tanto, las moléculas antisentido se pueden usar para inhibir indirectamente la interacción entre, por ejemplo, un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena o una molécula quimiotáctica y su receptor correspondiente; o para prevenir la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados mediante la reducción de la liberación por
60

parte de los fibroblastos de al menos un tipo de molécula quimiotáctica que atrae a las células inmunocompetentes.

Un mutante negativo dominante del IGF-1R, por ejemplo, el mutante negativo dominante de IGF-1R designado IGF-1R, 486/STOP descrito en el presente documento, también puede servir como sustancia que puede inhibir la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena; o como sustancia que previene la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al reducir la liberación por parte de los fibroblastos de al menos un tipo de molécula quimiotáctica que atrae a las células inmunocompetentes.

Las células hospedadoras transformadas con una secuencia de nucleótidos que codifica un mutante negativo dominante pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. Se describen células hospedadoras transformadas con un polinucleótido purificado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que corresponde a un polipéptido de IGF-1R negativo dominante. Los expertos en la materia apreciarán que las células de este tipo o las preparaciones hechas a partir de estas células también pueden usarse en los métodos descritos en este documento para identificar una sustancia moduladora descrita en este documento.

Los vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), herpes o virus de la vacuna, o de varios plásmidos bacterianos se pueden usar para el suministro de secuencias de nucleótidos antisentido a la población de fibroblastos u otras células. El vector viral seleccionado debe ser capaz de infectar las células seleccionadas, por ejemplo, las células de fibroblastos y ser seguro para el hospedador y causar una transformación celular mínima. Los vectores retrovirales y los adenovirus proporcionan un medio eficiente, útil y bien caracterizado para introducir y expresar genes extraños en células de mamíferos. Estos vectores son bien conocidos en la materia y tienen amplios rangos de hospedador y tipo de célula, y expresan los genes de manera estable y eficiente. Se pueden usar métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir dichos vectores recombinantes y se describen en Sambrook et al. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nueva York (1989). Incluso en ausencia de integración en el ADN, dichos vectores pueden continuar transcribiendo moléculas de ARN hasta que son desensamblados por las nucleasas endógenas. La expresión transitoria puede durar un mes o más con un vector no replicante e incluso más si los elementos de replicación apropiados son parte del sistema vectorial.

Se prefieren especialmente las células hospedadoras recombinantes eucariotas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a levadura, células de mamífero que incluyen, pero no se limitan a líneas celulares de origen humano, bovino, porcino, mono y roedor, y células de insecto que incluyen, entre otras, líneas celulares derivadas de *Drosophila* y gusano de seda. Las líneas celulares derivadas de especies de mamíferos son particularmente adecuadas y pueden obtenerse de una variedad de fuentes comerciales conocidas en la materia.

El vector de expresión puede introducirse en células hospedadoras mediante una cualquiera de una serie de técnicas que incluyen, por ejemplo, transformación, transfección, lipofección, fusión de protoplastos y electroporación. Los kits disponibles en el mercado, que incluyen vectores, reactivos y condiciones de transfección bien caracterizados y materiales de cultivo celular están bien establecidos y fácilmente disponibles, por ejemplo, de Clonetech (Palo Alto, CA); Invitrogen (Carlsbad, CA); Pharmingen (San Diego, CA) y Stratagene (La Jolla, CA). Las células que contienen vectores de expresión se propagan clonalmente y se analizan individualmente para determinar el nivel de producción de polipéptidos. La identificación de los clones de la célula hospedadora que expresan, por ejemplo, un mutante negativo dominante se puede realizar por varios medios, que incluyen, entre otros, la reactividad inmunológica con anticuerpos y/o la presencia de actividad biológica específica asociada a la célula hospedadora. Una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión del mutante negativo dominante, utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteína son conocidos en la materia. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Las ribozimas, que son moléculas de ARN enzimáticas, se pueden usar para catalizar la escisión específica de un ARNm del receptor de autoantígenos, por ejemplo, el ARNm de IGF-1R. El mecanismo de la acción de la ribozima implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de la ribozima al ARN del receptor de autoantígeno diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión de ribozimas específicos dentro de cualquier diana de ARN potencial se identifican mediante la exploración de un ARN receptor de autoantígeno para sitios de escisión de ribozimas que incluyen las siguientes secuencias: GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las secuencias de ARN cortas de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar para determinar las características estructurales secundarias que pueden hacer que el oligonucleótido sea inoperable. La idoneidad de las dianas candidatas también puede evaluarse probando la accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios utilizando ensayos de protección con ribonucleasa. Las moléculas antisentido y las ribozimas pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la materia para la síntesis de moléculas de ácidos nucleicos.

Como se describe en el presente documento, una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena puede ser un compuesto o molécula que se une al receptor o su ligando, por ejemplo, IGF-1R, con suficiente afinidad para reducir o inhibir la interacción específica que da lugar a la activación del receptor y al subsiguiente reclutamiento de linfocitos T e infiltración. El autoantígeno se puede

ubicar en un fibroblasto o en cualquier otro tipo de célula.

Por lo tanto, una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

5 Una sustancia moduladora que inhibe, por ejemplo, la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena también puede ser un derivado, un análogo o un compuesto mimético, así como un pequeño compuesto orgánico, siempre y cuando la interacción entre el receptor y el ligando dé lugar al reclutamiento de linfocitos T y se reduzca o inhiba la infiltración en presencia de la sustancia. El tamaño de una sustancia moduladora, como una que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena, no es importante, siempre y cuando la molécula muestre o pueda presentar actividad inhibitoria con respecto a la interacción que da lugar a la activación de fibroblastos. Por ejemplo, una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena puede ser tan baja como entre aproximadamente uno y 10 seis, y tan alta como decenas o cientos de bloques de construcción de monómeros que constituyen una macromolécula o molécula de unión química. De forma similar, un compuesto orgánico puede ser una estructura simple o compleja siempre que tenga suficiente actividad con respecto a la inhibición de la interacción, por ejemplo, 15 entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena o entre una molécula quimiotáctica y su receptor, que da lugar al reclutamiento e infiltración de linfocitos T.

Los ejemplos de una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena incluyen, por ejemplo, el ácido nucleico antisentido de IGF-1R y los inhibidores transcripcionales que se unen a la región reguladora/promotora de IGFIR. Además, los receptores, ligandos, factores de crecimiento, citoquinas o quimiocinas, por ejemplo, que inhiben el reclutamiento e infiltración de linfocitos T mediado por fibroblastos son útiles para poner en práctica los métodos descritos. Además, como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos de unión al ADN, como los factores de transcripción y los factores de replicación del ADN, también son sustancias moduladoras útiles para poner en práctica los métodos descritos, siempre que tengan actividad selectiva con respecto a la inhibición de la interacción entre un autoantígeno receptor y una 20 inmunoglobulina endógena que da lugar a la activación de fibroblastos; inhiban la interacción entre una molécula quimiotáctica y su receptor; neutralicen una molécula quimiotáctica; inhiban la liberación por un fibroblasto de una molécula quimiotáctica; o cualquiera de los mecanismos descritos en el presente documento o conocidos por los expertos en la materia para inhibir el reclutamiento e infiltración de linfocitos T. Finalmente, los polipéptidos, ácidos nucleicos y compuestos químicos como los seleccionados de bibliotecas aleatorias y combinadas también pueden ser sustancias moduladoras que inhiben la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena que da lugar a la activación del receptor que resulta en el reclutamiento e infiltración de linfocitos T. 25

Como se describe en el presente documento, una sustancia moduladora útil para poner en práctica los métodos de la invención puede tener actividad selectiva con respecto a inhibir directa o indirectamente la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena que da lugar a la activación de fibroblastos. 30

35 Se pueden usar varias estrategias para identificar una sustancia moduladora que reduce la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos al administrarse en una cantidad efectiva. Por ejemplo, un enfoque es utilizar la información disponible con respecto a la estructura y función de IGF-1R para generar poblaciones de moléculas de unión a partir de moléculas que se sabe que funcionan como moléculas de unión a proteasas o que se sabe que exhiben o son capaces de mostrar afinidad de unión específica para un polipéptido receptor autoantígeno en particular. Como se establece en el presente documento, una sustancia moduladora que, al administrarse en una cantidad efectiva, reduce la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos; puede ser un anticuerpo y otro receptor del repertorio inmune que previene la activación de los fibroblastos dando como resultado un compuesto de infiltración de linfocitos T. Un anticuerpo que reconoce un sitio catalítico de una molécula asociada con la mediación de la activación de 40 fibroblastos es especialmente útil para poner en práctica el método de la invención para reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos administrando a un individuo una cantidad efectiva de al menos una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena. La función normal de dichos receptores inmunes es unirse esencialmente a un número infinito de antígenos y ligandos diferentes. Por lo tanto, generar una población diversa de moléculas de unión de un repertorio inmune, por ejemplo, puede ser útil para identificar una sustancia moduladora que, si se administra en una 45 cantidad efectiva, reduce la gravedad de una condición asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. 50

Una sustancia moduladora que inhibe, por ejemplo, la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena y previene la activación de fibroblastos, puede identificarse además a partir de una gran 55 población de moléculas desconocidas por métodos muy conocidos en la materia. Dicha población puede ser una biblioteca aleatoria de péptidos o compuestos de moléculas pequeñas. La población puede generarse para contener una diversidad suficiente de secuencia o estructura para contener una molécula que se unirá a una molécula receptora de autoantígeno endógeno tal como, por ejemplo, IGF-1R, o su correspondiente ácido nucleico. Los expertos en la materia sabrán qué tamaño y diversidad es necesaria o suficiente para el propósito previsto. Se puede generar una población de tamaño y complejidad suficientes para que tenga una alta probabilidad de contener una sustancia moduladora que se una, por ejemplo, a una molécula de receptor de autoantígeno endógeno tal como 60

IGF-1R, con suficiente afinidad para modular la actividad. Existen muchos otros tipos de poblaciones de moléculas de biblioteca y se describen más adelante.

Si bien las descripciones expuestas en este documento utilizan principalmente como ejemplo un autoantígeno receptor y la correspondiente inmunoglobulina, se entiende que los tipos de sustancias moduladoras y los métodos de identificación descritos en este documento son aplicables a cualquier sustancia moduladora descrita en este documento para la puesta en práctica de los métodos de la invención, incluida una sustancia moduladora que tiene actividad selectiva con respecto a la inhibición de la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena; que inhibe la interacción entre una molécula quimiotáctica y su receptor; que neutraliza una molécula quimiotáctica; que inhibe la liberación por un fibroblasto de una molécula quimiotáctica; o cualquier mecanismo adicional descrito en el presente documento o conocido por los expertos en la materia para inhibir directa o indirectamente el reclutamiento e infiltración de linfocitos T.

Cualquier molécula que se una a un receptor de autoantígeno endógeno, a una región del gen que controla la expresión de dicho autoantígeno, o a una molécula reguladora que modula la actividad o expresión de un receptor de autoantígeno endógeno, así como a cualquier molécula reguladora que modula la expresión de un receptor de autoantígenos endógeno, por ejemplo, IGF-1R, y reduce o inhibe la activación de fibroblastos es una sustancia moduladora útil para poner en práctica la invención. Por ejemplo, una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena puede ser una molécula reguladora que afecta la expresión de un autoantígeno como el IGFIR mediante la modulación de la acción de un factor de transcripción que controla o regula al alza la transcripción del ácido nucleico del receptor del autoantígeno.

Un ejemplo de una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena puede ser un anticuerpo contra una molécula reguladora que modula la expresión o actividad de un autoantígeno receptor o una inmunoglobulina endógena específica de enfermedad. Alternativamente, puede querer usarse poblaciones de péptidos aleatorios para identificar una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena. Dadas las directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la materia sabrán o podrán determinar qué tipo de enfoque y qué tipo de sustancia moduladora es adecuada para poner en práctica los métodos descritos en este documento.

Una población de tamaño moderado para la identificación de una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena puede constar de cientos y miles de moléculas de unión diferentes dentro de la población, mientras que una población de moléculas de unión de gran tamaño constará de decenas de miles y millones de especies de moléculas diferentes de unión. Más específicamente, las poblaciones grandes y diversas de moléculas de unión para la identificación de una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena contendrán cualquiera de aproximadamente 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , o más, especies de moléculas diferentes. Un experto en la materia conocerá la diversidad aproximada de la población de sustancias de ensayo suficientes para identificar una sustancia moduladora, un término referido colectivamente en el presente documento para describir una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena; una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena; una sustancia que inhibe la interacción entre una molécula quimiotáctica y su receptor; o una sustancia que neutraliza al menos un tipo de quimiotáctico.

Se pueden utilizar bibliotecas recombinantes de sustancias de prueba para identificar una sustancia moduladora, ya que se pueden generar y analizar rápidamente poblaciones grandes y diversas. Las bibliotecas recombinantes de polipéptidos expresados útiles para identificar una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena se pueden diseñar de una gran cantidad de formas diferentes conocidas en la materia. Los métodos de biblioteca recombinante de manera similar permiten la producción de un gran número de poblaciones de sustancias de prueba a partir de repertorios naturales. Ya sea recombinante o de otro tipo, se puede usar esencialmente cualquier fuente de la población de sustancias de prueba siempre que la fuente proporcione un tamaño y diversidad suficientes de diferentes compuestos para identificar una sustancia moduladora que inhiba la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena.

Una biblioteca de expresión de fagos en donde los fagos lisogénicos provocan la liberación de polipéptidos de moléculas de unión expresadas de manera bacteriana es un ejemplo específico de una biblioteca recombinante que puede usarse para identificar una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena. En otro tipo de biblioteca de expresión de fagos, un gran número de sustancias moduladoras potenciales que inhiben la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena se pueden expresar como polipéptidos de fusión en la superficie periplásmica de las células bacterianas. También existen bibliotecas en levadura y células eucariotas superiores y son igualmente aplicables en los métodos descritos en este documento. Los expertos en la materia sabrán o pueden determinar qué tipo de biblioteca es útil para identificar una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena.

Además de los métodos descritos anteriormente, que utilizan un polipéptido purificado para seleccionar bibliotecas de compuestos para aquellos que inhiben la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena, se puede identificar una sustancia moduladora inhibitoria utilizando un polipéptido purificado para producir anticuerpos. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que son específicos para IGF-1R u otro receptor de autoantígeno endógeno como sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena y pueden generarse usando métodos que son bien conocidos en la materia. Una sustancia moduladora de este tipo que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal contra el IGF-1R, por ejemplo, el anticuerpo bloqueador de IGF-1R # 36491 (Pharmingen, San Diego, CA), o cualquier otro receptor de autoantígeno endógeno, así como fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos, incluyendo los fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd y Fv y similares, siempre que el anticuerpo o fragmento, en virtud de la inhibición de la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena, reduzca o inhiba la activación de fibroblastos es una sustancia moduladora útil para poner en práctica los métodos de la invención. Además, las sustancias moduladoras útiles para la puesta en práctica de los métodos de la invención pueden ser un anticuerpo no natural, incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo bifuncional, un anticuerpo injertado en la región determinante de complementariedad (injertado en CDR) o un anticuerpo humanizado, así como un fragmento de unión a antígeno del mismo. Dicho anticuerpo, molécula tipo anticuerpo o fragmento del mismo es útil como sustancia moduladora siempre que inhiba el reclutamiento y la infiltración de linfocitos T.

Los métodos de preparación y aislamiento de anticuerpos, incluidos los anticuerpos policlonales y monoclonales, que utilizan inmunógenos peptídicos, son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Los anticuerpos de origen no natural pueden construirse utilizando síntesis de péptidos en fase sólida, pueden producirse de forma recombinante o pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el cribado de bibliotecas combinatorias que consisten en cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables como lo describe Huse et al., *Science* 246: 1275-1281 (1989). Estos y otros métodos para fabricar, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, injertados a CDR, de cadena simple y bifuncionales son bien conocidos por los expertos en la materia (Hoogenboom et al., *Patente de Estados Unidos Núm. 5.564.332*, expedida el 15 de octubre de 1996; Winter y Harris, *Immunol. Today* 14: 243-246 (1993); Ward et al., *Nature* 341: 544-546 (1989); Hilyard et al., *Protein Engineering: A practical approach* (IRL Press 1992); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2ª ed. (Oxford University Press 1995).

Una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena para inhibir o reducir el reclutamiento o infiltración de linfocitos T puede ser marcada para ser detectable utilizando métodos bien conocidos en la materia (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996); Harlow y Lane, *supra*, 1988; Cap. 9). Por ejemplo, una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena se puede unir a un radioisótopo o agente terapéutico mediante métodos bien conocidos en la materia. Una sustancia moduladora que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena al unirse directamente a un autoantígeno endógeno o a una inmunoglobulina específica de la enfermedad, cuando está unida a un radioisótopo u otro grupo capaz de permitir su visualización, puede ser útil para diagnosticar o estadificar la progresión de una etapa clínica de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales, por ejemplo, en un conejo, cabra, ratón u otro mamífero, son bien conocidos en la materia (Harlow y Lane, *supra*, 1988). La producción de anticuerpos anti-péptidos habitualmente involucra el uso de animales hospedadores como conejos, ratones, cobayas o ratas. Si se necesita una gran cantidad de suero, se pueden usar animales más grandes como ovejas, cabras, caballos, cerdos o burros. Los animales generalmente se seleccionan según la cantidad de antisero requerido y los animales adecuados incluyen conejos, ratones, ratas, cobayas y hámsteres. Estos animales producen un máximo de 10-50 µl, 100-200 µl y 1-2 ml de suero por sangrado individual, respectivamente (Harlow y Lane, *supra*, 1988). Los conejos son muy útiles para la producción de antiseros policlonales, ya que pueden sangrarse de manera segura y repetida y producir altos volúmenes de antisero. Dos inyecciones de dos a cuatro semanas de diferencia con 15-50 µg de antígeno en un adyuvante adecuado como, por ejemplo, el adyuvante completo de Freund pueden ir seguidas de la extracción de sangre y el análisis del antisero.

Además, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener utilizando métodos que son bien conocidos y rutinarios en la materia (Harlow y Lane, *supra*, 1988). Una porción peptídica de una proteína tal como IGF-1R o, como se describe más adelante, de una molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES, IL-16, o sus respectivos receptores, para su uso como inmunógeno puede determinarse por métodos bien conocidos en la materia. Las células del bazo de un ratón inmunizado se pueden fusionar con una línea celular de mieloma apropiada para producir células de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma clonadas pueden cribarse utilizando una proteína marcada para identificar los clones que secretan los anticuerpos correspondientes, respectivamente. Las hibridomas que expresan los anticuerpos monoclonales que tienen una especificidad y afinidad deseables pueden aislarse y utilizarse como fuente continua del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados pueden construirse confiriendo esencialmente cualquier especificidad de unión a antígeno a un marco de anticuerpo humano. Los métodos para construir anticuerpos humanizados son útiles para preparar un anticuerpo apropiado para poner en práctica los métodos de la invención y evitar las respuestas

inmunes del hospedador contra el agente neutralizante de anticuerpos cuando se usan terapéuticamente. Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar para generar sustancias moduladoras terapéuticas para reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos mediante métodos bien conocidos en la materia, como el injerto de la región determinante complementaria (CDR) y la optimización del marco y los restos CDR. Por ejemplo, la humanización de un agente neutralizante de anticuerpos puede conseguirse mediante un injerto de CDR como se describe en Fiorentini et al., *Immunotechnology* 3 (1): 45-59 (1997). Brevemente, el injerto de CDR implica unir de forma recombinante las CDR de un agente neutralizante de anticuerpo no humano en una región marco humana para conferir actividad de unión al anticuerpo injertado resultante, o un fragmento de unión de región variable del mismo. Una vez que se prepara el anticuerpo injertado a CDR, o el fragmento de unión a la región variable, se puede volver a adquirir una afinidad de unión comparable al agente neutralizante de anticuerpo no humano mediante rondas subsiguientes de estrategias de maduración de afinidad conocidas en la materia. La humanización de un anticuerpo policlonal de conejo se puede conseguir mediante métodos similares a los descritos en Rader et al., *J. Biol. Chem.* 275 (18): 13668-13676 (2000).

La humanización de un anticuerpo no humano útil como sustancia moduladora para la puesta en práctica de un método de la invención también se puede conseguir mediante la optimización simultánea de los restos del marco y de la CDR, lo que permite la identificación rápida de los restos del marco y de la CDR de interacción cooperativa, como se describe en Wu et al., *J. Mol. Biol.* 294 (1): 151-162 (1999). En resumen, una biblioteca combinatoria que examina una serie de posiciones marco potencialmente importantes se expresa de forma concomitante con bibliotecas de CDR enfocadas que consisten en variantes que contienen mutaciones aleatorias de un solo aminoácido en la tercera CDR de las cadenas pesada y ligera. Mediante este método, se pueden identificar múltiples variantes de Fab que contienen tan poco como un resto de marco no humano y que muestran una afinidad aproximadamente 500 veces mayor que la del Fab quimérico inicial. El examen de las bibliotecas de CDR marco combinatorio permite la identificación de anticuerpos monoclonales con estructuras optimizadas para la función, incluidos los casos en que el antígeno induce cambios conformacionales en el anticuerpo monoclonal. Las variantes humanizadas mejoradas contienen menos restos de la estructura no humana que los anticuerpos humanizados mediante la humanización secuencial *in vitro* y las estrategias de maduración de afinidad conocidas en la materia.

Se contempla además que una sustancia moduladora útil para poner en práctica un método de la invención puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante métodos conocidos en la materia que implican la inmunización de un animal transgénico no humano con el antígeno deseado. El animal transgénico no humano puede modificarse de manera que no produzca anticuerpos endógenos, sino que produce células B que secretan inmunoglobulinas totalmente humanas. Los anticuerpos producidos pueden obtenerse del animal directamente o de células B inmortalizadas derivadas del animal transgénico no humano. Alternativamente, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas pueden recuperarse y expresarse para obtener los anticuerpos directamente o modificarse para obtener análogos de anticuerpos como, por ejemplo, moléculas F_v de una sola cadena. Por lo tanto, se contempla producir una sustancia moduladora útil para poner en práctica un método de la invención que es una inmunoglobulina completamente humana contra un antígeno específico o para producir un análogo de la inmunoglobulina mediante un proceso que incluye la inmunización de un animal no humano con antígeno en condiciones que estimulan una respuesta inmune.

El animal no humano que produce un anticuerpo humano puede modificarse para que sea sustancialmente incapaz de producir una cadena de inmunoglobulina pesada o ligera endógena, pero puede producir inmunoglobulinas con regiones tanto variables como constantes humanas. En la respuesta inmune resultante, el animal produce células B que secretan inmunoglobulinas que son completamente humanas y específicas para el antígeno, por ejemplo, IGF-1R, RANTES o IL-16. La inmunoglobulina humana de especificidad deseada puede recuperarse directamente del animal, por ejemplo, del suero, o pueden obtenerse células B primarias del animal e inmortalizarse. Las células B inmortalizadas se pueden usar directamente como fuente de anticuerpos humanos o, alternativamente, los genes que codifican los anticuerpos se pueden preparar a partir de células B inmortalizadas o de células B primarias de la sangre o tejido linfoide, por ejemplo, bazo, amígdalas, ganglios linfáticos, médula ósea, del animal inmunizado y expresado en hospedadores recombinantes, con o sin modificaciones, para producir la inmunoglobulina o sus análogos. Además, los genes que codifican el repertorio de inmunoglobulinas producidas por el animal inmunizado pueden usarse para generar una biblioteca de inmunoglobulinas para permitir la selección de aquellas regiones variables que proporcionan la afinidad deseada. Los clones de la biblioteca que tienen las características deseadas pueden usarse a continuación como fuente de secuencias de nucleótidos que codifican las regiones variables deseadas para una manipulación adicional para generar anticuerpos humanos o análogos con estas características usando técnicas recombinantes convencionales. Diversas técnicas para preparar anticuerpos humanos utilizando animales transgénicos no humanos, por ejemplo, ratones transgénicos, son bien conocidas en la materia y se describen, por ejemplo, en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-851 (1996); Heijnen et al., *Journal of Clinical Investigation* 97: 331-338 (1996); Lonberg et al. *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Chadd y Chamow, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2): 188-94 (2001); Russel et al., *Infection and Immunity* 1820-1826 (2000); Gallo et al., *European Journal of Immunology* 30: 534-540 (2000); Davis et al., *Cancer Metastasis Rev.* 18 (4): 421-5 (1999); Green, *Journal of Immunological Methods* 231: 11-23 (1999) Yang et al., *Journal of Leukocyte Biology* 66: 401-410 (1999); Jakobovits, *Advanced Drug Delivery Reviews* 31: 33-42 (1998); Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188 (3): 483-495 (1998); Jakobovits, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7 (4): 607-614 (1998); Mendez et al., *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997); Jakobovits, *Weir's Handbook of*

Experimental Immunology, The Integrated Immune System, vol. IV: 194.1-194.7 (1996).

Además, en las patentes de Estados Unidos números 6.162.963; 6.150.584; 6.114.598; 6.111.166; 6.096.311 y 6.075.181 se describen varias técnicas conocidas en la materia para la preparación de un anticuerpo humano.

5 Como se describe en el presente documento, un anticuerpo puede ser una sustancia moduladora útil para poner en práctica un método de la invención y puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, así como versiones recombinantes y fragmentos funcionales de los mismos. Las versiones recombinantes de anticuerpos incluyen una amplia variedad de construcciones que van desde la expresión simple y el co-ensamblaje de la codificación de los ADNc de cadenas pesadas y ligeras hasta construcciones especializadas denominadas anticuerpos de diseño. Las metodologías recombinantes, combinadas con la extensa caracterización de polipéptidos dentro de la superfamilia de inmunoglobulinas, y particularmente los anticuerpos, brindan la capacidad de diseñar y construir un gran número de diferentes tipos, estilos y especificidades de moléculas de unión derivadas de dominios de unión de región constante y variable de inmunoglobulina. Los ejemplos específicos incluyen anticuerpos quiméricos, donde la región constante de un anticuerpo está sustituida con la de otro anticuerpo, y anticuerpos humanizados, descritos anteriormente, donde las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo están sustituidas con las de otro anticuerpo.

10 Otras versiones recombinantes de anticuerpos incluyen, por ejemplo, variantes de anticuerpo funcional en donde el dominio de unión de la región variable o fragmentos funcionales responsables de mantener antígeno de unión se fusiona a un dominio de unión a receptor F_c de la región constante de anticuerpo. Dichas variantes son formas esencialmente truncadas de anticuerpos que eliminan las regiones no esenciales para el antígeno y la unión del receptor F_c . Las variantes truncadas pueden tener una valencia única, por ejemplo, o alternativamente, pueden construirse con múltiples valencias dependiendo de la aplicación y la necesidad del usuario. Además, se pueden insertar enlazadores o espaciadores entre el antígeno y los dominios de unión al receptor F_c para optimizar la actividad de unión, así como contener dominios funcionales adicionales fusionados o unidos para efectuar funciones biológicas distintas de, por ejemplo, la unión a un autoantígeno receptor para inhibir su interacción con una inmunoglobulina endógena; la unión a una molécula quimiotáctica o su receptor para neutralizar la actividad de reclutamiento celular de la molécula quimiotáctica; o la unión a un receptor de la molécula quimiotáctica para evitar la liberación de la molécula quimiotáctica de una célula de fibroblasto. Los expertos en la materia sabrán cómo construir anticuerpos recombinantes a la luz del conocimiento de la técnica con respecto a la ingeniería de anticuerpos, y se les proporcionará orientación y enseñanzas en este documento. Se puede encontrar una descripción de anticuerpos recombinantes, fragmentos funcionales y variantes y moléculas similares a anticuerpos, por ejemplo, en "Antibody Engineering," 2nd Edition, (Carl A.K. Borrebaeck, Ed.) Oxford University Press, Nueva York, (1995).

20 Variantes funcionales adicionales de anticuerpos que pueden utilizarse como sustancias moduladoras útiles para poner en práctica un método de la invención incluyen moléculas similares a anticuerpos distintos de fusiones del dominio de unión del antígeno-unión del receptor F_c . Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos, fragmentos funcionales y fusiones de los mismos que contienen un dominio de unión del receptor F_c para que sean biespecíficos en el sentido de que un dominio de unión de la región variable exhibe actividad de unión para un antígeno y el otro dominio de unión de la región variable exhibe actividad de unión para un segundo antígeno. Dichos agentes neutralizantes de anticuerpos biespecíficos pueden ser ventajosos en los métodos de la invención debido a que un único anticuerpo biespecífico contendrá dos especies de unión a antígeno diana diferentes. Por lo tanto, se puede administrar una sola entidad molecular para conseguir la neutralización de, por ejemplo, tanto RANTES como IL-16.

25 En el presente documento también se describe el uso de una inmunoadhesión o una inmunoadhesión biespecífica. Las inmunoadhesiones son moléculas similares a anticuerpos que combinan el dominio de unión de un polipéptido no anticuerpo con las funciones efectoras de un anticuerpo de un dominio constante de anticuerpo. El dominio de unión del polipéptido no anticuerpo puede ser, por ejemplo, un ligando o un receptor de superficie celular que tiene actividad de unión a ligando. Las inmunoadhesiones pueden contener al menos las funciones efectoras de unión al receptor F_c del dominio constante del anticuerpo. Los ejemplos específicos de ligandos y receptores de superficie celular que pueden usarse para el dominio de unión a antígeno de una inmunoadhesión incluyen, por ejemplo, un receptor de células T tal como el receptor CCR5 que reconoce RANTES. Se entiende que pueden usarse de manera similar otros ligandos y receptores de ligandos conocidos en la materia para el dominio de unión a antígeno de una inmunoadhesión. Además, se pueden construir inmunoadhesiones multivalentes y multiespecíficas para su uso como una sustancia moduladora para reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. La construcción de anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesiones, inmunoadhesiones biespecíficas y otros polipéptidos heteromultiméricos que pueden usarse en los métodos descritos es la materia individual de, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos números 5.807.706 y 5.428.130.

30 También se describe un método para reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos mediante la administración a un individuo de una cantidad eficaz de al menos una sustancia moduladora, cuya sustancia moduladora previene la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados neutralizando la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica que normalmente es liberada por los fibroblastos y que atrae a las células inmunocompetentes.

Como se describe con más detalle a continuación, la molécula quimiotáctica puede ser una citoquina, que incluye una citoquina quimiotáctica, más habitualmente denominada quimiocina. La molécula quimiotáctica puede ser una quimiocina C-C, por ejemplo, la molécula quimiotáctica RANTES. La molécula quimiotáctica también puede ser una citoquina que sirve como ligando CD4+ específico, por ejemplo, la molécula quimiotáctica IL-16.

5 Una respuesta con éxito del hospedador a la inflamación generalmente requiere la acumulación de células hospedadoras especializadas en el sitio del daño tisular. Esta acumulación celular es una etapa crítica en el proceso inflamatorio normal y está mediada por una familia de más de cuarenta proteínas relacionadas estructuralmente y funcionalmente conocidas como citoquinas. Las citocinas son glicoproteínas solubles en el rango de 5-20 kDa que son liberadas por las células del sistema inmunológico y que actúan de forma no enzimática a través de receptores
10 específicos para regular las respuestas inmunitarias. Las citocinas se parecen a las hormonas porque actúan a bajas concentraciones unidas con alta afinidad a un receptor específico.

15 La interleucina 16 (IL-16), antes conocida como factor quimiotáctico de linfocitos o LCF, es una citoquina específica de células CD4+ detectada en asma, AR, enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico. La IL-16 se sintetiza como una molécula precursora de 69 kDa y posteriormente se rompe por la caspasa-3, lo que resulta en la liberación de polipéptidos de 17 kDa a 20 kDa de la célula. La actividad se confiere posteriormente mediante la multimerización de cuatro subunidades idénticas a una molécula de 56 kDa. IL-16 es un ligando específico de CD4+ que activa los linfocitos T, monocitos y eosinófilos que muestran CD4+. Los linfocitos CD4+ y CD8+, el epitelio de las vías respiratorias, los linfocitos B y los mastocitos pueden expresar IL-16. Además, se ha demostrado la expresión de IL-16 en fibroblastos activados por citoquinas, tal como describen Sciaky et al., J. Immunol. 164: 3806 (2000).

20 Las quimiocinas representan un subconjunto de citoquinas. Las quimiocinas son proteínas de unión a heparina de 8 a 10 kDa homólogas que poseen un motivo estructural conservado que contiene dos pares de cisteína y se dividen en subfamilias en función de la posición relativa de los restos de cisteína en la proteína madura. Existen al menos cuatro subfamilias de quimiocinas, pero solo dos, las quimiocinas α y las quimiocinas β han sido bien caracterizadas. En las quimiocinas α , los primeros dos restos de cisteína están separados por un solo aminoácido (CXC), mientras
25 que en las quimiocinas β los dos primeros restos de cisteína son adyacentes entre sí (CC). Las quimiocinas CXC incluyen, por ejemplo, interleucina-8 (IL-8), factores derivados de plaquetas humanas, IP-10 y Mig. Los miembros de la subfamilia de quimiocinas CC incluyen, por ejemplo, regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES) (Regulado en la activación, células T expresadas y secretadas normales), quimiotáctico de macrófagos y factor de activación (MCAF), proteína inflamatoria de macrófagos-1 α (MIP-1 α) y proteína inflamatoria de macrófagos-1 β (MIP-1 β).
30

Las quimiocinas inducen la migración y activación celular de al menos dos formas: primero, mediante quimioatracción directa y, segundo, mediante la unión a receptores específicos de superficie de células acoplados a proteína G en células diana. Las quimiocinas atraen selectivamente los subconjuntos de leucocitos; algunas quimiocinas actúan específicamente hacia los eosinófilos, otras hacia los monocitos, las células dendríticas o las células T según lo revisado por Lustre, New Engl. J. Med. 338: 436-445 (1998). En general, las quimiocinas CC quimioatraen monocitos, eosinófilos, basófilos y células T; y producen la señalización a través de receptores
35 específicos de quimiocinas. Se han identificado más de 10 receptores distintos de quimiocinas, cada uno expresado en diferentes subconjuntos de leucocitos. Los receptores de quimiocinas se expresan de manera constitutiva en algunas células, mientras que son inducibles en otras.

40 RANTES utiliza al menos cuatro receptores acoplados a proteína GTP, incluido el CCR5, y activa basófilos, eosinófilos, monocitos, así como linfocitos T *naïve* y de memoria, tanto en reposo como activados. En los linfocitos T, el compromiso de RANTES con CCR5 activa las quinasas Janus quinasa y la quinasa de proteína activada por mitógenos p38 y las múltiples vías de señalización aguas abajo descritas por Wong et al., J. Biol. Chem. 276: 11427 (2001).

45 Como se describe en este documento, la liberación de las moléculas quimiotáctica IL-16 y RANTES por células inmunocompetentes activadas da lugar al reclutamiento e infiltración de linfocitos T. Una vez que un tejido se ha infiltrado con células inmunocompetentes que incluyen células T y monocitos, estas células secretan altos niveles de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1. CD40, un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) de moléculas de superficie, se expresa en una variedad de tipos de células, incluidas las células no linfoides, como los fibroblastos, endotelios y células epiteliales en cultivo. La evidencia reciente sugiere la participación del puente de ligando CD40/CD40 en el diálogo entre las células tiroideas residentes y las células derivadas de la médula ósea reclutadas en el tiroideo. Por lo tanto, una vez que un tejido se ha infiltrado con células inmunocompetentes que secretan altos niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1, se puede iniciar un bucle de retroalimentación cuando los fibroblastos responden propagando la cascada
50 inflamatoria.
55

Como se describe en el presente documento, la liberación por fibroblastos de una molécula quimiotáctica que atrae a células inmunocompetentes, por ejemplo, los linfocitos T, puede inhibirse al reducir o prevenir la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena.

Como se describe en el presente documento, se puede administrar a un individuo una cantidad eficaz de al menos

una sustancia moduladora que previene la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al reducir la liberación por los fibroblastos de al menos un tipo de molécula quimiotáctica que atrae a las células inmunocompetentes.

5 También se puede administrar a un individuo una cantidad efectiva de al menos una sustancia moduladora que previene la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al neutralizar la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica que normalmente es liberada por los fibroblastos y que atrae a las células inmunocompetentes.

10 Una sustancia moduladora que neutraliza la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, modula la molécula quimiotáctica lo suficiente para reducir su actividad relacionada con el reclutamiento celular. Dicha sustancia neutralizante puede ser una macromolécula, tal como un polipéptido, ácido nucleico, carbohidrato o lípido. Una sustancia moduladora que neutraliza la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica también puede ser un compuesto derivado, análogo o mimético, así como un pequeño compuesto orgánico siempre que la actividad de reclutamiento de células se reduzca en presencia del agente neutralizante. Los tipos de moléculas que pueden ser sustancias neutralizantes útiles para poner en práctica los métodos descritos en el presente documento con referencia a las moléculas quimiotácticas son igualmente aplicables tanto a las citoquinas como a las quimiocinas. Una sustancia neutralizante puede ser tan baja como entre aproximadamente uno y seis, y tan grande como decenas o cientos de bloques de construcción de monómeros que constituyen una macromolécula o molécula de unión química. De manera similar, un compuesto orgánico puede ser una estructura simple o compleja siempre que se una a la molécula quimiotáctica dirigida con suficiente afinidad para reducir la actividad. Una sustancia que neutraliza una molécula quimiotáctica puede ser un polipéptido, ácido nucleico o compuesto químico como se describe en el presente documento y, además, puede identificarse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para identificar una sustancia moduladora. En particular, una sustancia que neutraliza una molécula de quimioterapia puede ser un polinucleótido antisentido dirigido a un polinucleótido que codifica dicha quimiocina, un nucleótido aptámero que afecta la unión de dicha quimiocina a al menos un receptor de quimiocinas y una pequeña molécula que afecta la unión de dicha quimiocina a al menos un receptor de quimiocinas. Por lo tanto, la biblioteca y los métodos de selección descritos en el presente documento para la identificación de una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena, son igualmente aplicables a la identificación de una sustancia que previene la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al neutralizar la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16.

35 Las sustancias neutralizantes específicas para una molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, pueden incluir anticuerpos y otros polipéptidos de unión al receptor o ligando del sistema inmunitario. Dichas otras moléculas del sistema inmunitario incluyen, por ejemplo, receptores de células T (TCR) que incluyen receptores de células CD4. Además, los receptores de la superficie celular, como las integrinas, los receptores del factor de crecimiento y los receptores de quimiocinas, así como cualquier otro receptor o fragmento de los mismos que se unen a la molécula quimiotáctica, o que puedan unirse a la molécula quimiotáctica, con suficiente afinidad para reducir la actividad, también son sustancias neutralizantes útiles para la puesta en práctica de los métodos descritos. Además, los receptores, factores de crecimiento, citoquinas o quimiocinas, por ejemplo, que inhiben la expresión de la molécula quimiotáctica o su receptor, por ejemplo, RANTES o IL-16, también son sustancias neutralizantes útiles para poner en práctica los métodos descritos. Además, los polipéptidos de unión al ADN, como los factores de transcripción y los factores de replicación del ADN, también se incluyen dentro de la definición del término molécula de unión, siempre que tengan una actividad de unión selectiva para la molécula quimiotáctica diana, por ejemplo, RANTES o IL-16, o moléculas reguladoras que controlan la expresión o actividad de la molécula quimiotáctica diana o regiones genéticas que controlan la expresión de la molécula quimiotáctica diana. Finalmente, dentro de la definición del término también se incluyen los polipéptidos, ácidos nucleicos y compuestos químicos tales como los seleccionados de bibliotecas aleatorias y combinatorias, como se describe anteriormente, siempre y cuando dicha molécula se una a la molécula quimiotáctica dirigida con suficiente afinidad para disminuir la actividad de reclutamiento celular.

50 Se pueden usar varios métodos para identificar una sustancia moduladora que previene la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al neutralizar la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, que normalmente es liberada por los fibroblastos y que atrae células inmunocompetentes. Por ejemplo, un enfoque es utilizar la información disponible con respecto a la estructura y función de la molécula quimiotáctica dirigida para generar poblaciones de moléculas de unión a partir de moléculas que se sabe que funcionan como moléculas de unión a citoquinas o que pueden presentar o ser capaces de mostrar afinidad de unión específica para la molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, como fragmentos o miméticos del receptor CCR5 que se encuentra en las células T CD4+. Una sustancia moduladora que previene la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al neutralizar la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, puede ser un anticuerpo y otro receptor del repertorio inmune. La función normal de dichos receptores inmunes es unirse esencialmente a un número infinito de antígenos y ligandos diferentes. Por lo tanto, puede ser útil generar una población diversa de moléculas de unión a partir de un repertorio inmune, por ejemplo, para identificar una sustancia moduladora que previene la entrada de células

inmunocompetentes a los tejidos afectados al neutralizar la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16.

5 Una sustancia moduladora que previene la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al neutralizar la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, puede identificarse adicionalmente de una gran población de moléculas desconocidas por métodos bien conocidos en la materia y descritos en el presente documento. Dicha población puede ser una biblioteca aleatoria de péptidos o compuestos de moléculas pequeñas y puede generarse para que contenga una diversidad suficiente de secuencia o estructura para que contenga una sustancia moduladora que impida la afluencia de células inmunocompetentes a los tejidos afectados neutralizando la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES
10 o IL-16, o sus respectivos ácidos nucleicos. Los expertos en la materia sabrán qué tamaño y diversidad es necesaria o suficiente para el propósito previsto. Se puede generar una población de tamaño y complejidad suficientes para que tenga una alta probabilidad de contener una sustancia moduladora que evite la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al neutralizar la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, con suficiente afinidad para disminuir la actividad de reclutamiento celular. Existen
15 muchos otros tipos de poblaciones de moléculas de biblioteca y se describen más adelante.

Cualquier sustancia que se una a un receptor, a una región del gen que controla la expresión, o a una molécula reguladora que modula la actividad o la expresión de la molécula quimiotáctica diana, así como cualquier sustancia que se una a una molécula reguladora que modula la expresión del receptor de la molécula quimiotáctica específica puede ser una sustancia moduladora inhibitoria útil para poner en práctica el método descrito. Cualquier sustancia
20 que modula o regula la actividad o expresión de la molécula quimiotáctica diana, la actividad o expresión del receptor correspondiente, una región génica que controla la expresión de la molécula quimiotáctica dirigida, o una molécula reguladora que modula la actividad o la expresión de la molécula quimiotáctica dirigida, así como cualquier molécula reguladora que modula o regula la expresión del receptor correspondiente es una sustancia moduladora útil para poner en práctica los métodos descritos. Por lo tanto, una sustancia que previene la afluencia de células
25 inmunocompetentes a los tejidos afectados neutralizando la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, pueden actuar directamente a través de una unión o interacción no vinculante con la propia molécula quimiotáctica, así como indirectamente a través de una unión o interacción no vinculante con cualquier otra molécula que regula o modula la expresión o actividad de la molécula quimiotáctica dirigida.

Una sustancia que puede modular la expresión o actividad de una molécula quimiotáctica dirigida lo suficiente para disminuir su actividad es útil para poner en práctica los métodos reivindicados de reducir la gravedad de una
30 afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos al prevenir la afluencia de células inmunocompetentes. Además, dicha sustancia moduladora neutralizante puede disminuir la actividad o expresión de la molécula quimiotáctica modulando un receptor correspondiente, una molécula reguladora que, a su vez, modula la actividad o expresión de la molécula quimiotáctica, o una región del gen que controla la expresión de la molécula
35 quimiotáctica. Por ejemplo, una sustancia útil para poner en práctica los métodos descritos puede ser un anticuerpo contra una molécula reguladora que modula la expresión o actividad de la molécula quimiotáctica dirigida, por ejemplo, RANTES o IL-16. Por ejemplo, un anticuerpo anti-RANTES o anti-IL-16 es una sustancia neutralizante útil para poner en práctica los métodos descritos en este documento. Además, ya que las moléculas quimiotácticas son proteínas secretadas que se sabe que se unen a un receptor de células T específico, una sustancia neutralizante útil
40 para la puesta en práctica de los métodos descritos puede ser cualquier polipéptido de unión, receptor o fragmento del mismo de la superfamilia de receptores de inmunoglobulina. Alternativamente, puede querer utilizarse poblaciones de péptidos aleatorios para identificar otras sustancias que eviten la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al neutralizar la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16. Basándose en la orientación proporcionada en este documento y lo que se conoce en
45 la materia, los expertos en la materia sabrán o podrán determinar qué tipo de enfoque y qué tipo de agente neutralizante es apropiado para poner en práctica los métodos descritos para reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

Una sustancia útil para poner en práctica los métodos de reducción de la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos también puede ser una sustancia que inhibe la interacción entre al
50 menos dos antígenos propios, por ejemplo, TSHR y IGF-1R, que pueden interactuar en respuesta a una inmunoglobulina endógena específica de la enfermedad, lo que lleva a la señalización aguas abajo. Los epítopos presentes en los autoantígenos pueden estar relacionados. Por ejemplo, los expertos en la materia saben que las Ig anti-TSHR promueven el crecimiento del tiroides y la actividad desordenada. Como se describe en el presente documento, las interacciones entre IGF-1R y EG-IgG pueden iniciar la migración de células T y dar lugar a la
55 infiltración de linfocitos de la glándula tiroides, el tejido conectivo orbital, la piel y otras regiones anatómicas del cuerpo. Debido a que muchos tipos de células expresan IGF-1R funcional, incluidos los linfocitos, las EG-IgG dirigidas contra este receptor provocan respuestas en múltiples tejidos que pueden modularse en base a los descubrimientos descritos en el presente documento.

60 Como se ha descrito anteriormente para la identificación de una sustancia que inhibe la interacción entre un autoantígeno receptor y una inmunoglobulina endógena, una población de tamaño moderado para la identificación de una sustancia que evita la afluencia de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al neutralizar la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, puede constar de cientos y

miles de moléculas diferentes, por ejemplo, moléculas de unión, dentro de la población, mientras que una gran población constará de decenas de miles y millones de especies de moléculas diferentes. Más específicamente, poblaciones grandes y diversas de moléculas para la identificación de una sustancia útil para poner en práctica los métodos descritos contendrán cualquiera de aproximadamente 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} o más, especies de moléculas diferentes. Un experto en la materia conocerá la diversidad aproximada de la población de moléculas suficiente para identificar una sustancia que evite la entrada de células inmunocompetentes a los tejidos afectados al neutralizar la actividad de al menos un tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16.

Un anticuerpo con actividad de unión específica para una molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, puede generarse utilizando como inmunógeno una molécula quimiotáctica sustancialmente purificada, que puede prepararse a partir de fuentes naturales o producirse de forma recombinante, o una porción peptídica de la molécula quimiotáctica dirigida, incluyendo péptidos sintéticos. Una porción peptídica no inmunogénica de una molécula quimiotáctica puede hacerse inmunogénica acoplando el hapteno a una molécula portadora tal como albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH), o expresando la porción peptídica como una proteína de fusión. Varias otras moléculas portadoras y métodos para acoplar un hapteno a una molécula portadora son bien conocidos en la materia (véase Harlow y Lane, *supra*, 1988; véase, también, Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996). Como se ha descrito anteriormente, un anticuerpo útil como sustancia que neutraliza la actividad de una molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, también puede generarse contra una molécula reguladora que modula la expresión o actividad de la molécula quimiotáctica diana en lugar de contra la molécula quimiotáctica directamente.

Los polinucleótidos que codifican IGF-1R, RANTES, IL-16, o moléculas reguladoras que modulan la expresión o actividad de estas moléculas, o cualquier fragmento de las mismas, o moléculas antisentido, pueden usarse como sustancias útiles para poner en práctica el método descrito con fines terapéuticos. Como ejemplo, se pueden usar moléculas antisentido para los ácidos nucleicos que codifican RANTES o IL-16 para bloquear la transcripción o traducción del ARNm. Específicamente, las células pueden transformarse con secuencias complementarias a estos ácidos nucleicos. Dichos métodos son bien conocidos en la materia, y pueden diseñarse oligonucleótidos sentido o antisentido o fragmentos más grandes a partir de diversas ubicaciones a lo largo de las regiones de codificación o control de secuencias que codifican, por ejemplo, una molécula quimiotáctica dirigida. Por lo tanto, las moléculas antisentido pueden usarse como sustancias para neutralizar la actividad, o para lograr la regulación de la función del gen en los métodos descritos en el presente documento.

La actividad de un quimiotáctico, así como la actividad neutralizante de una sustancia pueden ser confirmados por ensayos *in vitro* conocidos en la materia. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de quimiotaxis para evaluar la capacidad de señales definidas para inducir la migración direccional de una población de células diana, por ejemplo, linfocitos T. La actividad de RANTES o IL-16 se puede neutralizar, por ejemplo, con un anticuerpo monoclonal humano y se puede determinar el efecto de este tratamiento sobre la migración de células T al sitio de la inflamación. Un sello distintivo de la unión de quimiocinas a un receptor de quimiocinas específico es un cambio en los niveles de calcio intracelular. El calcio intracelular en células T individuales que expresan receptores puede determinarse utilizando un sistema de imagen digital con una cámara sensible a la luz. La molécula proinflamatoria humana recombinante puede incubarse con o sin la sustancia neutralizante candidata y añadirse a cámaras separadas de células. El $[Ca^{2+}]_i$ se determina antes y después de la estimulación.

Como se describe en el presente documento, la neutralización de una molécula quimiotáctica también se puede conseguir mediante la inhibición de la interacción entre la molécula quimiotáctica y su receptor correspondiente, por ejemplo, una quimiocina y un receptor de quimiocina; una citocina y un receptor de citocina. La sustancia que inhibe la interacción entre la molécula quimiotáctica y su receptor puede ser una molécula quimiotáctica modificada, un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente al receptor de la molécula quimiotáctica, un polinucleótido antisentido dirigido a un polinucleótido que codifica la molécula quimiotáctica, un nucleótido aptámero que afecta la unión de la molécula quimiotáctica a al menos una molécula quimiotáctica, un aptámero peptídico que afecta la unión de la molécula quimiotáctica a al menos un receptor de la molécula quimiotáctica, y una pequeña molécula que afecta la unión de la molécula quimiotáctica a al menos un receptor de la molécula quimiotáctica. Como ejemplo, la sustancia puede ser una molécula RANTES modificada, por ejemplo, modificada mediante la adición de un grupo aminooxipentano (AOP) al comienzo de la secuencia de la proteína. Modificado de esta manera, AOP-RANTES conserva su capacidad para unirse a CCR5, pero no puede inducir ninguna de las actividades biológicas de RANTES con respecto a la atracción o activación de las células T. AOP-RANTES también puede desplazar otras quimiocinas unidas a CCR5, uniéndose más estrechamente al receptor. Una molécula de IL-16 químicamente modificada para conservar su capacidad de unirse al receptor CD4+, pero sin la capacidad de inducir cualquiera de las actividades biológicas de IL-16 con respecto a la atracción o activación de células T también es útil para poner en práctica los métodos reivindicados. Además, un fragmento o peptidomimético de una molécula quimiotáctica que se une al receptor de la molécula quimiotáctica diana con suficiente afinidad para disminuir su actividad es útil para poner en práctica los métodos reivindicados.

El término "se une específicamente" significa que el polipéptido tendrá una afinidad por el polipéptido diana que es considerablemente más alta que su afinidad por una interacción no específica. Una molécula quimiotáctica modificada, un fragmento o peptidomimético de una molécula quimiotáctica, o un anticuerpo o fragmento de la misma que puede unirse al receptor de la molécula quimiotáctica con baja o alta afinidad siempre que la unión sea

suficiente para inhibir la interacción entre una molécula quimiotáctica y receptor. Por ejemplo, una molécula quimiotáctica modificada puede unirse al receptor de la molécula quimiotáctica correspondiente con una afinidad de unión (Kd) de aproximadamente 10^{-4} M o menos, 10^{-5} M o menos, 10^{-6} M o menos, aproximadamente 10^{-7} M o menos, incluidos aproximadamente 10^{-8} M o menos, como 10^{-9} M o menos. Se conocen varios métodos para detectar o medir la unión de polipéptidos en la materia.

Los expertos en la materia pueden formular y administrar las sustancias útiles para poner en práctica los métodos descritos en el presente documento de una manera y en una cantidad apropiada para la afección a tratar; la tasa o cantidad de inflamación; el peso, género, edad y salud del individuo; la naturaleza bioquímica, bioactividad, biodisponibilidad y efectos secundarios del compuesto en particular; y de una manera compatible con regímenes de tratamiento concurrente. Una cantidad y una formulación adecuadas para disminuir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos en seres humanos pueden extrapolarse a partir de modelos animales creíbles conocidos en la materia del trastorno particular. Se entiende que la dosis de una sustancia terapéutica debe ajustarse en función de la afinidad de unión de la sustancia, de modo que se pueda administrar una dosis más baja de una sustancia que muestre una afinidad de unión significativamente mayor en comparación con la dosis necesaria para una sustancia con menor afinidad de unión.

La cantidad total de una sustancia se puede administrar como una dosis única o por infusión durante un período de tiempo relativamente corto, o se puede administrar en dosis múltiples administradas durante un período de tiempo más prolongado. Dichas consideraciones dependerán de una variedad de factores específicos del caso, como, por ejemplo, si la categoría de la enfermedad se caracteriza por episodios agudos o deterioro gradual o crónico. Para un individuo afectado con deterioro crónico, por ejemplo, asociado con un trastorno neuroinflamatorio como la esclerosis múltiple, la sustancia se puede administrar en una matriz de liberación lenta, que puede implantarse para el suministro sistémico o en el sitio del tejido diana. Las matrices contempladas útiles para la liberación controlada de compuestos terapéuticos son bien conocidas en la materia, e incluyen materiales tales como DepoFoam™, biopolímeros, microbombas y similares.

Las sustancias administradas en los métodos de la invención pueden administrarse al individuo por cualquier número de vías conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, sistémicamente, tal como intravenosa o intraarterialmente. Se puede proporcionar una sustancia terapéutica en forma de polipéptidos aislados y sustancialmente purificados y fragmentos de polipéptidos en formulaciones farmacéuticamente aceptables usando métodos de formulación conocidos por los expertos en la materia. Estas formulaciones pueden administrarse por vías convencionales, que incluyen, por ejemplo, vías tópicas, transdérmicas, intraperitoneales, intracraneales, intracerebroventriculares, intracerebrales, intravaginales, intrauterinas, orales, rectales o parenterales (por ejemplo, intravenosa, intraspinal, intratecal, subcutánea o intramuscular). La administración intratecal de una sustancia terapéutica en el espacio intradural o subaracnoideo es una ruta preferida para poner en práctica los métodos de la invención para disminuir la gravedad de una afección neuroinflamatoria asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. La administración intravenosa de una sustancia terapéutica también es una ruta preferida para poner en práctica los métodos de la invención. Además, una sustancia terapéutica administrada en los métodos de la invención puede incorporarse en polímeros biodegradables permitiendo la liberación sostenida de la sustancia útil para reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Los polímeros biodegradables y su uso se describen, por ejemplo, en La administración intravenosa de una sustancia terapéutica también es una ruta preferida para poner en práctica los métodos de la invención. Además, una sustancia terapéutica administrada en los métodos de la invención puede incorporarse en polímeros biodegradables permitiendo la liberación sostenida de la sustancia útil para reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Los polímeros biodegradables y su uso se describen, por ejemplo, en Brem et al., J. Neurosurg. 74: 441-446 (1991)

Una sustancia terapéutica administrada en los métodos de la invención también puede administrarse como una solución o suspensión junto con un medio farmacéuticamente aceptable. Dicho medio farmacéuticamente aceptable puede incluir, por ejemplo, disolventes acuosos estériles tales como tampón fosfato de sodio, solución salina tamponada con fosfato, solución salina normal o solución de Ringer u otra solución salina tamponada fisiológicamente, u otro disolvente o vehículo tal como glicol, glicerol, un aceite como aceite de oliva o un éster orgánico inyectable. Un medio farmacéuticamente aceptable puede contener adicionalmente compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, estabilizan el agente neutralizante, aumentan su solubilidad o aumentan su absorción. Dichos compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono tales como glucosa, sacarosa o dextranos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o glutatión; permeabilizadores mediados por receptores, que pueden usarse para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica; agentes quelantes como el EDTA, que rompe las membranas microbianas; iones metálicos divalentes tales como calcio o magnesio; proteínas de bajo peso molecular; lípidos o liposomas; u otros estabilizantes o excipientes. Los expertos en la materia entienden que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable depende de la vía de administración del compuesto que contiene la sustancia neutralizante y de sus características físicas y químicas particulares.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas tales como los medios farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente. Las soluciones pueden contener adicionalmente, por ejemplo, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea

isotónica con la sangre del receptor previsto. Otras formulaciones incluyen, por ejemplo, suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en contenedores de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en una condición liofilizada que requiere, por ejemplo, la adición del vehículo líquido estéril, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

Para aplicaciones que requieren que los compuestos y composiciones crucen la barrera hematoencefálica, son particularmente deseables las formulaciones que aumentan la lipofilia del compuesto. Por ejemplo, el agente neutralizante puede incorporarse en liposomas (Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. I a III, 2ª ed. (CRC Press, Boca Raton FL (1993)). Los liposomas, que consisten en fosfolípidos u otros lípidos, son portadores no tóxicos fisiológicamente aceptables, y metabolizables que son relativamente simples de hacer y administrar.

Una sustancia terapéutica administrada en los métodos de la invención también puede prepararse como nanopartículas. La adsorción de compuestos peptídicos en la superficie de las nanopartículas ha demostrado ser eficaz en la administración de fármacos peptídicos al cerebro (ver Kreuter et al., Brain Research 674: 171-174 (1995)). Las nanopartículas ejemplares son partículas poliméricas coloidales de poli-butilacrilato con una sustancia terapéutica para ser administrada en los métodos de la invención adsorbidos sobre la superficie y a continuación recubiertos con polisorbato 80.

El suministro de ultrasonidos guiado por imágenes de una sustancia terapéutica administrada en los métodos de la invención a través de la barrera hematoencefálica en ubicaciones seleccionadas en el cerebro puede utilizarse como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.752.515. Brevemente, para administrar una sustancia terapéutica más allá de la barrera hematoencefálica, se selecciona una ubicación seleccionada en el cerebro y se usa una ecografía para inducir un cambio detectable mediante imágenes en los tejidos y/o líquidos del sistema nervioso central (SNC) en esa ubicación. Se toma al menos una imagen de una parte del cerebro cerca de la ubicación seleccionada, por ejemplo, mediante imágenes de resonancia magnética (MRI), para confirmar la ubicación del cambio. Una sustancia terapéutica administrada en los métodos de la invención en el torrente sanguíneo del paciente puede administrarse en la ubicación confirmada aplicando ultrasonidos para efectuar la apertura de la barrera hematoencefálica en esa ubicación y, por lo tanto, para inducir la absorción de la sustancia.

Además, se pueden usar polipéptidos denominados permeabilizadores mediados por receptores (RMP) para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a moléculas como sustancias terapéuticas o de diagnóstico, como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.268.164; 5.506.206; y 5.686.416. Estos permeabilizadores mediados por el receptor pueden coadministrarse por vía intravenosa a un hospedador con moléculas cuyo destino deseado es el compartimiento del líquido cefalorraquídeo del cerebro, por ejemplo, en el tratamiento de una afección neuroinflamatoria autoinmune. Los polipéptidos permeabilizantes o sus análogos conformacionales permiten que las sustancias terapéuticas penetren en la barrera hematoencefálica y lleguen a su destino.

En los regímenes de tratamiento actuales para enfermedades autoinmunes, a menudo se administra más de un compuesto a un individuo para el tratamiento de los mismos o diferentes aspectos de la enfermedad. De manera similar, en los métodos de la invención que implican reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos, una sustancia terapéutica puede formularse ventajosamente con un segundo compuesto terapéutico como un compuesto antiinflamatorio, un compuesto inmunosupresor o cualquier otro compuesto que gestione los mismos o diferentes aspectos de la enfermedad. Dichos compuestos incluyen, por ejemplo, acetato de metilprednisolona, dexametasona y betametasona. Como ejemplo, para el tratamiento de la enfermedad de Graves, una sustancia terapéutica puede formularse ventajosamente con un segundo compuesto terapéutico, como los fármacos antitiroideos, incluyendo propiltiouracilo (PTU) y metimazol (Tapazole®); medicamentos bloqueadores beta-adrenérgicos, incluidos atenolol (Tenormin®), nadolol (Corgard®), metoprolol (Lopressor®) y propranolol (Inderal®); y yodo radioactivo. Los métodos contemplados para reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos incluyen la administración de una sustancia terapéutica útil en los métodos de la invención solos, en combinación con, o en secuencia con, otros compuestos. Alternativamente, las terapias de combinación pueden consistir en proteínas de fusión, donde la sustancia terapéutica útil en los métodos de la invención está unida a una proteína heteróloga, tal como una proteína terapéutica.

También se describe un método para diagnosticar o predecir la susceptibilidad a una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos en un individuo sospechoso de padecer una enfermedad de este tipo mediante la obtención de una muestra de tejido de prueba del individuo; midiendo el nivel de anticuerpos específicos para el receptor de IGF-1, y comparando los niveles de expresión medidos de anticuerpos con niveles de anticuerpos de una muestra de tejido de control, en donde un aumento de 2 veces o más de los niveles de anticuerpos en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control indica la presencia de una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

También se describe un método para diagnosticar o predecir la susceptibilidad a una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos en un individuo sospechoso de padecer dicha

5 enfermedad mediante la obtención de una muestra de tejido de prueba del individuo; midiendo el nivel de al menos un tipo de molécula quimiotáctica capaz de reclutar linfocitos T, y comparando los niveles de expresión medidos de la molécula quimiotáctica con los niveles de una muestra de tejido de control, en donde un aumento de 2 veces o más en el nivel medido de la molécula quimiotáctica en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control indica la presencia de una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

10 Como se usa en el presente documento, el término "muestra" pretende significar cualquier fluido biológico, célula, tejido, órgano o porción del mismo, que incluya o potencialmente incluya autoanticuerpos específicos de la enfermedad, por ejemplo, anti-IGF1R, o una molécula quimiotáctica asociada con el reclutamiento de linfocitos T mediado por fibroblastos. El término incluye muestras presentes en un individuo, así como muestras obtenidas o derivadas del individuo. Por ejemplo, una muestra puede ser una sección histológica de un espécimen obtenido por biopsia, o células que se ponen en o se adaptan al cultivo de tejidos. Una muestra adicional puede ser una fracción o extracto subcelular, o una preparación de ácido nucleico o polipéptido en bruto o sustancialmente pura.

15 Los métodos de diagnóstico y pronóstico descritos en el presente documento son útiles para determinar si un paciente está en riesgo o padece una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos en un individuo. Los métodos de diagnóstico y pronóstico descritos en el presente documento se pueden usar para identificar individuos con probabilidad de experimentar una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos en un individuo, de modo que se puedan ofrecer terapias adecuadas.

20 La enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos incluye, por ejemplo, la enfermedad de Graves y la artritis reumatoide. Tal como se describe en el presente documento, en función de la existencia de autoinmunidad inducida por trauma mediante la cual el repertorio autorreactivo regula las respuestas inmunológicas en curso del sistema nervioso central (SNC), los métodos de diagnóstico y predictivo descritos en este documento también son aplicables en el contexto del trauma del SNC y las enfermedades neurodegenerativas. Los métodos en este documento son aplicables para el diagnóstico o tratamiento de cualquiera o todas las afecciones asociadas con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

25 En el presente documento también se describe un método para diagnosticar o predecir una afección autoinmune basada en el hallazgo de una correlación positiva entre la expresión de autoanticuerpos dirigidos contra el Receptor IGF1 en células de fibroblastos y el grado o extensión de la afección asociada con la infiltración de linfocitos T. Los métodos de diagnóstico son aplicables a numerosas afecciones y patologías como se ha descrito anteriormente. Una consecuencia de la progresión a estas afecciones es un aumento de la expresión de las IgG que se unen específicamente al Receptor IGF-1, que sirve como autoantígeno. Este aumento en la expresión del anticuerpo anti-IGF-1R en individuos que padecen una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos puede medirse comparando la cantidad o concentración de anticuerpo anti-IGF-1R con la encontrada, por ejemplo, en muestras de sangre, linfa o tejido normales, por ejemplo, muestras de ganglios linfáticos. Un aumento de dos veces o más en la expresión del anticuerpo anti-IGF-1R en una muestra de prueba con respecto a las muestras obtenidas de la muestra de tejido de control es indicativo de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. De manera similar, un aumento en la expresión de anticuerpos anti-IGF-1R que da lugar a una secreción del doble o más en la sangre u otros fluidos circulatorios del individuo en comparación con las muestras de sangre o fluidos normales también es indicativo de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

30 Como indicador de diagnóstico, los anticuerpos anti-IGF-1R se pueden usar de forma cualitativa para identificar positivamente una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos como se describe anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos anti-IGF-1R también se pueden usar cuantitativamente para determinar el grado o la susceptibilidad a una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Por ejemplo, se pueden usar aumentos sucesivos en los niveles de expresión, incluidos los niveles de anticuerpos anti-IGF-1R en fluidos circulantes, como indicador predictivo del grado o la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos, por ejemplo, la enfermedad de Graves o la artritis reumatoide, porque la expresión aumentada, que lleva a un aumento en los niveles acumulados, por ejemplo, también puede correlacionarse positivamente con el aumento de la gravedad de dicha afección. Cuanto más alto sea el nivel de expresión de autoanticuerpos, más tardía será la etapa de la afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Los autoanticuerpos específicos de la enfermedad y las moléculas quimiotácticas asociadas con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos también pueden usarse cuantitativamente para distinguir entre los diferentes tipos de afecciones autoinmunes.

35 Los aumentos correlativos se pueden determinar mediante la comparación de autoanticuerpos específicos de la enfermedad o moléculas quimiotácticas asociadas con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos del individuo que tiene, o se sospecha que tiene una afección particular a los niveles de expresión correspondientes de muestras conocidas determinadas para exhibir la afección particular. Alternativamente, los aumentos correlativos también pueden determinarse mediante la comparación de autoanticuerpos específicos de la enfermedad o moléculas quimiotácticas asociadas con la expresión de infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos del individuo de prueba en combinación con los niveles de expresión de otros marcadores conocidos de una afección

particular, tales como, por ejemplo, tirotropina, anticuerpos dirigidos contra el receptor de tirotropina (anticuerpos anti-TSH-R), o niveles de hormona tiroidea en pacientes de Graves; proteínas SR o niveles de autoanticuerpos anti-SR para el lupus eritematoso sistémico (ver Neugebauer et al., *Arthritis Rheum.* 43 (8): 1768-78 (2000)). De manera similar, se pueden usar otros marcadores conocidos asociados con trastornos autoinmunes particulares, por ejemplo, como un patrón interno o externo para la correlación de la expresión específica del estadio con aumentos en la expresión de otros marcadores conocidos asociados con una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. A la inversa, una regresión en la gravedad de una afección o patología puede ir seguida de una disminución correspondiente en los niveles de expresión de autoanticuerpos específicos de la enfermedad o moléculas quimiotácticas y puede evaluarse de manera similar utilizando los métodos descritos anteriormente.

Dadas las enseñanzas y la guía que se proporcionan en el presente documento, los expertos en la materia conocerán o podrán determinar la etapa o la gravedad de una afección particular asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos basada en la determinación de la expresión de autoanticuerpos específicos de la enfermedad o moléculas quimiotácticas utilizando procedimientos conocidos y comparaciones de marcadores distintos de los descritos anteriormente. Para una revisión de los valores reconocidos para ese otro marcador en tejidos normales frente a patológicos, ver, por ejemplo, *Endocrinology* (Degroot y Jameson, Eds., 4th ed., 2001, WB Saunders, Filadelfia); Werner e Ingbar, *Thyroid: A Fundamental and Clinical Text* (Braverman and Utiger, Eds., 7th ed., 1996, Lippincott, Filadelfia).

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un método para diagnosticar y pronosticar una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos, por ejemplo, la enfermedad de Graves (EG) y la artritis reumatoide (AR), así como otras afecciones autoinmunes.

El uso de niveles de expresión de autoanticuerpos específicos de la enfermedad o moléculas quimiotácticas en muestras de tejido o muestras obtenidas del sistema circulatorio como indicador de diagnóstico de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos permite un diagnóstico temprano como indicador predictivo cuando no hay síntomas fisiológicos o patológicos evidentes. Los métodos son aplicables a cualquier persona que se sospeche que padece o está en riesgo de contraer una enfermedad autoinmune, por ejemplo, las mujeres en edad fértil con antecedentes familiares de trastornos autoinmunes. En este sentido, se sabe que alrededor del 75 por ciento de las enfermedades autoinmunes ocurren en mujeres, con mayor frecuencia durante sus años fértiles. Se sospecha un componente genético de las enfermedades autoinmunes, ya que varios miembros de la familia pueden verse afectados, aunque no siempre con la misma enfermedad. Para la enfermedad de Graves, los estudios han demostrado que el 75 % de los gemelos monocigóticos son discordantes para la enfermedad. Debido a que la gravedad de la enfermedad puede cambiar después del embarazo o la menopausia, también se sospecha que las hormonas desempeñan un papel. Además, la aparición puede seguir a infecciones virales o bacterianas, ya que las enfermedades autoinmunes pueden ser provocadas por ciertos patógenos que en última instancia provocan una respuesta inmune anormal contra el cuerpo.

Teniendo en cuenta los factores de riesgo conocidos citados y otros conocidos en la materia, los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento son aplicables a individuos con riesgo de padecer una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos antes de la aparición de síntomas clínicos manifiestos. Al determinar los niveles de expresión de un autoanticuerpo específico de la enfermedad, por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF-1R, o una molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, en muestras de prueba de tejido o muestras de prueba obtenidas del sistema circulatorio y al comparar el nivel medido con el de una muestra de control apropiada, es posible determinar si hay un aumento en estos niveles en el individuo sospechoso de padecer una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos en comparación con los individuos normales.

Por ejemplo, los individuos sospechosos de padecer una afección autoinmune particular asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos pueden identificarse al presentar signos de la afección particular que se conocen en la materia y dependen de la enfermedad específica y del órgano o tejido afectado, pero en general puede incluir, por ejemplo, fiebre baja, malestar general y fatiga. Los métodos de pronóstico también son aplicables a individuos después del diagnóstico de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos, por ejemplo, para monitorizar mejoras o identificar una remisión.

En el presente documento también se describe un método para predecir la aparición de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. El método consiste en determinar el aumento de los niveles de expresión de un autoanticuerpo específico de la enfermedad, por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF-1R, o una molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, en una muestra de prueba de un individuo que tiene o es sospechoso de padecer una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos y comparar el nivel de expresión medido con una muestra de control aislada de un individuo normal, donde un aumento del nivel de expresión de un autoanticuerpo específico de la enfermedad, por ejemplo, el anticuerpo anti-IGF-1R, o una molécula quimiotáctica, por ejemplo, RANTES o IL-16, en la muestra indica el inicio de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

Los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento son aplicables para su uso con una variedad de diferentes tipos de muestras aisladas u obtenidas de un individuo que tiene, o se sospecha que tiene una afección

asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Por ejemplo, las muestras aplicables para su uso en uno o más formatos de diagnóstico, incluyen muestras de tejido y células. Se puede obtener una muestra de tejido o de células, por ejemplo, mediante biopsia o cirugía. Como se describe a continuación, y dependiendo del formato del método, el tejido se puede usar entero o se puede disociar en pedazos más pequeños, agregados celulares o células individuales. Cuando se mide el polipéptido o los niveles de actividad, se puede emplear la amplificación de la señal con acoplamiento enzimático o mejora fotométrica utilizando solo unas pocas o un pequeño número de células. Todo el tejido obtenido de una biopsia de, por ejemplo, un ganglio linfático es un ejemplo de una muestra de células. De particular interés para poner en práctica los métodos descritos, las cepas de fibroblastos, por ejemplo, los fibroblastos orbitales pueden iniciarse a partir de restos quirúrgicos. Los fibroblastos dérmicos pueden derivarse, por ejemplo, de biopsias por punción u obtenerse de una fuente de terceros, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC). Las muestras de células de tejido completo pueden analizarse empleando cualquiera de los formatos descritos a continuación.

Las células individuales y los agregados celulares de un individuo que tiene, o se sospecha que tiene una afección particular asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos, es otro ejemplo de una muestra de células que puede analizarse para determinar la expresión incrementada de polipéptido o actividad. La muestra de tejido o célula se puede obtener directamente del individuo o, alternativamente, se puede obtener de otras fuentes para realizar pruebas. De manera similar, la muestra de células se puede analizar cuando está recién aislada o se puede analizar después de períodos cortos o prolongados de crioconservación sin pérdida sustancial de precisión o sensibilidad. Si la muestra se va a analizar después de un período de tiempo indeterminado, se puede obtener y a continuación crioconservar, o almacenar a 4 °C durante cortos períodos de tiempo, por ejemplo. Una ventaja de los métodos de diagnóstico descritos en este documento es que no requieren un análisis histológico de la muestra. Como tal, la muestra inicialmente puede ser desagregada, lisada, fraccionada o purificada y el componente activo puede almacenarse para un diagnóstico posterior.

Las muestras de fluidos que pueden medirse para niveles de expresión de, por ejemplo, una inmunoglobulina o autoanticuerpo específico de la enfermedad, autoantígeno, molécula quimiotáctica, incluyen, por ejemplo, sangre, suero y linfa. Los fluidos corporales son conocidos por los expertos en la materia y son igualmente aplicables para su uso como una muestra en los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento. Una de las ventajas de analizar muestras de fluidos es que se pueden obtener fácilmente, en cantidad suficiente, sin procedimientos invasivos como requieren la biopsia y la cirugía. El análisis de muestras de líquidos como la sangre, el suero y la linfa generalmente se realizará en los formatos de diagnóstico descritos anteriormente y más adelante, que miden los niveles o la actividad. A medida que el polipéptido circula, los métodos serán similares a los que miden los niveles de expresión de los lisados celulares.

Un control adecuado para la comparación puede ser una muestra obtenida de un individuo donante que se sabe que no tiene la afección particular a la que se dirige el método de diagnóstico o pronóstico. La muestra de control para su comparación se puede medir simultáneamente con una o más muestras de prueba o, alternativamente, se pueden establecer niveles de expresión para un tipo particular de muestra y estandarizar parámetros internos o externos, como el contenido de proteínas, el número de células o la masa de tejido. Estas muestras de control estandarizadas pueden compararse directamente con los resultados obtenidos de la muestra de prueba. Un aumento de dos veces o más de los niveles de expresión de, por ejemplo, una inmunoglobulina o autoanticuerpo específico de la enfermedad, autoantígeno, molécula quimiotáctica, indica la presencia de la afección particular en el individuo analizado.

Los procedimientos de diagnóstico descritos anteriormente y más adelante pueden usarse adicionalmente junto con otros biomarcadores, como, por ejemplo, los anticuerpos anti-TSHR en el caso de la enfermedad de Graves (EG), para la corroboración simultánea o independiente de una muestra. Los expertos en la materia sabrán qué marcadores son aplicables para su uso junto con una afección particular para delinear información de diagnóstico más específica, como la descrita anteriormente.

En el presente documento también se describe un método para diagnosticar o predecir la susceptibilidad a una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos en un individuo sospechoso de padecer dicha enfermedad mediante la obtención de una muestra de tejido de prueba del individuo; midiendo el nivel de al menos un tipo de molécula quimiotáctica capaz de reclutar linfocitos T, y comparando los niveles de expresión medidos del tipo de molécula quimiotáctica con los niveles de moléculas quimiotácticas de una muestra de tejido de control. Un aumento de 2 veces o más en el nivel medido del tipo de molécula quimiotáctica en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control indica la presencia de una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

En el presente documento también se describe un método para diagnosticar o predecir la susceptibilidad a una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos en un individuo sospechoso de padecer una enfermedad asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos mediante la obtención de una muestra de tejido de prueba del individuo; midiendo el nivel de anticuerpos específicos para el receptor de IGF-1, y comparando los niveles de expresión medidos de anticuerpos con niveles de anticuerpos de una muestra de tejido de control, en donde un aumento de 2 veces o más de los niveles de anticuerpos en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control de anticuerpos indica la presencia

de una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

En el presente documento también se describe un método para identificar una sustancia que modula la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos mediante la inducción de la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos en una población de células; poniendo en contacto una primera subpoblación de células con una sustancia de prueba y una segunda subpoblación de células con una sustancia de control; y comparando la cantidad de infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos entre la primera y segunda subpoblaciones de células, en donde una diferencia en la cantidad de infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos entre la primera y segunda subpoblaciones de células sustancia modula la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

En el presente documento también se describe un método para identificar una sustancia capaz de modular la interacción entre un receptor de IGF-1 y una inmunoglobulina endógena al poner en contacto una muestra que contiene el receptor de IGF-1 y una inmunoglobulina endógena con una sustancia de prueba en condiciones que permiten la interacción entre el receptor de IGF-1 y la inmunoglobulina endógena, y la medición de la interacción entre el receptor de IGF-1 y la inmunoglobulina endógena, en donde una disminución en la cantidad de interacción entre el receptor de IGF-1 y la inmunoglobulina endógena en presencia de la sustancia de prueba en comparación con la ausencia de la sustancia de prueba indica que la sustancia es capaz de modular la interacción entre el receptor de IGF-1 y la inmunoglobulina endógena.

Una sustancia capaz de modular la interacción entre un receptor de IGF-1 y una inmunoglobulina endógena puede disminuir la cantidad de interacción. Dicha sustancia es útil en las aplicaciones terapéuticas descritas en el presente documento dirigidas a reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

En el presente documento también se describe un método para identificar una sustancia capaz de inhibir la liberación de al menos un tipo de molécula quimiotáctica de los fibroblastos al poner en contacto una muestra de células de fibroblastos con una sustancia de prueba en condiciones que están asociadas con la liberación del quimiotáctico y medir la cantidad de quimiotáctico que se libera a partir de la muestra de células de fibroblastos, en donde una disminución en la cantidad de quimiotáctico que se libera de la muestra en presencia de la sustancia de prueba en comparación con la ausencia de la sustancia de prueba indica que la sustancia es capaz de inhibir la liberación del tipo de molécula quimiotáctica de los fibroblastos. La muestra de células de fibroblastos puede ponerse en contacto con una sustancia de control en afecciones que están asociadas con la liberación de dicho tipo de molécula quimiotáctica, por ejemplo, una quimiocina como la quimiocina C-C RANTES o una citoquina como el ligando CD4+ específico IL-16. Por ejemplo, la muestra de células de fibroblastos puede ponerse en contacto con anticuerpos específicos de la enfermedad que se sabe que se unen específicamente y activan un receptor de autoantígeno que resulta en la liberación subsiguiente de una molécula quimiotáctica que recluta células inmunocompetentes. Además, como se describe en el Ejemplo IV, la inducción de la expresión de IL-16 y la liberación de esta molécula quimiotáctica a partir de los fibroblastos implica la vía FRAP/mTOR y la activación de la serina/treonina quinasa p70^{S6k}. Esta vía puede ser inhibida por el macrólido rapamicina como se describe por Brennan et al., Mol. Cell. Biol. 19: 4729 (1999).

Por lo tanto, la rapamicina es una sustancia moduladora que puede prevenir la liberación por parte de un fibroblasto de una molécula quimiotáctica. De manera similar, la liberación de la molécula quimiotáctica IL-16 de los fibroblastos depende de la caspasa-3 (Ejemplo III), de manera que un inhibidor de la caspasa-3 es una sustancia moduladora adicional que puede prevenir la liberación por parte de un fibroblasto de una molécula quimiotáctica.

Como se describe en el presente documento, una sustancia capaz de inhibir la liberación de al menos un tipo de molécula quimiotáctica de los fibroblastos representa una sustancia moduladora útil en las aplicaciones terapéuticas descritas en este documento dirigidas a reducir la gravedad de una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Una muestra de prueba adecuada puede ser una muestra de células de fibroblastos obtenida de un individuo afectado por una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Una muestra de prueba de fibroblastos adecuada puede contener células que expresan el autoantígeno y pueden obtenerse, por ejemplo, mediante biopsia por punción de la dermis o de un sitio de remodelación tisular, de un individuo que se sabe que padece una afección asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Los expertos en la materia apreciarán que, en los métodos descritos en el presente documento, la ausencia de una sustancia de ensayo puede representar la presencia de una sustancia de control.

Para confirmar la actividad moduladora de una sustancia de prueba, es necesario inducir las afecciones asociadas con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Dicha afección se puede inducir, por ejemplo, exponiendo la prueba de fibroblastos y las muestras de control a una inmunoglobulina obtenida de un individuo afectado por una enfermedad autoinmune asociada con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos, por ejemplo, enfermedad de Graves (EG); una manifestación de la enfermedad de Graves (EG) asociada con la remodelación del tejido conectivo, como la oftalmopatía asociada al tiroides (OAT) y la dermatopatía; la artritis reumatoide; o una afección asociada con la neuroinflamación.

La infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos se puede inducir de varias maneras. Cualquier compuesto o proceso que resulte en la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos puede usarse para inducir este proceso.

Por ejemplo, se pueden usar los compuestos que imitan a la inmunoglobulina anti-IFG1R endógena o una molécula quimiotáctica que se libera naturalmente por los fibroblastos para atraer linfocitos T en los métodos de selección descritos en el presente documento. La inducción de infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos puede ocurrir a través de la activación de IFG1R o a través de otros mecanismos. Del mismo modo, la activación de IFG1R puede ocurrir a través de la unión de una inmunoglobulina endógena o un compuesto diferente. Por ejemplo, una forma truncada de una inmunoglobulina anti-IFG1R que retiene la capacidad de unirse al IGF-1R y conducir a la activación de fibroblastos puede inducir la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

Se entiende que un fragmento de una inmunoglobulina endógena que reconoce IFG1R puede ser suficiente para inducir las afecciones que están asociadas con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Por ejemplo, un fragmento de una inmunoglobulina endógena que retiene sustancialmente la misma capacidad para unirse específicamente a IFG1R como el polipéptido completo es útil para poner en práctica los métodos de la invención. Un fragmento de una molécula quimiotáctica que reconozca su receptor correspondiente puede ser, de manera similar, suficiente para producir las afecciones asociadas con la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Los fragmentos pueden incluir, por ejemplo, deleciones aminos-terminales, carboxilo terminal o deleciones internas de una molécula quimiotáctica de la sustancia de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento puede contener al menos aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, o más restos de aminoácidos contiguos o no contiguos de un polipéptido de longitud completa. Los fragmentos de polipéptidos se pueden generar, por ejemplo, utilizando métodos de ADN recombinante o escisión enzimática o química de polipéptidos más grandes. Además, varias moléculas, como otros polipéptidos, carbohidratos o lípidos, o moléculas pequeñas pueden unirse a una molécula quimiotáctica o una inmunoglobulina endógena que incluye fragmentos de estas moléculas. Por ejemplo, se puede unir un resto de etiqueta a una molécula quimiotáctica.

Se entiende que pueden realizarse modificaciones limitadas a un anticuerpo sin destruir su actividad de unión específica con respecto a, por ejemplo, un autoantígeno tal como IFG1R. Varias modificaciones de la secuencia de aminoácidos primaria pueden dar como resultado polipéptidos que tienen una función sustancialmente equivalente, disminuida o mejorada en comparación con la inmunoglobulina endógena. Los expertos en la materia reconocen que dichas modificaciones pueden ser deseables en ocasiones para mejorar la bioactividad, biodisponibilidad o estabilidad de un polipéptido, o para facilitar su síntesis o purificación. Las sustituciones de aminoácidos contempladas en la secuencia nativa de un polipéptido pueden incluir, por ejemplo, cambios conservativos, en donde un aminoácido sustitutivo tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, reemplazo de un aminoácido polar con otro aminoácido polar o reemplazo de un aminoácido cargado con un aminoácido cargado de manera similar. Los expertos en la materia también reconocen que también pueden realizarse cambios no conservativos, por ejemplo, el reemplazo de un aminoácido polar no cargado con un aminoácido no polar o el reemplazo de un aminoácido cargado con un aminoácido polar no cargado sin afectar la función de un polipéptido tal como un anticuerpo anti-IFG1R o una molécula de agente quimioterapéutico. Además, en la materia se conocen diversas modificaciones de polipéptidos para restringir la estructura de los polipéptidos para mejorar la estabilidad o la unión (Cabezas y Satterthwait, *supra*, 1999; Stanfield et al., *supra*, 1999).

Las células utilizadas en los métodos de selección descritos en el presente documento pueden incluir células primarias, así como líneas celulares. Se pueden usar células primarias en una sección de tejido o crecidas en cultivo celular. Por ejemplo, se pueden usar fibroblastos humanos y se pueden cultivar en cultivo celular en forma aislada o con otras células que se pueden usar para proporcionar un mejor crecimiento de los fibroblastos. Además, los fibroblastos se pueden usar como un corte de tejido, por ejemplo, un corte de tejido de ganglios linfáticos que se usa directamente después del aislamiento o que se ha mantenido en el cultivo de tejidos. Las técnicas de cultivo de células y tejidos son bien conocidas en la materia.

Las líneas celulares también se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento. Se han establecido varias líneas celulares neuronales y no neuronales y son bien conocidas en la materia. Las líneas celulares apropiadas están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC) o de investigadores individuales. Además, las células pueden aislarse de un individuo afectado por una enfermedad particular e inmortalizarse por métodos bien conocidos en la materia. Se pueden usar líneas celulares que no sean de fibroblastos, por ejemplo, cualquier línea celular que pueda transfectarse con IFG1R. Las líneas celulares no neuronales que pueden transfectarse incluyen, por ejemplo, células 293T, HeLa, COS-7 y Jurkat, entre otras. Las técnicas de transfección, tales como fosfato de calcio, lípidos y electroporación son bien conocidas en la materia. Además, en la invención se pueden usar células madre u otras células pluripotentes. Estas células se pueden usar como células primarias o líneas celulares en un estado diferenciado o no diferenciado.

El nivel de infiltración de linfocitos T mediado por fibroblastos puede medirse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de quimiotaxis para evaluar la migración direccional de los linfocitos T. Una vez que la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos ha sido inducida en una célula, los métodos actuales contemplan el contacto de la célula con una sustancia de prueba para identificar una sustancia que modula la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Los métodos descritos en el presente documento son particularmente útiles para identificar, entre una población diversa de moléculas, aquellas sustancias que modulan la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. Los métodos para producir bibliotecas que contienen diversas poblaciones de moléculas, incluyendo moléculas químicas o biológicas tales como moléculas orgánicas simples o complejas, péptidos, proteínas, peptidomiméticos, glicoproteínas,

lipoproteínas, polinucleótidos y similares, son bien conocidos en la materia (Huse, patente de Estados Unidos n.º 5.264.563; Blondelle et al., Trends Anal. Chem. 14: 83-92 (1995); York et al., Science 274: 1520-1522 (1996); Gold et al., Proc Natl. Acad. Sci., USA 94: 59-64 (1997); Gold, patente de Estados Unidos n.º 5.270.163). Dichas bibliotecas también pueden obtenerse de fuentes comerciales.

5 Dado que las bibliotecas de diversas moléculas pueden contener hasta 10^{14} a 10^{15} moléculas diferentes, un ensayo de detección como se describe en el presente documento proporciona un medio simple para identificar aquellas sustancias en la biblioteca que pueden modular la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos. En particular, puede automatizarse un ensayo de selección como se describe en el presente documento, lo que permite una selección de alto rendimiento de bibliotecas de agentes diseñadas al azar para identificar aquellos agentes
10 particulares que pueden modular la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos.

Un ensayo de selección puede analizar dos o más muestras simultáneamente para identificar una sustancia con la actividad deseada. Hay varios formatos disponibles para la selección que pueden permitir la detección simultánea de un número bajo o un número elevado de muestras. Por ejemplo, pueden analizarse simultáneamente 10, 100, 1000, 10.000, 100.000, 1.000.000 o más compuestos utilizando formatos de alto o bajo rendimiento. Los ensayos de
15 selección a menudo utilizan células o tejidos aislados, pero también pueden usar un sistema libre de células, como una solución química o biológica o un extracto libre de células derivado de células. Además, un ensayo de selección podría utilizar organismos o animales completos. Como entiende un experto en la materia, el diseño particular de un ensayo de selección depende de la actividad deseada del compuesto que se busca y de los reactivos disponibles.

Como se describe a continuación, la sustancia que modula la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos puede ser un compuesto o molécula que se une a IFG1R o cualquier otra molécula con afinidad suficiente para modular la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos y puede ser una macromolécula, como un polipéptido, ácidos nucleicos, hidratos de carbono o lípidos. Por lo tanto, una sustancia que modula la infiltración de linfocitos T
20 mediada por fibroblastos puede ser un anticuerpo, un ácido nucleico antisentido y cualquier compuesto identificado por los métodos descritos a continuación. Una sustancia que modula la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos también puede ser un compuesto derivado, análogo o mimético, así como un compuesto orgánico pequeño, siempre que la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos se module en presencia del compuesto. El tamaño de una sustancia que modula el compuesto de infiltración de linfocitos T mediado por fibroblastos no es importante siempre que la molécula muestre o pueda fabricarse para exhibir dicha actividad moduladora. Por
25 ejemplo, una sustancia que modula la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos puede ser tan baja como entre aproximadamente uno y seis, y tan grande como decenas o cientos de bloques de construcción de monómeros que constituyen una macromolécula o molécula de unión química. De manera similar, un compuesto orgánico puede ser una estructura simple o compleja siempre que tenga suficiente actividad.

Una sustancia que modula la infiltración de linfocitos T mediada por fibroblastos puede incorporarse en una formulación terapéutica que aumenta la especificidad de la diana. Por ejemplo, un tipo de célula particular, por
35 ejemplo, fibroblasto, monocito o macrófago, puede expresar un marcador de superficie celular único, un receptor de superficie celular o un ligando para un receptor particular. En tal caso, un anticuerpo, por ejemplo, una IgG específica de la enfermedad, puede generarse contra el marcador único de la superficie celular y una sustancia moduladora puede unirse al anticuerpo. Tras la administración del complejo de fármaco/anticuerpo al paciente, la unión del anticuerpo al marcador de superficie celular da como resultado el suministro dirigido de una concentración relativamente alta de la sustancia. La sustancia moduladora también puede estar unida al ligando específico o al
40 receptor, respectivamente, proporcionando así un medio para dirigir una concentración relativamente alta. Varios tipos de células pueden expresar marcadores únicos y, por lo tanto, proporcionar dianas potenciales para las moléculas de referencia que pueden dirigir una sustancia moduladora a un tipo de célula deseado, por ejemplo, fibroblastos.

Los expertos en la materia saben cómo identificar marcadores específicos de células diana que se expresan en solo uno o unos pocos tejidos e identificar moléculas que interactúan específicamente con dichos marcadores. Varios tipos de células pueden expresar marcadores únicos y, por lo tanto, proporcionar dianas potenciales para las moléculas *homing*. Ahora hay métodos disponibles para producir grandes poblaciones de moléculas y para
45 seleccionar bibliotecas de moléculas para identificar aquellas de interés, por ejemplo, las bibliotecas de presentación de péptidos de fagos pueden usarse para expresar grandes números de péptidos que pueden seleccionarse *in vitro* con una molécula diana particular o una célula de interés para identificar péptidos que se unen específicamente a una molécula o célula diana. La selección de dichas bibliotecas de presentación de fagos se ha utilizado, por ejemplo, para identificar ligandos que se unen específicamente a varios anticuerpos y receptores de la superficie celular. La selección de una biblioteca de presentación de fagos generalmente implica una exploración *in vitro* de la
50 biblioteca utilizando una molécula diana purificada. El fago que se une a la molécula diana se puede recuperar, el fago individual se puede clonar y se puede determinar el péptido expresado por un fago clonado. Dicho péptido puede ser útil para el suministro de una sustancia unida al péptido a células que expresan la molécula diana, por ejemplo, fibroblastos.

EJEMPLO I

60 **El suero de la enfermedad de Graves provoca la liberación mediada por IgG de moléculas quimiotácticas de**

fibroblastos activados

Este ejemplo demuestra que el suero de pacientes con enfermedad de Graves provoca la liberación mediada por IgG de la actividad de quimioatracción de linfocitos a partir de fibroblastos.

5 Los fibroblastos humanos derivados de pacientes con enfermedad de Graves y de donantes normales que se mantienen en condiciones de cultivo basales liberan niveles muy bajos de actividad quimiotáctica cuando el medio acondicionado en donde se incuban se somete a ensayos de migración celular utilizando linfocitos NWNA-T como dianas.

10 Brevemente, los resultados descritos en el presente documento se obtuvieron utilizando fibroblastos humanos de individuos con enfermedad de Graves o de donantes sin enfermedad tiroidea conocida. Las cepas de fibroblastos orbitales se iniciaron a partir de restos quirúrgicos. Los fibroblastos dérmicos se derivaron de biopsias por punción de piel de apariencia normal o se compraron en la American Type Tissue Collection (Rockville, MD). Se pensaba que todos los pacientes eran eutiroideos en el momento de la donación de tejido. Los sueros se recogieron de pacientes con enfermedad de Graves, sin o con OAT clínicamente aparente y de individuos sin enfermedad tiroidea (controles). Estos incluían hombres y mujeres adultos. El diagnóstico de la enfermedad de Graves se realizó sobre motivos clínicos, incluida la supresión de TSH, niveles elevados de T4 en suero, la presencia de anticuerpos antitiroideos, bocio, y síntomas típicos y signos de tirotoxicosis. La mayoría de los individuos eran eutiroideos en el momento de la extracción de sangre, mientras que pocos eran hipertiroideos. La IgG se preparó mediante el método descrito previamente utilizando proteína A como se describe en Hardy, Purification and Characterization of Monoclonal Antibodies in Handbook of Experimental Immunology, Volumen I, Immunochemistry (D.M. Weir, ed., Oxford: Blackwell Scientific, 1986). Las monocapas de fibroblastos se cubrieron con medio de Eagle suplementado con FBS al 10 %, antibióticos y glutamina, tal como describen Smith, J. Clin. Invest. 74: 2157 (1984). Los cultivos se incubaron en una atmósfera a 37 °C, humidificada, con el 5 % de CO₂, y se pasaron en serie con un tratamiento suave con tripsina/EDTA. Las cepas de fibroblastos se utilizaron entre el tercer y el duodécimo pases. Se ha demostrado que no expresan el factor VIII o la actina específica del músculo liso (Smith et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 80: 2620 (1995). No hubo diferencias en la morfología de los cultivos de los controles normales y los pacientes con enfermedad de Graves.

30 Como se muestra en el panel superior de la figura 1, cuando se añade suero no fraccionado de un paciente con enfermedad de Graves al medio de cultivo a una concentración final del 1 % que cubre las monocapas de fibroblastos, en este caso procedente de la órbita, tejido conectivo subcutáneo y tiroides derivados de un solo donante, y se incuba durante 24 horas, la actividad quimiotáctica de los linfocitos T se incrementa drásticamente. Una fracción sustancial de la quimiotaxis regulada al alza se puede bloquear con un anticuerpo monoclonal anti-IL-16 (columna blanca) (5 g/ml) añadido al ensayo de migración. La columna negra representa la quimiotaxis en ausencia del anticuerpo monoclonal anti-IL-16. La migración del 135 % fue significativa a un límite de confianza del 5 %.

35 Brevemente, para los diversos ensayos de quimiotaxis descritos en el presente documento, los fibroblastos se pusieron en placas de 24 pocillos y se dejó que proliferaran hasta confluencia. Después de enjuagar las monocapas con solución salina tamponada con fosfato (PBS), los cultivos se cambiaron a medio que contenía FBS al 1 % durante la noche antes de la adición de nada (control), IL-1 β (10 ng/ml), suero humano (concentración final del 1 %) o proteína IgG humana purificada en el medio. Los cultivos se incubaron durante los tiempos indicados en el texto y en las leyendas de las figuras. Al final de estas incubaciones, el medio de cultivo se recogió cuantitativamente y se almacenó a -80 °C hasta que se analizó.

45 La quimiotaxis se evaluó en una cámara de quimiotaxis de Boyden modificada utilizando linfocitos NWNA-T humanos como dianas celulares, como se ha descrito anteriormente (30). Brevemente, se pusieron 50 μ l de una suspensión celular (10⁷ células/ml) en los compartimentos superiores de cámaras de microquimiotaxis de 48 pocillos, separadas a partir de 32 μ l de muestras por filtros de nitrocelulosa con microporos de 8 μ m (Neuroprobe, Cabin John, MD) y posteriormente se incubaron a 37 °C en un ambiente de CO₂ al 5 % durante 3 horas. Los filtros se fijaron, se tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron en portaobjetos de vidrio, y se observaron bajo microscopía óptica. La migración de linfocitos se cuantificó contando el número total de células que migran más allá de cierta profundidad, configuradas de manera rutinaria para identificar una migración basal en condiciones de control de 10 a 15 células por campo de alta potencia. Se contabilizaron cinco campos de alta potencia por duplicado para cada muestra y las medias y las desviaciones típicas se calcularon y expresaron como valores porcentuales de la migración celular de referencia en el tampón de control solo (100 %). Para cada conjunto de condiciones experimentales, se realizaron al menos tres experimentos separados y las diferencias entre las condiciones experimentales y de control se analizaron mediante la prueba t de Student utilizando los valores absolutos obtenidos para la migración de linfocitos con significación estadística aceptada al 5 % de confianza.

60 Para evaluar la actividad quimiotáctica atribuible a IL-16, se realizaron experimentos de neutralización incubando sobrenadantes de cultivo durante 15 minutos con mAb anti-IL-16 purificado por afinidad (clon 14.1, 10 μ g/ml, que neutraliza la actividad quimiotáctica de 50 ng/ml rIL-16). El anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad anti-rIL-16 se preparó a partir de sueros de conejo inmunizados con rIL-16 como describen Cruikshank et al. Proc. Natl Acad Sci. USA 91: 5109 (1994). Para determinar la fracción dependiente de RANTES, se añadió mAb anti-

RANTES (5 µg/ml, que posee un ND50 de 200 ng/ml para rRANTES) al ensayo de migración. Se adquirió un ensayo ELISA para RANTES de BioSource y se compraron anticuerpos anti-RANTES neutralizantes de R&D Systems (Minneapolis, MN).

5 También en la figura 1 (panel inferior) se muestra que, cuando el medio de fibroblastos de los fibroblastos tratados con suero de la enfermedad de Graves se sometió a un ELISA de IL-16 específico, se encontró que los niveles de quimiotáctico estaban muy elevados. IL-16 fue indetectable en los cultivos de control.

10 Brevemente, los resultados descritos en el presente documento que involucran la cuantificación de la proteína IL-16 liberada de las monocapas de fibroblastos se obtuvieron al someter alicuotas de medio acondicionado a un ensayo ELISA específico, realizado según lo descrito por Sciaky et al., J. Immunol. 164: 3806 (2000). Las muestras de cada cultivo se analizaron por duplicado y rIL-16 y las alicuotas del medio acondicionado se diluyeron en PBS a las concentraciones deseadas. Se incubaron muestras de medio de cultivo (100 µl) en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Naperville, IL) a 37 °C durante 1 hora. Las manipulaciones posteriores se realizaron a temperatura ambiente.

15 Como se muestra en la figura 2, la actividad inductora de IL-16 se adsorbió completamente de los sueros de la enfermedad de Graves cuando se sometieron a cromatografía en columna de proteína A. El efluente no pudo influir en la migración de células T. Como se ha descrito anteriormente, los fibroblastos orbitales normales y de la enfermedad de Graves fueron tratados durante 24 h con suero (1 %), fracción de IgG (100 ng/ml) o efluente de la cromatografía de proteína A. Los medios se sometieron al ensayo de quimiotaxis de células T en ausencia o presencia de anticuerpo neutralizante anti-IL-16 (5 µg/ml). Los datos se expresan como los medios ± SD de tres determinaciones independientes. La migración de células T superior al 135 % fue significativa en el límite de confianza del 5 %.

20 La figura 2 también demuestra la ausencia de un efecto EG-IgG en los fibroblastos de un donante sin una enfermedad tiroidea conocida. Además, la IgG de un donante de control no pudo provocar la actividad de migración de células T en la enfermedad de Graves o en los fibroblastos normales. Las preparaciones de IgG de 26 pacientes diferentes con enfermedad de Graves a una concentración final de 100 ng/ml se probaron en una sola cepa de fibroblastos derivada de la enfermedad de Graves por su capacidad para inducir la migración de células T dependientes de IL-16 y la proteína IL-16. Doce de las muestras de IgG se derivaron de individuos con enfermedad de Graves, pero sin OAT evidente. Veinticinco de estas preparaciones de IgG provocaron una regulación al alza de la migración de células T dependientes de IL-16. Además, las mismas preparaciones de EG-IgG regulan al alza la síntesis y liberación de IL-16 en el medio de cultivo.

25 Como se muestra en el panel izquierdo de la figura 3, se encontró un alto grado de correlación entre la regulación al alza de la migración de células T dependientes de IL-16 y las concentraciones de proteína IL-16 según lo determinado por ELISA. En contraste, los sueros e IgG de 12 de 13 individuos sin enfermedad tiroidea conocida no consiguieron aumentar la producción de actividad de quimioatracción de linfocitos en los fibroblastos o la proteína IL-16 detectable. Brevemente, los pocillos de cultivo con monocapas de fibroblastos de la enfermedad de Graves confluentes se trataron durante 24 h con EG-IgG, los medios se recogieron y se sometieron al ensayo de quimiotaxis de células T o al ELISA de IL-16, ambos como se ha descrito anteriormente. Todas las muestras se analizaron por triplicado. La migración dependiente de IL-16 representa la diferencia entre la quimiotaxis de células T en presencia y ausencia de anticuerpos neutralizantes. Los datos se sometieron a análisis de regresión lineal mediante la ecuación: $f(x) = 0,1256108x + 15,37059$. ($r = 0,914$, $p = 0,001$). Las preparaciones de IgG de 2 individuos con artritis reumatoide activa y 2 pacientes con lupus eritematoso sistémico no pudieron inducir IL-16 en fibroblastos de pacientes con enfermedad de Graves. Estos resultados demuestran la especificidad con respecto al tipo de enfermedad autoinmune que afecta al donante de IgG.

35 EG-IgG se liga al TSHR y, a través de esa interacción, inicia los eventos que culminan en la inducción de IL-16. El receptor se expresa en fibroblastos de varias regiones anatómicas y es capaz de señalar a través de p70^{s6k} (Bell et al., Am. J. Physiol. 279: C335 (2000)). En consecuencia, los fibroblastos de la enfermedad de Graves se incubaron con altas concentraciones de rTSH (hasta 10 mU/ml) y se determinó que la hormona no puede inducir la actividad quimiotáctica de las células T o la síntesis detectable de la proteína IL-16 por los fibroblastos de la enfermedad de Graves. Como se muestra en el panel derecho de la figura 3, no existe correlación entre la actividad de migración de células T provocada por EG-IgG (dependiente de IL-16 más la independiente de IL-16) de fibroblastos tratados con inmunoglobulina y concentraciones respectivas de anticuerpos anti-TSHR (TRAb). Brevemente, se sometieron alicuotas de sueros de 26 donantes diferentes con enfermedad de Graves a una preparación de IgG con proteína A y se sometieron a ensayos de migración de células T (ordenadas) o se sometieron a un ensayo de radiorreceptores para TRAb, como se indica, a lo largo de la abscisa. ($r = 0,065$, $p = 0,62$). El kit de ensayo de radiorreceptores (DYNObest-TRAK) para determinar los anticuerpos TSHR se compró a Brahms (Hennigsdorf, Alemania) y se usó según las instrucciones del fabricante. Estos hallazgos muestran que la quimiotaxis de células T y las inducciones de IL-16 provocadas por GD-IgG no están relacionadas con la actividad anti-TSHR presente en los sueros de la enfermedad de Graves y que la TSHR no está mediando la regulación al alza por GD-IgG de IL-16.

60 Un panel de 11 cepas de fibroblastos diferentes de pacientes con enfermedad de Graves y 5 de individuos sin enfermedad tiroidea conocida se expuso a EG-IgG (100 ng/ml), IgG normal (100 ng/ml) o IL-1β (10 ng/ml)

(BioSource, Camarillo, CA) durante 24 h y se evaluó la actividad de migración de células T mediante un ensayo de quimiotaxis de linfocitos y la producción de IL-16 (figura 15). Las IgG normales y las EG-IgG utilizadas en esa encuesta derivaron de cualquiera de 2 donantes individuales. Estas no fueron agrupadas. La EG-IgG indujo la migración de células dependientes de IL-16 en 10 de las cepas de fibroblastos de la enfermedad de Graves que incluían las de la órbita o varias regiones anatómicas de la piel. Se incluyeron cepas de la piel pretibial, así como la pared abdominal y el cuello. Los dos últimos sitios raramente manifiestan la enfermedad de Graves. Una fracción sustancial de la actividad de migración de células T provocada por EG-IgG en la mayoría de estas cepas fue resistente a la neutralización con anti-IL-16.

Para determinar si los anticuerpos neutralizantes dirigidos a otras moléculas quimiotácticas podrían bloquear la actividad residual, se investigó el efecto de anti-RANTES en la actividad de migración de células T provocada por EG-IgG (figura 15). La EG-IgG regulaba al alza las proteínas IL-16 y RANTES en ocho cepas de fibroblastos derivadas de la enfermedad de Graves, mientras que RANTES era indetectable en dos de las cepas de la enfermedad de Graves que exhibían marcadas inducciones de IL-16. La EG-IgG no logró regular la quimiotaxis de las células T ni inducir la proteína IL-16 o RANTES en una cepa de la enfermedad de Graves (cepa orbital 9) y en cualquiera de las 5 cepas de cultivos derivadas de donantes sin enfermedad tiroidea conocida. La IgG de control no indujo la expresión de IL-16 o RANTES en ninguna de las cepas de fibroblastos analizadas. En contraste, la IL-1 β indujo la quimioatracción de células T en todas las cepas de fibroblastos, según Sciaky et al., *supra*, 2000.

EJEMPLO II

La artritis reumatoide y la enfermedad de Graves están asociadas con IgG específicas de la enfermedad que inducen una respuesta quimiotáctica y la expresión de quimiocinas a través del IGF-1R

Este ejemplo demuestra que las IgG de la artritis reumatoide (AR-IgG) y las EG-IgG inducen una respuesta quimiotáctica y expresión de quimiocinas en fibroblastos obtenidos de individuos afectados con artritis reumatoide y enfermedad de Graves, respectivamente, y que esta inducción está mediada por IGF 1R.

Para determinar si la quimiotaxis de células T era inducida por AR-IgGs y EG-IgGs en fibroblastos obtenidos de individuos afectados con artritis reumatoide y enfermedad de Graves, respectivamente, se observó la presencia de un anticuerpo bloqueador anti-IGF-1R en la quimiotaxis de células T utilizando anticuerpo bloqueador IGF-1R # 36491 (Pharmingen, San Diego, CA). Como se muestra en la figura 7, la inducción de la quimiotaxis por IgG específicas de la enfermedad se puede imitar añadiendo IGF-1 y además se puede atenuar añadiendo IGF-1R.

Para determinar si el IGF-1R podría estar directamente implicado en la mediación de los aumentos de EG-IgG y de AR-IgG, respectivamente, en la expresión de IL-16 y RANTES, los cultivos fueron estimulados con las Igs respectivas en ausencia o presencia del anticuerpo bloqueador anti-IGF-1R, que se une a la subunidad del receptor. Como se muestra en la figura 8, la presencia del anticuerpo bloqueador anti-IGF-1R resulta en la atenuación de las respuestas a las IgG específicas de la enfermedad tanto en la enfermedad de Graves como en la artritis reumatoide. Por lo tanto, el bloqueo de IGF-1R se asocia con una atenuación casi completa de estas dos respuestas provocadas por IgG específicas de la enfermedad.

EJEMPLO III

La IgG de la enfermedad de Graves induce la liberación de IL-16 recién sintetizada de una manera dependiente de la caspasa-3

Este ejemplo demuestra que EG-IgG puede provocar la liberación de IL-16 recién sintetizada a partir de fibroblastos de la enfermedad de Graves de una manera dependiente de la caspasa-3.

Para determinar si EG-IgG induce la síntesis *de novo* de IL-16 en los fibroblastos de la enfermedad de Graves, las monocapas de fibroblastos confluentes, en este caso de la piel, se trataron con EG-IgG (100 ng/ml) durante las duraciones indicadas a lo largo de la abscisa de la figura 4. Las monocapas de fibroblastos confluentes se marcaron por pulsos con [³⁵S] metionina (500 μ Ci/ml) durante 6 h y se inmunoprecipitaron con anti-IL-16 (clon 14.1, 5 μ g/ml) conjugado con perlas de proteína A, se lavaron y se contabilizó la radioactividad. Los datos mostrados en la figura 4 se expresan como la media \pm desviación típica de tres réplicas. La liberación de [³⁵S] IL-16 se mejoró en las 12 h siguientes a la adición de IgG al medio de cultivo. La síntesis máxima se produjo a las 30 h cuando estaba al menos 100 veces por encima del valor de referencia y se mantuvo durante la duración del estudio (48 h). La proteína IL-16 se sintetiza como una pro-molécula de 69 kDa que se modifica a la molécula activa de 56 kDa que se libera de la célula (Baier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5273 (1997); Zhang et al., J. Biol. Chem. 273: 1144 (1998)). En los linfocitos, este procesamiento implica una escisión dependiente de caspasa-3 (Zhang et al., *supra*, 1998). Además, en los fibroblastos, la inducción por IL-1 β de IL-16 implica esta enzima (Sciaky et al., *supra*, 2000).

Con el fin de determinar si la inhibición de la caspasa-3 con un péptido inhibidor específico podría bloquear la liberación de IL-16 de EG-IgG en los fibroblastos de la enfermedad de Graves, se añadió el péptido denominado Ac-DEVD-CHO, un inhibidor específico de la caspasa-3, a los fibroblastos. En particular, las monocapas de fibroblastos confluentes se trataron con EG-IgG (100 ng/ml) sola o en combinación con el péptido inhibidor de la caspasa-3 (Ac-DEVD-CHO, 100 μ M) o un péptido inhibidor de la caspasa-1 (Ac-YVAD-Ald, 100 μ M). Los medios se recogieron y se

sometieron a un ensayo de migración de células T (panel superior) o un ELISA de IL-16 (panel inferior). La migración se determinó en ausencia o presencia de anticuerpos anti-IL-16 (5 µg/ml) o anti-RANTES (5 µg/ml). Los datos se expresan como la media + desviación típica de las determinaciones por triplicado. Como se muestra en la figura 5, la adición del péptido designado Ac-DEVD-CHO al medio de fibroblastos resultó en una drástica disminución en la migración de linfocitos atribuible a IL-16 y a la inducción por IgG de la proteína IL-16 como se determinó en el ensayo ELISA. En contraste, la regulación al alza de RANTES no se vio afectada. El inhibidor peptídico específico de la caspasa-1, Ac-YVAD-Ald, no pudo influir en la actividad de IL-16 o RANTES o la liberación de proteínas en el medio.

EJEMPLO IV

La inducción de EG-IgG de la expresión y liberación de IL-16 a partir de fibroblastos implica una vía sensible a la rapamicina

Este ejemplo demuestra que la inducción de la proteína IL-16 por EG-IgG puede ser bloqueada por la rapamicina.

Para determinar si EG-IgG induce la expresión de quimiotácticos en fibroblastos EG actuando como factor de crecimiento y uniendo un epítipo en la superficie del fibroblasto e iniciando la síntesis de proteínas mediante la activación de una o más vías de señalización, se investigó la posibilidad de la participación de la vía FRAP/mTOR. La vía FRAP/mTOR y la activación de la serina/treonina quinasa p70^{s6k} desempeñan un papel central en la mediación de los efectos provocados por múltiples factores que actúan en la superficie celular (Pullen y Thomas, FEBS Letters 410: 78 (1997)). Una característica prominente de esta vía es su susceptibilidad a la inhibición por el macrólido rapamicina (Brennan et al., Mol. Cell. Biol. 19: 4729 (1999)). Significativamente, la rapamicina en una concentración de 20 nM puede bloquear aproximadamente el 50 % de la actividad quimiotáctica provocada por EG-IgG, coincidiendo con una atenuación de la migración de células T dependientes de IL-16 (figura 16). La inducción de la proteína IL-16 por EG-IgG está bloqueada por la rapamicina, mientras que la de RANTES no lo está.

Para determinar si EG-IgG aumentó los niveles de p70^{s6k} activado, se realizó un análisis de inmunotransferencia de Western con un anticuerpo primario específico para p70^{s6k} fosforilado en Thr³⁸⁹. En resumen, la activación de p70^{s6k} se evaluó sometiendo la proteína celular de fibroblastos activados por IgG a un análisis de inmunotransferencia. Los fibroblastos se dejaron proliferar hasta confluencia en placas de 60 mm. Después de las incubaciones con los compuestos de ensayo indicados, las monocapas se solubilizaron en un tampón que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, desoxicolato al 0,5 %, Triton X-100 al 1 %, glicerol al 10 %, SDS al 0,1 %, Na₃VO₄ 2 mM, NaP₂O₄ 20 mM, NaF 1 mM y microcistina 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 mM. Las muestras de lisado normalizadas a su contenido de proteína respectivo se hirvieron en tampón Laemmli y se sometieron a electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida según el método descrito por Wang et al., J. Biol. Chem. 271: 22718 (1996). Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Bio-Rad) y, posteriormente, se incubaron con anti-p70^{s6k} Thr389 primario fosfo-específico (Cell Signaling Technology). Otras partes alícuotas de la muestra se sometieron a electroforesis y transferencia contra un anticuerpo pan p70^{s6k} (Santa Cruz) o un anticuerpo anti-actina (Sigma). Después de lavados exhaustivos a temperatura ambiente, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa durante 1 hora. Después de los lavados, se utilizó el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham Corp.) para generar las señales relevantes. Las bandas se analizaron densitométricamente con un escáner.

Para los resultados mostrados en la figura 6, las monocapas confluentes de fibroblastos orbitales de dos pacientes con enfermedad de Graves (A y B) o un solo donante con tejido orbital normal (C) se incubaron con nada (control), IgG normal (100 ng/ml), EG-IgG (100 ng/ml) o IL-1β (10 ng/ml) durante 15 minutos, las células se enjuagaron y se recogieron en tampón de lisis. Cantidades equivalentes de proteína se sometieron a análisis de transferencia Western, como se ha descrito anteriormente, con anticuerpos pan anti-p70^{s6k}, anti-p70^{s6k} Thr389 fosfo-específico, o anti-actina. Las alturas de las columnas representan las densidades de señal de p70^{s6k} Thr389 corregidas para sus respectivos niveles de actina. Como se muestra en la figura 6, EG-IgG provoca un aumento en p70^{s6k} activado. La IgG de los sujetos control también aumentó el p70^{s6k} fosforilado, pero los niveles fueron considerablemente más bajos que los de la EG-IgG. Además, los fibroblastos normales expuestos con EG-IgG o con control IgG no mostraron una activación sustancial de p70^{s6k}. En conjunto, estos hallazgos demuestran que la activación de p70^{s6k} por IgG sola es insuficiente para regular al alza la expresión de IL-16. Dada la capacidad de la rapamicina para bloquear, la activación de p70^{s6k} es esencial para la inducción por EG-IgG de IL-16 en fibroblastos.

Los glucocorticoides ejercen poderosas acciones moduladoras en la expresión de muchas moléculas proinflamatorias y tienen un importante papel terapéutico en la enfermedad de Graves que se complica con la OAT. El impacto de estos esteroides en la inducción por EG-IgG de la expresión de quimiotácticos en fibroblastos se determinó mediante la adición del glucocorticoide Dexametasona (10 nM) al medio en combinación con EG-IgG y fibroblastos seguido de una incubación de 16 h. Como se muestra en la figura 16, el glucocorticoide podría bloquear la inducción de IL-16 y RANTES por EG-IgG.

Ejemplo V

La inducción de IgG de IL-16 y RANTES en fibroblastos EG se puede atenuar bloqueando el IGF-1R

Este ejemplo demuestra que el IGF-1R está directamente involucrado en las actividades ejercidas por EG-IgG en fibroblastos derivados de pacientes con enfermedad de Graves.

Los fibroblastos activados por citoquinas proinflamatorias expresan una actividad de promoción de la quimiotaxis de células T (Skiaky et al., *supra*, 2000). Además, como se describe en el presente documento, la EG-IgG aislada de individuos sin o con OAT manifiesta puede activar los fibroblastos de pacientes con enfermedad de Graves para expresar altos niveles de IL-16 y RANTES.

El suero de pacientes con enfermedad de Graves contiene anticuerpos anti-TSHR. Con el fin de determinar si TSHR representa el autoantígeno relevante para estos efectos en los fibroblastos, los fibroblastos de la enfermedad de Graves se trataron con TSH (2 mU/ml) durante 24 h y a continuación se analizaron para determinar la expresión del quimiotáctico.

Como se muestra en la figura 10, TSH no pudo influir en la expresión de IL-16 o RANTES. Este resultado demuestra que la activación de TSHR no está mediando las acciones de EG-IgG en los fibroblastos. La IL-1 induce los niveles de IL-16 y RANTES y la quimiotaxis de las células T en todas las cepas de fibroblastos analizadas, independientemente de si se derivaron de pacientes con enfermedad de Graves o de sujetos control sin enfermedad tiroidea conocida.

Se examinó un gran número de otros compuestos que se sabe que se unen y activan los receptores expresados por los fibroblastos humanos para determinar su capacidad para inducir IL-16 y RANTES, ya que sus respectivos receptores representarían antígenos candidatos para EG-IgG. Entre los evaluados, el IGF-1 (10 nM) aumentó drásticamente la migración de células T dependientes de IL-16 y RANTES y los niveles de ambos quimiotácticos después de un tratamiento de cultivos de fibroblastos durante 24 h (figura 10). La magnitud de las inducciones fue similar a la observada con IL-1 (figura 10).

Para definir la especificidad del efecto IGF-1, los ligandos específicos de IGF-1R Des (1-3) IGF-1 y Leu24 IGF-1 también se analizaron y se encontró que inducían la expresión de quimiotácticos. La figura 10 muestra la inducción de la proteína IL-16 y la proteína RANTES por EG-IgG y el análogo de IGF des (1-3), una forma truncada de IGF-1 que carece del tripéptido N-terminal y es un ligando específico de IGF-1R con afinidad muy reducida por las proteínas de unión a IGF (IGFBP) en comparación con el IGF-1 natural según lo descrito por Bang et al., *Acta Endocrinologica* 124: 620-629 (1991). [Leu24] IGF-1 es un análogo de IGF-1 humano con la sustitución de una Leu por una Tyr en la posición 24. [Leu24] IGF-1 tiene una afinidad fuertemente reducida para el IGF-1R y una afinidad reducida para algunos IGFBP. Como se muestra en el panel B de la figura 10, la actividad quimiotáctica de los linfocitos T en los fibroblastos de la enfermedad de Graves es atribuible a las EG-IgG y se señala a través del IGF-1R per se en lugar de a través de las proteínas de unión accesorias (IGFBP).

Para probar si las actividades de IGF-1 tienen restricciones similares, se probaron varias cepas de fibroblastos diferentes obtenidas de donantes normales. Como se muestra en la figura 11, ninguno de estos fibroblastos respondió al tratamiento con IGF-1 en condiciones idénticas a las utilizadas en los estudios con fibroblastos de la enfermedad de Graves. Por lo tanto, las diferencias intrínsecas en la enfermedad de Graves y los fibroblastos normales subyacen en las respuestas a EG-IgG y al IGF-1 exógeno, lo que muestra que el IGF-1 y la EG-IgG actúan a través de la misma vía o una vía relacionada. La IL-1 induce los niveles de IL-16 y RANTES y la quimiotaxis de las células T en todas las cepas de fibroblastos probadas, independientemente de si se derivaron de pacientes con EG o de sujetos control sin enfermedad tiroidea conocida.

Se examinó un gran número de otros compuestos que se sabe que se unen y activan los receptores expresados por los fibroblastos humanos para determinar su capacidad para inducir IL-16 y RANTES, ya que sus respectivos receptores representarían antígenos candidatos para EG-IgG. Entre los evaluados, el IGF-1 (10 nM) aumentó drásticamente la migración de células T dependientes de IL-16 y RANTES y los niveles de ambos quimiotácticos después de un tratamiento de 24 h de cultivos de fibroblastos. La magnitud de las inducciones fue similar a la observada con IL-1.

Para determinar si el IGF-1R participa directamente en la mediación de los aumentos dependientes de EG-IgG en la expresión de IL-16 y RANTES, los cultivos se estimularon con Ig en ausencia o presencia de un anticuerpo altamente específico que bloquea el receptor, el clon 1H7, que se une a la subunidad del receptor. Como se muestra en la figura 12, bajas concentraciones del anticuerpo bloquean la acción de EG-Ig. Las concentraciones de 1H7 analizadas oscilaron entre 0,1 µg/ml y 5 µg/ml. Incluso en la concentración más baja utilizada, la atenuación de las respuestas a las EG-IgG fue del 90 %. Por lo tanto, el bloqueo de IGF-1R se asocia con una atenuación casi completa de las respuestas provocadas por EG-IgG.

Para determinar si el impacto del suero de la enfermedad de Graves en la expresión de quimiotácticos mediada por IGF-1R podría generalizarse a los sueros de la mayoría de los pacientes con la enfermedad, se analizaron varias muestras en una sola cepa de fibroblastos de la enfermedad de Graves. Como demuestra la figura 14, las cinco muestras de sueros provocaron inducciones de la quimiotaxis de células T dependientes de IL-16 y RANTES y, en todos los casos, los anticuerpos anti-IGF-1R bloquearon estas inducciones. Además, las IgG regulaban al alza los niveles de las dos proteínas, según lo evaluado por los ELISA específicos de citoquinas.

Otro enfoque más directo para demostrar el papel de IGF-1R en la mediación de los efectos de EG-IgG en la quimiotaxis producida por los fibroblastos implicaría dirigir el receptor con una mutante dominante negativo (DN) e interrumpir su expresión. Los cultivos se transfectaron de forma transitoria con el mutante IGF-1R, 486/STOP o el vector vacío como control y determinando el impacto que el DN tiene en las respuestas celulares a EG-IgG. Brevemente, se permitió que los cultivos proliferaran hasta una confluencia del 80 % en medio que contenía un 10 % de FBS. El plásmido que contiene 486/STOP DN IGF-1R se transfectó de forma transitoria en las células utilizando el sistema LipofectAMINE PLUS (Invitrogen, San Diego, CA). En particular, 0,75 µg del plásmido y 0,1 µg de ADN del vector pRL-TK (Promega), que sirve como control de eficiencia de transfección, se mezclaron con reactivo PLUS durante 15 minutos antes de combinarse con LipofectAMINE PLUS durante otros 15 minutos. Algunos cultivos recibieron ADN del vector vacío como control. La mezcla de ADN-lípidos se añadió al medio de cultivo durante 3 horas a 37 °C. El medio de Eagle modificado de Dulbecco que contenía FBS al 10 % reemplazó la mezcla de transfección durante la noche. Los cultivos transfectados se privaron de suero y algunos recibieron EG-IgG o IgG normal durante 16 h. Las muestras de los medios se recogieron y se congelaron hasta que se analizaron para determinar la actividad promotora de la migración de las células T o el contenido de IL-16 y RANTES en los respectivos ELISA.

Como se muestra en la figura 13, IGF-1R DN inhibió la inducción por EG-IgG de la actividad quimiotáctica de las células T y atenuó la inducción tanto de IL-16 como de RANTES por EG-IgG. En contraste, las transfecciones simuladas y aquellas con vector vacío no pudieron alterar los efectos de la EG-IgG. Tomado junto con los resultados con los anticuerpos bloqueadores de IGF-1R y los agonistas específicos de IGF-1R descritos anteriormente, este resultado confirma que el receptor de IGF-1R parece participar directamente en las actividades ejercidas por EG-IgG en fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Graves.

EJEMPLO VI

La inducción de IL-16 en fibroblastos EG no implica aumentos en el ARNm de IL-16

Este ejemplo muestra que la inducción de IL-16 en los fibroblastos de la enfermedad de Graves no implica aumentos en el ARNm de IL-16 y que la inducción de RANTES en estas células está mediada a nivel pre-traducciona.

La inducción de EG-IgG de IL-16 y RANTES en fibroblastos implica vías de señalización divergentes. Como se describe en el presente documento, la anterior regulación al alza es susceptible a la rapamicina, un inhibidor de la vía FRAP/mTOR/p70^{S6k}, mientras que esta última no se ve afectada por el medicamento. Se sabe que los fibroblastos expresan altos niveles de ARNm de IL-16 de forma constitutiva y los niveles no se ven afectados por el tratamiento con citoquinas proinflamatorias que regulan al alza la síntesis de proteínas de IL-16 y la quimiotaxis de células T que se le atribuye. Como se muestra en la transferencia de Northern en la figura 14, EG-IgG no logra aumentar los altos niveles de ARNm de IL-16 en el transcurso del experimento (hasta 16 h). IL-1β tampoco logró influir en los niveles de transcripción en estado estacionario. En contraste, el ARNm de RANTES no se detecta en condiciones de cultivo basal, pero se produce una inducción sustancial y dependiente del tiempo del transcrito con tratamiento con IgG. También se produjo una fuerte inducción en cultivos tratados con IL-1β. Como se muestra en la figura 18, los fibroblastos orbitales y de la piel, incluidos los de pacientes con EG, expresan una actividad de promoción de la quimiotaxis de células T en respuesta a la IL-1β, de la cual la gran mayoría puede atribuirse a la IL-16 y RANTES. La EG-IgG aislada de individuos sin o con OAT manifiesta puede activar los fibroblastos de pacientes con EG para expresar niveles altos de ambos quimiotácticos (figura 18).

Para el análisis de Northern, los fibroblastos se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro hasta un estado confluyente y a continuación se trataron con los agentes de prueba. Brevemente, el ARN celular se extrajo de monocapas enjuagadas por el método de Chomczynski y Sacchi, Anal Biochem. 162: 156-159 (1987), con un sistema de aislamiento de ARN adquirido en Biotecx (Houston, TX). El ácido nucleico se sometió a electroforesis a través de geles de formaldehído desnaturizantes de agarosa al 1 %. La integridad del ARN se estableció determinando las relaciones espectroscópicas 260/280 y tiñendo las muestras sometidas a electroforesis con bromuro de etidio e inspeccionándolas con luz UV. El ARN se transfirió a la membrana de la sonda Zeta (Bio-Rad) y las muestras inmovilizadas se hibridaron con sondas de ADNc PGHS-1, PGHS-2, p23 y mPGES marcadas con [³²P]-dCTP generadas por el método de cebador aleatorio. La hibridación se realizó en una solución que contenía 5X SSC, 50 % de formamida, 5X de solución de Denhardt, 50 mM de tampón fosfato (pH 6,5), 1 % de SDS y 0,25 mg/ml de esperma de salmón a 48 °C durante la noche. Las membranas se lavaron en condiciones de alta rigurosidad y a continuación los híbridos de ARN/ADN se visualizaron mediante autorradiografía en una película X-Omat (Kodak, Rochester, NY) después de la exposición a -70 °C. Las bandas resultantes de los híbridos radiactivos se escanearon por densitometría. A continuación, las membranas se eliminaron según las instrucciones del fabricante y se volvieron a hibridar con una sonda de ADNc GAPDH, y las densidades de banda se normalizaron a esta señal.

Ejemplo VII

Expresión de IGF-1R y desplazamiento por EG-IgG de la unión de ¹²⁵I-IGF-1 de fibroblastos EG intactos

Para confirmar que la diferencia en la estimulación con EG-IgG de fibroblastos EG y de control era atribuible a la presentación de IGF-1R, la expresión del receptor en estas células se analizó mediante citometría de flujo. Como se

5 muestra en la figura 17A, los fibroblastos de control expresaron niveles más bajos de IGF-1R (2-3 veces) que los fibroblastos de pacientes con EG. Dado que el anticuerpo de detección reconoce específicamente IGF-1R α , la expresión de IGF-1 β se determinó mediante análisis de transferencia Western de lisados celulares. La figura 17B demuestra que la subunidad β del receptor puede detectarse en las 7 cepas de fibroblastos (3 del control y 4 de donantes EG) pero los niveles fueron mayores en los fibroblastos de pacientes con EG (EG, 0,845 + 0,35 UA; control, 0,181 + 0,1 UA (media + SD).

10 Para confirmar la asociación directa entre EG-IgG e IGF-1R, se realizaron estudios de unión competitiva. El análisis de Scatchard reveló que el ^{125}I -IGF-1 se une a estas células con una Kd de 0,3 nM. Como se muestra en la figura 17C, las concentraciones crecientes de IGF-1 sin marcar desplazan casi el 100 % de la unión de ^{125}I -IGF-1 total a estas células. La adición de IGF-1 Des (1,3) también inhibe esta unión (65 % a la concentración más alta probada), lo que indica una unión desplazable sustancial de ^{125}I -IGF-1 a IGF-1R. La EG-IgG desplazó la unión a ^{125}I -IGF-1 hasta un 80 %, mientras que la IgG de control atenuó la unión en un máximo de solo un 18 % a la concentración más alta probada (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

15 El análisis de citometría de flujo confirmó la interacción específica entre EG-IgG e IGF-1R mostrada en fibroblastos EG. La Ig específica de la enfermedad bloquea la unión del anticuerpo anti-IGF-1R α conjugado con FITC, de modo que el número de células positivas para IGF-1R se reduce del 79 % al 32 % (figura 17D). Es importante destacar que EG-IgG no influye en la detección de IGF-1R α en las células de control (figura 17D). Por lo tanto, EG-IgG reconoce específicamente el IGF-1R en la superficie del fibroblasto EG.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para usar en un método para reducir la gravedad de una enfermedad autoinmune seleccionada entre la enfermedad de Graves, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la colitis ulcerosa, la esclerodermia y la enfermedad de Crohn, en donde el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo se une a un receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R), inhibe la interacción entre el IGF-1R y la inmunoglobulina G autoinmune endógena anti-IGF-1R, e inhibe la activación por dicha inmunoglobulina G autoinmune endógena de fibroblastos en dicha enfermedad.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad autoinmune es la enfermedad de Graves.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso según la reivindicación 2, en donde reducir la gravedad de dicha enfermedad de Graves comprende reducir la gravedad de una manifestación de la enfermedad de Graves seleccionada de oftalmopatía y dermopatía asociadas al tiroides.
4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde reducir la gravedad de dicha enfermedad de Graves comprende reducir la gravedad de una manifestación de la enfermedad de Graves asociada con la remodelación de tejido conectivo.
5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad autoinmune es artritis reumatoide.
- 20 6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo bifuncional y un anticuerpo injertado en la región determinante de complementariedad.

FIGURA 1

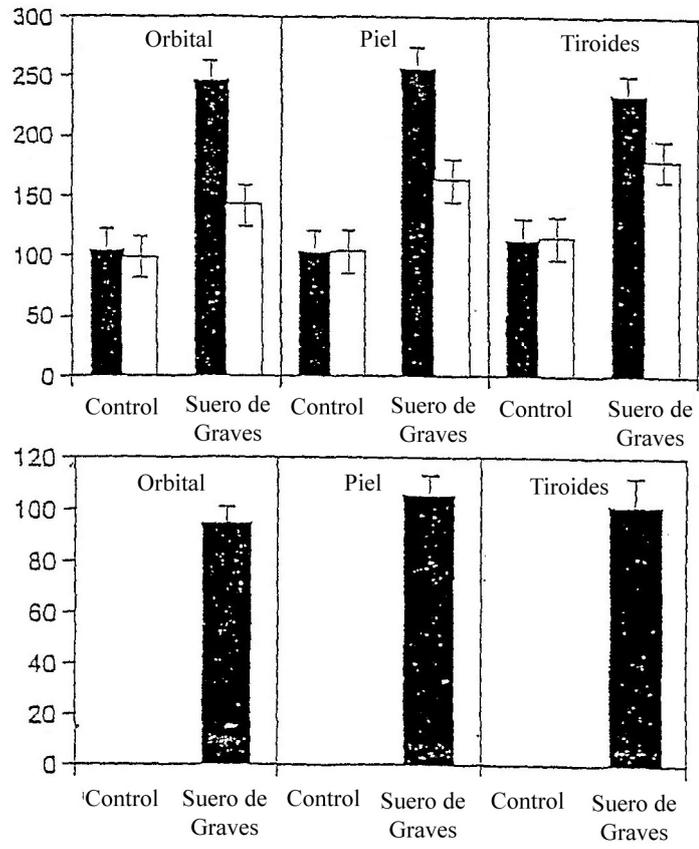
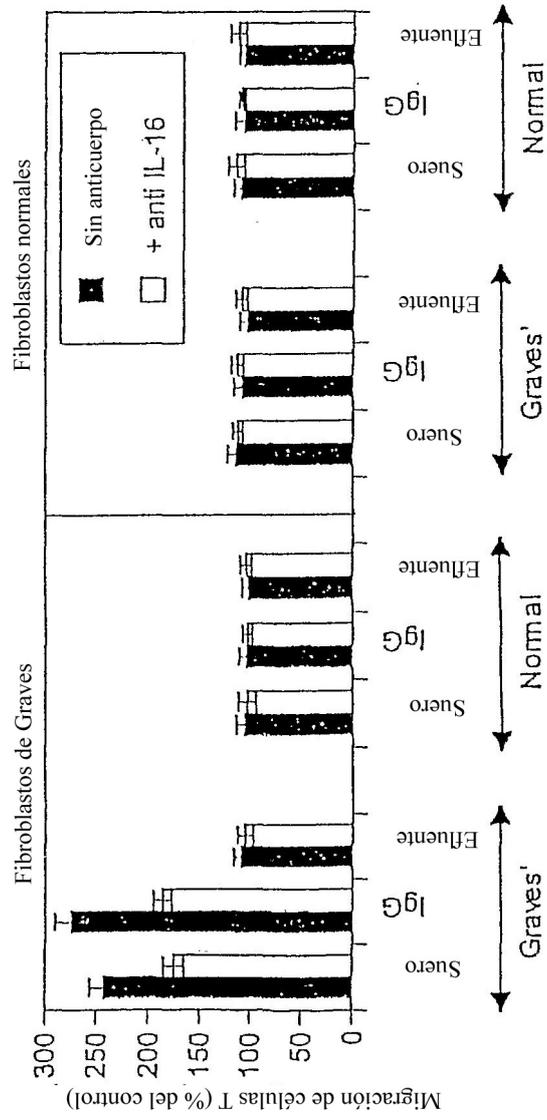


FIGURA 2



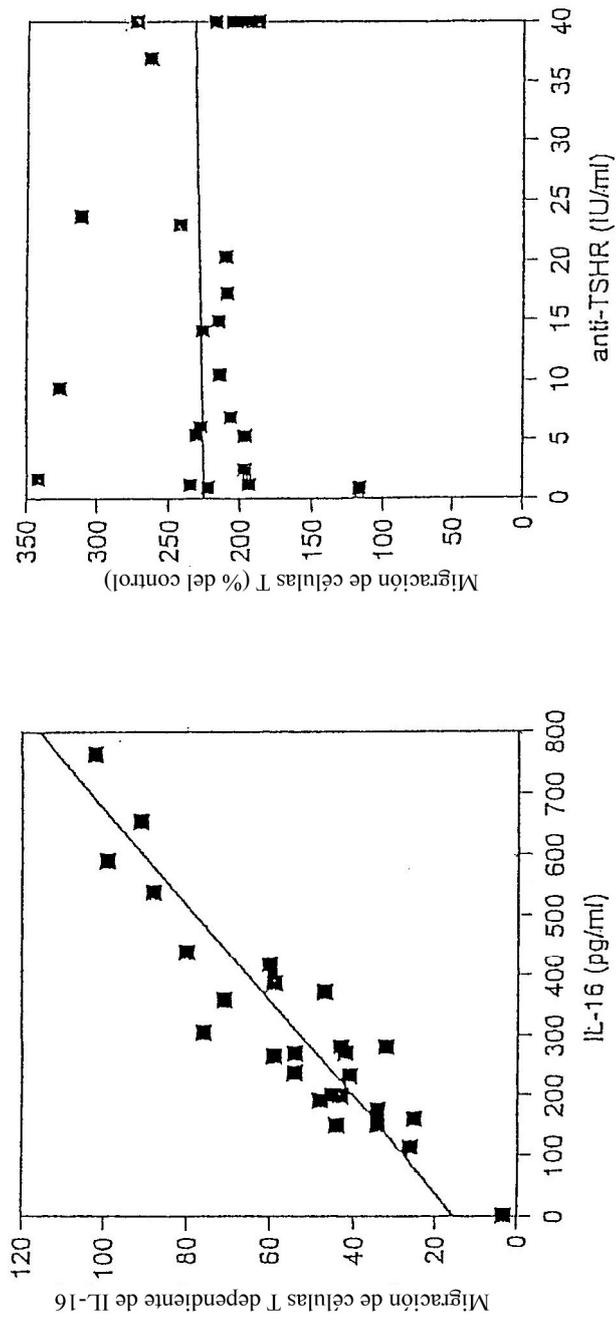


FIGURA 3

FIGURA 4

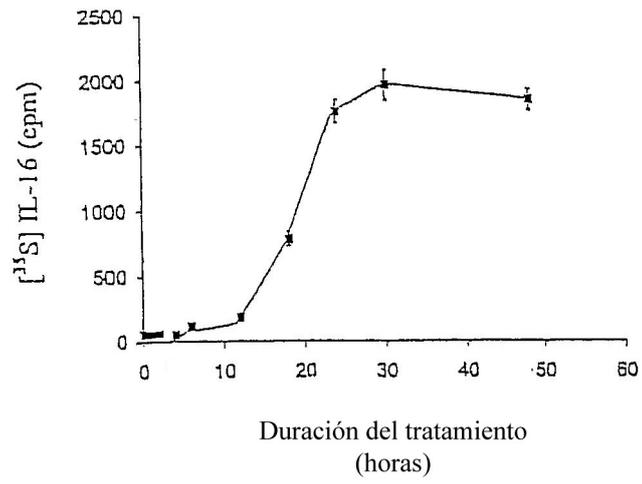
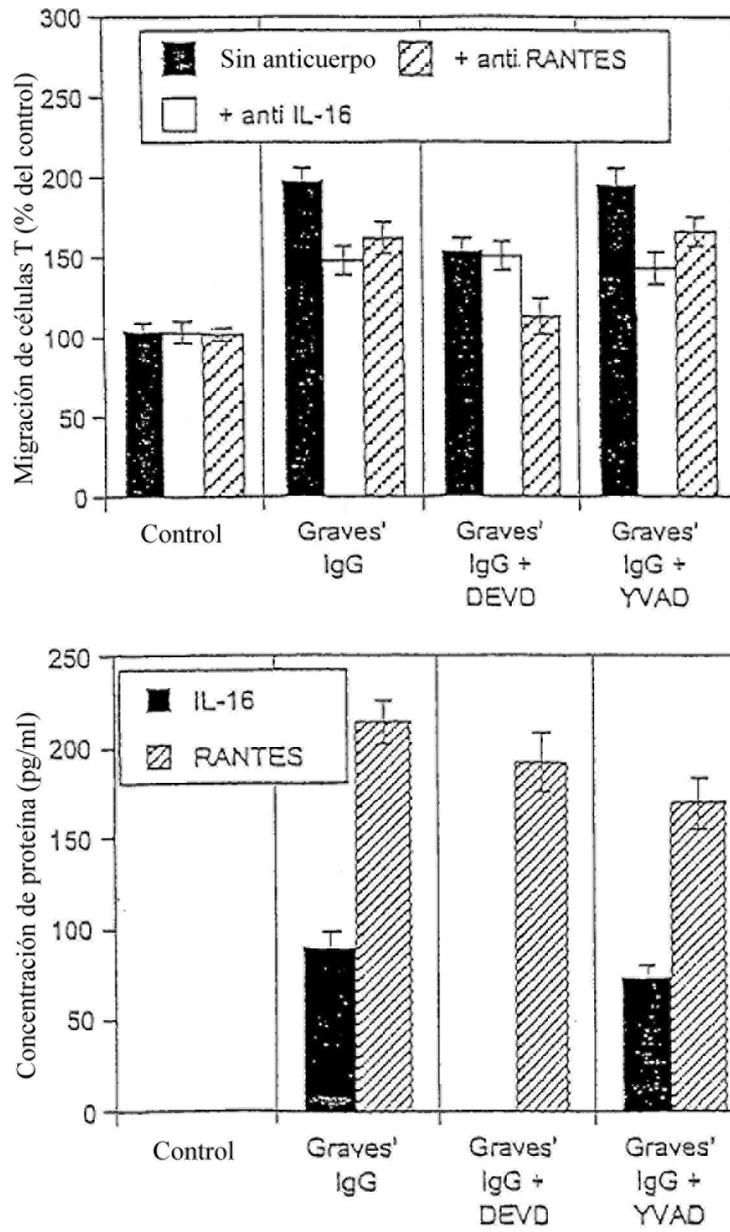


FIGURA 5



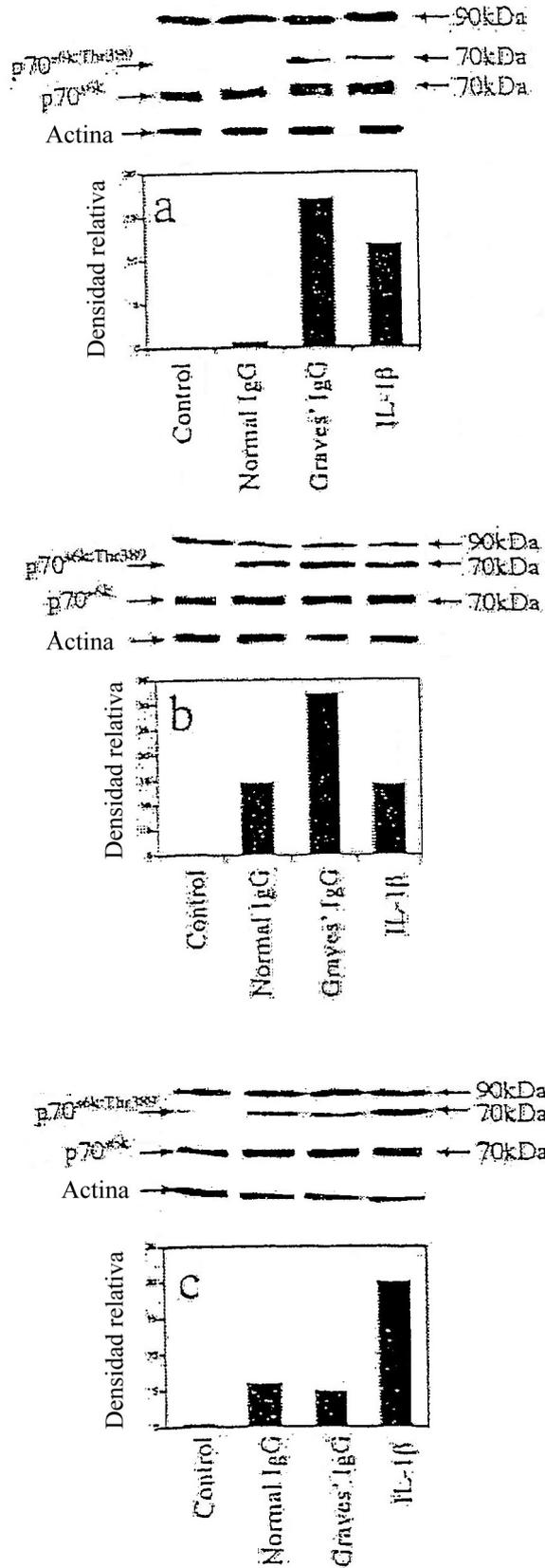


FIGURA 6

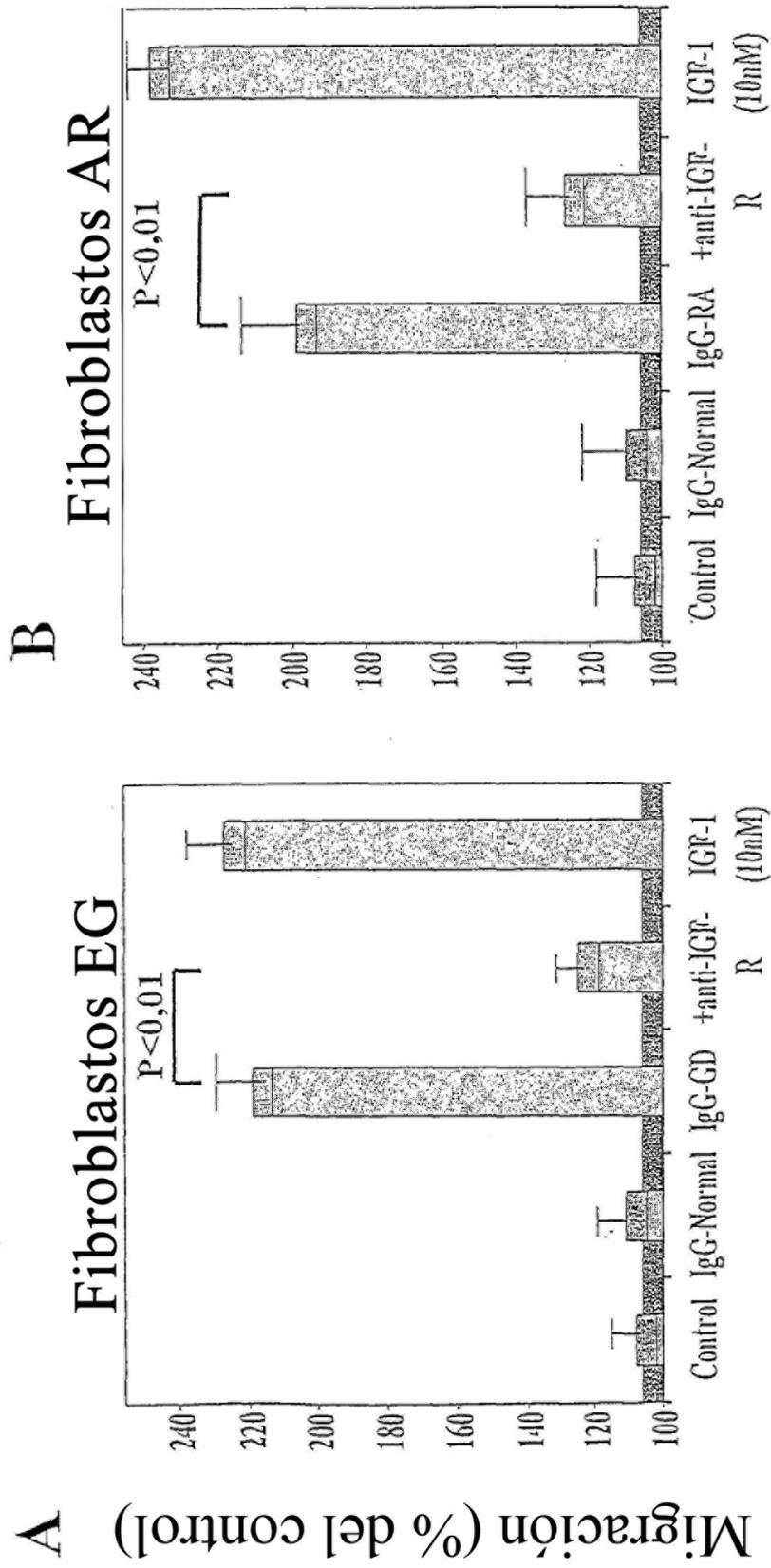


FIGURA 7

Fibroblastos AO

C

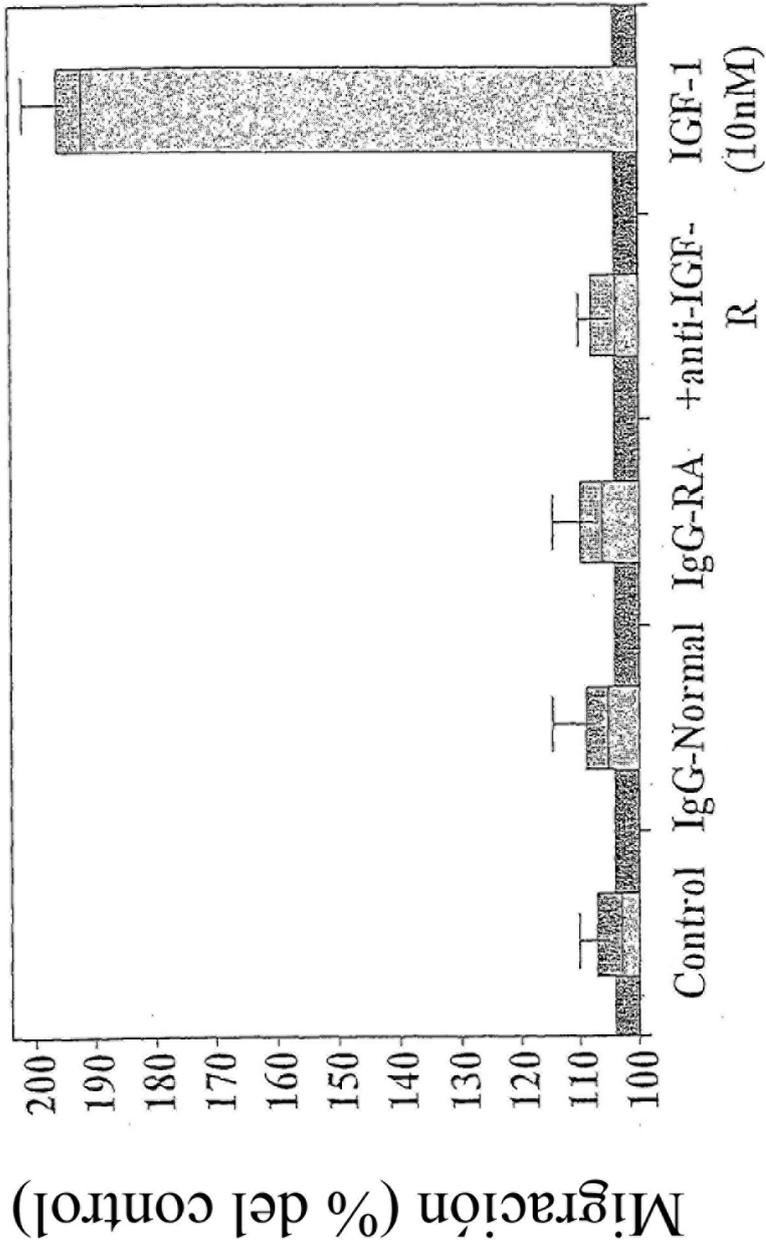


FIGURA 7 (CONTINUACIÓN)

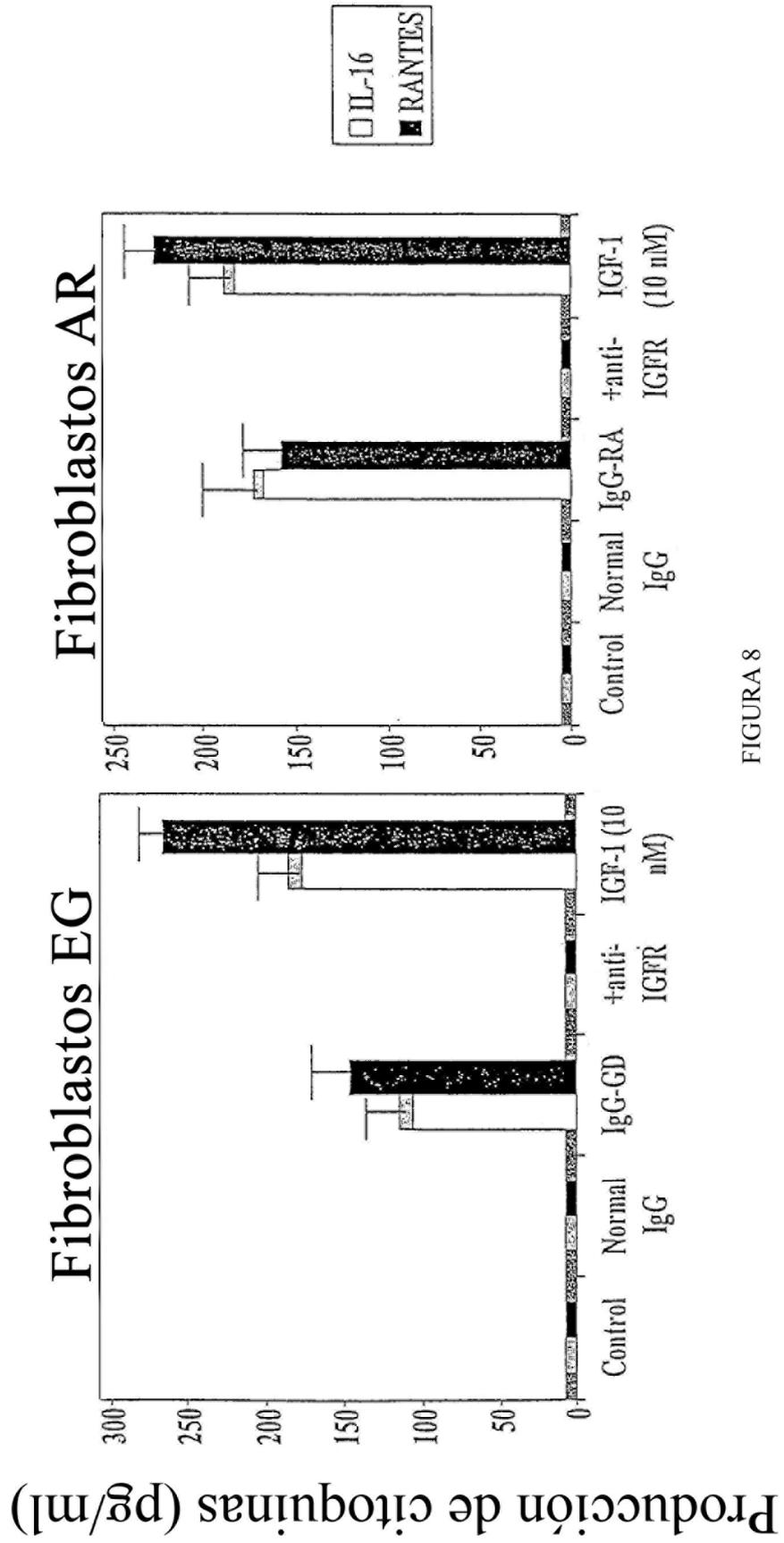
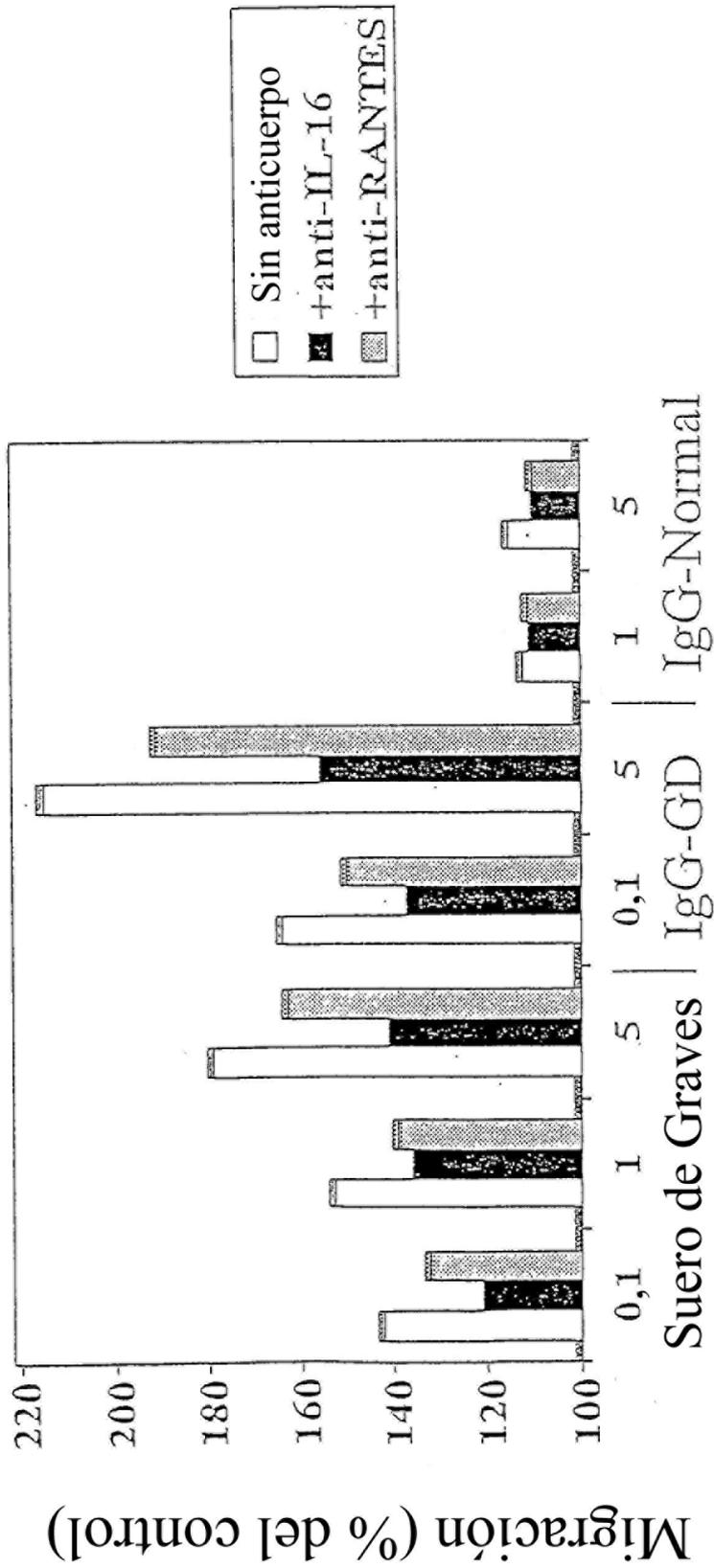


FIGURA 8



Sueros en cultivos (%)

FIGURA 9

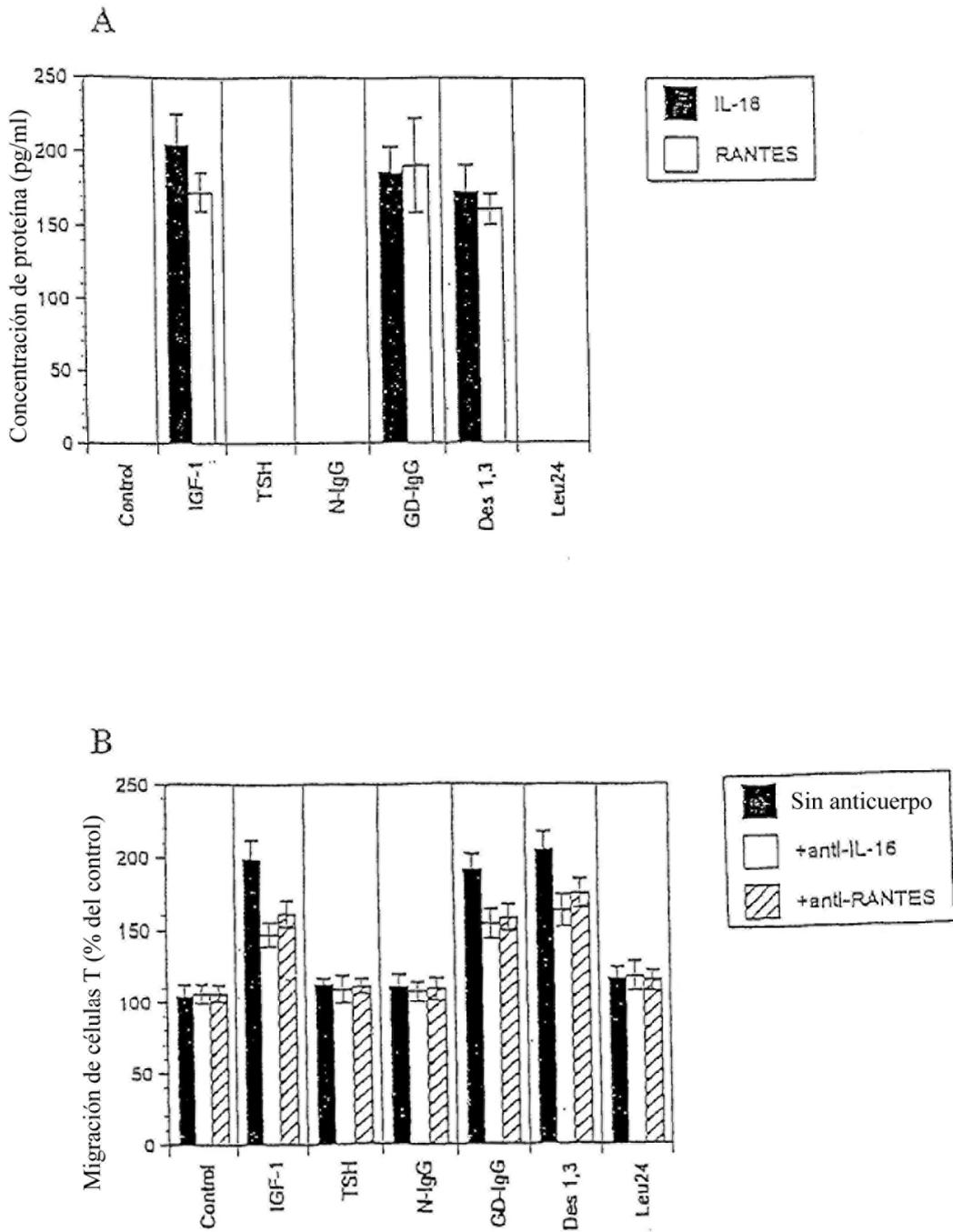
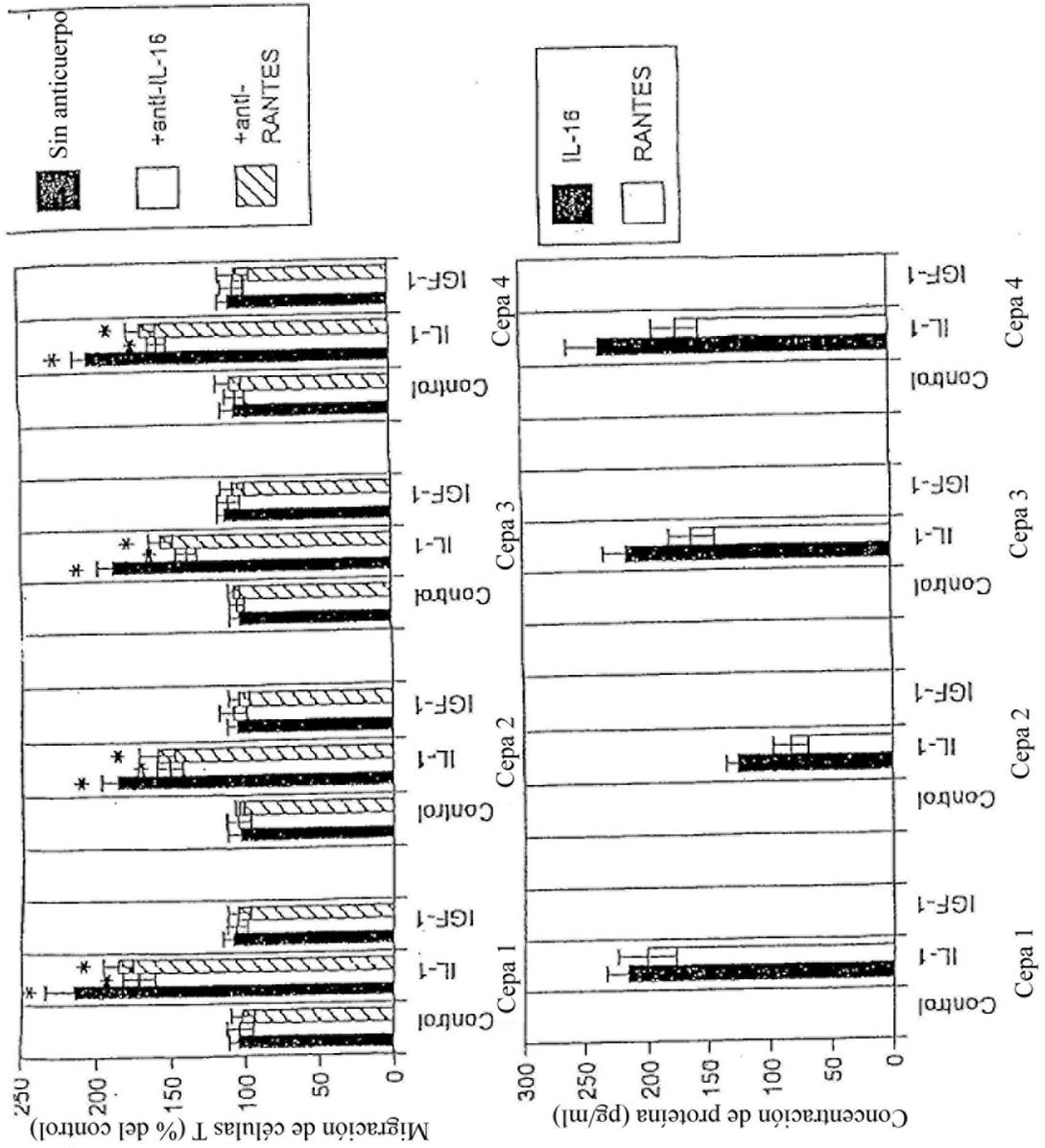


FIGURA 10

FIGURA 11



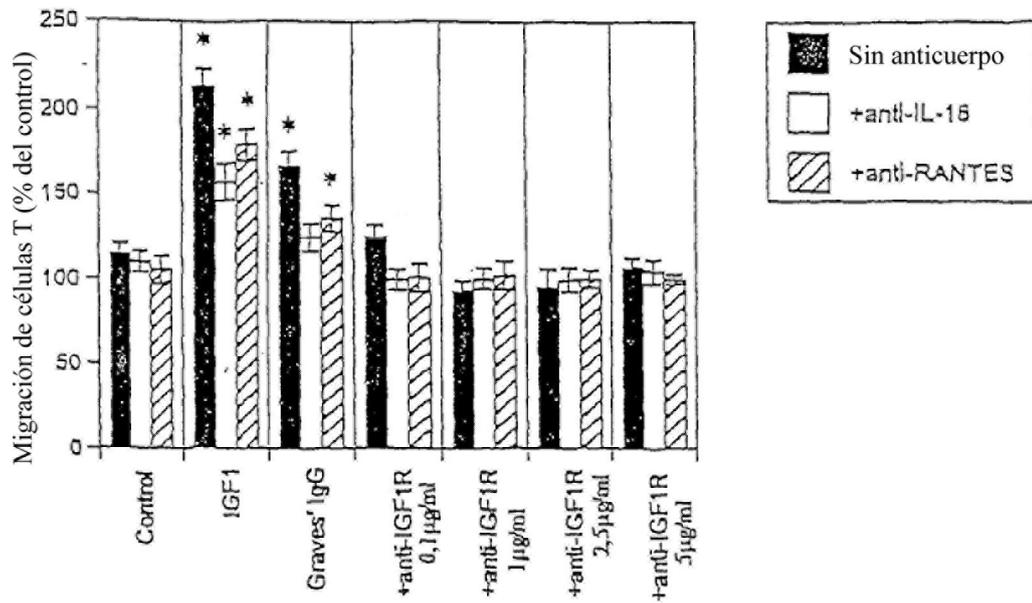


FIGURA 12

FIGURA 13

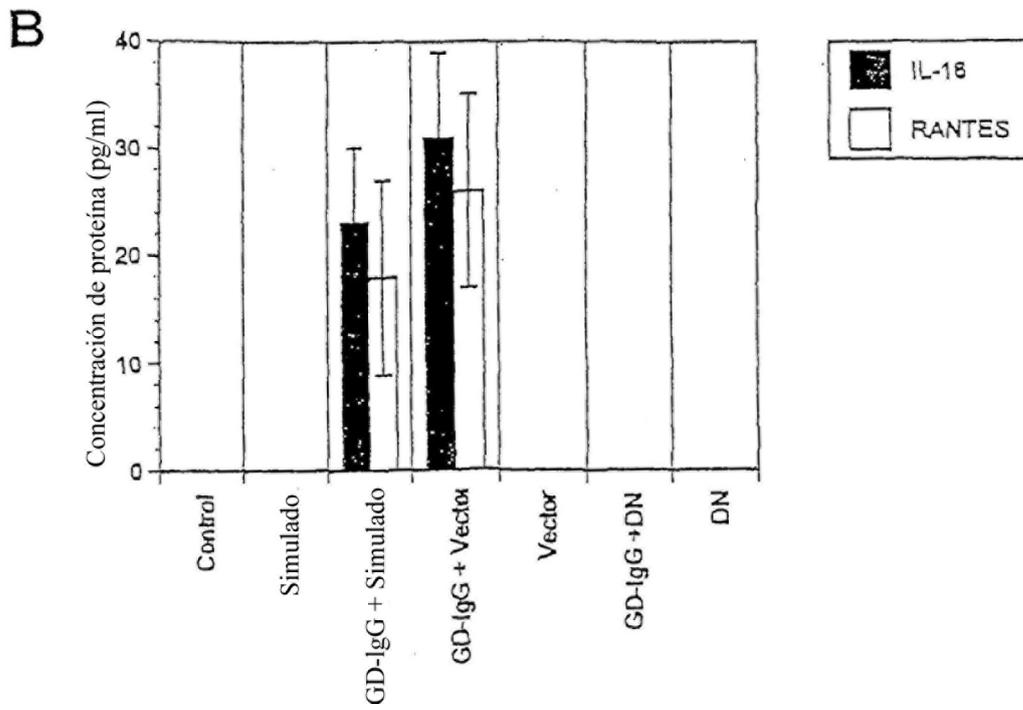
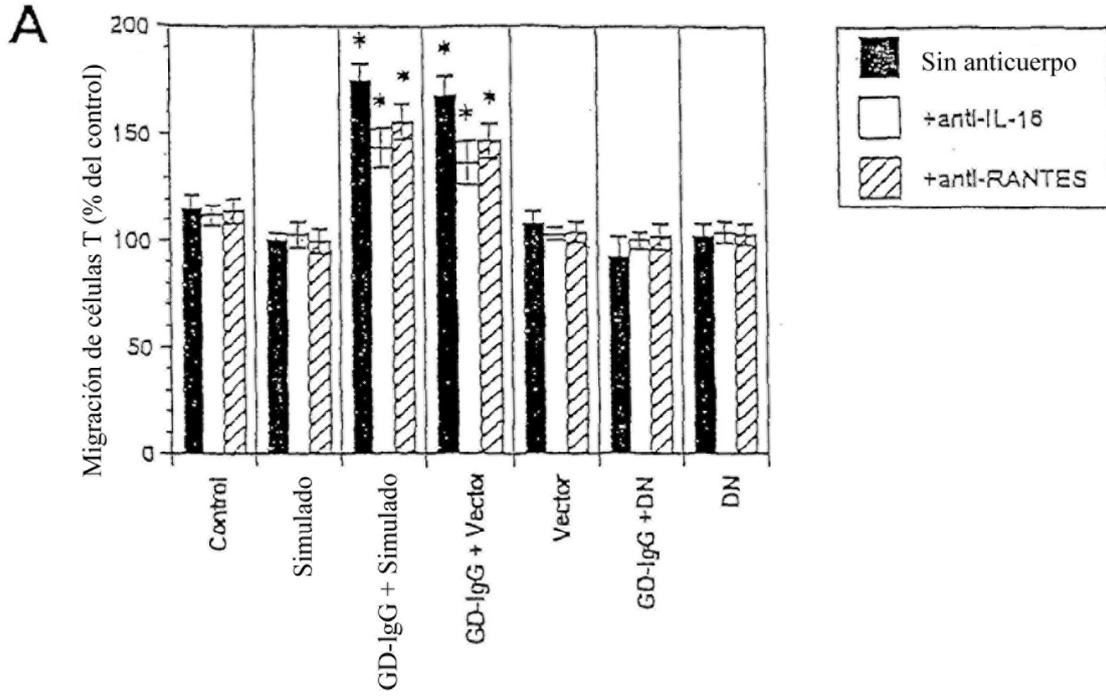
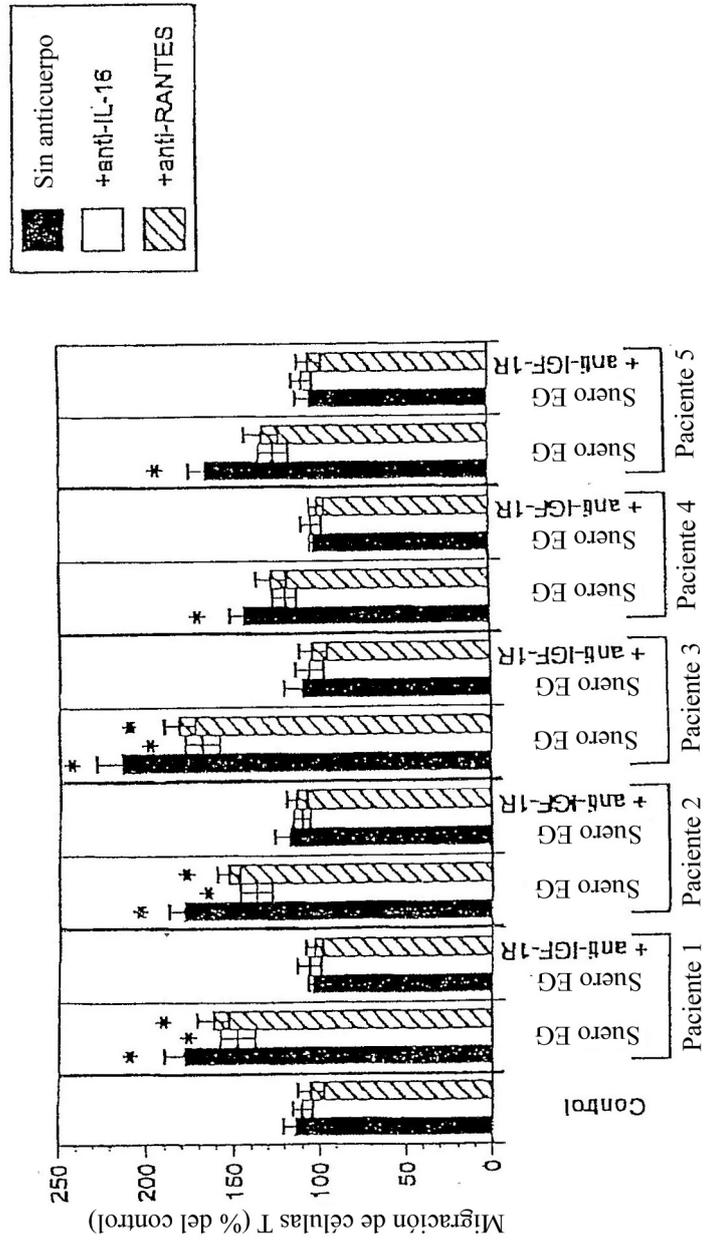


FIGURA 14



ES 2 727 450 T3

Cepa	Sitio	Diagnóstico	Tratamiento	Migración de células T				
				(% del control)	+Anti-IL-16	+Anti-RANTES	IL-16 ^b (pg/ml)	RANTES ^c (pg/ml)
1	Órbita	EG	Control	108 ± 9	102 ± 4	110 ± 7	ND ^d	ND
			IgG Normal	110 ± 6	104 ± 7	103 ± 6	ND	ND
			EG-IgG	179 ± 9	142 ± 8	158 ± 9	58 ± 9	83 ± 10
			IL-1β	194 ± 11	149 ± 8	167 ± 10	71 ± 9	84 ± 8
2	Órbita	EG	Control	110 ± 7	104 ± 8	107 ± 9	ND	ND
			IgG Normal	119 ± 10	109 ± 10	116 ± 11	ND	ND
			EG-IgG	181 ± 11	117 ± 12	171 ± 9	115 ± 15	ND
			IL-1β	195 ± 13	171 ± 7	170 ± 8	82 ± 9	116 ± 11
3	Piel abdominal	EG	Control	108 ± 10	101 ± 8	103 ± 6	ND	ND
			IgG Normal	110 ± 11	108 ± 7	106 ± 8	ND	ND
			EG-IgG	187 ± 10	165 ± 9	175 ± 9	90 ± 9	109 ± 12
			IL-1β	195 ± 13	171 ± 7	171 ± 8	82 ± 9	116 ± 11
4	Órbita	EG	Control	111 ± 8	105 ± 6	103 ± 4	ND	ND
			IgG Normal	109 ± 5	122 ± 10	113 ± 9	ND	ND
			EG-IgG	280 ± 12	130 ± 6	197 ± 17	213 ± 14	98 ± 9
			IL-1β	236 ± 19	175 ± 12	188 ± 9	194 ± 29	128 ± 26
5	Piel abdominal	EG	Control	93 ± 6	99 ± 7	99 ± 6	ND	ND
			IgG Normal	110 ± 9	107 ± 8	104 ± 8	ND	ND
			EG-IgG	157 ± 6	132 ± 8	142 ± 9	ND	ND
			IL-1β	144 ± 8	128 ± 8	131 ± 5	ND	ND
6	Piel del cuello	EG	Control	103 ± 5	100 ± 7	104 ± 6	ND	ND
			EG-IgG	195 ± 11	153 ± 12	168 ± 8	97 ± 21	198 ± 30
			IL-1β	211 ± 13	148 ± 10	178 ± 12	116 ± 27	253 ± 42
			Control	112 ± 9	109 ± 7	104 ± 8	ND	ND
7	Piel pretibial	EG	IgG Normal	108 ± 7	101 ± 6	103 ± 9	ND	ND
			EG-IgG	213 ± 11	168 ± 9	179 ± 10	168 ± 23	119 ± 17
			IL-1β	236 ± 19	175 ± 12	188 ± 9	194 ± 29	128 ± 26
			Control	109 ± 8	107 ± 8	111 ± 9	ND	ND
8	Piel pretibial	EG	IgG Normal	114 ± 9	112 ± 5	114 ± 10	ND	ND
			EG-IgG	167 ± 9	126 ± 8	150 ± 6	58 ± 24	ND
			IL-1β	204 ± 14	164 ± 10	173 ± 8	79 ± 11	ND
			Control	109 ± 7	104 ± 8	104 ± 9	ND	ND
9	Órbita	EG	IgG Normal	106 ± 8	101 ± 6	109 ± 9	ND	ND
			EG-IgG	111 ± 5	106 ± 8	104 ± 10	ND	ND
			IL-1β	243 ± 13	167 ± 11	189 ± 10	218 ± 33	78 ± 21
			Control	105 ± 8	109 ± 10	104 ± 5	ND	ND
10	Órbita	EG	IgG Normal	101 ± 9	100 ± 7	108 ± 8	ND	ND
			EG-IgG	221 ± 13	172 ± 8	189 ± 11	159 ± 28	195 ± 35
			IL-1β	248 ± 19	189 ± 14	206 ± 12	246 ± 32	214 ± 30
			Control	106 ± 7	104 ± 8	101 ± 5	ND	ND
11	Órbita	EG	IgG Normal	110 ± 10	107 ± 5	103 ± 7	ND	ND
			EG-IgG	195 ± 11	135 ± 9	159 ± 7	47 ± 7	26 ± 8
			IL-1β	210 ± 13	162 ± 11	183 ± 6	94 ± 12	69 ± 6
			Control	108 ± 9	109 ± 4	101 ± 7	ND	ND
12	Órbita	Normal	IgG Normal	104 ± 6	109 ± 5	107 ± 6	ND	ND
			EG-IgG	110 ± 9	105 ± 8	112 ± 8	ND	ND
			IL-1β	168 ± 11	143 ± 9	156 ± 9	56 ± 10	42 ± 9
			Control	92 ± 4	90 ± 7	94 ± 6	ND	ND
13	Órbita	Normal	IgG Normal	106 ± 9	95 ± 5	99 ± 8	ND	10 ± 8
			EG-IgG	92 ± 9	97 ± 6	101 ± 5	ND	ND
			Control	102 ± 8	104 ± 5	105 ± 7	ND	ND
			IgG Normal	108 ± 5	108 ± 4	103 ± 9	ND	ND
14	Órbita	Normal	EG-IgG	109 ± 8	104 ± 7	106 ± 5	ND	ND
			IL-1β	189 ± 10	154 ± 8	159 ± 9	68 ± 9	79 ± 11
			Control	103 ± 4	103 ± 8	100 ± 6	ND	ND
			IgG Normal	106 ± 9	104 ± 7	103 ± 8	ND	ND
15	Piel de la extremidad	Normal	EG-IgG	105 ± 7	107 ± 7	101 ± 5	ND	ND
			IL-1β	197 ± 10	153 ± 9	172 ± 9	138 ± 15	173 ± 12
			Control	108 ± 8	103 ± 7	105 ± 10	ND	ND
			IgG Normal	107 ± 6	104 ± 8	103 ± 6	ND	ND
16	Piel de la extremidad	Normal	EG-IgG	100 ± 6	106 ± 7	101 ± 5	ND	ND
			IL-1β	201 ± 7	155 ± 8	173 ± 7	98 ± 19	125 ± 9
			Control	107 ± 6	104 ± 8	103 ± 6	ND	ND
			IgG Normal	100 ± 6	106 ± 7	101 ± 5	ND	ND

FIGURA 15

	Migration de linfocitos ^b (% control)	+ Anti-IL-16	+ Anti-RANTES	+ sendos Ab	IL-16 ^c (pg/ml)	RANTES ^c (pg/ml)
Expt. 1						
EG-IgG	274 ± 16	186 ± 9	217 ± 9	162 ± 8	538 ± 51	462 ± 68
EG-IgG + rapamicina	190 ± 10	184 ± 12	157 ± 9	155 ± 11	ND	449 ± 73
Expt. 2						
EG-IgG	195 ± 11	135 ± 9	159 ± 7		47 ± 7	26 ± 8
EG-IgG + dexametasona	121 ± 8	117 ± 9	118 ± 8		ND	ND

FIGURA 16

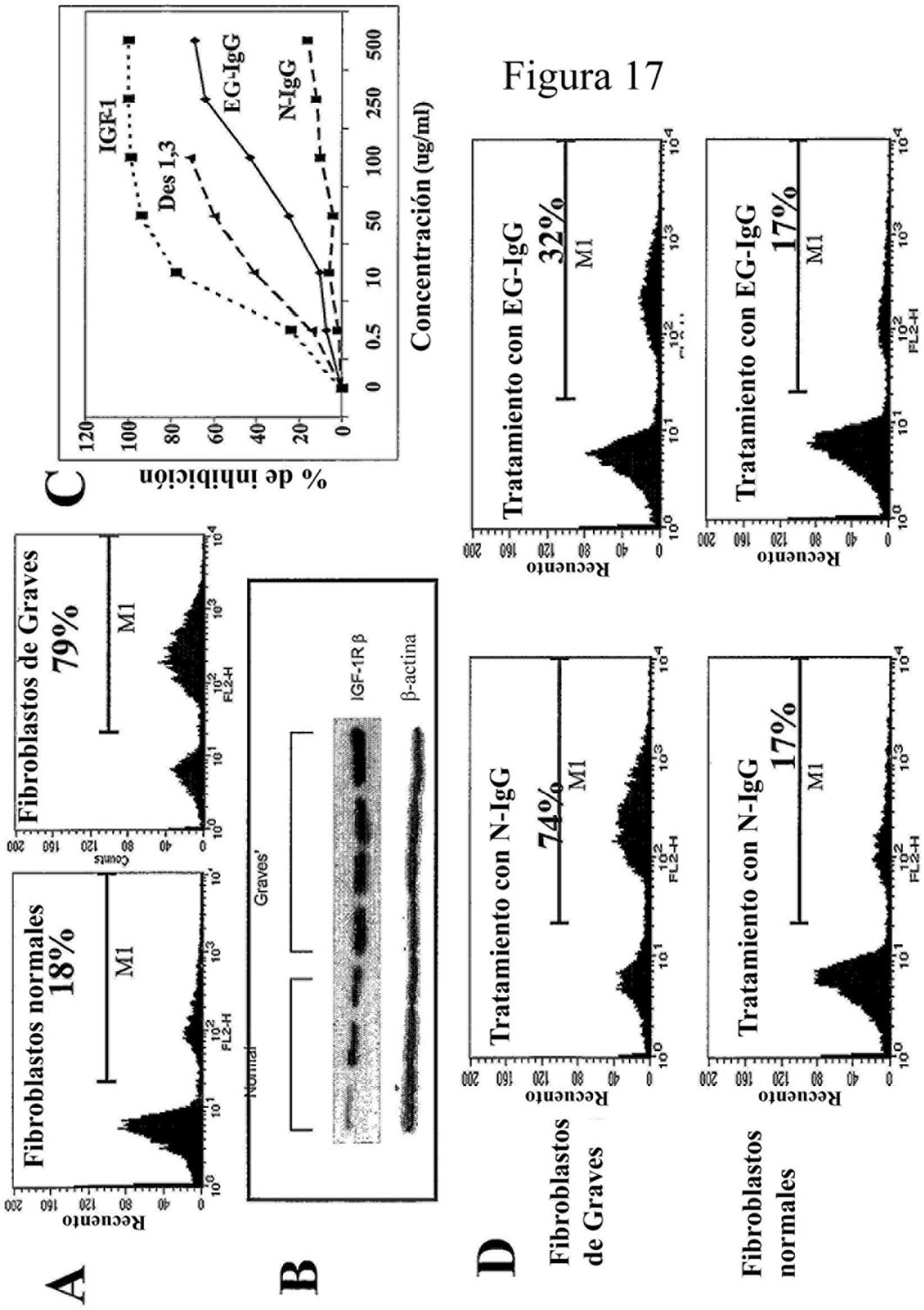


Figura 17

Figura 18

