



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-134818- -00000-0000

Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N° _____

54. TÍTULO LIGANDOS PEPTOIDES PARA EL AISLAMIENTO Y EL
TRATAMIENTO DE CÉLULAS T AUTOINMUNES.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL G01N 33/50

71. SOLICITANTE THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY
OF TEXAS SYSTEM y OPKO HEALTH, INC.

DOMICILIO Texas, Estados Unidos de América y
Miami Florida, Estados Unidos de América

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____



No. 11-134818- -00000-0000

Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: THE BOARD OF REGENTS OF
THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM y
OPKO HEALTH, INC.

Dirección: 201 W. 7th St., Austin, Texas
78701, Estados Unidos de América y 4400
Biscayne Blvd. Miami, Florida 33137, Estados
Unidos de América.

Nacionalidad o domicilio: Texas, Estados
Unidos de América y Miami, Florida, Estados
Unidos de América.

Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 **Fax:** 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER HOJA ANEXA

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/036537 Fecha 28 de mayo de 2010

Publicación Internacional No. WO 2010/138797 A1 Fecha 02 de diciembre de 2010

6 **TÍTULO (54)** LIGANDOS PEPTOIDES PARA EL AISLAMIENTO Y EL
TRATAMIENTO DE CÉLULAS T AUTOINMUNES.

7 **Clasificación Internacional (51)** G01N 33/50

8 **Prioridad**

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

Estados Unidos de América

(32) Fecha

29 de mayo de 2009

12 de noviembre de 2009

(31) Número de Solicitud

61/182.368

61/260.608

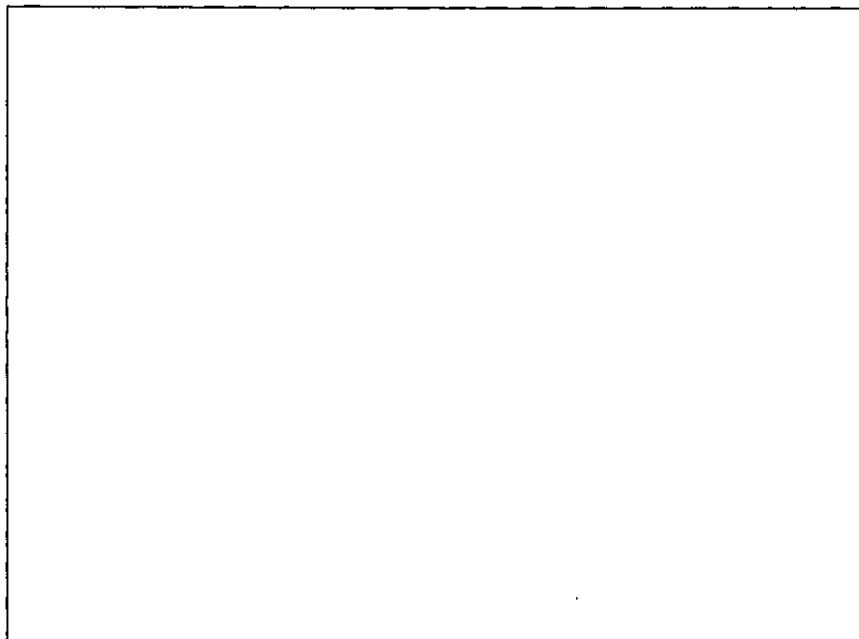
9 **Comprobante de pago** No. 11-92794 // 92805 // 11-92806 // 11-97684 // 11-97685 // 11-97774 // 11-97773
// 1177793 // 11-87387 Fecha 21 de septiembre de 2011 // 05 de octubre de 2011.

10

ANEXOS

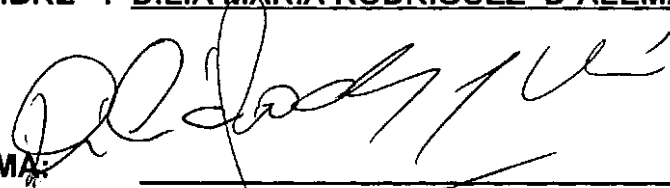
- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA: 

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXO

INVENTORES

1.) GOCKE, Anne, R.

(c/o Office For Technology Development, Ut Southwestern Medical Center At Dallas, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, Texas 75390, Estados Unidos de América);

2.) UDUGAMASOORIYA, D., Gomika

(C/o UT Southwestern Medical Center At Dallas, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, Texas 75390, Estados Unidos de América);

3.) KODADEK, Thomas

(The Scripps Research Institute, Scripps Florida, 130 Scripps Way, #3A2, Jupiter, Florida 33458, Estados Unidos de América).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0092794

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Septiembre 21 de 2011 - 16:32:06

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353179256	21/09/2011	65.400.000.00

*** Conceptos Pagados ***

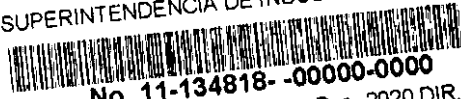
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-134818- -00000-0000

Fecha: 2011-10-11 14:54:53

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR

Eve: 378 FASE NACIONAL I

Folios: 141

P-3105

000003

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Septiembre 21 de 2011 - 16:32:22

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0092805

Bogotá D.C., Septiembre 21 de 2011 - 16:32:06

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353179256	21/09/2011	65.400.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-134818- -00000-0000

Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

000004

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Septiembre 21 de 2011 - 16:32:22

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0092806
		Bogotá D.C., Septiembre 21 de 2011 - 16:32:06

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353179256	21/09/2011	65.400.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. LINDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
=====				

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
-*****-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-134818- -00000-0000
Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

0000005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0097684

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 16:44:47

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325084605	05/10/2011	77.805.000.00

*** Conceptos Pagados ***

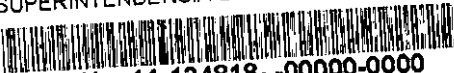
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	200.000.00	200.000.00
				\$200.000.00

SON: **DOSCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-134818- -00000-0000

Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

000000

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 5 de 2011 - 16:45:08

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0097685

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 16:44:47

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325084605	05/10/2011	77.805.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	200.000.00	200.000.00
				\$200.000.00
			=====	

SON: **DOSCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-134818- 00000-0000

Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

0097685

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 5 de 2011 - 16:45:08

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0097774

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 16:44:47

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

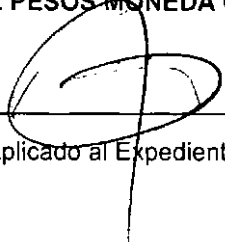
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325084605	05/10/2011	77.805.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	10.000.00	10.000.00
				\$10.000.00
=====				

SON: **DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-134818- -00000-0000

Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

000006

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Octubre 5 de 2011 - 16:45:10

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0097773

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 16:44:47

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

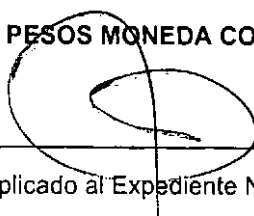
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325084605	05/10/2011	77.805.000.00

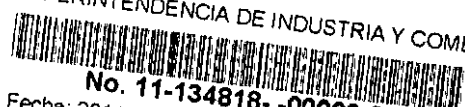
*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	10.000.00	10.000.00
				\$10.000.00

SON: **DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-134818- -00000-0000
Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

000000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

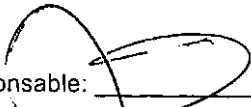
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0077793
		Bogotá D.C., Agosto 11 de 2011 - 17:05:38

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325105211	11/08/2011	26.435.000.00

*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR. LUNDITARIO	VR. CONCEPTO	
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	10.000.00	10.000.00	
				\$10.000.00	
			=====		

SON: **DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-134818- -00000-0000

Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

000010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0087387

Bogotá D.C., Septiembre 07 de 2011 - 16:44:52

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325037926	07/09/2011	51.575.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-134818- -00000-0000
Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

000011

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 7 de 2011 - 16:45:18

LIGANDOS PEPTOIDES PARA EL AISLAMIENTO Y EL TRATAMIENTO DE
CÉLULAS T AUTOINMUNES

RESUMEN

[00237] La presente invención proporciona la identificación de poblaciones de células T autorreactivas de individuos que tienen enfermedades autoinmunes, tales como esclerosis múltiple y EAE. Se pueden utilizar peptoides reconocidos por células T autorreactivas para identificar diversos tipos de enfermedades autoinmunes, y también se pueden utilizar para dirigir las terapias contra tales poblaciones.

000012

DESCRIPCIÓN**LIGANDOS PEPTOIDES PARA EL AISLAMIENTO Y EL TRATAMIENTO DE
CÉLULAS T AUTOINMUNES**

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de las Solicitudes Provisionales de Patente Estadounidense número de serie 61/182,368 presentada en Mayo 29, 2009 y número de serie 61/260,608 presentada en Noviembre 12, 2009, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0002] Esta invención se realiza con el apoyo gubernamental en virtud del otorgamiento no. NO1-HV28185 del Instituto Nacional de Corazón, Pulmón y Sangre, y otorgamiento no. DP10D00066301 de los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION**1. Campo de la invención**

[0003] La presente invención se relaciona de manera general con los campos de la biología molecular, inmunología y medicina. Más particularmente, se relaciona con la identificación de peptoides que son reconocidos por las células T autoinmunes. Se pueden utilizar estos peptoides para identificar sujetos que sufren de o están en riesgo de enfermedades autoinmunes, así como también para dirigir estas células para el retiro, inhibición o destrucción.

2. Descripción de la Técnica Relacionada

[0004] Permanece desconocida la base molecular de muchas enfermedades autoinmunes. Debido en parte a esta carencia de la comprensión del nivel molecular, está lejos de ser óptimo el estado de la técnica en el desarrollo de agentes diagnósticos y terapias efectivas para enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, no existe marcador de proteína en suero altamente confiable para el

000013

diagnóstico de la mayor parte de enfermedades autoinmunes. Casi sin excepción, los fármacos empleados para tratar estas afecciones inhiben un evento posterior de la respuesta autoinmune en sí misma, tal como inflamación, o intenta modular o suprimir el sistema inmune completo en forma no selectiva (Hemmer & Hartung, 2007), con efectos colaterales indeseables significativos. Para las aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, uno podría en forma ideal tener moléculas que están dirigidas a las células B autorreactivas (y los anticuerpos que ellas producen) y directamente células T, pero ignoran las células B y T que reconocen los antígenos externos. Se pueden emplear tales moléculas como agentes diagnósticos y herramientas de investigación para la detección y enriquecimiento de anticuerpos autoinmunes, células B y células T. Adicionalmente, estas moléculas pueden servir como la base para un programa de desarrollo de fármaco novedoso que ayuda a erradicar estas células autorreactivas sin afectar la función apropiada del sistema inmune.

[0005] Así, subsiste una necesidad de procedimientos diagnósticos para ambas enfermedades que son (i) exactos y objetivos, (ii) simples y reproducibles, y (iii) útiles en caso de etapa temprana o tardía.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La presente invención proporciona métodos para utilizar moléculas sintéticas, es decir, ligandos, que unen las unidades estructurales de unión de ligando, tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, o células no adherentes presentes en mezclas biológicas complejas, como biomarcadores para un estado fisiológico particular. En ciertos aspectos, un ligando es un peptoide

[0007] Así, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para identificar un ligando o peptoide que se reconoce específicamente por las células T autoinmunes que comprende (a)

. 000014

proporcionar una primera población de células T de un sujeto saludable, en donde dicha población se marca con una primera marca detectable; (b) proporcionar una segunda población de células T de un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune, en donde dicha población se marca con una segunda marca detectable; (c) poner en contacto dicha primera y segunda población de células T con una pluralidad de dichos peptoides candidatos; y (d) evaluar la unión de dicha primera y segunda población de células T a dicho peptoide candidato, en donde si dicho peptoide se une a dicha segunda población de células T pero no a dicha primera población de células T, dicho peptoide se reconoce por ser células T autoinmunes pero no células T saludables.

[0008] Las enfermedades autoinmunes pueden ser esclerosis múltiple o artritis reumatoide. El ligando o peptoide puede ser un 3-mer, un 4-mer, un 5-mer, un 6-mer, un 7-mer, un 8-mer, un 9-mer o un 10-mer. Las primeras y segundas marcas pueden ser fluorescentes o quimioluminiscentes, o puntos cuánticos. El peptoide se puede unir a un soporte, tal como una microesfera, un chip, un filtro, una barra, una membrana, una matriz polimérica o un pozo. La etapa de poner en contacto puede comprender poner dicho soporte en contacto con dicha primera y segunda población de células T al mismo tiempo. La población de células T puede comprender células T CD4⁺. Los sujetos pueden ser humanos o murinos.

[0009] En otra realización, se proporciona un método para retirar una célula T autoinmune de un sujeto que sufre de una enfermedad autoinmune que comprende (a) proporcionar un ligando o peptoide que se une específicamente a células T autoinmunes, en donde dicho ligando o peptoide se une a un soporte; (b) poner en contacto una muestra que contiene células T de dicho sujeto con dicho peptoide unido al soporte durante un tiempo suficiente para permitir la unión de células T autoinmunes a dicho ligando unido al soporte o peptoide; y (c) separar dicho soporte de dicha muestra. El método puede comprender adicionalmente regresar la muestra de la etapa (c) a dicho sujeto. Las enfermedades autoinmunes pueden ser esclerosis múltiple o artritis reumatoide.

000015

[0010] El ligando o peptoide puede ser un 3-mer, un 4-mer, un 5-mer, un 6-mer, un 7-mer, un 8-mer, un 9-mer o un 10-mer. El soporte puede ser una microesfera, un chip, un filtro, una barra, una membrana, una matriz polimérica o un pozo. La muestra puede ser sangre, fluido cerebroespinal o semen. Cuando la muestra es sangre, esta se puede obtener de dicho sujeto, se trata ex vivo, y se regresa a dicho sujeto, y adicionalmente, la sangre se puede perfundir a través de dicho ligando unido al soporte o peptoide y se regresa a dicho sujeto en un circuito cerrado. El método puede comprender adicionalmente obtener dicha muestra de dicho sujeto. El sujeto puede ser humano o murino.

[0011] En todavía otra realización, se proporciona un método para matar una célula T autoinmune obtenida de un sujeto que sufre de una enfermedad autoinmune que comprende (a) proporcionar un ligando o peptoide que se une específicamente a células T autoinmunes, en donde dicho ligando o peptoide se conjuga con una toxina; y (b) poner en contacto una muestra que contiene células T de dicho sujeto con dicho conjugado durante un tiempo suficiente para permitir la unión de por lo menos una célula T autoinmune a dicho conjugado, en donde dicho conjugado provoca la muerte de dicha célula T autoinmune. La muestra se puede tratar ex vivo, y dicho método puede comprender adicionalmente regresar la muestra a dicho sujeto. Las enfermedades autoinmunes pueden ser esclerosis múltiple o artritis reumatoide.

[0012] El ligando o peptoide puede ser un 3-mer, un 4-mer, un 5-mer, un 6-mer, un 7-mer, un 8-mer, un 9-mer o un 10-mer. La toxina puede ser ricina, toxina de la difteria o toxina del cólera. Alternativamente, la toxina puede ser una toxina fotoactivada, tal como rutenio (II) tris-bipididilo, y la etapa (b) puede comprender adicionalmente exponer dicha muestra a la luz visible. La muestra puede ser sangre, fluido cerebroespinal o semen. El método puede comprender adicionalmente obtener dicha muestra de dicho sujeto. El sujeto puede ser humano o murino.

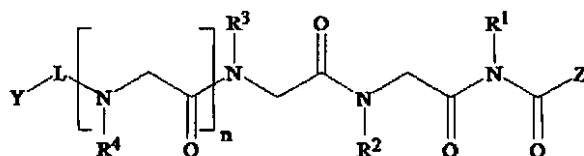
000016

[0013] En todavía otra realización, se proporciona un método para matar una célula T autoinmune obtenida de o en un sujeto que sufre de una enfermedad autoinmune que comprende (a) proporcionar un ligando o peptoide que se une específicamente a células T autoinmunes, en donde dicho ligando o peptoide se conjuga con una molécula que contiene Fc IgG; y (b) poner en contacto una población de células T autoinmunes con dicho conjugado durante un tiempo suficiente para permitir la unión de por lo menos una célula T autoinmune a dicho conjugado, en donde dicho conjugado recluta efectores inmunes a dichas células T autoinmunes que resulta en la muerte de las mismas. La población de células T autoinmunes se pueden tratar ex vivo, y el método puede comprender adicionalmente regresar la muestra de la etapa (b) a dicho sujeto. Las enfermedades autoinmunes pueden ser esclerosis múltiple o artritis reumatoide.

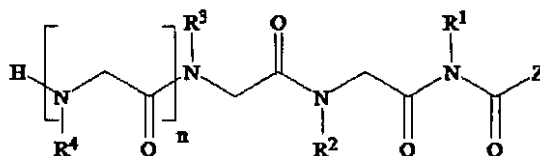
[0014] El ligando o peptoide puede ser un 3-mer, un 4-mer, un 5-mer, un 6-mer, un 7-mer, un 8-mer, un 9-mer o un 10-mer. La molécula que contiene Fc IgG puede ser un anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla, o un fragmento Fc, por ejemplo, un anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla, y dicho ligando o peptoide se ancla al sitio de unión de antígeno de dicho anticuerpo, o un fragmento Fc que carece de las regiones variables IgG, y dicho ligando o peptoide se ancla al terminal carboxi de dicho fragmento Fc. La muestra puede ser sangre, fluido cerebroespinal o semen. El método puede comprender adicionalmente obtener dicha muestra de dicho sujeto. El sujeto puede ser humano o murino.

[0015] En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención tienen las siguientes fórmulas, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables de las mismas:

000017



Fórmula I



Fórmula II

en donde n es 0-8; L es ligador; Y es toxina o fragmentos de anticuerpo; Z es un NH₂, N(alquilo C₁-C₆)₂, OH o O(alquilo C₁-C₆); y R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ (con cada valor de n por encima de 4 agregado al siguiente grupo R en orden numérico a la Fórmula I o Fórmula II), puede ser hidrógeno; alquilo; alilo; metilo; etilo; n-propilo; isopropilo; n-butilo; isobutilo; sec-butilo; tert-butilo; pentilo; hexilo; isopentilo; arilo; heteroarilo; furanilo; indolilo; tiofenilo; tiazolilo; imidazolilo; isoxazoilo; oxazoilo; piperonilo; pirazoilo; pirrolilo; pirazinilo; piridilo; pirimidilo; pirimidinilo; purinilo; cinnolinilo; benzofuranilo; benzotienilo; benzotriazolilo; benzoxazolilo; quinolina; isoxazolilo; isoquinolina cicloalquilo; alqueno; cicloalqueno; fenilo; piridilo; metoxietilo; (R)-metilbenzilo; alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆); alquino C₂-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆); alqueno C₂-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆).

[0016] En ciertos aspectos, R₁, R₂, y/o R₃ pueden ser independientemente alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆); alquino C₂-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆); alqueno

000018

C₂-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆).

[0017] En ciertos aspectos, R1 es alquilo C₁-C₆ terminalmente sustituido con un NH₂, particularmente 4 aminobutano.

[0018] En aspectos adicionales, R2 es alquilo C₁-C₆ terminalmente sustituido con un NH₂, particularmente 4 aminobutano.

[0019] En todavía aspectos adicionales, R3 es alquilo C₁-C₆, alquinilo C₂-C₆, o alquenilo C₂-C₆. En ciertos aspectos R3 es isobutilo.

[0020] En ciertos aspectos, R4 es alquilo C₁-C₆ terminalmente sustituido con un NH₂, particularmente 4 aminobutano.

[0021] En aspectos adicionales, R5 es (R)-metilbencilo.

[0022] En todavía aspectos adicionales, R6 es furanilo.

[0023] En ciertos aspectos, R7 es alquilo C₁-C₆ terminalmente sustituido con un NH₂, particularmente 4 aminobutano.

[0024] En aspectos adicionales R8 es alquilo C₁-C₆ y particularmente isobutilo.

[0025] Ciertas realizaciones de la invención incluyen 8-mer en donde R1, R2, R4, y R7 son 4-aminobutano; R3 y R8 son isobutilo; R5 es (R)-metilbencilo; y R6 es furanilo (compuesto AG12A). El AG12A puede terminar en un grupo lisilo (4-aminobutano), hidroxilo, o carboxilo.

[0026] En otros aspectos el grupo terminal R termina en un grupo lisilo, carboxilo, o hidroxilo.

000019

[0027] Se contempla que se puede implementar cualquier método o composición descrita aquí con respecto a cualquier otro método o composición descrita aquí.

[0028] El uso de la palabra "un" o "una" cuando se utiliza en conjunto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "uno," pero también es consistente con el significado de "uno o más," "por lo menos uno," y "uno o más de uno."

[0029] Se contempla que cualquier realización discutida en esta especificación se puede implementar con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Adicionalmente, se pueden utilizar las composiciones y equipos de la invención para lograr métodos de la invención.

[0030] A través de esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método se emplea para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0031] Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor en referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas aquí.

[0032] **FIGURAS 1A-D: Identificación de los peptoides de unión de células T autorreactivas utilizando un protocolo de detección en microglóbulo bicolor.** (FIGURA 1A) Representación esquemática del protocolo de detección de peptoides. (FIGURA 1B) Imágenes microscópicas fluorescentes de glóbulos de peptoides después de detección y lavado (100X de magnificación; filtro DAPI); (i) y (ii): los dos glóbulos se seleccionan como aciertos que se

000020

observan unen solo las células teñidas con rojo; (iii): una unión de glóbulo a células T CD4⁺ de ratones saludables y ratones EAE. (FIGURA 1C) Estructuras químicas de los dos aciertos identificados en la detección. (FIGURA 1D) Imágenes microscópicas fluorescentes de glóbulos Tentagel que exhiben AG12A unido a células T autorreactivas; (i): las células T CD4⁺ de ratones de control tipo natural B10.PL no unen a las microesferas de peptoide AG12A; (i) i: células T CD4⁺ de ratones transgénicos TCR MBP Ac1-11 V α 2.3/V β 8.2 que se unen a las microesferas de peptoides AG12A.

[0033] **FIGURAS 2A-C: AG12A se une a células T específicas MBP Ac1-11 con afinidad micromolar moderada y alta especificidad.** (FIGURA 2A) Análisis de citometría de flujo de células T CD4⁺ tipo natural B10.PL vs. transgénicas V α 2.3/V β 8.2 MBP Ac1-11 TCR en la presencia de concentraciones incrementadas de biotina-DOPA-AG12A. Las células se preincubaban con concentraciones de 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 250 μ M, o 500 μ M de biotina-DOPA-AG12A, se entrecruzan y se tiñen con anti-CD4-PerCP-Cy5.5 y anti-estreptavidina-aloficocianina (APC). Se utiliza citometría de flujo de dos colores para determinar la afinidad de unión estimada de AG12A biotinilado para células T CD4⁺ autorreactivas. Los resultados se describen como la superposición de los histogramas con la línea verde que representa células T transgénicas V α 2.3/V β 8.2 MBP Ac1-11 TCR y la línea azul que representa células T CD4⁺ tipo natural B10.PL. La línea roja representa un control negativo no peptoide. Se determina la intensidad fluorescente media (MFI) para cada concentración de peptoide probado utilizando el software Flowjo. Solo se encuentra que las células T transgénicas V α 2.3/V β 8.2 MBP Ac1-11 TCR se unen al AG12A. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. (FIGURA 2B) Isotermo de unión de AG12A para células T transgénicas V α 2.3/V β 8.2 MBP Ac1-11 TCR evaluadas mediante citometría de flujo. Se grafica el MFI para cada concentración de peptoide probado para células T transgénicas TCR + células T AG12A, WT + AG12A, células T transgénicas TCR + peptoide de control, y células T WT + peptoide de control. Se calcula el K_d utilizando

000021

software Graphpad Prism y se estima que es de aproximadamente 40 μ M. (FIGURA 2C) Entrecruzamiento activado por peryodato de biotina-DOPA-AG12A a células T transgénicas V α 2.3/V β 8.2 MBP Acl-11 TCR seguido por electroforesis de gel SDS y Western blot con NeutrAvidin-HRP (NA-HRP) que resulta en un producto entrecruzado principal con un peso molecular de aproximadamente 45 kDa (lado derecho). Este producto no se ve cuando se utilizan las células T CD4⁺ de los ratones WT o esplenocitos negativos CD4 de un ratón transgénico TCR. Línea 1: WT células T CD4⁺, Línea 2: células T transgénicas V α 2.3/V β 8.2, Línea 3: esplenocitos negativos CD4. Lado derecho: Igual que el lado izquierdo con la excepción que la transferencia se sondea con un anticuerpo anti-V α 2 TCR. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

[0034] **FIGURAS 3A-C: El AG12A inhibe la proliferación de células T autorreactivas en una forma dependiente de dosis.** (FIGURA 3A) Se aíslan células T transgénicas TCR de murino específicas CD4⁺ MBP Acl-11, se marcan con CFSE, y se incuban con concentraciones aumentadas del peptoide AG12A o un peptoide de control. Las células se diluyen con células que presentan antígeno aisladas de los bazo de ratones B10.PL tipo natural y se estimulan con el péptido MBP Acl-11 en una concentración final de 10 μ g/ml. Las células se tiñen con un anticuerpo anti-CD4+-PerCP-CY5.5 y se analizan mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células divididas. Los resultados se describen en una gráfica lineal con concentración de peptoide mostrada en el eje X y porcentaje de división en el eje Y. Las células tratadas con el peptoide AG12A se describen con cuadrados y las células tratadas con el peptoide de control se describen con triángulos. (FIGURA 3B) Se aíslan células B de ratones tipo natural B10.PL y se tratan como se describe en (FIGURA 3A). Las células se estimulan con LPS y se realiza citometría de flujo como se describió anteriormente. (FIGURA 3C) Las células T CD4⁺ de ratones transgénicos MOG 35-55 TCR se aíslan y se tratan como se describió anteriormente con la excepción que se estimulan las células con el péptido MOG 35-55 en la presencia de células que

000022

presentan antígeno. Todos los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

[0035] **FIGURAS 4A-D: Adición de una cabeza de rutenio que aumenta la potencia de AG12A y evita la transferencia adoptiva EAE.** (FIGURA 4A) El dibujo ilustra la destrucción fotocatalítica del TCR autorreactivo. El AG12A se acopla químicamente a Ru^{2+} . Luego de incubación con el complejo de peptoide de rutenio, las células se irradian con luz visible (<380 nm). La irradiación resulta en la generación de oxígeno singulete que inactivará el receptor objetivo. (FIGURA 4B) Se aíslan células T transgénicas TCR de murino específicas CD4^+ MBP Acl-11 de ratones B10.PL y se incuban con concentraciones de $1 \mu\text{M}$ o 100 nM de AG12A- Ru^{2+} , un peptoide de control - Ru^{2+} , o disolvente solo (PBS o DMSO). Las células se irradian a <380 nm durante 10 minutos (barras rayadas) o no se exponen a la luz (barras negras). Se diluyen los cultivos con células que presentan antígeno de los bazos de ratones B10.PL tipo natural y se estimulan con el péptido MBP Acl-11 en una concentración final de $10 \mu\text{g/ml}$. Se determina la proliferación al agregar [^3H] timidina a las células durante el final de 16 horas de cultivo. Los niveles de referencia de proliferación de las células que no se estimulan con antígeno se restan de los resultados mostrados. (FIGURA 4C) Igual como el panel (B) con la excepción que las células T CD4^+ utilizadas se aíslan de ratones transgénicos TCR específicas MOG 35-55. La proliferación de estas células no se afecta por AG12A- Ru^{2+} . (FIGURA 4D) El tratamiento con AG12A- Ru^{2+} evita la transferencia adoptiva de EAE. Se aíslan células T CD4^+ de ratones transgénicos TCR específicos MBP Acl-11, se incuban con 100 nM AG12A- Ru^{2+} o el peptoide de control - Ru^{2+} y se irradian. Las células luego se estimulan con células que presentan antígeno y $10 \mu\text{g/ml}$ del péptido MBP Acl-11 durante 72 horas y se transfieren mediante inyección i.p. a ratones nulitratados B10.PL. Los ratones se monitorean diariamente para detectar signos clínicos de EAE y se describen gráficamente clasificaciones clínicas medias para los grupos tratados AG12A- Ru^{2+} (círculos abiertos), control- Ru^{2+} (cuadrados abiertos), solo antígeno (triángulos abiertos), y sin antígeno (estrellas). Todos

. 000023

los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes.

[0036] **FIGURAS 5A-B: Clasificaciones clínicas medias de ratones EAE para detección e ilustración estructural de la colección de peptóide empleada en la detección.** (FIGURA 5A) Se inmunizan ratones B10.PL con 50 µg del péptido MBP Acl-11 emulsificado en adyuvante completo de Freund (CFA) para inducir EAE. Se monitorean los ratones diariamente para detectar signos clínicos de enfermedad y se asigna una clasificación clínica con base en criterios estándar. Se inmunizan los ratones de control con CFA solo y no desarrolla EAE. Los ratones se sacrifican en el pico de la enfermedad y se aíslan las células T CD4⁺ y se utilizan para detección de colección de peptóide. Las clasificaciones de ratones EAE (cuadrados) y ratones de control (triángulos) se muestran en la gráfica. (FIGURA 5B) Ilustración de la colección de peptóide utilizada para detección. Superior: estructura química general de los compuestos en la colección. Se fijan tres residuos en el terminal y se diversifican los 6 residuos restantes. Cuadro: aminas utilizadas para realizar la colección.

[0037] **FIGURA 6: Estructuras del peptóide de control y el peptóide de control Ru2⁺.** Se muestran las estructuras químicas de los peptóides de control utilizadas para estos estudios.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0038] Los inventores aquí describen métodos para identificar moléculas sintéticas que se unen con alta especificidad a células T CD4⁺ autorreactivas. Este protocolo, realizado aquí en el contexto de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo de animal para esclerosis múltiple humana (MS), no requiere conocimiento previo de la naturaleza del antígeno natural. En su lugar, este emplea una estrategia de unión comparativa en la que se evalúa simultáneamente la capacidad de cada compuesto en la colección para unir las células T autorreactivas y las células T normales en una población natural.

000024

Solo los compuestos que exhiben alta selectividad para las células T autorreactivas se seleccionan como "aciertos." La caracterización detallada de un acierto de la detección EAE sugiere que este se une a al receptor de célula T (TCR). Adicionalmente, se muestra que este compuesto es un antagonista de la proliferación de células T que conduce al antígeno *in vitro*. Finalmente, cuando este compuesto se conjuga con un complejo de rutenio capaz de mediar el daño oxidativo a las proteínas cercanas cuando se fotolizan (Lee et al., 2008), el conjugado inhibe la capacidad de las células T autorreactivas para mediar la enfermedad en un experimento de transferencia adoptivo. Tomados juntos, estos datos prueban la capacidad de esta tecnología para identificar los compuestos sintéticos que son capaces de unir e inhibir las células T autorreactivas específicas de antígeno.

I. Enfermedades autoinmunes

[0039] La presente invención, como se discutió anteriormente, proporciona la identificación de moléculas que pueden unir las células T autoinmunes a partir de una variedad de estados de enfermedad. Aunque los ejemplos se dirigen a EAE, un modelo de animal para MS, esta invención debe ser útil en el contexto de una variedad de enfermedades autoinmunes, algunas de las cuales se discuten adelante. En ciertos aspectos, los estados de enfermedad incluyen, pero no se limitan a enfermedades tales como encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, enfermedad de Addison, agamaglobulinemia, asma alérgica, rinitis alérgica, alopecia areata, amiloidosis, espondiloartritis anquilosante, nefritis anti-GBM/anti-TBM, síndrome antifosfolípido (APS), anemia aplásica autoinmune, disautonomía autoinmune, hepatitis autoinmune, hiperlipidemia autoinmune, inmunodeficiencia autoinmune, enfermedad de oído interno autoinmune (AIED), miocarditis autoinmune, pancreatitis autoinmune, retinopatía autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune (ATP), enfermedad de tiroides autoinmune, neuropatías axonal & neuronal, enfermedad

000025

de Balo, enfermedad de Behcet, penfigoide vesicular, cardiomiopatía, enfermedad de Castlemen, celiacua (no tropical), enfermedad de Chagas, síndrome de fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), osteomielitis multifocal recurrente crónica (CRMO), síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial /penfigoide mucosal benigno, enfermedad de Crohn, síndrome de Cogan, enfermedad de aglutinina fría, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis de coxsackie, enfermedad de CREST, crioglobulinemia mezclada esencial, neuropatías desmielinizantes, dermatomiositis, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, fasciitis eosinófila, eritema nodoso, encefalomielitis alérgica experimental, síndrome de Evan, fibromialgia, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barre, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henock-Schonlein, herpes gestacional, hipogamaglobulinemia, púrpura trombocitopénico idiopático (ITP), nefropatía IgA, lipoproteínas inmunoreguladoras, mioscititis de cuerpo de inclusión, diabetes dependiente de insulina (tipo 1), cistitis intersticial, artritis juvenil, diabetes juvenil, síndrome de Kawasaki, síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, enfermedad IgA lineal (LAD), Lupus (SLE), enfermedad de Lyme, enfermedad de Meniere, poliangitis microscópica, enfermedad mixta de tejido conectivo (MCTD), úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, esclerosis múltiple, miastenia gravis, mioscititis, narcolepsia, neuromielitis óptica (de Devic), neutropenia, penfigoide cicatricial ocular, neuritis óptica, reumatismo palindrómico, PANDAS (Trastornos Neurosiquiátricos Autoinmunes Pediátricos Asociados con Estreptococos), degeneración cerebelar paraneoplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, ciclitis (uveítis periférica), pénfigo, neuropatía periférica, encefalomielitis perivenosa, anemia perniciosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, síndromes

poliglandular autoinmune tipo I, II & III, polimialgia reumática, polimioscitis, síndrome de infarto post-miocárdico, síndrome post-pericardiotomía, dermatitis de progesterona, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, soriasis, artritis soriática, fibrosis pulmonar idiopática, pioderma gangrenosa, aplasia pura de glóbulos rojos, fenómeno de Raynaud, distrofia simpatética de reflejo, síndrome de Reiter, policondritis recidivante, síndrome de piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, escleritis, escleroderma, síndrome de Sjögren, autoinmunidad testicular y de esperma, síndrome de personas rígidas, endocarditis bacteriana subaguda (SBE), oftalmia simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal /arterias con células gigantes, púrpura trombocitopénica (TPP), síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversal, colitis ulcerativa, enfermedad de tejido conjuntivo no diferenciado (UCTD), uveítis, vasculitis, dermatosis vesiculoampollosa, granulomatosis de vitiligo o de Wegener, hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, cardiomiopatía dilatada, miocarditis, síndrome poliendocrino autoinmune tipo I (APS-I), vasculaturas de fibrosis quística, hipoparatiroidismo adquirido, enfermedad de arteria coronaria, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgaris, encefalitis de Rasmussen, gastritis autoinmune, síndrome hipoglucémico por insulina (enfermedad de Hirata), resistencia a la insulina Tipo B, acantosis, lupus sistémico eritematoso (SLE), anemia perniciosa, artritis de Lyme resistente al tratamiento, polineuropatía, enfermedades desmielinizantes, dermatitis atópica, hipotiroidismo autoinmune, vitiligo, oftalmopatía asociada con tiroides, enfermedad celiaca autoinmune, deficiencia de ACTH, dermatomioscitis, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica, esclerosis sistémica progresiva, morfea, síndrome anti-fosfolípido primario, urticaria idiopática crónica, síndromes de tejido conjuntivo, glomerulonefritis necrotizante y semilunar (NCGN), vasculitis sistémica, síndrome de Raynaud, enfermedad crónica de hígado, leishmaniasis visceral, deficiencia autoinmune C1, glomerulonefritis proliferativa de membrana (MPGN), tiempo de coagulación prolongado,

000027

inmunodeficiencia, aterosclerosis, neuropatía, pénfigo paraneoplásico, síndrome paraneoplásico de persona rígida, encefalomiелitis paraneoplásica, neuropatía autonómica subaguda, retinopatía asociada con cáncer, ataxia paraneoplásica opsoclono mioclono, síndrome de neurona motora inferior y síndrome miasténico de Lambert-Eaton.

A. Espondiloartritis Anquilosante

[0040] El AS es un subconjunto de enfermedades dentro de una clasificación más amplia de enfermedades de espondiloartropatía. Los pacientes afectados con los diversos subconjuntos de espondiloartropatía tienen etiologías de enfermedad que son frecuentemente diferentes, que varían de infecciones bacterianas a heredades. Aún, en todos los subgrupos, el resultado final del proceso de la enfermedad es artritis axial. A pesar de las diferencias clínicamente tempranas vistas en las diversas poblaciones de pacientes, muchas de ellas finalizan casi idénticas en la evolución de la enfermedad de diez a veinte años. Estudios recientes sugieren el tiempo medio para el diagnóstico clínico de espondiloartritis anquilosante del inicio de la enfermedad que es 7.5 años (Khan, 1998). Estos mismos estudios sugieren que las espondiloartropatías han tenido prevalencia cercana a aquellos de la artritis reumatoide (Feldtkeller et al., 2003; Doran et al., 2003).

[0041] El AS es un trastorno reumático inflamatorio sistémico crónico del esqueleto axial con o sin manifestaciones extraesqueléticas. Las articulaciones sacroiliacas y la columna vertebral son las más afectadas, pero las articulaciones de cadera y hombro, y con menos frecuencia algunas articulaciones comúnmente periféricas o ciertas estructuras extra-articulares tales como los ojos, vasculatura, sistema nervioso, y sistema gastrointestinal también pueden estar involucradas. Esta etiología no se entiende aún completamente (Wordsworth, 1995; Calin and Taurog, 1998). Esto se asocia fuertemente con la histocompatibilidad principal clase I (MHC I) alelo HLA-B27

000023

(Calin and Taurog, 1998). El AS afecta a los individuos al inicio de su vida y se teme que se debe a su potencial para provocar dolor crónico y daño irreversible de los tendones, ligamentos, articulaciones, y huesos (Brewerton et al., 1973; Brewerton et al., 1973; Schlosstein et al., 1973). El AS puede ocurrir solo o en asociación con otra forma de espondiloartropatía tal como artritis reactiva, soriasis, artritis soriática, entesitis, colitis ulcerativa, enfermedad de intestino irritable, o enfermedad de Crohn, en cuyo caso se clasifica como AS secundario.

[0042] Típicamente, los sitios afectados incluyen las articulaciones discovertebrales, apofiseales, costovertebrales, y costotransversales de la columna vertebral, y las estructuras ligamentosas paravertebrales. La inflamación de las entesis, que son sitios musculotendinosos y ligamentosos adheridos a los huesos, también es importante en esta enfermedad (Calin and Taurog, 1998). Se sabe que el sitio de entesitis se infiltra por las células de plasma, linfocitos, y células polimorfonucleares. El proceso inflamatorio resulta frecuentemente en alquilosis ósea y fibrosa gradual, (Ball, 1971; Khan, 1990).

[0043] El diagnóstico retrasado es común debido a que los síntomas se atribuyen frecuentemente a problemas de espalda más comunes. Una pérdida dramática de flexibilidad en la parte lumbar de la columna vertebral es un signo temprano de AS. Otros síntomas comunes incluyen dolor crónico y rigidez en la parte baja de la espalda que inicia usualmente cuando la parte inferior de la columna vertebral se une a la pelvis, o cadera.

[0044] Aunque la mayor parte de los síntomas empiezan en las áreas lumbares y sacroiliacas, también puede involucrar la nuca y la parte superior de la espalda. La artritis también puede ocurrir en los hombros, caderas y pies. Algunos pacientes tienen inflamación en los ojos, y se pueden observar casos más severos que involucran la válvula cardíaca.

000029

[0045] La presentación más frecuente es dolor de espalda, pero la enfermedad puede empezar atípicamente en las articulaciones periféricas, especialmente en niños y mujeres, y raramente con iritis aguda (uveítis anterior). Los síntomas y signos tempranos adicionales son expansión reducida del tórax de involucramiento costovertebral difuso, fiebre de bajo grado, fatiga, anorexia, pérdida de peso, y anemia. El dolor de espalda recurrente - frecuentemente nocturno y de intensidad variable - es una complicación eventual, como lo es la rigidez en la mañana típicamente aliviada por la actividad. Una postura flexionada o encorvada alivia el dolor de espalda y espasmo del músculo paraespinal; así, es común algún grado de cifosis en pacientes no tratados.

[0046] Las manifestaciones sistémicas ocurren en 1/3 de los pacientes. La iritis aguda recurrente (uveítis anterior), generalmente auto limitada raramente se prolonga y es suficientemente grave como para afectar la visión. Los signos neurológicos pueden resultar ocasionalmente de radiculitis por compresión o ciática, fractura vertebral o subluxación, y síndrome de la cola de caballo (que consiste de impotencia, incontinencia urinaria nocturna, vejiga disminuida y sensación rectal, y ausencia de reflejo aquileo). Las manifestaciones cardiovasculares pueden incluir insuficiencia aórtica, angina, pericarditis, y anomalías de conducción ECG. Un hallazgo pulmonar raro es fibrosis de lóbulo superior, ocasionalmente con cavitación que se puede confundir con TB y se puede complicar mediante infección con *Aspergillus*.

[0047] El AS se caracteriza por erupciones leves o moderadas de espondiloartritis activa que alterna con periodos de casi o totalmente inflamación inactiva. El tratamiento apropiado en una mayor parte de los pacientes resulta en discapacidad mínima o ninguna discapacidad y en una vida plena y productiva a pesar de la rigidez en la espalda. Ocasionalmente, el curso es severo y progresivo, que resulta en deformidades incapacitantes

000030

pronunciadas. El pronóstico es sombrío para pacientes con iritis refractaria y para el paciente raro con amiloidosis secundaria.

[0048] El ESR y otros reactivos de fase aguda (*por ejemplo*, proteína reactiva C y niveles de suero Ig) se elevan levemente en la mayor parte de los pacientes con AS activo. Las pruebas para el factor reumatoide IgM y los anticuerpos antinucleares son negativos. Una prueba positiva para el HLA-B27 es usual pero no invariable y no específico (es más útil una prueba negativa en ayudar a excluir el AS cuando se diagnostica una prueba positiva). Esta prueba no es necesaria en pacientes con enfermedad típica.

[0049] Se puede confirmar el diagnóstico mediante rayos x. Las anormalidades más tempranas (pseudo-ensanchamiento de erosiones subcondriales, esclerosis o posterior estrechamiento) ocurren en las articulaciones sacroiliacas. Los cambios tempranos en la columna vertebral son cuadratura vertebral de la parte lumbar superior y desmineralización, clasificación ligamentosa dispersa, y uno o dos sindesmófitos que evolucionan. La columna vertebral tipo caña de bambú clásica con sindesmorfis prominentes y no es útil la calcificación ligamentosa paraespinal difusa para el diagnóstico temprano; estos cambios se desarrollan en una minoría de paciente durante un periodo promedio 10 años.

[0050] La severidad del involucramiento de la articulación y el grado de síntomas sistémicos variará mayor de un individuo a otro. El diagnóstico preciso y temprano y la terapia pueden minimizar años de dolor y discapacidad.

[0051] La incomodidad de la articulación se puede aliviar con los fármacos. Los planes de tratamiento usualmente están dirigidos a la prevención, retraso, o corrección de la deformidad y las necesidades de rehabilitación y sicosociales. Para postura apropiada y movimiento de la articulación, el ejercicio diario y otras mediciones de soporte (*por ejemplo*, entrenamiento postural, ejercicio terapéutico) son vitales para la resistencia de los

grupos de músculos que se oponen a la dirección de las deformidades potenciales (es decir, fortalecer el extensor en lugar de los grupos de músculos flexores). Leer mientras se encuentra decúbito y por lo tanto extender el cuello puede ayudar a mantener flexibilidad de nuevo.

[0052] Los NSAID facilitan el ejercicio y otras mediciones de soporte al suprimir la inflamación articular, dolor, y espasmo muscular. La mayor parte de los NSAID son de valor probado en el AS, pero la tolerancia y toxicidad, a diferencia de las diferencias marginales en la eficacia, dictan la elección del fármaco. Los pacientes se deben monitorear y se les debe advertir de las reacciones adversas potenciales. La dosis diaria de los NSAID debe ser tan baja como sea posible, pero se pueden necesitar dosis diarias de un fármaco tal como indometacina con enfermedad activa. El retiro del fármaco se debe intentar solo lentamente, después que se han suprimido los signos sistémicos y articulares de la enfermedad activa durante varios meses. Diversos nuevos NSAID, denominados como los fármacos COX-2 debido a que inhiben la ciclooxygenasa-2, proporcionan efectividad igual a los fármacos que inhiben el COX-1 con menos cambio de los efectos adversos en la mucosa gástrica, y la agregación de plaquetas.

[0053] Los corticosteroides han limitado el valor terapéutico; el uso a largo plazo se asocia con muchos efectos adversos serios, que incluyen osteoporosis de la de la columna vertebral rígida. Para iritis aguda, son adecuados usualmente los corticosteroides tópicos (y midriáticos); se indican raramente los corticosteroides orales. Los corticosteroides intra-articulares pueden ser beneficiosos, particularmente cuando una o dos articulaciones periféricas se inflaman más severamente que las otras, comprometiendo de por lo tanto el ejercicio y la rehabilitación.

[0054] Los fármacos de acción lenta (recidivante) para el RA (por ejemplo, dorado dado IM) no han estudiado o no son efectivos para

000032

el AS. La sulfasalazina puede ser útil, particularmente cuando se involucran las articulaciones periféricas. La dosificación se debe iniciar en 500 mg/día y se aumente en 500 mg/día en intervalos 1 de semana en mantenimiento de 1g bid (ver también *Rheumatoid Arthritis* in Ch. 50). El efecto lateral más común es náusea, que es principalmente central, pero son bien tolerados los recubrimientos recubiertos entéricos. Puede ayudar la reducción de dosis.

[0055] Los narcóticos, otros analgésicos fuertes, y relajantes musculares que carecen de propiedades anti-inflamatorias y se deben prescribir solo a corto plazo como adjuntos para ayudar a controlar dolor de espalda y espasmo severo. La radioterapia en la columna vertebral, aunque efectiva, se recomienda como último recurso debido a que esta aumenta el riesgo de leucemia mielogenosa aguda diez veces.

[0056] Son esenciales las terapias de rehabilitación. El sueño y las posiciones apropiadas al caminar, acopladas con ejercicios abdominales y de espalda, ayudan a mantener la postura. Los ejercicios ayudan a mantener la flexibilidad de las articulaciones. Los ejercicios de respiración mejoran la capacidad pulmonar, y nadar proporciona ejercicio aeróbico. Aún con tratamiento óptico, algunas personas desarrollarán una columna vertebral rígida o "anquilosante", pero permanecerán funcionales si ocurre esta fusión en una posición recta. Es crítico el cuidado continuo. El AS es un problema de vida larga, y las personas fallan frecuentemente en continuar el tratamiento, en cuyo caso ocurre postura permanente y pérdidas de la movilidad.

B. Artritis Soriática

[0057] La soriasis es un trastorno de la piel inflamatorio y proliferativo con una prevalencia de 1.5-3%. Aproximadamente 20% de los pacientes con soriasis desarrollan una forma característica de artritis que tiene diversos patrones (Gladman,

. 000033

1992; Jones et al., 1994; Gladman et al., 1995). Algunos individuos presentan síntomas de articulación primero pero la mayoría, presentan primero soriasis en la piel. Aproximadamente un tercio de los pacientes tienen exacerbaciones simultáneas de su piel y enfermedad de articulación (Gladman et al., 1987) y existe una relación topográfica entre las uñas y enfermedad de articulaciones interfalangeal distal (Jones et al., 1994; Wright, 1956). Aunque los procesos inflamatorios que enlazan enfermedad de piel, uñas y articulaciones permanecen elusivos, está implicada una patología mediada inmune.

[0058] La artritis soriática (PsA) es una artropatía inflamatoria crónica caracterizada por la asociación de artritis y soriasis y se reconoce como una entidad clínica distinta de la artritis reumatoide (RA) en 1964 (Blumberg et al., 1964). Los estudios posteriores han revelado que el PsA presenta un número de características genéticas, patogénicas y clínicas con otras espondiloartropatías (SpAs), un grupo de enfermedades que comprenden espondiloartritis anquilosante, artritis reactiva y artritis enteropática (Wright, 1979). La noción que el PsA pertenece al grupo SpA ha obtenido recientemente apoyo adicional a partir de estudios de formación de imágenes que demuestran la entesitis generalizada, que incluyen PsA pero no RA (McGonagle et al., 1999; McGonagle et al., 1998). Más específicamente, la entesitis se ha postulado como uno de los primeros eventos más tempranos que ocurren en los SpAs, que conducen a remodelamiento óseo y anquilosis en la columna vertebral, así como también a sinovitis articular cuando la entesis inflamada está cerca a las articulaciones periféricas. Sin embargo, el enlace entre entesitis y las manifestaciones clínicas en el PsA permanecen en su mayoría no claras, cuando el PsA se puede presentar con patrones claramente heterogéneos de la implicación de las articulaciones con grados variables de severidad (Marsal et al., 1999; Salvarani et al., 1998). Así, se deben postular otros factores para dar en cuenta de las múltiples características de PsA, solo unos pocos de los cuales (tal como la expresión de la molécula HLA-B27, que se asocia fuertemente con enfermedad axial)

000034

se han identificado. Como una consecuencia, permanece difícil de mapear las manifestaciones de la enfermedad para mecanismos patogénicos específicos, que significa que el tratamiento de esta afección permanece en su mayoría empírico.

[0059] Los estudios de familia han sugerido contribución genética para el desarrollo de PsA (Moll & Wright, 1973). Otras formas inflamatorias crónicas de artritis, tales como espondiloartritis anquilosante y artritis reumatoide, se considera que tienen una base genética compleja. Sin embargo, el componente genético del PsA ha sido difícil de evaluar por diversas razones. Existe una evidencia fuerte de una predisposición genética a la soriasis sola que puede enmascarar los factores genéticos que son importantes para el desarrollo de PsA. Aunque la mayoría aceptaría el PsA como una enfermedad distinta, a veces hay una superposición fenotípica con artritis reumatoide y espondiloartritis anquilosante. También, el PsA en sí mismo no es una afección homogénea y se han propuestos diversos subgrupos. Aunque no todos estos factores de confusión fueron superados en el actual estudio, nos concentramos en investigar genes candidatos en tres categorías amplias de pacientes con PsA que cubren el espectro de la enfermedad.

[0060] Los polimorfismos en la región promotora de la región TNFA son de considerable interés cuando pueden influenciar niveles de secreción TNF- α (Jacob et al., 1990; Bendzen et al., 1988). Las cantidades incrementadas de TNF- α se han reportado en la piel soriática (Ettehadi et al., 1994) y fluido sinovial (Partsch et al., 1997).

[0061] Estudios recientes han mostrado un beneficio positivo de tratamiento anti-TNF en PsA (Mease et al., 2000) y espondiloartritis anquilosante (Brandt et al., 2000). Adicionalmente, el locus para los residuos TNF- α dentro de la región clase III del MHC y así puede proporcionar asociaciones más estrictas con PsA de aquellos proporcionados mediante regiones de flaqueo clase I y clase II. Existen asociaciones

relativamente débiles con los alelos TNFA en nuestro grupo total PsA. El alelo TNFA -238A no común se incrementa en frecuencia en el grupo con poliartritis periférica y ausente en aquellos pacientes con espondiloartritis, aunque se puede explicar este hallazgo mediante desequilibrio de ligado con HLA-Cw*0602. Si existen consecuencias funcionales asociadas con polimorfismo en el alelo TNFA -238 no es claro (Pociot et al., 1995). No obstante, es posible que el patrón de artritis que se desarrolla en pacientes con soriasis se pueden unir directamente o indirectamente a este alelo particular.

[0062] Hohler et al. (1997) encuentra un aumento en la frecuencia del alelo TNFA -238A en pacientes con PsA así como también en soriasis de inicio juvenil. La asociación del TNFA -238A con soriasis de inicio juvenil y el PsA es más fuerte que con HLA-Cw6. De forma similar, en nuestro estudio, existen asociaciones fuertes entre soriasis de inicio juvenil y el HLA-Cw*0602 y el TNFA -238A, aunque ningún alelo tiene ninguna relación con la edad del inicio de artritis. En nuestro estudio, todos los pacientes con PsA quienes tiene por lo menos un alelo TNFA -238A son HLA-Cw6 positivos, enfatizando en el ligado cerrado entre estos alelos en PsA. Sin embargo, en contraste al estudio por Hohler et al. (1997), y explicable por ligado cerrado a HLA-Cw*0602, el alelo TNFA -238A solo se incrementa en pacientes con artritis periférica. También es de interés que, en un estudio separado de espondiloartritis anquilosante, el mismo grupo encuentra los alelos TNFA -308A y -238A no comunes que tienen un efecto protector en el desarrollo de la espondiloartritis (Hohler et al., 1998).

C. Artritis Reactiva

[0063] En la artritis reactiva (ReA) el mecanismo del daño articular no es claro, pero es probable que las citoquinas cumplan funciones críticas. Se ha reportado Un perfil más prevalente Th1 de altos niveles de interferón gama (IFN- γ) y bajos niveles de interleuquina 4 (IL-4) (Laheesmaa et al., 1992;

Schlaak et al., 1992; Simon et al., 1993; Schlaak et al., 1996; Kotake et al., 1999; Ribbens et al., 2000), pero diversos estudios mostrados tienen predominancia relativa de IL-4 y IL-10 y carencia relativa de IFN- γ y factor alfa de necrosis de tumor (TNF- α) en la membrana sinovial (Simon et al., 1994; Yin et al., 1999) y fluido (SF) (Yin et al., 1999; Yin et al., 1997) de pacientes con artritis reactiva comparado con pacientes con artritis reumatoide (RA). Se ha reportado un nivel inferior de secreción TNF- α en artritis reactiva que en pacientes RA después de estímulo ex vivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Braun et al., 1999).

[0064] Se ha argumentado que la depuración de bacterias asociadas con artritis reactiva requiere la producción de niveles apropiados de IFN- γ y TNF- α , mientras que el IL-10 actúa al suprimir estas respuestas (Autenrieth et al., 1994; Sieper & Braun, 1995). El IL-10 es una citoquina reguladora que inhibe la síntesis de IL-12 y TNF- γ mediante macrófagos activados (de Waal et al., 1991; Hart et al., 1995; Chomarat et al., 1995) y de IFN- γ mediante células T (Macatonia et al., 1993).

D. Artritis Enteropática

[0065] La Artritis enteropática (EA) ocurre en combinación con enfermedad inflamatorias del intestino (IBD) tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa. También se afecta la columna vertebral y articulaciones sacroiliacas. La artritis enteropática involucra las articulaciones periféricas, usualmente en las extremidades inferiores tales como las rodillas o los tobillos. Implica comúnmente solo un número pequeño o limitado de articulaciones y puede seguir de cerca la afección del intestino. Esto ocurre en aproximadamente 11% de los pacientes con colitis ulcerativa y 21% de aquellos con enfermedad de Crohn. La sinovitis es de manera genera autolimitado y no deformante.

000037

[0066] Las artropatías enteropáticas comprenden una colección de afecciones reumatológicas que comparten un vínculo con la patología GI. Estas afecciones incluyen artritis reactiva (es decir, relacionada con infección) debido a bacterias (por ejemplo, especies *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Clostridium difficile*), parásitos (por ejemplo, especies *Strongyloides stercoralis*, *Taenia saginata*, *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*, *Cryptosporidium*), y espondiloartropatías asociadas con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Otras afecciones y trastornos que incluyen derivación intestinal (yeyunoileal), artritis, enfermedad celiaca, enfermedad de Whipple, y colitis colagenosa.

[0067] Son desconocidas las cantidades precisas de artropatías enteropáticas. La inflamación del tracto GI puede aumentar la permeabilidad, que resulta en la absorción del material antigénico, que incluye antígenos bacterianos. Estos antígenos artrogénicos luego se pueden localizar en los tejidos musculoesqueléticos (que incluyen entesis y sinovio), provocando así una respuesta inflamatoria. Alternativamente, se puede inducir una respuesta autoinmune a través de imitación molecular, en la que la respuesta inmune anfitriona a estos antígenos que reaccionan cruzadamente con los autoantígenos en el sinovio.

[0068] Es de interés particular la asociación fuerte entre la artritis reactiva y HLA-B27, una molécula HLA clase I. Un péptido de antígeno bacteriamente derivado, potencialmente artrogénico se puede fijar en la ranura que presenta antígeno de la molécula B27, que resulta en una respuesta de células T CD8⁺. Las ratas transgénicas HLA-B27 desarrollan características de artropatía enteropática con artritis e inflamación por gota.

E. Colitis Ulcerativa

[0069] La colitis ulcerativa es una enfermedad que provoca inflamación y llagas, denominadas úlceras, en el recubrimiento del intestino grueso. La inflamación ocurre usualmente. e000038

recto y la parte inferior del colon, pero este puede afectar el colon completo. La colitis ulcerativa afecta raramente el intestino delgado excepto para la sección final, denominada el íleo terminal. La colitis ulcerativa también se puede denominar colitis o proctitis. La inflamación hace frecuentemente el colon vacío, originando diarrea. Las úlceras se forman en sitios en donde la inflamación ha matado las células que recubren el colon; las úlceras sangran y se produce pus.

[0070] La colitis ulcerativa es una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), el nombre general para las enfermedades que originan inflamación en el intestino delgado y colon. La colitis ulcerativa puede ser difícil de diagnosticar debido a que sus síntomas son similares a otros trastornos intestinales y con otro tipo de IBD, enfermedad de Crohn. La enfermedad de Crohn difiere de la colitis ulcerativa debido a que esta origina inflamación más profunda dentro de la pared intestinal. También, la enfermedad de Crohn ocurre usualmente en el intestino delgado, aunque también puede ocurrir en la boca, esófago, estómago, duodeno, intestino grueso, apéndice, y ano.

[0071] La colitis ulcerativa puede ocurrir en personas de cualquier edad, pero más frecuentemente esta inicia entre edades de 15 y 30, o menos frecuentemente entre edades de 50 y 70. Los niños y adolescentes algunas veces desarrollan la enfermedad. La colitis ulcerativa afecta hombres y mujeres por igual y aparece con frecuencia en algunas familias. Las teorías acerca de qué origina la colitis ulcerativa son numerosas, pero no se ha probado ninguna. La teoría más popular es que el sistema inmune corporal reacciona con un virus o una bacteria al originar inflamación en curso en la pared intestinal. Las personas con colitis ulcerativa tienen anormalidades del sistema inmune, pero los doctores no saben si estas anormalidades son una causa o un resultado de la enfermedad. La colitis ulcerativa no se origina por ansiedad emocional o sensibilidad a ciertos alimentos o productos alimenticios, pero estos factores pueden activar los síntomas en algunas personas.

. 000039

[0072] Los síntomas más comunes de colitis ulcerativa son dolor abdominal y diarrea con sangre. Los pacientes también pueden experimentar fatiga, pérdida de peso, pérdida del apetito, sangrado rectal, y pérdida de los fluidos corporales y nutrientes. Aproximadamente la mitad de los pacientes tiene síntomas leves. Otros sufren frecuentemente fiebre, diarrea con sangre, náusea, y calambres abdominales severos. La colitis ulcerativa también puede originar problemas tales como artritis, inflamación de los ojos, enfermedad del hígado (hepatitis, cirrosis, y colangitis esclerosante primaria), osteoporosis, erupciones de la piel, y anemia. Nadie sabe a ciencia cierta porqué se producen los problemas al exterior del colon. Los científicos piensan que pueden ocurrir estas complicaciones cuando el sistema inmune activa la inflamación en otras partes del cuerpo. Algunos de estos problemas desaparecen cuando se trata la colitis.

[0073] A través de un examen físico y una serie de pruebas se puede requerir diagnosticar la colitis ulcerativa. Se pueden hacer pruebas de sangre para revisar la anemia, que puede indicar sangrado en el colon o recto. Las pruebas de sangre tampoco puede cubrir un conteo alto de glóbulos blancos, que es un signo de inflamación en alguna parte en el cuerpo. Al analizar una muestra de heces, el doctor puede detectar el sangrado o infección en el colon o el recto. El doctor puede hacer una colonoscopia o sigmoidoscopia. Para prueba, el doctor inserta un endoscopio - un tubo largo, flexible, con luz conectado a un computador y monitor de TV - en el ano para ver el lado del colon y recto. El doctor será capaz de ver cualquier inflamación, sangrado, o úlceras en la pared del colon. Durante el examen, el doctor puede hacer una biopsia, que involucra tomar una muestra de tejido del recubrimiento del colon para ver con un microscopio. También se puede requerir un enema de bario de rayos x del colon. Este procedimiento implica llenar el colon con bario, una solución blanquecina. El bario se muestra blanco en películas de rayos x, lo que le permite al doctor una vista clara del colon, que

. 000040

incluyen cualesquier úlceras u otras anormalidades que pueden existir.

[0074] El tratamiento para la colitis ulcerativa depende de la seriedad de la enfermedad. La mayoría de personas se tratan con medicación. En casos severos, un paciente puede necesitar cirugía para retirar el colon enfermo. La cirugía es solo la cura para la colitis ulcerativa. Algunas personas cuyos síntomas se activan mediante ciertos alimentos son capaces de controlar los síntomas al evitar alimentos que molestan sus intestinos, como alimentos altamente sazonados, frutos y vegetales crudos, o azúcar en leche (lactosa). Cada persona puede experimentar colitis ulcerativa en forma diferente, ya que el tratamiento se ajusta para cada individuo. Es importante el soporte emocional y psicológico. Algunas personas tienen remisiones - periodos cuando los síntomas desaparecen - durante meses o aún años. Sin embargo, la mayor parte de los síntomas del paciente regresan eventualmente. Este patrón de cambio de la enfermedad significa que uno no siempre puede saber si un tratamiento ha ayudado. Algunas personas con colitis ulcerativa pueden necesitar cuidado médico durante algún tiempo, con visitas regulares al doctor para monitorear la afección.

[0075] El objetivo de la terapia es para inducir y mantener remisión, y para mejorar la calidad de vida de las personas con colitis ulcerativa. Están disponibles diversos tipos de fármacos:

- Aminosalicilatos - fármacos que contienen ácido 5-aminosalicíclico (5-ASA), ayudan a controlar la inflamación. Sulfasalazina es una combinación de sulfapiridina y 5-ASA y se utiliza para inducir y mantener la remisión. El componente de sulfapiridina lleva el 5-ASA anti-inflamatorio al intestino. Sin embargo, la sulfapiridina puede conducir a efectos colaterales tales como que incluyen náusea, vómito, ardor de estómago, diarrea, y jaqueca. Otros agentes 5-ASA tales como olsalazina, mesalamina, y balsalazida, tienen

un portador diferente, ofrece pocos efectos colaterales, y se pueden utilizar por las personas quienes no pueden tomar sulfasalazina. Los 5-ASA se dan oralmente, a través de un enema, o en un supositorio, dependiendo de la ubicación de la inflamación en el colon. La mayoría de las personas con colitis ulcerativa leve o moderada se tratan primero con este grupo de fármacos.

- Corticosteroides - tales como prednisona e hidrocortisona también reducen la inflamación. Ellos se pueden utilizar por personas quienes tienen colitis ulcerativa moderada o severa o quienes no responden a fármacos 5-ASA. Los corticosteroides, también conocidos como esteroides, se pueden dar oralmente, intravenosamente, a través de un enema, o en un supositorio, dependiendo de la ubicación de la inflamación. Estos fármacos pueden originar efectos colaterales tales como ganancia de peso, acné, vello facial, hipertensión, cambios de humor, y un riesgo incrementado de infección. Por esta razón, no se recomiendan para uso a largo plazo.
- Inmunomoduladores - tales como azatioprina y 6-mercaptopurina (6-MP) reducen la inflamación al afectar el sistema inmune. Ellos se utilizan en pacientes quienes no han respondido a 5-ASA o corticosteroides o quienes son dependientes de los corticosteroides. Sin embargo, los inmunomoduladores que actúan lento y pueden tomar hasta 6 meses antes que se vea beneficio completo. Los pacientes que toman estos fármacos se monitorean para complicaciones que incluyen pancreatitis y hepatitis, un conteo celular reducido de glóbulos blancos, y un riesgo aumentado de infección. Se puede utilizar ciclosporina A con 6-MP o azatioprina para tratar colitis ulcerativa severa, activa en personas quienes no responden a los corticosteroides intravenosos.

[0076] Se pueden dar otros fármacos para relajar el paciente o para aliviar el dolor, diarrea, o infección.

[0077] Ocasionalmente, los síntomas son suficientemente severos que la persona se tiene que hospitalizar. Por ejemplo, una persona puede tener sangrado severo o diarrea severa que provoca deshidratación. En tales casos el doctor tratará de detener la diarrea y la pérdida de sangre, fluidos, y sales minerales. El paciente puede necesitar una dieta especial, alimentada a través de la vena, medicaciones, o algunas veces cirugía.

[0078] Aproximadamente 25-40% de pacientes con colitis ulcerativa pueden tener eventualmente sus colones retirados debido al sangrado masivo, enfermedad severa, ruptura del colon, o riesgo de cáncer. Algunas veces el doctor recomendará retirar el colon si falla el tratamiento médico o si los efectos colaterales de los corticosteroides u otros fármacos amenazan la salud del paciente. La cirugía para retirar el colon y el recto, conocida como proctocolectomía, se sigue por una de las siguientes:

- Ileostomía, en la que el cirujano crea una abertura pequeña en el abdomen, llamada una estoma, y se adhiere al final del intestino delgado, llamado íleo, a este. El desperdicio viajará a través del intestino delgado y sale del cuerpo a través de la estoma. La estoma tiene aproximadamente el tamaño de una moneda y se ubica usualmente en la parte derecha inferior del abdomen cerca a la línea de la cintura. Se coloca una bolsa sobre la abertura para recolectar el desperdicio, y el paciente vacía la bolsa según se necesita.
- Anastomosis ileoanal, u operación a través de recepción, que le permite al paciente tener movimientos normales del intestino debido a que este conserva parte del ano. En esta operación, el cirujano remueve la parte enferma del colon y el interior de recto, dejando los músculos externos del recto. El cirujano luego une el íleo al

000043

interior del recto y el ano, creando una bolsa. El desperdicio se almacena en la bolsa y se pasa a través del ano en la forma usual. Los movimientos del intestino pueden ser más frecuentes y acuosos que antes del procedimiento. La inflamación de la bolsa (pouchitis) es una posible complicación.

[0079] No es apropiada cada operación para cada persona. La cirugía dependerá de la severidad de la enfermedad y las necesidades, expectativas, y estilo de vida del paciente. Las personas que se enfrentan con esta decisión deben obtener tanta información como sea posible al hablar con sus doctores, con enfermeras quienes trabajan con pacientes de cirugía de colon (terapistas enterostómicas), y con otros pacientes de cirugía de colon. Las organizaciones de defensa del paciente pueden dirigir a las personas a los grupos de apoyo y otras fuentes de información.

[0080] La mayoría de las personas con colitis ulcerativa nunca necesitará tener cirugía. Si la cirugía no llega a ser necesaria, sin embargo, algunas personas encuentran comodidad en saber que después de la cirugía, se cura la colitis y la mayoría de las personas tienen vidas activas normales.

F. Enfermedad de Crohn

[0081] Otro trastorno para el que se ha tratado la inmunosupresión es enfermedad de Crohn. Los síntomas de enfermedad de Crohn incluyen inflamación intestinal y el desarrollo de estenosis intestinal y fistulas; la neuropatía acompaña frecuentemente estos síntomas. Los fármacos anti-inflamatorios, tales como 5-aminosalicilatos (*por ejemplo*, mesalamina) o corticosteroides, se prescriben típicamente, pero no siempre son efectivos (revisado en Botoman et al., 1998). La inmunosupresión con ciclosporina es algunas veces beneficiosa para pacientes resistentes a o intolerantes a los corticosteroides (Brynskov et al., 1989).

000044

[0082] No obstante, la corrección quirúrgica se requiere eventualmente en 90% de los pacientes; 50% experimentan resección colónica (Leiper et al., 1998; Makowiec et al., 1998). Es alto el índice de recurrencia después de cirugía, con 50% requiere cirugía adicional dentro de 5 años (Leiper et al., 1998; Besnard et al., 1998).

[0083] Una hipótesis para la etiología de la enfermedad de Crohn es que una falla de la barrera mucosal intestinal, resulta posiblemente de susceptibilidades genéticas y factores ambientales (por ejemplo, fumar), se expone al sistema inmune a antígenos del lumen intestinal que incluye antígenos bacterianos y alimentos (por ejemplo, Soderholm et al., 1999; Hollander et al., 1986; Hollander, 1992). Otras hipótesis es que la infección intestinal persistente por patógenos tales como *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, abnormal *Escherichia coli*, o paramyxovirus, estimula la respuesta inmune; o alternativamente, los síntomas resultan de una respuesta inmune desregulada a los antígenos en todas partes, tales como microflora intestinal normal y los metabolitos y las toxinas que producen (Sartor, 1997). La presencia de anticuerpos IgA y IgG anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) en el suero se encuentra que es altamente diagnóstico en enfermedad de Crohn pediátrica (Ruemmele et al., 1998; Hoffenberg et al., 1999).

[0084] En la enfermedad de Crohn, una respuesta inmune desregulada se inclina hacia inmunopatología mediada por célula (Murch, 1998). Pero los fármacos inmunosupresores, tales como ciclosporina, tacrolimus, y mesalamina se han utilizado para tratar casos resistentes a los corticosteroides de enfermedad de Crohn con éxito mezclado (Brynskov et al., 1989; Fellerman et al., 1998).

[0085] Se han enfocado recientes esfuerzos para desarrollar herramientas de tratamiento y diagnósticas contra la enfermedad de Crohn en la función central de las citoquinas (Schreiber, 1998; van Hogezaand & Verspaget, 1998). Las citoquinas son

proteínas secretadas pequeñas o factores (5 a 20 kD) que tienen efectos específicos en las interacciones célula a célula, comunicación intercelular, o el comportamiento de otras células. Se producen citoquinas mediante linfocitos, especialmente linfocitos T_H1 y T_H2 , monocitos, macrófagos intestinales, granulocitos, células epiteliales, y fibroblastos (reviewed in Rogler & Andus, 1998; Galley & Webster, 1996). Algunas citoquinas son pro-inflamatorias (por ejemplo, $TNF-\alpha$, $IL-1(\alpha$ y $\beta)$, $IL-6$, $IL-8$, $IL-12$, o factor inhibidor de leucemia, o LIF); otros son anti-inflamatorios (por ejemplo, antagonista del receptor $IL-1$, $IL-4$, $IL-10$, $IL-11$, y $TGF-\beta$). Sin embargo, puede haber una sobreposición y redundancia funcional en sus efectos bajo ciertas condiciones inflamatorias.

[0086] En casos activos de enfermedad de Crohn, concentraciones elevadas de $TNF-\alpha$ y $IL-6$ se secretan en la circulación de la sangre, y $TNF-\alpha$, $IL-1$, $IL-6$, y $IL-8$ se producen en exceso localmente mediante células mucosales (*id.*; Funakoshi et al., 1998). Estas citoquinas pueden tener efectos que varían mucho en los sistemas fisiológicos que incluyen desarrollo óseo, hematopoyesis, y función de hígado, tiroides, y neurosiquiática. También, un imbalance de la relación $IL-1\beta/IL-1ra$, en favor del $IL-1\beta$ pro-inflamatorio, se ha observado en pacientes con enfermedad de Crohn (Rogler & Andus, 1998; Saiki et al., 1998; Dionne et al., 1998; pero ver Kuboyama, 1998). Un estudio sugiere que los perfiles de citoquina en muestras de herramienta pueden ser una herramienta diagnóstica útil para enfermedad de Crohn (Saiki et al., 1998).

[0087] Los tratamientos que se han propuesto para enfermedad de Crohn incluyen el uso de diversos antagonistas de citoquina (por ejemplo, $IL-1ra$), inhibidores (por ejemplo, de antioxidantes y enzimas que convierten $IL-1\beta$) y anticuerpos anti-citoquina (Rogler and Andus, 1998; van Hogezaand & Verspaget, 1998; Reimund et al., 1998; Luger et al., 1998; McAlindon et al., 1998). En particular, se han ensayado anticuerpos monoclonales contra el

TNF- α con algún éxito en el tratamiento de enfermedad de Crohn (Targan et al., 1997; Stack et al., 1997; van Dullemen et al., 1995).

[0088] Otro método para el tratamiento de enfermedad de Crohn se ha enfocado en por lo menos erradicar parcialmente la comunidad bacteriana que puede activar la respuesta inflamatoria y reemplazarla con una comunidad no patogénica. Por ejemplo, la Patente Estadounidense 5,599,795 describe un método para la prevención y el tratamiento de enfermedad de Crohn en pacientes humanos. Sus métodos está dirigido a estabilizar el tracto intestinal con por lo menos un antibiótico y por lo menos un agente antifúngico para matar la flora existente y reemplazándola con diferentes bacterias bien caracterizadas, seleccionadas tomadas de humanos normales. Borody enseña un método para tratar enfermedad de Crohn mediante por lo menos el retiramiento parcial de la microflora intestinal existente mediante lavado y reemplazo con una nueva comunidad bacteriana introducida por el inóculo fecal de un donante humano que se le detecta la enfermedad o mediante una composición que comprende las especies *Bacteroides* y *Escherichia coli*. (Patente Estadounidense 5,443,826). Sin embargo, no se ha conocido causa para la enfermedad de Crohn a la que se ha dirigido el diagnóstico y/o el tratamiento.

G. Artritis Reumatoide

[0089] La etiología exacta del RA permanece desconocido, pero los primeros signos de enfermedad de las articulaciones aparecen en la capa sinovial de recubrimiento, con proliferación de fibroblastos sinoviales y su adhesión a la superficie articular en el margen de la articulación (Lipsky, 1998). Posteriormente, se reclutan los macrófagos, células T y otras células inflamatorias en la articulación, cuando producen un número de mediadores, que incluyen las citoquinas interleuquina-1 (IL-1), que contribuye a las secuelas crónicas que conducen a destrucción de cartílago y huesos, y factor de necrosis de tumor (TNF- α), que cumple una función en la inflamación (Dinarello, 1998; Arend &

000047

Dayer, 1995; van den Berg, 2001). La concentración de IL-1 en plasma es significativamente mayor en pacientes con RA que en individuos saludables y, notablemente, los niveles de plasma IL-1 se correlacionan con actividad de la enfermedad RA (Eastgate et al., 1988). Más aún, los niveles de fluido sinovial de IL-1 se correlacionan con diversas características radiográficas e histológicas de RA (Kahle et al., 1992; Rooney et al., 1990).

[0090] En articulaciones normales, los efectos de estas y otras citoquinas proinflamatorias se balancean mediante una variedad de citoquinas anti-inflamatorias y factores reguladores (Burger & Dayer, 1995). La significancia de este balance de citoquina se ilustra en pacientes RA juveniles, quienes tienen incrementos cíclicos en fiebre a lo largo del día (Prieur et al., 1987). Después de cada pico de fiebre, un factor que bloquea los efectos del IL-1 se encuentra en el suero y la orina. Este factor se ha aislado, clonado e identificado como el antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra), un miembro de la familia de gen IL-1 (Hannum et al., 1990). El IL-1ra, como su nombre lo indica, es un antagonista receptor natural que compite con IL-1 para la unión a los receptores IL-1 tipo I y, como un resultado, bloquea los efectos del IL-1 (Arend et al., 1998). Se puede necesitar un exceso de 10- a 100 veces de IL-1ra para bloquear el IL-1 efectivamente; sin embargo, las células sinoviales aisladas de los pacientes con RA no aparecen para producir suficiente IL-1ra para contrarestar los efectos del IL-1 (Firestein et al., 1994; Fujikawa et al., 1995).

H. Lupus Sistémico Eritematoso

[0091] Tampoco se ha conocido la causa de las enfermedades autoinmunes tales como lupus sistémico eritematoso. El lupus sistémico eritematoso (SLE) es una enfermedad reumática autoinmune caracterizada por el depósito en los tejidos de autoanticuerpos y complejos inmunes que conducen a lesión del tejido (Kotzin, 1996). En contraste a las enfermedades autoinmunes tales como MS y diabetes mellitus tipo 1, el SLE

involucra potencialmente múltiples sistemas de órgano directamente, y sus manifestaciones clínicas son diversas y variables (revisadas por Kotzin & O'Dell, 1995). Por ejemplo, algunos pacientes pueden demostrar principalmente erupciones de la piel y dolor de las articulaciones, muestran remisiones espontáneas, y requieren poca medicación. Al otro extremo del espectro son pacientes quienes demuestran involucramiento de riñón severo y progresivo que requiere terapia con altas dosis de esteroides y fármacos citotóxicos tales como ciclofosfamida (Kotzin, 1996).

[0092] La característica serológica principal de SLE, y la prueba diagnóstica primaria disponible, es niveles de suero elevados de los anticuerpos IgG a los constituyentes del núcleo celular, tal como ADN bicatenario (dsADN), ADN monocatenario (ss-ADN), y cromatina. Entre estos autoanticuerpos, los IgG anti-dsADN IgG cumplen una función principal en el desarrollo de glomerulonefritis de lupus (G N) (Hahn & Tsao, 1993; Ohnishi et al., 1994). La glomerulonefritis es una afección seria en la que las paredes capilares de los glomérulos que purifican la sangre del riñón se espesan mediante acumulaciones sobre el lado epitelial de las membranas de base glomerular. La enfermedad es frecuentemente crónica y progresiva y puede conducir a falla renal eventual.

[0093] Los mecanismos mediante los cuales se inducen los autoanticuerpos en estas enfermedades autoinmunes permanece no claro. Como no se ha conocido la causa del SLE, a la que se puede dirigir el diagnóstico y/o tratamiento, el tratamiento se ha dirigido a suprimir las respuestas inmunes, por ejemplo con antibióticos macrolida, a diferencia de una causa subyacente. (por ejemplo, Patente Estadounidense 4,843,092).

I. Síndrome Irritable del Intestino

[0094] El síndrome irritable del intestino (IBS) es un trastorno funcional caracterizado por dolor abdominal y hábitos de

. 000049

intestino alterados. Este síndrome puede empezar en el adulto joven y se puede asociar con discapacidad significativa. Este síndrome no es un trastorno homogéneo. Por el contrario, se han descrito los subtipos de IBS sobre la base de la diarrea de síntoma predominante, estreñimiento, o dolor. En la ausencia de los síntomas "alarma", tales como fiebre, pérdida de peso, y hemorragia gastrointestinal, se necesita un trabajo limitado. Una vez se hace un diagnóstico de IBS, un método de tratamiento integrado puede reducir efectivamente la severidad de los síntomas. El IBS es un trastorno común, aunque han variado sus índices de prevalencia. En general, el IBS afecta aproximadamente 15% de los adultos Estadounidenses y ocurre aproximadamente tres veces más frecuentemente en mujeres que en hombres (Jailwala et al., 2000).

[0095] El IBS se cuenta entre 2.4 millones y 3.5 millones de visitas a los médicos cada año. Esta no es solo la afección más común vista por los gastroenterólogos sino también es una de las afecciones gastrointestinales más comunes vistas por los médicos de cuidado primario (Everhart et al., 1991; Sandler, 1990).

[0096] El IBS también es un trastorno costoso. Comparado con personas quienes no tienen síntomas del intestino, las personas con IBS pierden tres veces de días laborales y probablemente se reportan más enfermos al trabajo (Drossman et al., 1993; Drossman et al., 1997). Más aún, aquellos con IBS incurren en cientos de dólares más en los cargos médicos que las personas sin trastornos del intestino (Talley et al., 1995).

[0097] La anormalidad específica no cuenta para la exacerbación y la remisión de dolor abdominal y hábitos de intestino alterados experimentados por los pacientes con IBS. La teoría de la evolución del IBS sugiere desregulación en múltiples niveles del eje cerebro-intestino. Se ha implicado dismotilidad, hipersensibilidad visceral, modulación anormal del sistema nervioso central (SNC), e infección. Adicionalmente, los factores fisicoquímicos cumplen una función modificada importante. La

motilidad intestinal anormal se ha considerado un factor en la patogenia del IBS. El tiempo de tránsito a través del intestino delgado después de una comida se ha mostrado que es más corto en pacientes con IBS predominante a la diarrea que en pacientes quienes tienen el subtipo predominante de dolor o predominante de estreñimiento (Cann et al., 1983).

[0098] En estudios del intestino durante ayuno, la presencia de contracciones agrupadas discretas y prolongadas, las contracciones propagadas se han reportado en pacientes con IBS (Kellow & Phillips, 1987). Ellos también experimentan dolor con contracciones irregulares más frecuentemente que las personas saludables (Kellow & Phillips, 1987; Horwitz & Fisher, 2001).

[0099] Estos hallazgos de motilidad no cuentan para el síntoma completo complejo en pacientes con IBS; de hecho, la mayoría de estos pacientes no tienen anormalidades demostrables (Rothstein, 2000). Los pacientes con IBS han aumentado la sensibilidad de dolor visceral. Los estudios involucran distensión de balón del colon rectosigmoide ha mostrado que los pacientes con IBS experimentan dolor y coagulación en presiones y volúmenes mucho menores que los sujetos de control (Whitehead et al., 1990). Estos pacientes mantienen percepción normal del estímulo somático.

[00100] Se han propuesto múltiples teorías para explicar este fenómeno. Por ejemplo, los receptores en la víscera pueden tener sensibilidad aumentada en respuesta a distensión o contenidos intraluminales. Las neuronas en asta posterior de la médula espinal pueden tener excitabilidad aumentada. Adicionalmente, se puede involucrar la alteración en el procesamiento del SNC de las sensaciones (Drossman et al., 1997). Los estudios de formación de imágenes de resonancia magnética funcional han mostrado recientemente que comparado con los sujetos de control, los pacientes con IBS tienen activación aumentada de la corteza cingulada anterior, un centro de dolor importante, en respuesta al estímulo rectal doloroso (Mertz et al., 2000).

[00101] De forma aumentada, la evidencia sugiere una relación entre la enteritis infecciosa y el desarrollo posterior del IBS. Las citoquinas inflamatorias pueden cumplir una función. En una encuesta de pacientes con una historia de gastroenteritis bacteriana confirmada (Neal et al., 1997), alteración persistente reportada al 25% con los hábitos del intestino. La persistencia de los síntomas puede ser debido a la tensión psicológica al momento de infección aguda (Gwee et al., 1999).

[00102] Datos recientes sugieren que el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado puede tener una función en los síntomas IBS. En un estudio (Pimentel et al., 2000), 157 (78%) de los 202 pacientes IBS referidos para prueba de respiración tienen hallazgos de prueba que son positivos para el sobrecrecimiento bacteriano. De los 47 sujetos quienes tienen han seguido la prueba, 25 (53%) reportan mejoramiento en los síntomas (es decir, dolor abdominal y diarrea) con el tratamiento antibiótico.

[00103] El IBS puede estar presente con un rango de síntomas. Sin embargo, el dolor abdominal y los hábitos de intestino alterado permanece las características primarias. El malestar abdominal se describe frecuentemente como calambres y se ubica en el cuadrante inferior izquierdo, aunque puede diferir grandemente la severidad y ubicación. Los pacientes pueden reportar diarrea, estreñimiento, o episodios alternantes de diarrea y estreñimiento. Los síntomas de diarrea se describen típicamente como heces blandas de volumen pequeño, y las heces se acompañan algunas veces por descarga de moco. Los pacientes también pueden reportar hemorragia, urgencia fecal, evacuación incompleta, y distensión abdominal. También pueden estar presentes síntomas gastrointestinales superiores, tales como reflujo gastroesofágico, dispepsia, o náusea (Lynn & Friedman, 1993).

[00104] La persistencia de los síntomas no es una indicación de prueba adicional; esta es una característica de IBS y es en sí misma un síntoma inesperado del síndrome. La evaluación

diagnóstica más extensa se indica en pacientes cuyos síntomas se empeoran o cambian. Las indicaciones para prueba adicional también incluyen la presencia de síntomas alarma, inicio de síntomas después de los 50 años, y una historia familiar de cáncer de colon. Las pruebas pueden incluir colonoscopia, tomografía computarizada del abdomen y pelvis, y estudios de bario del intestino delgado o grueso.

J. Artritis Reumatoide Juvenil

[00105] La artritis reumatoide juvenil (JRA), un término para la forma más prevalente de artritis en niños, se aplica a una familia de enfermedades caracterizadas por inflamación crónica e hipertrofia de las membranas sinoviales. El término sobreposición, pero no es completamente sinónimo, con la familia de enfermedades denominadas como artritis crónica juvenil y/o artritis idiopática juvenil en Europa.

[00106] Jarvis (1998) y otros (Arend, 2001) han propuesto que la patogenia de la enfermedad reumatoide en adultos y niños involucra interacciones complejas entre la inmunidad adaptativa e innata. Esta complejidad se encuentra en el núcleo de la dificultad de la patogenia de la enfermedad no revelada.

[00107] Los sistemas inmunes adaptativos e innatos utilizan múltiples tipos de células, una disposición vasta de proteínas secretadas y de superficie celular, y redes interconectadas de retroalimentación positiva y negativa (Lo et al., 1999). Adicionalmente, aunque en principio separables, las alas innatas y adaptativas del sistema inmune se intersectan funcionalmente (Fearon & Locksley, 1996), y los eventos patológicos ocurren en estos puntos de intersección que son probablemente altamente relevantes a nuestro entendimiento de la patogenia de las formas de artritis crónicas de adultos y niños (Warrington, et al., 2001).

. 000053

[00108] El JRA poliarticular es un subtipo clínico distinto caracterizado por inflamación y proliferación sinovial en múltiples articulaciones (cuatro o más), que incluye las articulaciones pequeñas de las manos (Jarvis, 2002). Este subtipo de JRA puede ser severo, debido a que se involucran sus múltiples articulaciones y su capacidad de progresar rápidamente durante el tiempo. Aunque clínicamente distinto, el JRA poliarticular no es homogéneo, y los pacientes varían en manifestaciones de enfermedad, edad de inicio, pronóstico, y respuesta terapéutica. Estas diferencias reflejan muy probablemente un espectro de variación en la naturaleza de ataque inflamatorio e inmune que puede ocurrir en esta enfermedad (Jarvis, 1998).

K. Síndrome de Sjogren

[00109] El síndrome de Sjögren primario (SS) es una enfermedad autoinmune sistémica, lentamente progresiva, crónica, que afecta predominantemente mujeres de edad media (relación hembra a macho 9:1), aunque se puede ver en todas las edades incluyen niñez (Jonsson et al., 2002). Se caracteriza por infiltración linfocítica y destrucción de las glándulas exocrinas, que se infiltran mediante células mononucleares que incluyen los linfocitos CD4+, CD8+ y células B (Jonsson et al., 2002). Adicionalmente, se ven manifestaciones extraglandulares (sistémicas) en una tercera parte de los pacientes (Jonsson et al., 2001).

[00110] La infiltración linfocítica glandular es una característica progresiva (Jonsson et al., 1993), que, cuando es extensa, puede reemplazar a proporciones grandes de los órganos. De forma interesante, los infiltrados glandulares en algunos pacientes semejan de cerca microestructuras linfoides ectópicas en las glándulas salivares (denotado como centros germinales ectópicos) (Salomonsson et al., 2002; Xanthou & Polihronis, 2001). En el SS, los GC ectópicos se definen como agregados de células T y B de células proliferantes con una red de células dendríticas foliculares y células endoteliales activadas. Estas estructuras

. 000034

como GC formadas dentro del tejido objetivo también presentan propiedades funcionales con la producción de autoanticuerpos (anti-Ro/SSA y anti-La/SSB) (Salomonsson & Jonsson, 2003).

[00111] En otras enfermedades autoinmunes sistémicas, tales como RA, se han identificado los factores críticos para los GC ectópicos. Se muestra que los tejidos sinoviales reumatoides con GC producen quimioquinas CXCL13, CCL21 y linfotoxinas (LT)- β (detectadas en el centro folicular y células B de manta). El análisis de regresión multivariado de estos analitos identifican CXCL13 y LT- β como las citoquinas solitarias que predicen los GC en sinovitis reumatoide (Weyand & Goronzy, 2003). Recientemente CXCL13 y CXCR5 en glándulas salivares se ha mostrado que cumplen una función esencial en el proceso inflamatorio para el reclutamiento de células B y T, contribuyendo por lo tanto a neogenia linfoide y formación ectópica GC en SS (Salomonsson & Larsson, 2002).

L. Artritis Temprana

[00112] La presentación clínica de diferentes artropatías inflamatorias es similar casi en el curso de la enfermedad. Como un resultado, es frecuentemente difícil distinguir pacientes quienes están en riesgo de desarrollar la sinovitis severa y persistente que conduce a daño erosivo de la articulación de aquellos cuya artritis es más auto limitada. Tal distinción es crítica con el fin de dirigir la terapia apropiadamente, tratando agresivamente aquellos con enfermedad erosiva y evitando toxicidad innecesaria en pacientes con enfermedad más auto limitada. Los criterios clínicos actuales para diagnosticar artropatías erosivas tales como artritis reumatoide (RA) son menos efectivas en la enfermedad temprana y los marcadores tradicionales de enfermedad tal como conteos de articulación y respuesta de fase aguda no identificada adecuadamente en pacientes probablemente por tener resultados pobres (Harrison & Symmons et al., 1998). Los parámetros reflectivos de los eventos

- 000055

patológicos que ocurren en el sinovio son probablemente de mayor valor pronóstico significativo.

[00113] Esfuerzos recientes para identificar los predictores del resultado pobre en artritis inflamatoria temprana han identificado la presencia de autoanticuerpos específicos del RA, en particular anticuerpos hacia los péptidos citrulinados, que se van a asociar con enfermedad erosiva y persistente en cohortes de artritis inflamatoria. Sobre la base de esto, se ha desarrollado un péptido citrulinado cíclico (CCP) para asistir en la identificación de los anticuerpos anti-CCP en suero de pacientes. Utilizando este método, se ha mostrado que la presencia de los anticuerpos anti-CCP son específicos y sensibles para RA, se puede distinguir RA de otras artropatías, y se puede predecir potencialmente persistente, la sinovitis erosiva antes de estos resultados se llega a manifestar clínicamente (Schellekens et al., 2000). De forma importante, los anticuerpos anti-CCP frecuentemente detectables en suero muchos años antes de los síntomas clínicos que sugieren que pueden ser reflectivos de eventos inmunes subclínicos (Nielen et al., 2004; Rantapaa-Dahlqvist et al., 2003).

[00114] La presentación clínica de diferentes artropatías inflamatorias es similar en el curso de la enfermedad. Como resultado, es frecuentemente difícil de distinguir en pacientes quienes están en riesgo de desarrollar sinovitis severa y persistente que conduce a daño erosivo de la articulación de aquellos cuya artritis es más auto limitada. Tal distinción es crítica con el fin de dirigir la terapia apropiadamente, tratar agresivamente aquellos con enfermedad erosiva y evitando la toxicidad innecesaria en pacientes con enfermedad más autolimitada. Los criterios clínicos actuales para diagnosticar artropatías erosivas tales como artritis reumatoide (RA) son menos efectivos en enfermedad temprana y marcadores tradicionales de actividad de la enfermedad tales como conteos de la articulación y respuesta de fase aguda que no se identifica de forma adecuada en pacientes que tienen probablemente pobres

resultados (Harrison et al., 1998). Los parámetros reflectivos de los eventos patológicos ocurren en el sinovio que son más probablemente de valor pronóstico significativo.

[00115] Esfuerzos recientes para identificar los predictores de pobre resultado en artritis inflamatoria temprana han identificado la presencia de autoanticuerpos específicos RA, en particular los anticuerpos hacia los péptidos citrulinados, que se van a asociar con enfermedad erosiva y persistente en cohortes de artritis inflamatoria temprana. Sobre la base de esto, se ha desarrollado un péptido citrulinado cíclico (CCP) para asistir en la identificación de anticuerpos anti-CCP en suero del paciente. Utilizando este método, se ha mostrado que la presencia de anticuerpos anti-CCP es específica y sensible para el RA, puede distinguir RA de otras artropatías, y se puede predecir potencialmente persistente, sinovitis erosiva antes de que estos resultados se lleguen a manifestar clínicamente. De forma importante, los anticuerpos anti-CCP son frecuentemente detectables en suero muchos años antes de que los síntomas clínicos sugieran que pueden ser reflectivos de eventos inmunes subclínicos (Nielen et al., 2004; Rantapaa-Dahlqvist et al., 2003).

M. Soriasis

[00116] La soriasis es una enfermedad crónica de la piel de formación de escamas e inflamación que afecta 2 a 2.6 por ciento de la población de los Estados Unidos, o entre 5.8 y 7.5 millones de personas. Aunque la enfermedad ocurre en todos los grupos de edad, esta afecta principalmente a los adultos. Esta aparece aproximadamente igual en mujeres y hombres. La soriasis ocurre cuando las células de la piel surgen rápidamente de su origen por debajo de la superficie de la piel y se acumulan sobre la superficie antes que ellas tengan un cambio en madurez. Usualmente este movimiento (también denominado recambio) toma aproximadamente un mes, pero en la soriasis esto puede ocurrir en solo unos pocos días. En su forma típica, la soriasis resulta en

parches de piel roja (inflamada) gruesa cubierta con escamas plateadas. Estos parches, que se denominan algunas veces como placas, usualmente pican o duelen. Ellos más frecuentemente ocurren en los codos, rodillas, otras partes de las piernas, cuero cabelludo, espalda baja, rostro, palmas, y plantas de los pies, pero pueden ocurrir en la piel en cualquier parte del cuerpo. La enfermedad también puede afectar las uñas de los dedos de las manos, las uñas de los dedos de los pies, y los tejidos blandos de los genitales y dentro de la boca. Aunque no es inusual para la piel alrededor de las articulaciones afectadas se rasgue, aproximadamente 1 millón de personas con inflamación de la articulación que experimenta soriasis que produce síntomas de artritis. Esta afección se denomina artritis soriática.

[00117] La soriasis es un trastorno de la piel se dirige por el sistema inmune, que involucra especialmente un tipo de glóbulos blancos denominados como una célula T. Normalmente, las células T ayuda a proteger el cuerpo contra la infección y la enfermedad. En el caso de soriasis, las células T se ponen en acción por error y llegan a ser muy activas ya que ellas activan otras respuestas inmunes, que conducen a inflamación y a recambio rápido de las células de la piel. En aproximadamente una tercer parte de los casos, existe una historia familiar de soriasis. Los investigadores han estudiado un gran número de familias afectadas por soriasis e identifican genes enlaces a la enfermedad. Las personas con soriasis pueden notar que existen momentos cuando su piel empeora, luego mejora. Las afecciones que pueden provocar reacciones eritematosas incluyen infecciones, tensión, y cambios en el clima que resecan la piel. También, ciertas medicinas, que incluyen litio y bloqueadores beta, que se prescriben para alta presión de la sangre, pueden activar un brote o empeoramiento de la enfermedad.

N. Esclerosis múltiple

[00118] Esclerosis múltiple (abreviada MS, también conocida como esclerosis diseminada o encefalomiелitis diseminada) es una

00058

afección autoinmune en la que el sistema inmune ataca el sistema nervioso central, que conduce a desmielinización. El inicio de la enfermedad ocurre usualmente en adultos jóvenes, y es más común en las mujeres. Este tiene una prevalencia entre rangos de 2 y 150 por 100,000. El MS primero se describe en 1868 por Jean-Martin Charcot.

[00119] El MS afecta la capacidad de las células de nervio en el cerebro afecta la capacidad de las células del nervio en el cerebro y la médula espinal para comunicar uno con el otro. Las células de nervio se comunican al enviar señales eléctricas llamadas potenciales de acción por las fibras largas llamadas axones, que se envuelven en una sustancia aislante llamada mielina. En el MS, el sistema inmune propio del cuerpo ataca y daña la mielina. Cuando la mielina se pierde, los axones no pueden conducir más efectivamente las señales. El nombre de esclerosis múltiple se refiere a cicatrices (esclerosis - mejor conocidas como placas o lesiones) en las que la materia blanca del cerebro y la médula espinal, se compone principalmente de mielina. Aunque se conoce mucho más a cerca de los mecanismos involucrados en el proceso de la enfermedad, el origen permanece desconocido. Las teorías incluyen infecciones o causas genéticas. También se han encontrado diferentes factores de riesgo ambiental.

[00120] Puede aparecer casi cualquier síntoma neurológico con la enfermedad, y frecuentemente progresa en discapacidad cognitiva y física. El MS toma varias formas, con nuevos síntomas que ocurren en ataques discretos (formas de recaída) o se acumulan lentamente durante el tiempo (formas progresivas). Entre los ataques, los síntomas se pueden ir completamente, pero frecuentemente ocurren problemas neurológicos permanentes, especialmente cuando avanza la enfermedad.

[00121] No existe cura para el MS. Los tratamientos intentan funcionar después de un ataque, prevenir nuevos ataques, y prevenir discapacidad (ver discusión detallada adelante). Las

medicaciones de MS pueden tener efectos adversos o pueden ser pobremente tolerados, y muchos pacientes siguen tratamientos alternativos, a pesar de carecer del estudio científico de soporte. El pronóstico es difícil de predecir; esto depende del subtipo de la enfermedad, las características de enfermedad del paciente individual, los síntomas individuales y el grado de discapacidad que la persona experimente cuando avanza el tiempo. La expectativa de vida de los pacientes es casi igual a aquella de la población no afectada.

[00122] Los síntomas del MS aparece usualmente en periodos agudos episódicos de empeoramiento (recaídas, exacerbaciones, episodios o ataques), en un deterioro gradualmente progresivo de la función neurológica, o en una combinación de ambos.

[00123] La presentación más común del MS es el síndrome clínicamente aislado (CIS). En CIS, un paciente tiene un ataque sugestivo de desmielinización, pero no cumple completamente los criterios para esclerosis múltiple. Solo 30 a 70% de las personas experimentan CIS después de desarrollar MS. La enfermedad usualmente se presenta con síntomas sensoriales (46% de los casos), visuales (33%), cerebelares (30%) y motores (26%). También se han reportado muchos síntomas iniciales raros, que incluyen afasia, sicosis y epilepsia. Los pacientes primero buscan atención médica comúnmente presente con múltiples síntomas. Los signos y síntomas iniciales de MS son frecuentemente transitorios, leves, y auto limitados. Estos signos y síntomas frecuentemente no hacen que una persona busque atención médica y algunas veces se identifican solo retrospectivamente una vez se ha hecho el diagnóstico de MS. Los casos de MS algunas veces se identifican incidentalmente durante exámenes neurológicos desarrollados para otras causas. Tales casos se denominan como MS clínico.

[00124] La persona con MS puede sufrir casi de cualquier síntoma o signo neurológico, que incluye cambios en la sensación (hipoestesia y paraestesia), debilidad del músculo, espasmos

musculares, o dificultad en el movimiento; dificultades con coordinación y balance (ataxia); problemas en el habla (disartria) o tragar (disfagia), problemas visuales (nistagmo, neuritis óptica, o diplopia), fatiga, dolor agudo o crónico, y dificultades del intestino y la vejiga. También son comunes el deterioro cognitivo de varios grados y síntomas emocionales de depresión o humor inestable. La medición clínica principal de progresión de discapacidad y severidad del síntoma es la Escala de Estado de Discapacidad Expandida o EDSS.

[00125] Las recaídas de esclerosis múltiple son frecuentemente impredecibles, que ocurre sin peligro y sin factores de incitación obvios. Algunos ataques, sin embargo, se preceden mediante activaciones comunes. Las recaídas ocurren más frecuentemente durante invierno y verano. Las infecciones tales como el resfriado común, influenza, o gastroenteritis incrementan el riesgo de recaída. La tensión también puede activar un ataque. El embarazo puede afectar la susceptibilidad para recaídas, ofreciendo protección durante el último trimestre, por ejemplo. Durante los primeros pocos meses después de suministro, sin embargo, se aumenta el riesgo de recaída. En general, el embarazo no se ve en discapacidad a largo plazo por influencia. Se han examinado muchas activaciones potenciales y se ha encontrado que influyen índices de recaída de MS. No existe evidencia que la vacunación para la influenza, hepatitis B, varicela, tétano, o tuberculosis incrementa el riesgo de recaída. El trauma físico no activa las recaídas. La exposición a temperaturas ambiente más usuales pueden exacerbar el grado de los síntomas, un efecto conocido como el fenómeno de Uhthoff. El fenómeno de Uhthoff no es, sin embargo, una recaída establecida activada.

[00126] Se han descrito diversos subtipos, o patrones de progresión. Los subtipos utilizan el curso pasado de la enfermedad en un intento por predecir el curso futuro. Ellos son importantes no solo para el pronóstico sino también para las decisiones terapéuticas. En 1996 la Sociedad Nacional de Esclerosis Múltiple de los Estados Unidos que estandariza cuatro

definiciones subtipo: remisión de recaída, recaída secundaria progresiva, primario progresivo y progresivo.

[00127] El subtipo de recaída-remisión se caracteriza por recaídas impredecibles seguido por periodos de meses a años de calma relativa (remisión) sin nuevos signos de la actividad de la enfermedad. Los déficits sufridos durante los ataques pueden resolver o dejar secuelas. Esto describe el curso inicial de 85-90% de los individuos con MS. Cuando los déficits siempre se resuelven entre los ataques, esto algunas veces se denomina como MS benigno.

[00128] El MS progresivo secundario describe aquellas personas con MS de recaída-remisión inicial, quienes empiezan a tener decline neurológico progresivo entre los ataques agudos sin ningún periodo definido de remisión. Pueden aparecer recaídas ocasionales y remisiones menores. El tiempo medio entre el inicio de la enfermedad y la conversión de recaída-remisión en el MS progresivo secundario es 19 años.

[00129] El subtipo progresivo primario describe que aproximadamente 10-15% de los individuos quienes nunca tienen remisión después de sus síntomas iniciales de MS. Esto se caracteriza por progresión de discapacidad del inicio, sin, o solo remisiones y mejoras ocasionales y menores. La edad de inicio para el subtipo progresivo primario es mayor que otros subtipos.

[00130] El MS de recaída progresivo describe aquellos individuos quienes, desde el inicio, tienen un decline neurológico constante sino también que sufren ataques superimpuestos claros. Esto es el más común de los subtipos.

[00131] También se han descrito casos sin comportamiento estándar. Algunas veces denominados como formas límite de esclerosis múltiple, estos incluyen enfermedad de Devic, esclerosis concéntrica de Baló, esclerosis difusa de Schilder y esclerosis múltiple de Marburg. La esclerosis múltiple también se comporta

de forma diferente en niños. Existe un debate de si hay variantes atípicas de MS o diferentes enfermedades.

[00132] La esclerosis múltiple puede ser difícil de diagnosticar debido a que sus signos y síntomas pueden ser similares a muchos otros problemas médicos. Las organizaciones médicas han creado criterios diagnósticos para facilitar y estandarizar el proceso diagnóstico para los médicos practicantes. Históricamente, los criterios de Schumacher y Poser son populares. Actualmente, los criterios de MacDonald se enfocan en una demostración con datos radiológicos, de laboratorio y clínicos de lesiones MS en tiempo y espacio. No se puede hacer un diagnóstico hasta que se han descartado otras afecciones posibles y existe evidencia de eventos desmielinizantes separados anatómicamente y en el tiempo.

[00133] Los datos clínicos solo pueden ser suficientes para un diagnóstico de MS si un individuo ha sufrido episodios separados de síntomas neurológicos característicos de MS. Debido a que algunas personas buscan atención médica después de solo un ataque, otras pruebas pueden acelerar y facilitar el diagnóstico. Las herramientas diagnósticas utilizadas más comúnmente son formación de neuroimágenes, análisis de fluido cerebroespinal y potenciales evocados. La formación de imagen de resonancia magnética del cerebro y la columna vertebral muestran áreas de desmielinización (lesiones o placas). Se puede administrar gadolinio intravenosamente como un contraste a altas placas activas y, mediante eliminación, demuestran la existencia de lesiones históricas no asociadas con los síntomas en el momento de la evaluación. La prueba de fluido cerebroespinal obtenida de una punción lumbar puede proporcionar evidencia de inflamación crónica del sistema nervioso central. El fluido cerebroespinal se prueba para bandas oligoclonales, que son un marcador de inflamación encontrada en 75-85% de las personas con MS. El sistema nervioso de una persona con MS responde frecuentemente menos activamente a la estimulación del nervio óptico y nervios sensores debido a la desmielinización de tales rutas. Estas

- 000083

respuestas de cerebro se pueden examinar utilizando potenciales evocados visuales y sensores.

[00134] El MS es se considera actualmente que es un trastorno mediado inmune con una activación inicial, que puede tener una etiología vírica, aunque este concepto se ha debatido durante años y algún aún opuesto a esto. El daño se considera que se provoca por el sistema inmune propio del paciente. El sistema inmune ataca el sistema nervioso, posiblemente como un resultado de exposición a una molécula con una estructura similar a una de sí mismo.

[00135] Las lesiones MS pueden involucrar más comúnmente áreas de materia blanca cercanas a los ventrículos del cerebelo, Tallo cerebral, ganglio basal y médula espinal; y el nervio óptico. La función de las células de materia blanca es para llevar señales entre las áreas de materia gris, en donde se hace el procesamiento, y el resto del cuerpo. El sistema nervioso periférico raramente se involucra.

[00136] Más específicamente, el MS destruye los oligodendrocitos, las células responsables para crear y mantener una capa grasa conocida como la lámina de mielina - que ayuda a las neuronas que llevan señales eléctricas. El MS resulta en un adelgazamiento o una pérdida completa de la mielina y, cuando la enfermedad avanza, se cortan (transección) las extensiones de las neuronas o axones. Cuando se pierde la mielina, una neurona no puede tener señales eléctricas más grandes conducidas efectivamente. Un proceso de reparación, llamado remielinización, tiene lugar en fases tempranas de la enfermedad, pero los oligodendrocitos no pueden volver a construir la lámina de mielina de las células. Los ataques repetidos conducen a remielinaciones sucesivamente efectivas, hasta que se construye una placa como cicatriz alrededor de los axones dañados. Se han descrito cuatro patrones de lesión diferentes.

000064

[00137] Aparte de la desmielinización, la otra característica principal patológica de la enfermedad es inflamación. De acuerdo con una explicación estrictamente inmunológica de MS, el proceso inflamatorio se provoca por células T, un tipo de linfocito. Los linfocitos son células que cumplen una función importante en las defensas del cuerpo. En el MS, las células T de nuevo entran en el cerebro por medio de la barrera hematoencefálica, un sistema capilar que debe evitar la entrada de células T en el sistema nervioso. La barrera hematoencefálica no es normalmente permeable a estos tipos de células, a menos que se active por infección o un virus, que reduzca la integridad de las articulaciones estrechas que forman la barrera. Cuando la barrera hematoencefálica recupera su integridad, usualmente después que la infección o virus ha cesado, las células T se atrapan dentro del cerebro. Las células T reconocen la mielina como extraña y la atacan como si esta fuera un virus invasor. Esto activa los procesos inflamatorios, estimulando otras células inmunes y factores solubles como citoquinas y anticuerpos. Se forman fugas en la barrera hematoencefálica, que a su vez origina un número de otros efectos de daño tales como inflamación, activación de macrófagos, y mayor activación de las citoquinas y otras proteínas destructivas.

[00138] Aunque no existe cura para esclerosis múltiple, diversas terapias han probado ser útiles. Las ayudas primarias de terapia funcionan después de un ataque, previniendo nuevos ataques, y previniendo discapacidad. Como con cualquier tratamiento médico, las medicaciones utilizadas en el manejo de MS tienen diversos efectos adversos. Los tratamientos alternativos son solicitados por algunos pacientes, a pesar del acortamiento del estudio científico de replicado, comparable, de soporte.

[00139] Durante los ataques sintomáticos, la administración de altas dosis de corticosteroides intravenosos, tales como metilprednisolona, es la terapia de rutina para recaídas agudas. El propósito de este tipo de tratamiento es finalizar el ataque pronto y dejar pocos efectos duraderos en el paciente. Aunque de

manera general es efectivo en el corto plazo para aliviar los síntomas, los tratamientos con corticosteroides que no parecen tener un impacto significativo en la recuperación a largo plazo. Los efectos colaterales potenciales incluyen osteoporosis y memoria deteriorada, el último es reversible.

[00140] Los tratamientos que modifican la enfermedad son costosos y la mayor parte de estos requieren inyecciones frecuentes (hasta diariamente). Otros requieren infusiones IV en intervalos de 1-3 meses. La presentación clínica más temprana del MS de recaída-remisión (RRMS) es el síndrome clínicamente aislado (CIS). Diversos estudios han mostrado que el tratamiento con interferones durante un ataque inicial puede reducir el cambio clínico del Ms que desarrollará un paciente.

[00141] Desde el 2007, se han aprobado por las agencias reguladoras de diferentes países para el RRMS, seis tratamientos que modifican la enfermedad. Tres interferones: dos formulaciones de interferón β 1a (nombres comerciales Avonex, CinnoVex, ReciGen y Rebif) y una del interferón β 1b (nombre comercial Estadounidense Betaseron, en Europa y Japón Betaferon). Una cuarta medicación es acetato glatirámero (Copaxona). La quinta medicación, mitoxantrona, es un inmunosupresor también utilizado en quimioterapia de cáncer, aprobado solo en los Estados Unidos y mayormente para MS progresivo secundario. El sexto es natalizumab (comercializado como Tysabri). Todas las seis medicaciones son modestamente efectivas en la reducción del número de ataques y la disminución de la progresión de discapacidad, aunque difieren sus índices de eficacia, y estudios de sus efectos a largo plazo que aún carecen de comparación entre los inmunomoduladores (todos pero mitoxantrona) que muestran que el más efectivo es natalizumab, ambos en términos de la reducción del índice de recaída y detención de la progresión de la discapacidad; este también ha mostrado que reduce la severidad del MS. La mitoxantrona puede ser el más efectivo de todos ellos; sin embargo, no se considera de manera general como una terapia a

largo plazo, cuando su uso se limita mediante cardiotoxicidad severa.

[00142] Se suministran interferones y acetato de glatirámero mediante inyecciones frecuentes, que varían de una vez por día para acetato de glatirámero en una vez por semana (pero intramuscular) para Avonex. Se dan n y mitoxantrona mediante infusión IV en intervalos mensuales.

[00143] El tratamiento de MS progresivo es más difícil que el MS de recaída-remisión. La mitoxantrona ha mostrado efectos positivos en pacientes con cursos de recaída progresivo y progresivo secundario. Esto es moderadamente efectivo en reducir la progresión de la enfermedad y la frecuencia de recaídas en pacientes de seguimiento a corto plazo. No se ha probado tratamiento para modificar el curso del MS progresivo primario.

[00144] Como con cualquier tratamiento médico, estos tratamientos tienen diversos efectos adversos. Uno de los más comunes es irritación en el sitio de inyección para acetato de glatirámero y los tratamientos de interferón. Durante el tiempo, se puede desarrollar un hueco visible en el sitio de inyección, debido a la destrucción local del tejido graso, conocido como lipoatrofia. Los interferones producen síntomas similares a influenza; algunos pacientes que toman glatirámero experimentan reacción post-inyección manifestada por enrojecimiento, opresión en el pecho, palpitaciones cardíacas, dificultad para respirar, y ansiedad, que usualmente es menor de treinta minutos. Son más peligrosos los daños del hígado de los interferones y mitoxantrona, los efectos inmunosupresores y la toxicidad cardíaca de los últimos; y el enlace putativo entre natalizumab y algunos casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva.

[00145] Los tratamientos que modifican la enfermedad reducen el índice de progresión de la enfermedad, pero no la detiene. Cuando progresa la esclerosis múltiple, la sintomatología tiende a aumentar. La enfermedad se asocia con una variedad de síntomas y

déficits funcionales que resultan en un rango de deterioros progresivos y discapacidad. El manejo de estos déficits es por lo tanto muy importante. La terapia de fármaco y la neurorehabilitación han mostrado aliviar la carga de algunos síntomas, aunque la enfermedad no influencia la progresión. Como para cualquier paciente con los déficits neurológicos, un método multidisciplinario es clave para limitar y superar la discapacidad; sin embargo, existen dificultades particulares en especificar un 'equipo básico' debido a que la personas con MS pueden necesitar ayuda de casi cualquier profesional o servicio de salud al mismo punto. De forma similar, para cada síntoma existen diferentes opciones de tratamiento. Los tratamientos por lo tanto se deben individualizar en el paciente y el médico.

[00146] Como con la mayor parte de enfermedades crónicas, los tratamientos alternativos son solicitados por algunos pacientes, a pesar del acortamiento del estudio científico de replicado, comparable, de soporte. Ejemplos son regímenes dietarios, medicina herbal, que incluyen el uso de cannabis médica para ayudar a aliviar los síntomas, y oxigenación hiperbárica. La práctica terapéutica de las artes marciales tales como tai chi, disciplinas de relajación tales como yoga, o ejercicio general parece mitigar la fatiga, pero no hay efecto en la función cognitiva.

II. Determinaciones Diagnósticas en Enfermedades autoinmunes

[00147] La presente invención, en un aspecto, puede proporcionar un diagnóstico para enfermedades autoinmunes tales como aquellas discutidas anteriormente. Esto permitirá a los doctores discernir más fácilmente entre diversas enfermedades que sobreponen grupos de síntomas, y así han identificado correctamente la base fisiológica subyacente para los síntomas de un paciente, abren la intervención temprana y manejo de la enfermedad. De hecho, debido a que los tratamientos para muchas enfermedades autoinmunes disminuyen la progresión y alivian los síntomas, pero no evitan o curan la enfermedad, la capacidad para proporcionar un

. 00006\$

diagnóstico temprano para estas enfermedades es crítica en retrasar el inicio de más síntomas severos. Adicionalmente, es capaz de proporcionar a pacientes con los fármacos correctos para aliviar sus síntomas sin "ensayo y error" que algunas veces resulta del diagnóstico incorrecto, que reducirá significativamente el costo de cuidado, y evitará la incomodidad del paciente y el posible daño.

[00148] Estos ensayos emplearán una muestra de pacientes que contienen células T. La muestra biológica más comúnmente utilizada será sangre o suero debido a la prevalencia de las células T allí. Sin embargo, otras muestras tales como lágrimas, saliva, esputo, fluido cerebroespinal, semen u orina puede probar también ser útil.

[00149] En la evaluación de la presencia de células T autorreactivas en el sujeto, se pueden comparar los patrones de reactividad observados con un estándar. El estándar puede aliviar los patrones desconocidos del peptoide unido establecido para los sujetos normales y enfermos, y por lo tanto puede obviar la necesidad para un usuario para proporcionar cualquier cosa de una reacción de control de control, es decir, un control que muestra que están presentes los reactivos y las condiciones necesarias para una reacción positiva. Alternativamente, uno puede seleccionar ejecutar un control actual que comprende una muestra similar de una persona actual saludable o de estado de enfermedad desconocido. Adicionalmente, uno puede ejecutar una serie de muestras del mismo sujeto con el tiempo buscando una tendencia para aumentar las células T autorreactivas como una indicación de la progresión de la enfermedad.

[00150] Existe un número de diferentes formas para detectar una célula T autorreactiva de acuerdo con la presente invención. Un tipo del ensayo involucrará, o se modelará luego de, ensayos con base en anticuerpo, que incluyen formatos tales como ensayos inmunoabsorbentes enlaces a enzima (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoradiométricos, fluoroinmunoensayos, ensayos

. 000069

quimioluminiscentes, ensayos bioluminescentes, FACS, FRET y Western blot por mencionar unos pocos. Se han descrito las etapas de diversos métodos de inmunodetección en la bibliografía sintética, tal como, *por ejemplo*, Doolittle and Ben-Zeev (1999), Gulbis and Galand (1993), De Jager et al. (1993), y Nakamura et al. (1987). En general, tales ensayos involucrarán el uso de un peptoide dispuesto en un soporte. El peptoide se ha identificado previamente como un ligando relevante para una población de células T autorreactivas, o en su lugar, este puede ser parte de una disposición de peptoides no caracterizados, el patrón de unión de célula T general para el cual es predictivo de la enfermedad o salud.

[00151] El soporte sólido puede estar en la forma de una matriz de columna, glóbulo, filtro, membrana, barra, placa, o pozo y la muestra se aplicará al peptoide inmovilizado. Después de poner en contacto con las muestra, los componentes inesperados (no unidos específicamente) se lavarán del soporte, dejar las células T que complejen con el peptoide, que luego se detectan utilizando diversos medios, tales como adición posterior de los anticuerpos que reconocen los marcadores de superficie en células T (*por ejemplo*, CD4, CD8) unido al soporte, o un peptoide o peptoides marcados.

[00152] Poner en contacto la muestra biológica seleccionada con el peptoide bajo condiciones efectivas y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de los complejos de célula T de peptoide es de manera general una materia de simplemente poner en contacto la muestra con el peptoide e incubar la mezcla durante un periodo largo suficiente para las células T para unir los peptoides. Después de este tiempo, la composición del peptoide de muestra, tal como una placa, filtro o mancha, de manera general se lavará para retirar cualesquier especies de especies celulares no unidades específicamente o residuos, permitiendo solo aquellas células que se unen específicamente al peptoide inmovilizado que se va a detectar.

[00153] En general, la detección de la formulación complejo biológico es bien conocida en la técnica y se puede lograr a través de la aplicación de numerosos métodos. Estos métodos se basan de manera general en la detección de una marca o marcador, tal como cualquiera de aquellas etiquetas radioactivas, fluorescentes, biológicas y enzimáticas. Los pacientes se relacionan con el uso de tales marcas que incluyen la Patente Estadounidenses 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 y 4,366,241. Por supuesto, uno puede encontrar ventajas adicionales a través del uso de un ligando de unión secundario tal como un anticuerpo secundario y/o una disposición que se une al ligando de biotina/avidina, como se conoce en la técnica.

[00154] Se contemplan diversos otros formatos y son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Se discuten adelante tres ensayos particulares previstos por tener aplicabilidad en la presente invención.

A. ELISA

[00155] Los inmunoensayos, en su sentido directo y más simple, son ensayos de unión. Ciertos inmunoensayos que encuentran uso particular en la presente invención son diversos tipos de ensayos inmunoabsorbentes enlaces a enzima (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA) conocidos en la técnica.

[00156] En un ELISA de ejemplo, los peptoides de la invención se inmovilizan en una superficie seleccionada, tal como un pozo en una placa de microtítulo de poliestireno. Luego, se agrega una composición de prueba que se sospecha contiene las células T a los pozos. Después de la unión y lavado para retirar complejos unidos no específicamente, se pueden detectar células T unidas. La detección se puede lograr mediante la adición de otro peptoide ligado a una marca detectable. Este tipo de ensayo es análogo a un "ELISA intercalado" simple excepto que la unión del agente marcado es directa en la porción de unión a antígeno del receptor

- 000071

de células T. La detección también se puede lograr mediante la adición de un anticuerpo marcado que se une a cualquier antígeno de superficie específico de células T, *por ejemplo*, que reconoce una estructura que es única a las células T en general, o clases específicas de células T. Opcionalmente, el anticuerpo no se marca, y se sigue por la adición de un anticuerpo secundario que tiene afinidad de unión para el primer anticuerpo (Fc), con el segundo anticuerpo que se liga a una marca detectable.

[00157] En otro ELISA de ejemplo, las muestras que se sospecha contienen las células T se inmovilizan en una superficie de pozo y luego se ponen en contacto con los peptoides marcados de la presente invención. Después de la unión y lavado para retirar los complejos inmunes unidos no específicamente, se detectan peptoides marcados unidos.

[00158] Independiente del formato empleado, los ELISA tienen ciertas características en común, tales como recubrimiento, incubación y ligado, lavado para retirar especies de unión no específica, y detectar los complejos inmunes unidos. Debido a la química predecible y simple de los peptoides, ellos se pueden unir al soporte por medio de una reacción química específica.

[00159] "Bajo condiciones efectivas para permitir la formación de complejo inmune" significa que las condiciones incluyen preferiblemente diluir las células T con soluciones tales como BSA, globulina bovina y (BGG) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS)/Tween. Estos agentes agregados también tienden a ayudar en la reducción del fondo no específico. Las condiciones "adecuadas" también significan que la incubación está a una temperatura o durante un periodo suficiente para permitir la unión efectiva. Las etapas de incubación están típicamente de aproximadamente 1 a 2 a 4 horas o así sucesivamente, a temperaturas preferiblemente en el orden de 25° C a 27° C, o puede ser durante la noche a aproximadamente 4°C o así sucesivamente.

- 000072

[00160] Luego de todas las etapas de incubación en un ELISA, se lava la superficie que se ponen en contacto con el fin de retirar el material no complejo. Un procedimiento de lavado preferido incluye lavado con una solución tal como PBS/Tween, o regulador de borato. Luego de la formación de complejos inmunes específicos entre la muestra probada y el material unido originalmente, y lavado posterior, se puede determinar la ocurrencia de cantidades cada minuto de complejos inmunes.

[00161] La detección puede utilizar una enzima que generará desarrollo de color luego de incubación con un sustrato cromogénico apropiado. Así, por ejemplo, uno deseará poner en contacto o incubar el complejo inmune con una ureasa, oxidasa de glucosa, fosfatasa alcalina o anticuerpo conjugado con peroxidasa de hidrógeno o peptoide durante un periodo y bajo condiciones que favorecen el desarrollo de aquel complejo inmune (*por ejemplo*, incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS tal como PBS-Tween).

[00162] Después de incubación con el anticuerpo o peptoide marcado, y posteriormente lavar para retirar el material no unido, se cuantifica la cantidad de marca, *por ejemplo*, mediante incubación con un sustrato cromogénico tal como urea, o púrpura bromocresol, o ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), o H_2O_2 , en el caso de peroxidasa como la marca de enzima. La cuantificación luego se logra al medir el grado de color generado, *por ejemplo*, utilizando un espectrómetro de espectro visible.

B. Puntos cuánticos

[00163] Como se discute adelante, la presente invención utiliza ventajosamente puntos cuánticos para poblaciones celulares marcadas en ciertos aspectos de la presente invención. Un punto cuántico es un semiconductor cuyos excitones se confinan en todas las tres dimensiones espaciales. Como resultado, ellos tienen propiedades que están entre aquellas de semiconductores de masa y

aquellas de moléculas discretas. Ella se descubren por Louis E. Brus, que luego es Bell Labs. Los investigadores han estudiado puntos cuánticos en transistores, celdas solares, LED, y láser de diodo. Ellos también han investigado puntos cuánticos como agentes para formación de imágenes médicas y esperan utilizarlas como bits cuánticos.

[00164] Existen diversas formas que producen puntos cuánticos. En general, cables, pozos y puntos cuánticos se hacen crecer mediante técnicas epitaxiales avanzadas en nanocristales producidos por métodos químicos o mediante implantación de iones, o en nanodispositivos hechos por técnicas litográficas del estado de la técnica.

[00165] Se sintetizan los nanocristales semiconductor coloidales de los compuestos precursores disueltos en las soluciones, muchos procesos químicos tradicionales. La síntesis de los puntos cuánticos coloidales se basa en un sistema de tres componentes compuestos de: precursores, tensoactivos orgánicos, y disolventes. Cuando se calienta un medio de reacción en una temperatura suficientemente alta, los precursores se transforman químicamente en monómeros. Una vez los monómeros alcanzan un nivel suficientemente alto de supersaturación, el crecimiento de nanocristales inicia con un proceso de nucleación. La temperatura durante el proceso de crecimiento es uno de los factores críticos en la determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento de nanocristales. Debe ser suficientemente alto para permitir la redistribución e hibridación de los átomos durante el proceso de síntesis mientras es suficientemente bajo para promover el crecimiento de cristales. Otro factor crítico que se ha controlado exigentemente durante el crecimiento de nanocristales es la concentración de monómero. El proceso de crecimiento de los nanocristales puede ocurrir en dos regímenes diferentes, "focalizando" y "desfocalizando". En concentraciones mayores de monómero, el tamaño crítico (el tamaño en donde los nanocristales no crecen ni se encogen) es relativamente pequeño, que resulta en el crecimiento de casi todas las partículas. En

este régimen, las partículas más pequeñas crecen más rápido que las largas (debido a que los cristales más grandes necesitan que crezcan más átomos que los cristales pequeños) que resulta en "focalización" de la distribución de tamaño para producir partículas cercanamente monodispersas. La focalización del tamaño es óptima cuando la concentración de monómeros se mantiene de tal manera que el tamaño de nanocristales promedio presentes es siempre ligeramente mayor que el tamaño crítico. Cuando la concentración del monómero se agota durante el crecimiento, el tamaño crítico llega a ser mayor que el tamaño promedio presente, y la distribución se "desfocaliza" como un resultado de la maduración de Ostwald.

[00166] Existen métodos coloidales para producir muchos semiconductores diferentes, que incluyen selenida de cadmio, sulfuro de cadmio, arsenida de indio, y fosfida de indio. Estos puntos cuánticos pueden contener tan poco de 100 a 100,000 átomos dentro del volumen del punto cuántico, con un diámetro de 10 a 50 átomos. Esto corresponde a aproximadamente 2 a 10 nanómetros, y de 10 nm de diámetro, casi 3 millones de puntos cuánticos se pueden alinear de extremo a extremo y ajustar dentro del ancho del pulgar de un humano.

[00167] Se pueden sintetizar grandes cantidades de puntos cuánticos por medio de síntesis coloidal. La síntesis coloidal es de lejos la más económica y tiene la ventaja de ser capaz de ocurrir en condiciones de mesa de trabajo. Este conocimiento es el menos tóxico de todas las formas diferentes de síntesis.

[00168] Los puntos cuánticos autoensamblados están típicamente entre 10 y 50 nm en tamaño. Los puntos cuánticos definidos como electrodos de puerta estampados litográficamente, o al grabar en heteroestructuras semiconductoras con gases de electrón bidimensionales pueden tener dimensiones laterales que exceden 100 nm.

[00169] Algunos puntos cuánticos son regiones más pequeñas de un material enterrado en otro con un espacio de banda más largo. Estas se puede denominar estructuras cubierta-núcleo *por ejemplo*, con el CdSe en el núcleo y ZnS en la cubierta o de formas especiales de sílice llamado ormosilo.

[00170] Los puntos cuánticos algunas veces ocurren espontáneamente también en estructuras cuánticas debido a fluctuaciones monocapa en el espesor del pozo.

[00171] Los puntos cuánticos auto-ensamblados nucleon espontáneamente bajo ciertas condiciones durante epitaxia de rayos moleculares (MBE) y epitaxia de fase de vapor metalorgánico (MOVPE), cuando un material se hace crecer en un sustrato en el que la red no es compatible. La cepa resultante produce islas de cepas en forma coherente en una parte superior de una "capa húmeda" bidimensional. Este modo de crecimiento se conoce como un crecimiento de Stranski-Krastanov. Las islas se pueden enterrar posteriormente para formar el punto cuántico. Este método de fabricación tiene potencial para aplicaciones en criptografía cuántica (es decir, fuentes de fotón únicas) y computación cuántica. Las limitaciones principales de este método son el costo de fabricación y la carencia de control sobre el posicionamiento de los puntos individuales.

[00172] Se pueden crear puntos cuánticos individuales de electrones bidimensionales o gases de perforación presentes en pozos cuánticos remotamente dopados o heteroestructuras semiconductoras llamadas puntos cuánticos laterales. La superficie de muestra se cubre con una capa delgada resistente. Un patrón lateral luego se define resistente mediante litografía de rayos de electrón. Este patrón luego se puede transferir al electrón o gas de perforación mediante grabado, o al depositar los electrodos de metal (proceso de despegue) que permiten la aplicación de voltajes externos entre el gas de electrón y los electrodos. Tales puntos cuánticos son principalmente de interés para experimentos y aplicaciones

.. 000076

que involucran el electrón o transporte de perforación, es decir, una corriente eléctrica.

[00173] El espectro de energía de un punto cuántico se puede construir por ingeniería al controlar el tamaño geométrico, forma, y la resistencia del potencial de confinamiento. También, a diferencia de los átomos, es relativamente fácil conectar los puntos cuánticos mediante barreras de túnel para conducir avances, que permiten la aplicación de las técnicas de espectroscopía de túnel para su investigación. El confinamiento en puntos cuánticos también puede surgir de energía electrostáticos (generados mediante electrodos externos, dopaje, tensión, o impurezas).

[00174] Las disposiciones altamente ordenadas de los puntos cuánticos también se pueden autoensamblar mediante técnicas electroquímicas. Se crea una plantilla al provocar una reacción iónica en una interface de electrolito-metal que resulta en el ensamble espontáneo de las nanoestructuras, que incluyen puntos cuánticos, en el metal que luego se utiliza como una máscara para mesa de grabado de estas nanoestructuras sobre un sustrato seleccionado.

[00175] El punto cuántico de escala pequeña convencional no se fabrica confiando en un proceso llamado "inyección dual a alta temperatura" que es impráctico para la mayor parte de aplicaciones comerciales que requieren grandes cantidades de puntos cuánticos. Un método reproducible para crear cantidades más grandes de puntos cuánticos de alta cantidad consistentes que involucran la producción de nanopartículas de precursores químicos en la presencia de un compuesto agrupado molecular bajo condiciones por las que la integridad del grupo molecular se mantiene y actúa como una plantilla de siembra prefabricada. Las moléculas individuales de un compuesto agrupado actúa como una semilla o punto de nucleación luego de lo cual se puede iniciar el crecimiento de nanopartículas. En esta forma, una etapa de nucleación de alta temperatura no es necesaria para iniciar el

000077

crecimiento de nanopartículas debido a que los sitios de nucleación adecuados ya se han proporcionado en el sistema por los grupos moleculares. Una ventaja significativa de este método es que este es altamente escalable.

[00176] En análisis biológicos modernos, se utilizan diversos tipos de tintes orgánicos. Sin embargo, con cada año que pasa, se requiere más flexibilidad de estos tintes, y los tintes tradicionales son frecuentemente incapaces para cumplir las expectativas. Para este fin, los puntos cuánticos han cumplido completamente la función, que se encuentra es superior a los tintes orgánicos tradicionales en diversos conteos, uno de los más obvios inmediatamente es la brillantez (propio a la producción alta cuántica) así como también su estabilidad (permite mucho menos fotoblanqueamiento). Se ha estimado que los puntos cuánticos son 20 veces de brillo y 100 veces más estables que los indicadores fluorescentes tradicionales. Para el rastreo de partículas individuales, el parpadeo irregular de los puntos cuánticos es una desventaja menor.

[00177] El uso de puntos cuánticos para formación de imágenes celular altamente sensibles ha visto mayores avances durante la década pasada. La fotoestabilidad mejorada de puntos cuánticos, por ejemplo, permite la adquisición de muchas imágenes de plano focal consecutivas que se pueden volver a construir en una imagen tridimensional de alta resolución. Otra aplicación que se aprovecha de la fotoestabilidad extraordinaria de sondas de punto cuántico es el rastreo de las moléculas y células en tiempo real durante periodos extendidos. Los investigadores son capaces de observar puntos cuánticos en ganglios linfáticos de ratones durante más de 4 meses.

[00178] También se han empleado puntos cuánticos semiconductores para formación de imágenes in vitro de células premarcadas. La capacidad de migración de células únicas de imágenes en tiempo real se espera que sea importante para diversas áreas de

. 000078

investigación tales como embriogenia, metástasis de cáncer, terapéuticos de célula de tallo, e inmunología de linfocito.

C. Equipos de Detección

[00179] En realizaciones aún adicionales, la presente invención se relaciona con equipos de detección para uso con los métodos descritos anteriormente. Los peptoides de acuerdo con la presente invención se incluirán en el equipo. Los equipos así comprenderán, en medios de contenedor adecuados, uno o más peptoides que se unen a células T autorreactivas, opcionalmente enlaces al reactivo de detección y/o un soporte.

[00180] En ciertas realizaciones cuando el peptoide se preune a un soporte sólido, el soporte se proporciona e incluye una matriz de columna, microesfera, barra o pozo de una placa de microtítulo. Los reactivos de inmunodetección del equipo pueden tener una de una variedad de formas, que incluyen aquellas marcas detectables que se asocian con o se ligan en un peptoiode o anticuerpo dado. Los anticuerpos de ejemplo son aquellos que tienen afinidad de unión para los antígenos de superficie en receptores de células T.

[00181] Los medios de contenedor de los equipos incluirán de manera general por lo menos un frasco, tubo de prueba, matraz, botella, jeringa o otros medios de contenedor, en los que el peptoide se puede reemplazar, o preferiblemente, se forman alícuotas en forma adecuada. Los equipos de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener el peptoide, anticuerpo, y cualquier otro contenedor reactivo en confinamiento cerrado para escala comercial. Tales recipientes pueden incluir contenedores plásticos moldeados por soplado o inyección en los que se retienen los frascos deseados.

III. Terapias

. 000079

[00182] La presente invención también contempla el uso de peptoides que tienen especificidad de unión a células T autorreactivas en el contexto de los tratamientos. En enfermedades autoinmunes, la respuesta inmune propia del cuerpo se vuelve contra sí mismo. Más frecuentemente, este proceso inicia con ciertas células T que se llegan a sintetizar en el antígeno propio del anfitrión - un proceso que no tiene lugar en los sujetos saludables. Si estas células T autorreactivas se pueden reducir o eliminar selectivamente, es decir, sin afectar otras células T necesarias para supervivencia y actividad inmune normal, luego los síntomas de las enfermedades autoinmunes se deben por lo menos mitigar por lo menos, si no se elimina completamente.

A. Métodos con Base en Adherencia para Eliminar células T

[00183] En una realización, se propone que los soportes recubiertos con peptoides que han probado tener especificidad aprobada para células T autorreactivas se pueden utilizar para "recolectar" la sangre de sujetos que sufren de enfermedades autoinmunes. Este método seguirá los parámetros y el uso del mismo equipo para leucaféresis cuando se aplica en otros contextos, tales como terapia de cáncer o en la recolección de blastocitos.

[00184] Más generalmente, la leucaféresis es un procedimiento de laboratorio en el que se separan las microesferas blancos de una muestra de sangre. Esto se puede hacer para reducir un conteo de glóbulos blancos muy alto en individuos con cáncer (leucemia) o para retirar las microesferas blancos para transfusión. Alternativamente, solo se pueden retirar los granulocitos, macrófagos y monocitos, dejando el conteo de linfocitos mayormente sin cambio. Esto se utiliza como un tratamiento para enfermedades autoinmunes tales como colitis ulcerativa y artritis reumatoide, cuando estas células cumplen una parte activa en el proceso de inflamación.

000080

[00185] El peptoide se uniría a un soporte a través del cual pasará la sangre, lo que le permite a las células T autorreactivas unirse al soporte y ser retiradas de la muestra antes de regresar al paciente. En contraste, las células T que no se unen al peptoide no se unirán y regresarán al paciente. La sangre se obtiene del paciente por medio de una línea intravenosa y se regresa en la misma forma, usualmente en brazos opuestos. La sangre típicamente se conduce a través del soporte por medio de una bomba. Una duración típica para el procedimiento es 3-4 horas.

B. Terapias de Toxina e Inmunconjugado

[00186] En otra realización, los peptoides de la presente invención se utilizan como agentes objetivos para suministrar una carga específica específicamente a las células T a las que se unen. En una realización, la carga específica puede ser una toxina, que se puede unir a los peptoides utilizando químicas entrecruzadas estándar. Las toxinas tienen una amplia variedad de formas y acciones, como se discute adicionalmente adelante. Otra opción es enlazar un efecto inmune al peptoide para objetivar las células T. un tal efecto inmune es una molécula que contiene Fc IgG. También se proporciona adelante una discusión de moléculas que contienen Fc.

[00187] Se puede utilizar cualquiera de una amplia variedad de ligadores para afectar la unión de los peptoides. Ciertos ligadores se preferirán de manera general sobre otros ligadores, con base en diferentes características y capacidades farmacológicas, pero de manera general, se pueden utilizar cualesquier agentes de ligado/acoplamiento por aquellos expertos en la técnica para combinar los peptoides de la presente invención con toxinas, tales como, enlaces de avidina-biotina, enlaces de amida, enlaces de éster, enlaces tioéster, enlaces de éter, enlaces tioéter, enlaces fosfoéster, enlaces fosforoamida, enlaces de anhídrido, enlaces de disulfuro, interacciones iónicas e hidrófobas.

. 000081

TABLA 1 - ENTRECruzADORES HETERO-BIFUNCIONALES

Ligador	Reactivo Hacia	Ventajas y Aplicaciones	Brazo Espaciador Longitud
SMPT	Aminas primarias Sulfhidri- los	☐ Mayor estabilidad	11.2 A
SPDP	Aminas primarias Sulfhidri- los	☐ Tiolación ☐ Ligado cruzado divisible	6.8 A
LC-SPDP	Aminas primarias Sulfhidri- los	☐ Brazo espaciador extendido	15.6 A
Sulfo- LC-SPDP	Aminas primarias Sulfhidri- los	☐ Brazo espaciador extendido ☐ Soluble en agua	15.6 A
SMCC	Aminas primarias Sulfhidri- los	☐ Grupo reactivo maleimida estable ☐ Conjugación de anticuerpo-enzima ☐ Conjugación de proteína de portador de hapteno	11.6 A
Sulfo- SMCC	Aminas primarias Sulfhidri- los	☐ Grupo reactivo maleimida estable ☐ Soluble en agua ☐ Conjugación de anticuerpo-enzima	11.6 A
MBS	Aminas primarias Sulfhidri- los	☐ Conjugación de anticuerpo-enzima ☐ Conjugación de proteína de portador de hapteno	9.9 A

- 000082

Sulfo-MBS	Aminas primarias Sulfhidrilos	☐ Soluble en agua	9.9 A
SIAB	Aminas primarias Sulfhidrilos	☐ Conjugación de anticuerpo-enzima	10.6 A
Sulfo-SIAB	Aminas primarias Sulfhidrilos	☐ Soluble en agua	10.6 A
SMPB	Aminas primarias Sulfhidrilos	☐ Brazo espaciador extendido ☐ Conjugación de anticuerpo-enzima	14.5 A
Sulfo-SMPB	Aminas primarias Sulfhidrilos	☐ Brazo espaciador extendido ☐ Soluble en agua	14.5 A
EDC/Sulfo-NHS	Aminas primarias Grupos Carboxilo	☐ Conjugación del portador de hapteno	0
ABH	Carbohidratos No selectivos	☐ Reacciona con los grupos de azúcar	11.9 A

[00188] Un entrecruzador heterobifuncional de ejemplo contiene dos grupos reactivos: uno reacciona con el grupo amina primario (por ejemplo, N-hidroxí succinimida) y el otro reacciona con un grupo tiol (por ejemplo, piridil disulfuro, maleimidias, halógenos, etc.). A través del grupo reactivo amina primario, el entrecruzador puede reaccionar con los residuos lisina de una proteína (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento seleccionado) y a través del grupo tiol reactivo, el entrecruzador, que ya ha atado la primera proteína, reacciona con el residuo cisteína

- 000083

(grupo sulfhidrilo libre) de la otra proteína (por ejemplo, el agente selectivo).

[00189] Es particular se empleará un entrecruzador que tenga estabilidad razonable en la sangre. Se conocen numerosos tipos de enlace disulfuro que contienen ligadores que se pueden emplear exitosamente para conjugar los agentes terapéuticos/ preventivos y objetivo. Los ligadores que contienen un enlace disulfuro que es estéricamente impedido pueden probar dar mayor estabilidad *in vivo*, que previene la liberación del péptido objetivo antes de alcanzar el sitio de acción. Estos ligadores son así un grupo de agentes de ligado.

[00190] Otro reactivo entrecruzado es SMPT, que es un entrecruzador bifuncional que contiene un enlace de disulfuro que es "estéricamente impedido" mediante un anillo benceno adyacente y los grupos metilo. Se considera que la impedancia estérica del enlace disulfuro sirve como una función de proteger el enlace del ataque mediante aniones tiolatos tales como glutathione que puede estar presente en tejidos y sangre, y por lo tanto ayuda a evitar el desacoplamiento del conjugado antes del suministro del agente adherido al sitio objetivo.

[00191] El reactivo entrecruzado SMPT, como con muchos reactivos entrecruzados conocidos, conduce a la capacidad de entrecruzar los grupos funcionales tales como el SH de la cisteína o aminas primarias (por ejemplo, el grupo amino épsilon de lisina). Otro tipo posible de entrecruzador incluye las fenilazidas fotoreactivas hetero-bifuncionales que contienen un enlace de disulfuro divisible tal como sulfosuccinimidil-2-(p-azido salicilamido) etil-1,3'-ditiopropionato. El grupo N-hidroxysuccinimidilo reacciona con los grupos amino primarios y la fenilazida (luego de fotólisis) no reacciona selectivamente con cualquier residuo de aminoácido.

[00192] Además de los entrecruzadores obstaculizados, también se pueden emplear ligadores no obstaculizados de acuerdo esto. - 000084

entrecruzadores útiles, no se considera que contienen o generan un disulfuro protegido, que incluye SATA, SPDP y 2-iminotiolano (Wawrzynczak & Thorpe, 1986). El uso de tales entrecruzadores se entiende bien en la técnica. Otra realización involucra el uso de ligadores flexibles.

[00193] La Patente Estadounidense 4,680,338, describe ligadores bifuncionales útiles para producir conjugados de ligandos con polímeros que contienen amina y/o proteínas, especialmente para formar conjugados de anticuerpo con queladores, fármacos, enzimas, marcas detectables y similares. Las Patentes Estadounidenses 5,141,648 y 5,563,250 describen conjugados divisibles que contienen un enlace lábil que se divide bajo una variedad de condiciones leves. Este ligador es particularmente útil en aquel agente de interés que se puede unir directamente al ligador, con división que resulta en la liberación del agente activo. Los usos preferidos incluyen agregar un grupo sulhidrilo libre o amino libre en una proteína, tal como un anticuerpo, o un fármaco.

[00194] La Patente Estadounidense 5,856,456 proporciona ligadores de péptido para uso en conectar los constituyentes de polipéptido para hacer las proteínas de fusión, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla. El ligador tiene hasta aproximadamente 50 aminoácidos en longitud, contiene por lo menos una ocurrencia de un aminoácido cargado (preferiblemente arginina o lisina) seguido por una prolina, y se caracteriza por estabilidad mayor y agregación reducida. La Patente Estadounidense 5,880,270 describe ligadores que contienen aminooxi útiles en una variedad de técnicas separadoras e inmunodiagnósticas.

[00195] También se contemplan ligadores de péptido que incluyen un sitio de división para una enzima preferiblemente ubicada o activa dentro de un ambiente celular. Las formas de ejemplo de tales ligadores de péptido son aquellas que se dividen mediante uroquinasa, plasmina, trombina, Factor IXa, Factor Xa, o una

. 000085

metalaproteinasa, tal como colagenasa, gelatinasa, o estromelisin.

[00196] Sin embargo, los peptoides también proporcionan una oportunidad única, que es sintética, para la incorporación de puntos de adhesión más efectivos y más simples cuando se compara con péptidos y proteínas.

1. Toxinas

[00197] Se puede utilizar una variedad de toxinas biológicas de acuerdo con la presente invención. El término "biotoxina" como se utiliza aquí se refiere a una toxina de origen biológico. Las toxinas producidas por los microorganismos son determinantes de virulencia importantes responsables de la patogenicidad microbiana y/o la elevación de la respuesta inmune del anfitrión. Las biotoxinas varían mayormente en propósito y mecanismo, y pueden ser altamente complejas (el veneno del caracol como contiene docenas de proteínas pequeñas, cada una dirige un canal del nervio específico o receptor), o relativamente proteína pequeña. Las biotoxinas en naturaleza tienen dos funciones primarias - depredación (araña, serpiente, escorpión, medusa, avispa) y defensa (abeja, hormiga, termitas, abeja melífera, avispa, rana dardo venenoso). Algunos de los tipos más conocidos de biotoxinas incluyen cianotóxicas (producidas por cianobacterias), hemotoxinas (dirigidas a y destruyen glóbulos; víboras tales como cascabel), necrotoxinas (producen necrosis; reclusa marrón, "víbora bufadora" - *Bitis arietans*), neurotoxinas (viuda negra, escorpiones, medusa cubo).

[00198] Son de interés particular de acuerdo con la presente invención las citotoxinas, tales como ricina, de la planta de ricino. También son útiles las toxinas bacterianas que incluyen aquellas de *Clostridium*: *tetani* (tetanoespasmina), *perfringens* (toxina alfa, enterotoxina), *difficile* (A, B), *botulínica* (botox), *Staphylococcus* (*S. aureus* alfa/beta/delta, exfoliatina, toxina de síndrome de choque tóxico, SEB), así como también

. 000086

toxina ántrax, listeriolisina O, estreptolisina, leucocidina (leucocidina Panton-Valentina), factor de médula, toxina de la difteria, toxina shiga, verotoxina/toxina como shiga (*E. coli*), enterotoxina/enterotoxina estable al calor de *E. coli*, toxina del cólera, toxina pertusses, exotoxina *Pseudomonas*, ciclasa adenilato extracelular tipo I (Superantígeno), tipo II (toxinas formadoras de poro), tipo III (toxina AB/AB5), lipopolisacárido (Lípido A), endotoxina delta *Bacillus thuringiensis*, factor A de coagulación, y proteína A unida a la fibronectina.

[00199] El cromóforo asiste inactivación de luz (CALI) de proteínas que involucran generar especies altamente reactivas (frecuentemente oxígeno singulete) de un cromóforo (cabeza) utilizando luz. Las especies reactivas dañan la proteína objetivo, inactivando su función biológica. Se pueden utilizar estas moléculas para inactivar la función de una proteína.

[00200] Los experimentos por el inventor han mostrado un cromóforo basado en rutenio que es una cabeza efectiva. Ellos demuestran que el cromóforo de rutenio puede entrar en las células e inactivare un objetivo, permitiendo por lo tanto los tratamientos CALI de células vivas *in vivo* y *ex vivo*.

2. Moléculas que Contienen Fc

[00201] Se hacen anticuerpos bivalentes de hasta cuatro cadenas de polipéptido - dos segmentos cortos que tienen regiones variables, y dos segmentos más largos, que tienen regiones variables y constantes. Las cadenas corta y larga interactúan por medio de enlaces disulfuro y hacen la mitad de un anticuerpo normal, con la porción variable que es responsable para la unión de antígeno (Fv, o fragmento variable). Dos mitades del anticuerpo interactúan por medio de enlaces de disulfuro distintos y en la porción Fc (fragmento, cristalizable).

[00202] La porción Fc cumple una función importante en la modulación de la actividad celular inmune, tal como la unión a

diversos receptores celulares y moléculas inmunes, tales como las proteínas completas. Al hacer esto, esto media diferentes efectos fisiológicos incluyen la opzonización, lisis celular, y desgranulación de los mastocitos, basófilos y eosinófilos. En particular, esto puede marcar las células para la destrucción mediante otros componentes inmunes. La presente invención busca utilizar los anticuerpos, o fragmentos que contienen Fc de los mismos, para dirigir las células T para destrucción.

[00203] Se describe una tecnología particular que se puede utilizar por Popkov et al. (2009). Los autores construyen por ingeniería anticuerpos que contienen integrina $\alpha(v)\beta(3)$ y los ligandos adaptadores $\alpha(v)\beta(5)$, que se montan autoensamblados un instante, respuesta policlonal, químicamente programada contra los tumores implantados que tienen estos objetivos. Las respuestas terapéuticas significativas se observan sin recurrir a terapia adyuvante. Las respuestas inmunes químicamente programadas se conducen mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y citotoxicidad dirigida a complemento. Esto demuestra la capacidad de los ligandos de molécula pequeña para "raptar" anticuerpos al redirigir su especificidad de unión.

C. Terapias de Combinación

[00204] Las terapias como se discutió anteriormente se pueden administrar en combinación con otro agente para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. Al combinar los agentes, se puede lograr un efecto aditivo aunque no se incrementa la toxicidad (si existe) asociada con una monoterapia. Adicionalmente, es posible que se observen la mayor parte de efectos aditivos ("sinergismo"). Así, las terapias de combinación son una forma común de explotar nuevos regímenes terapéuticos.

[00205] El tratamiento de peptoide puede preceder, se co-actual con y/o seguir los otros agentes mediante intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones el tratamiento de peptoide y otros agentes se administran aplicados, uno de manera general

. 000088

aseguraría que un periodo significativo no expira entre el tiempo de cada suministro, de tal manera que el tratamiento de peptoide y otros agentes aún serían capaces de ejercer un efecto ventajosamente combinado en el sujeto. Por ejemplo, en tales casos, se contempla que uno puede proporcionar dos, tres, cuatro o más modalidades sustancialmente simultáneas (*es decir*, dentro de menos de aproximadamente un minuto) con el tratamiento de peptoide. En otros aspectos, se pueden administrar uno o más agentes dentro de sustancialmente simultáneamente, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 37 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 39 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 41 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 43 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 45 horas, aproximadamente 46 horas, aproximadamente 47 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días,

aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días, aproximadamente 21 días, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7 o aproximadamente 8 semanas o más, y cualquier rango derivable aquí, antes de y/o después de administrar el peptoide.

[00206] Se pueden emplear diversos regimenes de combinación del tratamiento de peptoide y uno o más agentes. Ejemplos no limitantes de tales combinaciones se muestran adelante, en donde un tratamiento de peptoide es "A" y un segundo agente es "B":

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	A/B/B	B/A/A	A/B/B/B	B/A/B/B
B/B/B/A	B/B/A/B	A/A/B/B	A/B/A/B	A/B/B/A	B/B/A/A		
B/A/B/A	B/A/A/B	A/A/A/B	B/A/A/A	A/B/A/A	A/A/B/A		

[00207] Así, las terapias de peptoide de la presente invención se pueden utilizar en conjunto con otras terapias que se utilizan para el tratamiento de los trastornos discutidos anteriormente, pero incluyen diversos tratamientos anti-inflamatorios e inmunosupresores.

IV. Ejemplos

[00208] Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Se debe apreciar por aquellos medianamente expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan las técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y así se puede considerar que constituye los modos preferidos para esta práctica. Sin embargo, aquellos medianamente expertos en la técnica deben, en claridad de la

. 000090

presente descripción, apreciar que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y aún obtienen una claridad o resultado similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLO 1 - MÉTODOS

[00209] **Síntesis de Colección de Peptoide.** Los detalles con respecto al diseño de la colección de peptoide se han publicado previamente (Udugamasooriya et al., 2008). En resumen, la colección se sintetiza en macroglóbulos TentaGel (140-170 μ M de diámetro; sustitución: 0.48 mmol/g de resina; Rapp Polymere). La síntesis de la colección se conduce utilizando ocho aminas diferentes que resultan en una diversidad teórica de 262,144 compuestos. Una colección 9-mer se sintetiza utilizando un protocolo de síntesis asistido por microondas (1000 W) y un método de agrupación y división (Olivos et al., 2002). En la terminación de la síntesis de colección, las microesferas se tratan con una mezcla de 95% de TFA, 2.5% de triisopropilsilano, y 2.5% de agua durante 2 horas para retirar los grupos de protección de cadena lateral y luego se neutralizan con 10% de diidopropietilamina en DMF. Las microesferas se lavan con diclorometano, se secan, y se almacenan a 4°C hasta uso.

[00210] **Resíntesis de peptoides solubles.** La resíntesis de ligandos peptoides y peptoides de control revueltos se conduce en resina MBHA de amida Knorr (Novabiochem) utilizando un protocolo asistido por microondas estándar (Olivos et al., 2002) (horno microondas 1000 W, 10% de potencia suministrada durante 2 X 15 segundos con mezcla breve). Para peptoides DOPA biotinilados y de biotina, Fmoc-Glu (biotinil-PEG)-OH (Novabiochem) y Fmoc-DOPA (Novabiochem) se acoplan posteriormente en resina MBHA de amida Knorr mediante un protocolo de síntesis de péptido estándar utilizando la química Fmoc (Udugamasooriya et al., 2008). Se utiliza un protocolo asistido por microondas estándar para crear la porción de peptoide de las moléculas como se describió anteriormente. Los peptoides se dividen de la resina con 95% de

. 000091

TFA, 2.5% de triisopropilsilano, y 2.5% de agua durante 2 horas, y se purifica utilizando un sistema Waters Breeze HPLC. Se detecta la masa de los peptoides utilizando un espectrómetro de masa MALDI-Voyager DE Pro.

[00211] **Ratones.** Se compran ratones hembra B10.PL y ratones transgénicos 2D2 MOG 35-55 TCR de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) y se mantienen en instalaciones para animales aprobadas federalmente en la Universidad del Centro Médico de Sur Oeste de Texas (Dallas, TX) de acuerdo con el Comité de Uso y Cuidado Animal Institucional. Los ratones transgénicos B10.PL Vα2.3Vβ8.2 TCR son un tipo de obsequio de Dr. Olaf Stuve (UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX) y se crían y mantienen en nuestras instalaciones para animales. Todos los ratones están entre 7 y 10 semanas de edad cuando se realizan los experimentos.

[00212] **Inducción de EAE.** Se induce EAE en ratones WT B10.PL mediante inyección subcutánea sobre 4 sitios en el flanco con 50 µg de péptido MBP Acl-11 de proteína básica de mielina en adyuvante de Freund completa. Se administra toxina de Pertusses al momento de inmunización y 48 horas después mediante inyección i.p. Los ratones se monitorean diariamente para detectar signos clínicos de EAE y se le asigna una clasificación clínica con base en los siguientes criterios: 0 = sin enfermedad, 1 = renquera de cola, 2 = debilidad de la pata trasera, 3 = debilidad grave de la pata trasera/parálisis parcial, 4 = parálisis de la pata trasera, 5 = moribundo, y 6 = muerte debido a EAE (Racke, 2001).

[00213] **Aislamiento de células T CD4⁺.** Se aíslan los bazo y ganglios linfáticos de ratones transgénicos EAE, WT, o TCR y se hacen suspensiones de células individuales al pasar a través de un filtro de nylon de 70 µm para células (BD Biosciences). Luego se aíslan las células T CD4⁺ mediante selección negativa utilizando un equipo de enriquecimiento de células T CD4⁺ (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se agrega un cóctel de enriquecimiento de linfocitos T CD4⁺ de ratones biotinilados a la suspensión celular. La adición

. 000092

de este cóctel resulta en la marca de los eritrocitos y leucocitos que no son células T CD4⁺. Luego de lavado, se agregan partículas de estreptavidina magnéticas a la suspensión y todas las células marcadas migran hacia un magneto, que deja las células T CD4⁺ no marcadas en la suspensión. Las células T CD4⁺ se retienen y todas las otras células se descargan. Luego de aislamiento, las células se lavan, se cuentan y se resuspenden en medio RPMI 1640 completo para aplicaciones posteriores.

[00214] **Ensayo de unión de citometría de flujo.** Luego del aislamiento de las células T CD4⁺ de los ratones transgénicos TCR y los controles WT, las células se lavan y se resuspenden en 0.1% de PBS/BSA (regulador FACS). Las células se incuban con concentraciones aumentadas (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 250 μ M, o 500 μ M) del peptoide biotina-DOPA-AG12A o un peptoide de biotina-DOPA-control y se incuban durante 30 min a 37°C. se agrega peryodato de sodio 5mM a las células en resumen al entrecruzamiento del peptoide al receptor objetivo. Esta reacción se apaga con DTT y las células se lavan dos veces con 0.1% de PBS/BSA. Se agrega bloque Fc (BD Biosciences) a las células durante 15 min en hielo con el fin de reducir unión no específica a los receptores Fc. Las células se tiñen con 1 μ g de anticuerpo anti CD4-PerCp Cy5.5 y 0.02 μ g de anticuerpo estreptavidina-APC (BD Biosciences) durante 15 minutos en hielo. El teñido se sigue mediante 2 lavados con .1% de PBS/BSA y las células se hacen correr en un citómetro de flujo FACS Calibur para evaluar la unión del peptoide. Los datos se analizan utilizando el software Flowjo (Treestar) para determinar la intensidad fluorescente media y se muestran como histogramas. Las intensidades fluorescentes medias (MFI) se grafican utilizando el software Graphpad Prism para determinar un valor estimado K_d y se describen como una gráfica lineal.

[00215] **Entrecruzamiento Químico.** Las células T CD4⁺ se aíslan de ratones transgénicos V α 2.3/V β 8.2 TCR y de ratones tipo natural como se describió anteriormente. Adicionalmente, los esplenocitos agotados de las células T CD4⁺ también se utilizan como un control negativo. Se hacen reacciones entrecruzadas en

Regulador de Extracto Nuclear (NEB) como se describió previamente (Lim et al., 2007). Se incuban aproximadamente 10×10^6 células por afección con 5 μM del peptoide biotina-DOPA-AG12A durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de incubación, se agrega NaIO_4 5 mM para entrecruzar el peptoide en su receptor objetivo. Después de una breve incubación, la reacción se apaga con regulador de carga 6X que contiene DTT 100 mM. Se realiza SDS-PAGE estándar y se hace inmunotransferencia con los anticuerpo neutrAvidin-HRP y anti-V α 2 TCR (eBioscience).

[00216] **Ensayo de proliferación CFSE.** Luego del aislamiento de células T CD4^+ , las células transgénicas T V α 2.3V β 8.2 TCR, células B, o células T transgénicas MOG-35-55 TCR se marcan con CFSE (sondas moleculares) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se resuspenden en una concentración de 1×10^6 por ml en PBS y se incuban con 0.5 μM de CFSE a 37°C durante 10 min. El teñido se apaga con adición de 5 volúmenes de medio de cultivo que contiene 10% de FBS. Las células se centrifugan, se lavan, y se resuspenden en medio RPMI 1640 completo. Las células luego se colocan en 1×10^6 por ml. y se incuban con concentraciones aumentadas del peptoide AG12A o un peptoide control (1 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM , 100 μM , 200 μM , o 500 μM) durante 30 min a 37°C . Las células que presente antígeno se aíslan de bazo de ratones WT B10.PL y 10 $\mu\text{g/ml}$ de MBP Ac1-11, MOG 35-55, o luego se agregan LPS al cultivo para estimular las células. Las células se dejan en cultivo durante 5 días, se tiñen con un anticuerpo anti-CD4-PerCp (BD Biosciences), y se corren en el citómetro de flujo FACS Calibur para evaluar la división celular. Los datos se analizan utilizando la plataforma de proliferación del software Flowjo (Treestar) para determinar el porcentaje de células divididas. El porcentaje de división se grafica utilizando el software Graphpad Prism y se describe como una gráfica lineal.

[00217] **Preparación de conjugados de rutenio-peptoide.** Se disuelven Bis(2,2'-bipiridine)-4'-metil-4-carboxibipiridina-rutenio-bis(hexafluorofosfato), diisopropil carbodiimida, y HOBT

en DMF y se hacen reaccionar con los peptoides desprotegidos previamente generados durante 2 horas a temperatura ambiente (Lee et al., 2008). Los compuestos se lavan y se dividen de la resina como se describió anteriormente y se purifica con HPLC. La masa de cada peptoide se determina utilizando un espectrómetro de masa MALDI-Voyager DE Pro.

[00218] **Ensayo de proliferación de la incorporación de timidina tritiada.** Se cosechan bazos de ratones transgénicos neófitos V α 2.3/V β 8.2 TCR o ratones transgénicos 2D2 MOG 35-55 TCRd y se hacen suspensiones de células individuales al presionar a través de un filtro para células de 70 μ m (BD Biosciences). Se aíslan células T CD4⁺ como se describió anteriormente y se resuspenden en medio RMPI completo libre de rojo fenol. Se colocan en placas 1 x 10⁵ células por pozos en una placa de 96 pozos y se incuban con concentraciones de 1 μ M o 100nM de AG12A-Ru²⁺, peptoide-Ru²⁺ de control, DMSO, o PBS cuadruplicado. Las células luego se irradian durante 10 min utilizando una lámpara de arco de Xenón de 150 W (Oriol, Stamford, CT) como se describió previamente (Lee et al., 2008). Luego de irradiación, las células T se activan con 10 μ g/ml de MBP Acl-11 y 3 x 10⁵ células que presentan antígeno por pozo. Los cultivos se mantienen en placas de fondo plano de 96 pozos durante 96 h a 37°C en 5% de CO₂/aire humidificado. Los pozos se pulsan con 0.5 μ Ci/pozo [metil-³H]timidina durante las 16 h iniciales del cultivo. Las células cosechadas en filtros de vidrio e incorporadas a [metil-³H]timidina se miden con un contador Betaplate (PerkinElmer Wallac, Gaithersburg, MD). Los niveles de referencia de proliferación de células que no se estimulan con antígeno se sustraen para determinar el porcentaje de proliferación máximo de cada condición. Los resultados se determinan como medias de cultivos de cuadruplicado y se muestran como con SEM.

[00219] **Transferencia Adoptiva.** Los bazos de ratones transgénicos neófitos V α 2.3/V β 8.2 TCR se cosechan y se preparan suspensiones celulares únicas al presionar a través de filtro de células 70 μ m (BD Biosciences). Se aíslan células T CD4⁺, se tratan con AG12A-

Ru^{2+} o peptoide- Ru^{2+} de control, se irradian, y se activan con MBP Acl-11 como se describió anteriormente. Después de 72 h, las células se lavan con PBS y 10×10^6 células se inyectan i.p. en ratones neófitos B10.PL. Los ratones se evalúan diariamente para detectar signos clínicos de EAE como se describió previamente (Racke, 2001).

[00220] **Ensayo bicolor en detección de glóbulos.** Aproximadamente 300,000 glóbulos se hinchan en DMF, se lavan con PBS, y se equilibran en medio RPMI 1640 completo que contiene 3% de BSA. Las células T CD4^+ aisladas de ratones EAE o tipo natural se resuspenden en RPMI y se marcan utilizando puntos cuánticos (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células T CD4^+ de ratones EAE se marcan con Qtracker 655 (red) y células T CD4^+ de ratones tipo natural se marcan con Qtracker 565 (verde). Las células marcadas se mezclan en una relación 1:1 con un total de aproximadamente 10×10^6 de cada tipo de célula. Las células luego se incuban con la colección del glóbulo de peptoide durante la noche en incubador 37°C con 5% de CO_2 y agitación gentil. Las microesferas se lavan gentilmente 2 veces con medio RPMI y luego se visualizan bajo un microscopio fluorescente (Olympus BX-51) con excitación 340-380 nm utilizando un filtro DAPI (magnificación total 100 X). Las microesferas se unen solo a glóbulos rojos marcados seleccionados manualmente utilizando una pipeta de 20 μl . Las microesferas "seleccionadas" luego se lavan, se hierven con 1% de SDS durante 30 minutos y se someten a secuencia Edman automática.

EJEMPLO 2 - RESULTADOS

[00221] **Una detección para ligandos células T autorreactivas específicas en EAE.** La Esclerosis múltiple (MS) (Noseworthy et al., 2000) - como condición de EAE se induce en cepas genéticamente susceptibles de roedores de inmunización con proteínas o péptidos mielina, o mediante transferencia pasiva de células T CD4^+ específicas de mielina (Zamvil and Steinman, 1990). Los estudios en EAE indican que células T CD4^+ específicas

000096

de mielina que se han llegado a activar en la periferia, y producir citoquinas pro-inflamatorias, cumplen una función principal en la patogenia de la enfermedad de MS (Zamvil and Steinman, 1990). Más aún estas células T expresan receptores de células T que se considera reconocen preferencialmente la proteína básica de mielina en el sistema nervioso central de individuos afectados que conducen a la destrucción de la lámina de mielina y, finalmente, el déficit neurológico (Zamvil and Steinman, 1990). Por lo tanto, una estrategia terapéutica que objetiva específicamente solo células T autorreactivas serían interesantes para investigar el MS así como también para otras enfermedades mediadas por célula T. Como una primera etapa, los inventores se enfocan en el aislamiento de los compuestos sintéticos capaces de unir altamente específicamente a las células T autorreactivas en EAE.

[00222] Para llevar a cabo esto, los inventores adaptados a la estrategia de detección desarrollaron previamente en su laboratorio para el aislamiento de peptoides (Simon et al., 1992) que se unen a los receptores de membrana integrales con alta especificidad (Udugamasooriya et al., 2008). En este protocolo, las células expresan o no expresan el receptor objetivo, pero se presumen que es otra forma idéntica, se marcan con puntos cuánticos rojos y verdes, respectivamente. Los dos tipos de células luego se mezclan y se incuban con miles de glóbulos hidrófilos, cada uno de los cuales exhibe un peptoide único. Las microesferas que unen solo las células marcadas con rojo y no las células marcadas con verde luego se recolectan, la presunción es que esto refleja unión altamente específica al receptor objetivo debido a que el peptoide debe ignorar todas las otras moléculas sobre la superficie celular con el fin de excluir las células verdes y ser clasificadas como un "acierto" (FIGURA 1A).

[00223] Para aplicar esta tecnología de detección de dos colores al actual problema, se induce EAE en ratones B10.PL mediante inmunización con el péptido de proteína básica de mielina Acl-11 (MBP Acl-11). La inmunización con este péptido de mielina resulta

- 000097

en la activación y expansión de las células T CD4⁺ que expresan MBP Acl-11 específico de V α 2.3/V β 8.2 TCR (Ando et al., 1989). Se sacrifican los ratones EAE y saludables luego del desarrollo de EAE clínicamente definido (FIGURA 5A) y se aíslan las células T CD4⁺. Las células T CD4⁺ de los ratones EAE se marcan con puntos cuánticos que emiten rojo y las células T de los ratones de control se marcan con puntos cuánticos que emiten verde. Las células luego se mezclan en una relación 1:1 y se incuban con una colección de peptoides que exhibe glóbulo que contiene aproximadamente 300,000 peptoides (FIGURA 5B). la hipótesis de los inventores es los millones de diferentes células T en la población general deben estar presentes en bajos niveles y que las dos poblaciones debe ser similares. La excepción principal sería un número incrementado de células T autorreactivas específicas de MBP Acl-11- que se expanden en respuesta a inmunización con el autoantígeno en los ratones EAE. Esto sugiere que si se encuentra un glóbulo se une solo a las células rojas, es altamente probable que sean células T autorreactivas (FIGURA 1A).

[00224] Luego de incubación con las microesferas de peptoides, los inventores identifican dos peptoides de acierto putativo que se observa se unen específicamente a las células T CD4⁺ de los ratones EAE y no a las células T de ratones de control saludables (FIGURA 1B, paneles i y ii). Se muestra una fotografía adicional que describe un glóbulo de peptoides que no se une específicamente a las células T CD4⁺ de los ratones EAE y los ratones de control saludables (FIGURA 1B, panel iii). Los peptoides sobre los dos glóbulos clasificados como aciertos se secuencian mediante degradación Edman (Alluri et al., 2003) y se ilustran sus estructuras deducidas en la FIGURA 1C. Se encuentra que los dos "aciertos" tienen alguna similitud de secuencia. Los inventores se enfocan en uno de los peptoides (AG12A) para caracterización más detallada.

[00225] El peptoides AG12A es un ligando para EAE de células T autorreactivas. Para determinar si el AG12A se une al TCR

- 000098

autorreactivo, los inventores toman ventaja de la existencia de ratones transgénicos, en los que la vasta mayoría de las células T CD4⁺ expresa el TCR específico de MBP Acl-11 (V α 2.3/V β 8.2 TCR) (Goverman et al., 1993). Las células T CD4⁺ se aíslan de estos ratones y se prueban para la unión a AG12A. Esto se hace en varias formas. Primero, el AG12A se vuelve a sintetizar en las microesferas, cuando es un peptoide de control no seleccionado como un ligando de célula T (FIGURA 6). Las microesferas luego se incuban con células T marcadas con puntos cuánticos rojos. Como se muestra en la FIGURA 1D, las células T CD4⁺ de ratones transgénicos MBP Acl-11 TCR unidas al AG12A se exhiben en las microesferas, en donde las células T CD4⁺ tipo natural no se exhiben (FIGURA 1D).

[00226] Para sondear la unión de AG12A a las células T específicas MBP Acl-11 adicionales, los inventores realizan un experimento de entrecruzamiento químico que involucra la oxidación de dihidroxifenilalanina (DOPA) unido al peptoide a un intermedio ortoquinona. Este intermedio luego se puede entrecruzar a los residuos nucleófilos cercanos en la proteína receptora objetivo (Burdine et al., 2004; Liu et al., 2006; Lim et al., 2007). Se observara entrecruzamiento solo si DOPA-AG12A y el receptor objetivo están en proximidad cercana, debido a que los extensos experimentos de control muestran que esta química no acopla las moléculas a menos que estén en un complejo (Liu et al., 2006). Las células T CD4⁺ de ratones transgénicos V α 2.3/V β 8.2 TCR se incuban con concentraciones aumentadas de DOPA-AG12A marcado con biotina o un peptoide DOPA de control DOPA marcado con biotina. Después de tratamiento con peryodato de sodio, las células luego se tiñen con estreptivina conjugada con fluorocromo y un anticuerpo anti-CD4⁺ conjugado con un fluorocromo diferente. La unión del peptoide para las células T se evalúa al calcular la intensidad de fluorescencia medida de células d CD4⁺ /estreptavidina+. El AG12A se encuentra que une a las células T específicas MBP Acl-11 con un K_D de aproximadamente 40 μ M (FIGURAS 2A-B). Sin embargo, no se puede detectar interacción entre las células T y AG12A biotiniladas obtenidas de un ratón

tipo natural, ni el peptoide de control biotinilado se une a las células T transgénicas V α 2.3/V β 8.2 TCR (FIGURA 2B).

[00227] Las interacción de células de peptoide también se analiza mediante SDS-PAGE y Western blot con peroxidasa de rábano NeutrAvidin (NA-HRP). Se detecta un producto que contiene biotina con una masa evidente de 45 kDa cuando se incubaba Biotin-DOPA-AG12A con células T transgénicas TCR, pero con células T CD4- o células T CD4+ de un ratón tipo natural (FIGURA 2C). La masa molecular de las cadenas TCR α y β son aproximadamente 45 y 40 kDa respectivamente (Zamvil and Steinman, 1990), sugieren el entrecruzamiento de AG12A al TCR. Más aún, cuando la transferencia se sondea con un anticuerpo α -V α 2 TCR, se observa un producto a aproximadamente 45kDa que se sobrepone con la banda detectada con NA-HRP, que sugiere adicionalmente que el AG12A se entrecruza entre MBP Acl-11 específico TCR (FIGURA 2C).

[00228] **AG12A es un antagonista específico de la proliferación de células T autorreactivas mediadas por el antígeno.** Para probar la posibilidad que la unión peptoide-TCR puede antagonizar la proliferación de células T específicas de antígeno, células T CD4⁺ de ratones transgénicos MBP Acl-11 TCR se incuban con concentraciones aumentadas de AG12A o un peptoide de control, marcado con succinimidil éster de diacetato carboxifluoresceína (CFSE), y se estimula con el péptido MBP Ac-11 y las células que presentan antígeno. El CFSE es permeable a las células en la forma de éster, pero estos grupos se hidrolizan una vez el compuesto ingresa a la célula, que presenta la célula impermeable. Así, la división celular resulta en la dilución de la concentración intracelular del fluoróforo. Después de incubación durante 5 días, se mide la división celular utilizando citometría de flujo. Se encuentra que el AG12A inhibe la proliferación de las células T autorreactivas MBP Acl-11 en una forma dependiente de dosis con un IC₅₀ de aproximadamente 60-80 μ M (FIGURA 3A). Esta reducción en la proliferación no se ve cuando las células T transgénicas se estimulan en la presencia de un peptoide de control (FIGURA 3A), ni inhiben AG12A la

proliferación de las células B (FIGURA 3B). De forma más importante, el AG12A tampoco inhibe la proliferación estimulada por antígeno de Glucoproteína de Oligodendrocito Mielina (MOG) 35-55 células T transgénicas TCR específicas (FIGURA 3C). Este experimento demuestra claramente que el efecto de AG12A es específica a las células T que reconocen el antígeno MBP Acl-11 y no se debe a alguna afinidad general para cualquier célula T activada.

[00229] **Inactivación Ex vivo de células T autorreactivas utilizando un conjugado de rutenio-peptoide.** Un antagonista con una mejor potencia que la del IC₅₀ de 40 μ M exhibida mediante AG12A (típico de un acierto de detección primario (Kodadek et al., 2004)) sería deseable para aplicaciones prácticas. Para lograr esto, se conjuga AG12A con un complejo de rutenio (II) tris-bipidridilo que es un catalizador eficiente para la generación de oxígeno singulete cuando se irradia con luz visible (Lee et al., 2008). El oxígeno singulete es una especie altamente reactiva que modificará y inactivará las proteínas mayores, pero que tiene un radio de difusión limitado de solo 40-80 Å. Así, solo se afectan las proteínas en la vecindad inmediata del rutenio "cabeza". Cuando se suministra para dirigir las proteínas mediante el ligando de peptoide, se puede lograr inactivación de proteína fotoactivada altamente específica (Lee et al., omitida para publicación). Las células T transgénicas TCR específicas MBP Ac-1-11 se incuban con concentraciones aumentadas del conjugado de AG12A-rutenio (FIGURA 4A) o un conjugado de peptoide-rutenio de control (FIGURA 6) y las células se irradian con luz visible (filtro de corte <380 nm). Permitiendo irradiación de diez minutos, las células T se activan con el autoantígeno MBP Acl-11 en la presencia de células que presentan antígeno. La proliferación celular se evalúa utilizando un ensayo timidina tritiado. Como se muestra en la FIGURA 4B, el conjugado de AG12A-rutenio inhibe la proliferación de células T autorreactivas específicas MBP Acl-11 potencialmente en una concentración de 100 nM (FIGURA 4B). Esto representa una mejora de aproximadamente 700 veces sobre la actividad del peptoide solo. Esta inhibición no se ve cuando se utilizan células T CD4⁺ de

ratones transgénicos MOG 35-55 TCR (FIGURA 4C), demostrando de nuevo la especificidad del AG12A para células T autorreactivas específicas MBP Acl-11.

[00230] Las terapias de fotofóresis existen las que las células se remueven, se tratan con un fármaco fotoreactivo, expuesto a luz UV, y se reinfunden en el paciente (Rostami et al., 1999; Besnier et al., 2002; Cavaletti et al., 2006). Así, aunque la luz azul requiere activar la producción de oxígeno singulete catalizado con tris-bipiridil de rutenio que no puede penetrar en un organismo vivo, la inactivación ex vivo de las células T autoinmunes mediante un conjugado peptoide-rutenio parece factible dado este precedente. Para probar esta teoría y confirmar que las células T autorreactivas no han presentado respuesta luego del tratamiento con el conjugado de peptoide-rutenio y luz, los inventores utilizan un modelo de transferencia adoptivo de EAE. Las células T CD4⁺ se aíslan de ratones transgénicos MBP Acl-11 TCR, se tratan con el conjugado de AG12A-rutenio o el conjugado del peptoide-rutenio de control, se irradian, se estimulan con el péptido MBP Acl-11 en la presencia de células que presentan antígeno, y se inyectan en receptores neófitos. Estos animales luego se observan para detectar signos clínicos de EAE. Como se anticipa, los animales inyectados con células T autorreactivas estimuladas con antígeno que se han expuesto al conjugado de peptoide-rutenio de control o no peptoide desarrollado EAE (FIGURA 4D). Cuando las células T no se estimulan con antígeno ni se exponen a un peptoide, la transferencia adoptiva no resulta en EAE, cuando se espera. Sorprendentemente, las células T CD4⁺ específicas MBP Acl-11 con antígeno y que se tratan con el conjugado de AG12A-rutenio no inducen EAE en los animales receptores (FIGURA 4D). Este experimento demuestra la factibilidad de utilizar conjugados peptoides de rutenio objetivado a células T autorreactivas como inhibidores fotoactivados potentes de la activación de células T autoinmunes ex vivo.

[00231] Los inventores han demostrado aquí un protocolo de detección de colección combinatorial que es capaz de producir moléculas sintéticas que se unen a células T autoinmunes específicas de antígeno con alta especificidad. En este estudio, las células T CD4⁺ de los ratones con EAE y células T CD4⁺ de ratones de control saludables se marcan con diferentes puntos cuánticos de color, se mezclan, y se incuban con una colección de aproximadamente 300,000 peptoides que exhiben glóbulos hidrófilos (FIGURA 1A). La colección se crea utilizando la estrategia de división y agrupamiento, de tal manera que cada glóbulo exhibe un único peptoide. Se aíslan los dos glóbulos que se observan para unir las células T marcadas con rojo, pero no las células T marcadas con verde. Las hipótesis de los inventores es que las dos poblaciones diferirán en su mayoría en la presencia o ausencia de un alto nivel de las células T autorreactivas que conducen a EAE, y así los peptoides que exhiben una preferencia para las células derivadas del ratón EAE probablemente serían ligandos para estas células T autorreactivas. Más aún, los inventores supusieron que el mecanismo más probable mediante el que un peptoide puede discriminar entre diferentes células T es a través de la unión directa al receptor de células T (TCR).

[00232] Uno de los peptoides que surgen de esta detección, el AG12A (FIGURA 1C), se caracteriza en detalle y estos datos validan las anteriores presunciones. El AG12A se muestra que es un ligando altamente específico para las células T autorreactivas MBP Acl-11 específicas que conducen a la enfermedad en este modelo. El peptoide resintetizado se muestra que une a las células T que contienen MBP Acl-11-reactivas V α 2.3/V β 8.2 TCR transgénicas, pero no células T normales, cuando el peptoide está en un glóbulo (FIGURA 1D). También se observa unión específica utilizando un ensayo basado en citometría de flujo cuando se incubaba el peptoide soluble, marcado fluorescentemente con las células T autoinmunes (FIGURAS 2A-B). Funcionalmente, el AG12A prueba ser un antagonista de la proliferación dependiente de antígeno de las células T específicas MBP Acl-11. De forma importante, el

000103

peptoide no tiene efecto en células T específicas de mielina que reconocen un antígeno diferente (FIGURA 3C), demostrando de nuevo la alta especificidad de unión a las células T específicas MBP Acl-11. Finalmente, los datos de entrecruzamiento indican que el peptoide se une directamente al TCR de estas células (FIGURA 2C), aunque estos datos no pueden descartar absolutamente la posibilidad que los entrecruzamientos de peptoide en una proteína diferente con masa similar a una de las cadenas TCR y que está presente solo en las células específicas MBP Acl-11. Sin embargo, esto parece ser altamente improbable.

[00233] Al mejor conocimiento de los inventores, este es el primer ejemplo de moléculas no naturales, sintéticas capaces de unir específicamente a las células T específicas de antígeno sin el requerimiento de presentación MHC. Los esfuerzos previos para dirigir las células T autorreactivas utilizan específicamente los antígenos de péptido utilizados conocidos o se sospechan que están asociados con la enfermedad e incluyen vacunación con estas especies o derivados ligeramente alterados, por ejemplo la inserción de los aminoácidos D (Vandenbark *et al.*, 1989; Howell *et al.*, 1989; Wraith *et al.*, 1989). Este es un método muy diferente al del tomado aquí. Más aún, el uso de tales ligandos de péptido alterados en ensayos humanos no ha producido resultados exitosos, pero exacerba la enfermedad (Bielekova *et al.*, 2000; de Haan *et al.*, 2005), resalta las dificultades con el diseño racional de los terapéuticos dirigidos por células T autorreactivas. Una característica importante de la tecnología de detección mediante estas moléculas que se identifica es aquella no conocida del antígeno natural reconocido por la célula T que es necesaria. Es verdad que los inventores toman ventaja de la naturaleza bien caracterizada de las células T autorreactivas en EAE con el fin de validar la utilidad del AG12A, pero la detección en sí misma simplemente involucrado en la identificación de los compuestos que exhiben glóbulos que unen a las células que son mucho más abundantes en una población que en otra. Por lo tanto, esta tecnología constituye un método potente

para el aislamiento de complejos de células autoinmunes de peptoides en general.

[00234] Por ejemplo, se considera que el método presentado aquí se puede aplicar para detectar el paciente y emparejar las muestras de control para identificar los peptoides que unen las células T ampliamente amplificadas en humanos. También parece probable que el mismo método debe ser efectivo en aislar los peptoides que unen las células B específicas de antígeno. Por supuesto, la naturaleza de la respuesta inmune en una enfermedad autoinmune humana debe ser más policlonal que es el caso del modelo EAE de ratón simple empleado aquí. Esto conduciría presumiblemente a la identificación de diversos peptoides que imitan diferentes antígenos unidos mediante diferentes células T. No obstante, a menos que el grado de policlonalidad es abrumadora, el mismo tipo de método utilizado aquí debe ser valioso en la identificación de peptoides que reconocen por lo menos las células autoinmunes específicas de antígeno más abundantes.

[00235] Los inventores anticipan que esta tecnología proporcionará las herramientas útiles para inmunología aplicada y básica. El experimento de citometría de flujo mostrado en la FIGURA 2B muestra que se pueden emplear estos peptoides para enriquecer las células T autorreactivas en una población, permitiéndoles ser estudiadas en detalle. Este tipo de protocolo también puede probar ser un procedimiento diagnóstico útil para las enfermedades autoinmunes para las que no existe buena prueba molecular, tal como MS. Finalmente, es posible que estos peptoides de unión a células T autorreactivas pueden ser útiles en un modo terapéutico. El experimento detallado en la FIGURA 4 muestra que un conjugado de tris-bipiridil de rutenio del peptoides puede inactivar las células T autorreactivas ex vivo cuando se irradian con luz visible, que sugieren la posible aplicación en una terapia tipo fotofóresis. Alternativamente, es posible que se pueda emplear el peptoides para suministrar algún tipo de cargo tóxico al objetivo de célula T. La ventaja de este método, por supuesto, es que solo las células T autorreactivas

objetivadas por el peptoide se afectarían, mientras que la función de las células T con diferentes especificidades de antígeno no cambiará. Todas las terapias actuales que ayudan a bloquear o modular la función del sistema inmune en enfermedades autoinmunes no se pueden discriminar entre las células T "buenas" y "malas", pero produce una respuesta de blanco, que resultan en efectos colaterales significativos (Hauser, 2008; Hemmer and Hartung, 2007; Stuve, 2008; Schneider, 2008; Coles et al., 2008).

* * * * *

[00236] Todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados aquí se pueden realizar y ejecutar una experimentación excesiva a luz de la presente descripción. Aunque se han descrito las composiciones y métodos de esta invención en términos de las realizaciones preferidas, será evidente para aquellos expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito aquí sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que se relacionan químicamente y fisiológicamente pueden sustituir los agentes descritos aquí mientras que se logran los mismos o resultados similares. Todas tales sustituciones o modificaciones similares evidentes para aquellos expertos en la técnica se considera que están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

. REFERENCIAS

Las siguientes referencias, al agrado en que proporcionan procedimiento de ejemplo u otros detalles complementarios para aquellos establecidos aquí, se incorporan específicamente aquí como referencia.

Patente Estadounidense 3,817,837

Patente Estadounidense 3,850,752

- 000106

- Patente Estadounidense 3,939,350
- Patente Estadounidense 3,996,345
- Patente Estadounidense 4,275,149
- Patente Estadounidense 4,277,437
- Patente Estadounidense 4,366,241
- Patente Estadounidense 4,680,338
- Patente Estadounidense 4,843,092
- Patente Estadounidense 5,141,648
- Patente Estadounidense 5,443,826
- Patente Estadounidense 5,563,250
- Patente Estadounidense 5,599,795
- Patente Estadounidense 5,856,456
- Patente Estadounidense 5,880,270
- Alluri et al., J. Am. Chem. Soc. 125:13995-4004, 2003.
- Ando et al., Cell Immunol., 124:132-43, 1989.
- Arend & Dayer, Arthritis Rheum., 38:151-60, 1995.
- Arend et al., Annu. Rev. Immunol., 16:27-55, 1998.
- Arend, Arthritis Rheum., 44:2224-2234, 2001.
- Autenrieth et al., Infect. Immun., 62:2590-9, 1994.
- Ball, Ann. Rheum. Dis., 30:213-223, 1971.
- Bendzen et al., Scand. J. Rheumatol., 28:599-606, 1988.
- Besnard et al., Gut, 43(5):634-38, 1998.
- Besnier et al., Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 18:36-41, 2002.
- Bielekova et al., Nat. Med., 6:1167-75, 2000.
- Blumberg et al., Arthritis Rheum., 7:93-7, 1964.
- Botoman et al., Am. Fam. Physician, 57(1):57-68, 1998.
- Brandt et al., Arthritis Rheum., 43:1346-52, 2000.
- Braun et al., Arthritis Rheum., 42:2039-44, 1999.
- Brewerton et al., Lancet, 1:904-907, 1973a.
- Brewerton et al., Lancet, 1:956-957, 1973b.
- Brynskov et al., N. Engl. J. Med., 321(13):845-50, 1989.
- Burdine et al., J. Amer. Chem. Soc., 126:11442-11443, 2004.
- Burger & Dayer, Neurology, 45(6 Suppl. 6):S39-43, 1995.
- Calin et al., In: The Spondylarthritides, Calin et al. (Eds.), Oxford, UK. Oxford University Press, 179, 1998.
- Cann et al., Gut, 24(5):405-11, 1983.

- Cavaletti et al., *Neurol. Sci.*, 27:24-32, 2006.
- Chomarat et al., *Arthritis Rheum.*, 38:1046-54, 1995.
- Coles et al., *N. Engl. J. Med.*, 359:1786-801, 2008.
- de Haan et al., *Mol. Immunol.*, 42:365-73, 2005.
- De Jager et al., *Semin. Nucl. Med.*, 23(2):165-179, 1993.
- de Waal et al., *J. Exp. Med.*, 174:1209-20, 1991.
- Dinareello, *Int. Rev. Immunol.*, 16:457-99, 1998.
- Dionne et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 112(3):435-42, 1998.
- Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol Biol*, 109:215-237, 1999.
- Doran et al., *J. Rheumatol.* 30(2):316-20, 2003.
- Drossman et al., *Dig Dis Sci.*, 38(9):1569-80, 1999.
- Drossman et al., *Gastroenterology*, 112(6):2120-37, 1997.
- Drossman et al., *Gastroenterology*, 112(6):2120-37, 1997.
- Eastgate et al., *Lancet*, 2:706-9, 1988.
- Ettehadi et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 96:146-51, 1994.
- Everhart and Renault, *Gastroenterology*, 100(4):998-1005, 1991.
- Fearon and Locksley, *Science*, 72:50-53, 1996.
- Feldtkeller et al., *Rheumatol. Int.* 23(2):61-66, 2003.
- Fellerman et al., *Am. J. Gastroenterol.*, 93(10):1860-66, 1998.
- Firestein et al., *Arthritis Rheum.*, 37:644-52, 1994.
- Fujikawa et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 54:318-20, 1995.
- Funakoshi et al., *Digestion*, 59(1):73-78, 1998.
- Galley & Webster, *Br. J. Anaesth.*, 77:11-16, 1996.
- Gladman et al., *J. Rheumatol.*, 22:675-9, 1995.
- Gladman et al., *Q. J. Med.*, 62:127-141, 1987.
- Gladman, *Rheum Dis Clin North Am*, 18:247-56, 1992.
- Goverman et al., *Cell*, 72:551-60, 1993.
- Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.*, 24(12):1271-1285, 1993.
- Gwee et al., *Gut*, 44(3):400-6, 1999.
- Hahn & Tsao, In: *Dubois' Lupus Erythematosus*, 4th Ed., Wallace & Hahn (Eds.), Lea and Febiger, Philadelphia, 195-201, 1993.
- Hannum et al., *Nature*, 343:336-40, 1990.
- Harrison et al., *J Rheumatol.*, 25(12):2324-2330, 1998.
- Harrison et al., *J Rheumatol.*, 25(12):2324-2330, 1998.
- Hart et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 99(3):331-337, 1995.
- Hart et al., *Immunology*, 84:536-42, 1995.
- Hauser, *N. Eng. J. Med.*, 359:1838-1841, 2008.

- Hemmer and Hartung, *Ann. Neurol.*, 62:314-26, 2007.
- Hoffenberg et al., *J. Pediatr.*, 134(4):447-52, 1999.
- Hohler et al. *J. Invest. Dermatol.*, 109(4):562-5, 1997.
- Hollander et al., *Ann. Intern. Med.*, 105:883-85, 1986.
- Hollander, *Scand. J. Gastroenterol.* 27:721-26, 1992.
- Horwitz and Fisher, *N. Engl. J. Med.*, 344(24):1846-50, 2001.
- Howell et al., *Science*, 246:668-70, 1989.
- Jacob et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1233-7, 1990.
- Jailwala et al., *Ann. Intern. Med.*, 133(2):136-47, 2000.
- Jarvis, *Curr Opin Rheumatol.*, 10:459-467, 1998.
- Jarvis, *Curr Opin Rheumatol.*, 10:459-467, 1998.
- Jarvis, *Pediatr Ann.*, 31:437-446, 2002.
- Jones et al., *Br. J. Rheumatol.*, 33:834-9, 1994.
- Jonsson and Brokstad, In: *A Textbook of Rheumatology*, 6th Ed.,
Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 495-504, 2001.
- Jonsson et al., *Br J Rheumatol.*, 32: 578-81, 1993.
- Jonsson et al., *Oral Dis.*, 8:130-140, 2002.
- Kahle et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 51:731-4, 1992.
- Kellow and Phillips, *Gastroenterology*, 92(6):1885-93, 1987.
- Khan, *Clin. Exp. Rheumatol.* 20(6):6-10, 1998.
- Khan, In: *Ankylosing spondylitis and related
spondyloarthropathies*, Spine, State of the Art Reviews,
1990.
- Kodadek et al., *Acc. Chem. Res.*, 37:711-718, 2004.
- Kotake et al., *Infect. Immun.*, 67:2682-6, 1999.
- Kotzin & O'Dell, In: *Samler's Immunologic Diseases*, 5th Ed.,
Frank et al. (Eds.), Little Brown & Co., Boston, 667-97,
1995.
- Kotzin, *Cell*, 85:303-06, 1996.
- Kuboyama, *Kurume Med. J.*, 45(1):33-37, 1998.
- Lahesmaa et al., *J. Immunol.*, 148:3079-85, 1992.
- Lee et al., *Mol. Biosyst.*, 4:59-65, 2008.
- Lee et al., *Mol. Biosyst.*, 4:59-65, 2008.
- Leiper et al., *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 12(1):179-99,
1998.
- Lim et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 129:12936-12937, 2007.
- Lim et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 129:12936-12937, 2007.

- Lipsky, In: Harrison's principles of internal medicine, Fauci et al. (Eds.), 14th Ed., NY, McGraw-Hill, 1880-1888, 1998.
- Liu et al., J. Amer. Chem. Soc., 128:15228-15235, 2006.
- Lo et al., Immunol Rev., 169:225-239, 1999.
- Lugering et al., Ital. J. Gastroenterol. Hepatol., 30(3):338-44, 1998.
- Lynn and Friedman, N. Engl. J. Med., 329(26):1940-5, 1993.
- Macatonia et al., J. Immunol., 150:3755-65, 1993.
- Makowiec et al., Z. Gastroenterol., 36(8):619-24, 1998.
- Marsal et al., Rheumatology, 38:332-7, 1999.
- McAlindon et al., Gut, 42(2):214-19, 1998.
- McGonagle et al., Arthritis Rheum., 41:694-700, 1998.
- McGonagle et al., Curr. Opin. Rheumatol., 11:244-50, 1999.
- Mertz et al., Gastroenterology, 118(5):842-8, 2000.
- Moll & Wright, Ann. Rheum. Dis., 32:181-201, 1973.
- Moll & Wright, Semin. Arthritis Rheum., 3:55-78, 1973.
- Murch, Nutrition, 14:780-83, 1998.
- Nakamura et al., In: Handbook of Experimental Immunology (4th Ed.), Weir et al. (Eds), 1:27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.
- Neal et al., BMJ, 314(7083):779-82, 1997.
- Nielen et al., Arthritis Rheum., 50(2):380-386, 2004.
- Noseworthy et al., N. Engl. J. Med., 343:938-52, 2000.
- Ohnishi et al., Int. Immunol., 6:817-30, 1994.
- Olivos et al., Org. Lett., 4:4057-4059, 2002.
- Partsch et al., Br. J. Rheumatol., 24:518-23, 1997.
- Pimentel et al., Am. J. Gastroenterol., 95(12):3503-6, 2000.
- Pociot et al., Scand. J. Immunol., 42:501-4, 1995.
- Popkov et al., Nat. Proc. Acad. Sci. USA, 106(11):4378-83, 2009.
- Prieur et al., Lancet, 2:1240-2, 1987.
- Racke, Curr. Protoc. Neurosci., Chapter 9:Unit 97, 2001.
- Rantapaa-Dahlqvist et al., Arthritis Rheum., 48(10):2741-2749, 2003.
- Reimund et al., Eur. J. Clin. Invest., 28(2):145-50, 1998.
- Ribbens et al., Eur. Cytokine Netw., 11:669-76, 2000.
- Rogler & Andus, World J. Surg., 22(4):382-89, 1998.
- Rooney et al., Rheumatol. Int., 10:217-9, 1990.

- 000110

- Rostami et al., *Mult. Scler.*, 5:198-203, 1999.
- Rothstein, *Med. Clin. North Am.*, 84(5):1247-57, 2000.
- Ruemmele et al., *Gastroenterol.*, 115(4):822-29, 1998.
- Saiki et al., *Scand. J. Gastroenterol.*, 33(6):616-22, 1998.
- Salomonsson et al., *Arthritis Rheum.*, 48:3187-201, 2003.
- Salomonsson et al., *Scand. J. Immunol.*, 55:336-42, 2002.
- Salvarani et al., *Curr. Opin. Rheumatol.*, 10:299-305, 1998.
- Sandler, *Gastroenterology*, 99(2):409-15, 1990.
- Sartor, *Am. J. Gastroenterol.*, 92(12):5S-11S, 1997.
- Schellekens et al., *Arthritis Rheum.*, 43(1):155-163, 2000.
- Schlaak et al., *Clin. Exp. Rheumatol.*, 14:155-62, 1996.
- Schlaak et al., *Eur. J. Immunol.*, 22:2771-6, 1992.
- Schlosstein et al., *NE J. Medicine*, 288:704-706, 1973.
- Schneider, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 9:431-8, 2008.
- Schreiber, *Neth. J. Med.*, 53(6):S24-31, 1998.
- Sieper & Braun, *Arthritis Rheum.*, 38:1547-54, 1995.
- Simon et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 94:122-6, 1993.
- Simon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9367-71, 1992.
- Simon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:8562-6, 1994.
- Soderholm et al., *Gastroenterol.*, 117:65-72, 1999.
- Stack et al., *Lancet*, 349(9051):521-24, 1997.
- Stuve, *J. Neurol. Sci.*, 274:39-41, 2008.
- Talley et al., *Gastroenterology*, 109(6):1736-41, 1995.
- Targan et al., *N. Engl. J. Med.*, 337(15):1029-35, 1997.
- Udugamasooriya et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 130:5744-5752, 2008.
- van den Berg, *Semin Arthritis Rheum.*, 30(5 Suppl.2):7-16, 2001.
- van Dullemen et al., *Gastroenterol.*, 109(1):129-35, 1995.
- van Hogezaand & Verspaget, *Drugs*, 56(3):299-305, 1998.
- Vandenbark et al., *Nature*, 341:541-4, 1989.
- Warrington et al., *Arthritis Rheum.*, 44:13-20, 2001.
- Wawrzynczak and Thorpe, *FEBS Lett.*, 207(2):213-216, 1986.
- Weyand and Goronzy, *Ann. NY Acad. Sci.*, 987:140-9, 2003.
- Whitehead et al., *Gastroenterology*, 98(5 Pt 1):1187-92, 2000.
- Wordsworth, In: *Genes and Arthritis*, *Brit. Medical Bulletin*, 51:249-266, 1995.
- Wraith et al., *Cell*, 57:709-15, 1989.
- Wright, *Ann. Rheum. Dis.*, 15:348-56, 1956.

. 000111

- Wright, Clin. Orthop. Related Res., 143:8-14, 1979.
- Xanthou et al., Arthritis Rheum., 44: 408-18, 2001.
- Yin et al., Arthritis Rheum., 40:1788-97, 1997.
- Yin et al., Rheumatology, 38:1058-67, 1999.
- Zamvil and Steinman, Annu. Rev. Immunol., 8:579-621, 1990.

. 000112

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un ligando que se reconoce específicamente mediante células T autoinmunes que comprende:

- (a) proporcionar una primera población de células T de un sujeto saludable, en donde dicha población se marca con una primera marca detectable;
- (b) proporcionar una segunda población de células T de un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune, en donde dicha población se marca con una segunda marca detectable;
- (c) poner en contacto dicha primera y segunda población de células T con una pluralidad de ligandos candidatos; y
- (d) evaluar la unión de dicha primera y segunda población de células T a dichos ligandos candidatos,

en donde si dicho ligando se une a dicha segunda población de células T pero no a dicha primera población de células T, el dicho ligando se reconoce por ser células T autoinmunes pero no células T saludables.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple o artritis reumatoide.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho ligando es un 3-mer, un 4-mer, un 5-mer, un 6-mer, un 7-mer, un 8-mer, un 9-mer o un 10-mer.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dichas primeras y segundas marcas son fluorescentes o quimioluminiscentes.
5. El método de la reivindicación 1, en donde dichas primeras y segundas marcas son puntos cuánticos.
6. El método de la reivindicación 1, en donde dicho ligando se une a un soporte.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dicho soporte es una microesfera, un chip, un filtro, una barra, una membrana, una matriz polimérica o un pozo.
8. El método de la reivindicación 7, en donde poner en contacto comprende poner dicho soporte en contacto con dicha primera y segunda población de células T al mismo tiempo.
9. El método de la reivindicación 1, en donde dicha población de células T comprende células T CD4⁺.

10. El método de la reivindicación 1, en donde dichos sujetos son humanos o murinos.
11. Un método para retirar una célula T autoinmune de un sujeto que sufre de una enfermedad autoinmune que comprende:
 - (a) proporcionar un ligando que se une específicamente a las células T autoinmunes, en donde dicho ligando se une a un soporte;
 - (b) poner en contacto una muestra que contiene células T de dicho sujeto con dicho ligando unido al soporte durante un tiempo suficiente para permitir la unión de células T autoinmunes a dicho ligando unido al soporte; y
 - (c) separar dicho soporte de dicha muestra.
12. El método de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente regresar la muestra de la etapa (c) a dicho sujeto.
13. El método de la reivindicación 11, en donde dicha enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple o artritis reumatoide.

14. El método de la reivindicación 11, en donde dicho ligando es un 3-mer, un 4-mer, un 5-mer, un 6-mer, un 7-mer, un 8-mer, un 9-mer o un 10-mer.
15. El método de la reivindicación 11, en donde dicho soporte es una microesfera, un chip, un filtro, una barra, una membrana, una matriz polimérica o un pozo.
16. El método de la reivindicación 11, en donde dicha muestra es sangre, fluido cerebroespinal o semen.
17. El método de la reivindicación 16, en donde dicha muestra es sangre, y dicha sangre se obtiene de dicho sujeto, se trata *ex vivo*, y se regresa a dicho sujeto.
18. El método de la reivindicación 17, en donde dicha sangre se perfusiona a través de dicho ligando unido al soporte y se regresa a dicho sujeto en un circuito cerrado.
19. El método de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente obtener dicha muestra de dicho sujeto.
20. El método de la reivindicación 11, en donde dicho sujeto es humano o murino.
21. El método de la reivindicación 11, en donde el ligando es un peptoide como se describe en las reivindicaciones 44-63.

22. Un método para matar una célula T autoinmune obtenida de un sujeto que sufre de una enfermedad autoinmune que comprende:
- (a) proporcionar un ligando que se une específicamente a células T autoinmunes, en donde dicho ligando se conjuga con una toxina; y
 - (b) poner en contacto una muestra que contiene células T de dicho sujeto con dicho conjugado durante un tiempo suficiente para permitir la unión de por lo menos una célula T autoinmune a dicho conjugado,
- en donde dicho conjugado provoca la muerte de dicha célula T autoinmune.
23. El método de la reivindicación 22, en donde dicha muestra se trata *ex vivo*, y dicho método comprende adicionalmente regresar la muestra a dicho sujeto.
24. El método de la reivindicación 22, en donde dicha enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple o artritis reumatoide.
25. El método de la reivindicación 22, en donde dicho ligando es un 3-mer, un 4-mer, un 5-mer, un 6-mer, un 7-mer, un 8-mer, un 9-mer o un 10-mer.

26. El método de la reivindicación 22, en donde dicha toxina es ricina, toxina de la difteria o toxina del cólera.
27. El método de la reivindicación 22, en donde dicha toxina es una toxina fotoactivada.
28. El método de la reivindicación 22, en donde dicha toxina fotoactivada es rutenio (II) tris-bipididilo, y la etapa (b) comprende adicionalmente exponer dicha muestra a la luz visible.
29. El método de la reivindicación 22, en donde dicha muestra es sangre, fluido cerebroespinal o semen.
30. El método de la reivindicación 22, que comprende adicionalmente obtener dicha muestra de dicho sujeto.
31. El método de la reivindicación 22, en donde dicho sujeto es humano o murino.
32. El método de la reivindicación 22, en donde el ligando es un peptoide como se describe en las reivindicaciones 44-63.
33. Un método para matar una célula T autoinmune obtenida de o en un sujeto que sufre de una enfermedad autoinmune que comprende:

000118

- (a) proporcionar un ligando que se une específicamente a células T autoinmunes, en donde dicho ligando se conjuga con una molécula que contiene Fc IgG; y
- (b) poner en contacto una población de células T autoinmunes con dicho conjugado durante un tiempo suficiente para permitir la unión de por lo menos una célula T autoinmune a dicho conjugado,

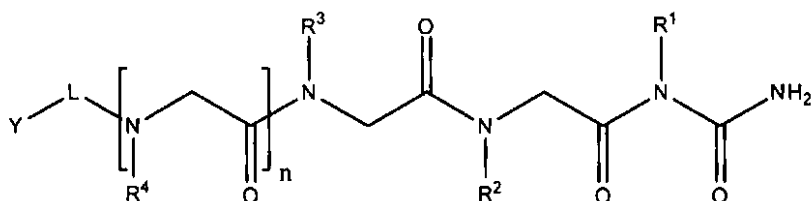
en donde dicho conjugado recluta efectores inmunes a dichas células T autoinmunes que resulta en muerte de las mismas.

- 34. El método de la reivindicación 33, en donde dicha población de células T autoinmunes se trata ex vivo, y comprende adicionalmente regresar la muestra de la etapa (b) a dicho sujeto.
- 35. El método de la reivindicación 33, en donde dicha enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple o artritis reumatoide.
- 36. El método de la reivindicación 33, en donde dicho ligando es un 3-mer, un 4-mer, un 5-mer, un 6-mer, un 7-mer, un 8-mer, un 9-mer o un 10-mer.
- 37. El método de la reivindicación 33, en donde dicha molécula que contiene Fc IgG es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla, o un fragmento Fc.

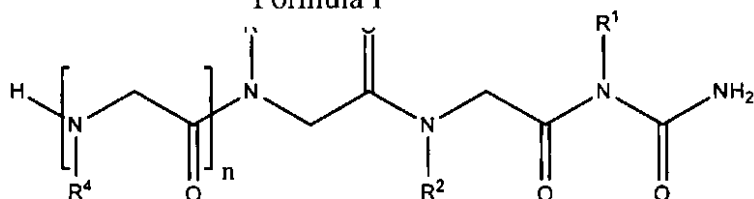
- 0001'9

38. El método de la reivindicación 37, en donde dicha molécula que contiene Fc IgG es un anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla, y dicho ligando se ancla al sitio de unión de antígeno de dicho anticuerpo.
39. El método de la reivindicación 38, en donde dicha molécula que contiene Fc IgG es un fragmento Fc que carece de las regiones variables IgG, y dicho peptoide se ancla al terminal carboxi de dicho fragmento Fc.
40. El método de la reivindicación 33, en donde dicha muestra es sangre, fluido cerebroespinal o semen.
41. El método de la reivindicación 33, que comprende adicionalmente obtener dicha muestra de dicho sujeto.
42. El método de la reivindicación 33, en donde dicho sujeto es humano o murino.
43. El método de la reivindicación 33, en donde el ligando es un peptoide como se describe en las reivindicaciones 44-63.
44. Un peptoide que tiene la fórmula:

. 000120



Fórmula I



Formula II

en donde n es 0-8; L es ligador; Y es toxina o fragmentos de anticuerpo; y R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8 (con cada valor de n por encima de 4 agregado al siguiente grupo R en orden numérico a la Fórmula I o Fórmula II), puede ser hidrógeno; alquilo; alilo; metilo; etilo; n-propilo; isopropilo; n-butilo; isobutilo; sec-butilo; tert-butilo; pentilo; hexilo; isopentilo; arilo; heteroarilo; furanilo; indolilo; tiofenilo; tiazolilo; imidazolilo; isoxazoilo; oxazoilo; piperonilo; pirazoilo; pirrolilo; pirazinilo; piridilo; pirimidilo; pirimidinilo; purinilo; cinnolinilo; benzofuranilo; benzotienilo; benzotriazolilo; benzoxazolilo; quinolina; isoxazolilo; isoquinolina cicloalquilo; alqueno; cicloalqueno; fenilo; piridilo; metoxietilo; (R)-metilbenzilo; alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆); alquinilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH,

000121

SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆); alquenoilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆).

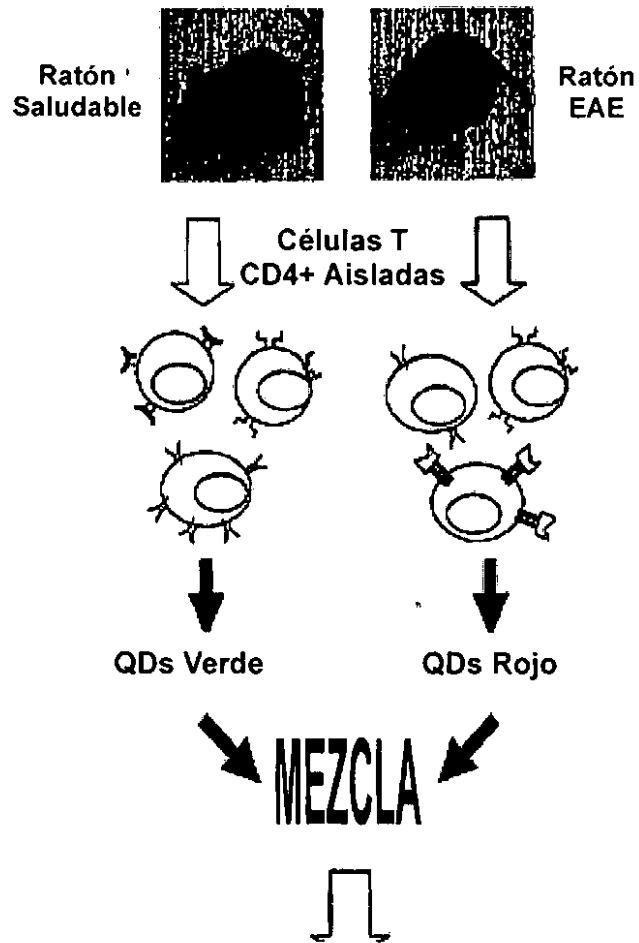
45. El peptoide de la reivindicación 44, en donde n es 5.
46. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R1 es alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆); alquenoilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆); alquenoilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆).
47. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R1 es alquilo C₁-C₆ terminalmente sustituido con un NH₂.
48. El peptoide de la reivindicación 47, en donde R1 es 4 aminobutano.
49. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R2 es alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆); alquenoilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆); alquenoilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido con NH₂, OH, SH, N(alquilo C₁-C₆)₂, O(alquilo C₁-C₆), o S(alquilo C₁-C₆).

000122

50. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R2 es alquilo C₁-C₆ terminalmente sustituido con un NH₂.
51. El peptoide de la reivindicación 50, en donde R1 es 4 aminobutano.
52. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R3 es alquilo C₁-C₆, alquinilo C₂-C₆, o alquenilo C₂-C₆.
53. El peptoide de la reivindicación 52, en donde R3 es isobutilo.
54. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R4 es un alquilo C₁-C₆ terminalmente sustituido con un grupo NH₂.
55. El peptoide de la reivindicación 54, en donde R4 es un grupo 4 aminobutano.
56. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R5 es un grupo (R)-metilbencilo.
57. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R6 es un grupo furanilo.
58. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R7 es alquilo C₁-C₆ terminalmente sustituido con un NH₂.
59. El peptoide de la reivindicación 58, en donde R7 es un grupo 4 aminobutano.

000123

60. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R8 es alquilo C₁-C₆.
61. El peptoide de la reivindicación 60, en donde R8 es un grupo isobutilo.
62. El peptoide de la reivindicación 44, en donde R1, R2, R4, y R7 son grupos 4-aminobutano; R3 y R8 son grupos isobutilo; R5 es un grupo (R)-metilbencilo; y R6 es un grupo furanilo.
63. El peptoide de la reivindicación 62, en donde R8 comprende un grupo lisilo terminal, hidroxilo, o carboxilo.



Selección contra 300,000 peptoides

FIG. 1A

115

2/15

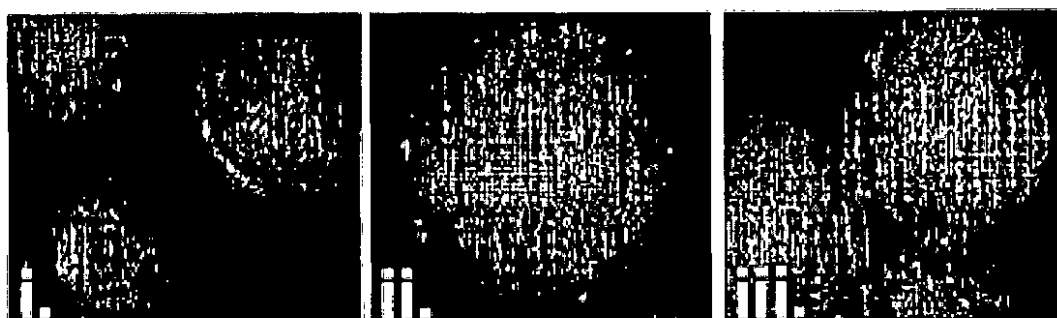


FIG. 1B

000126

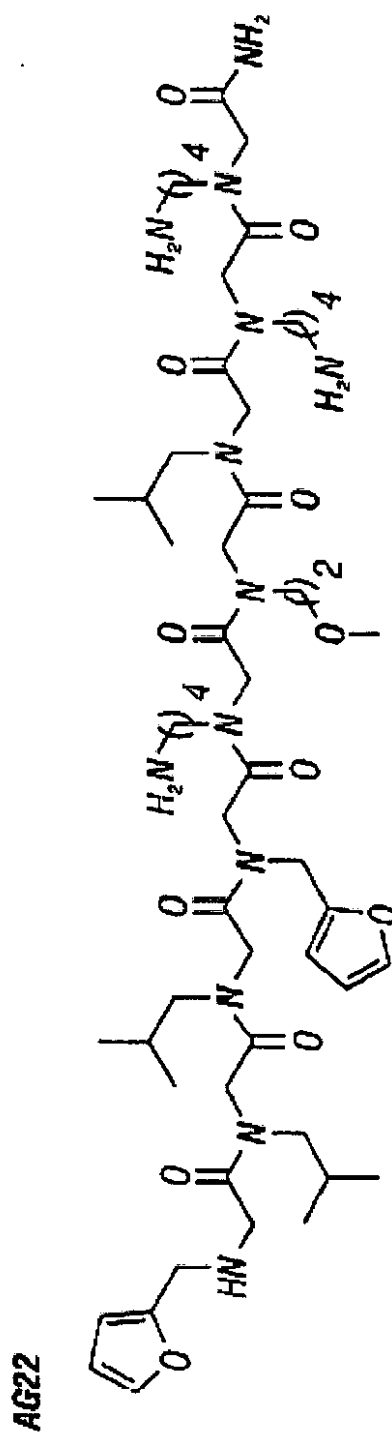
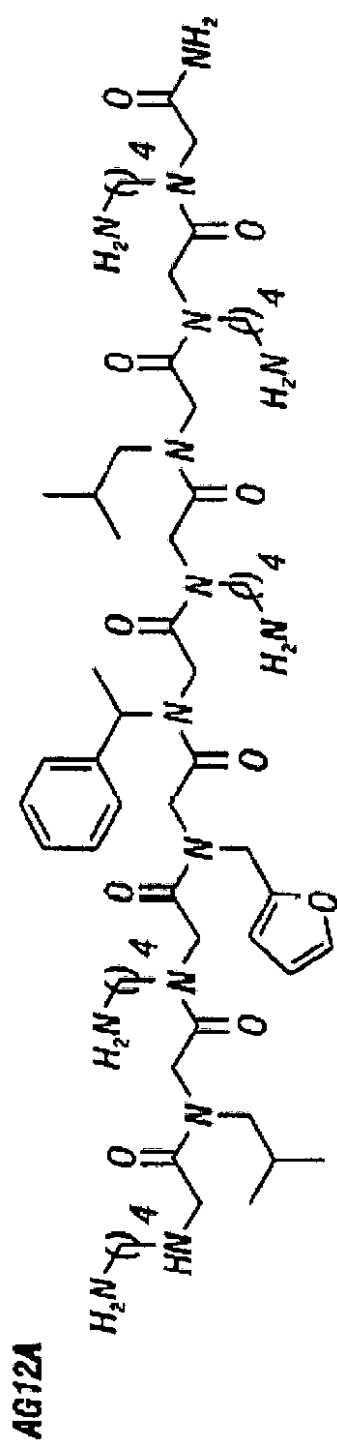
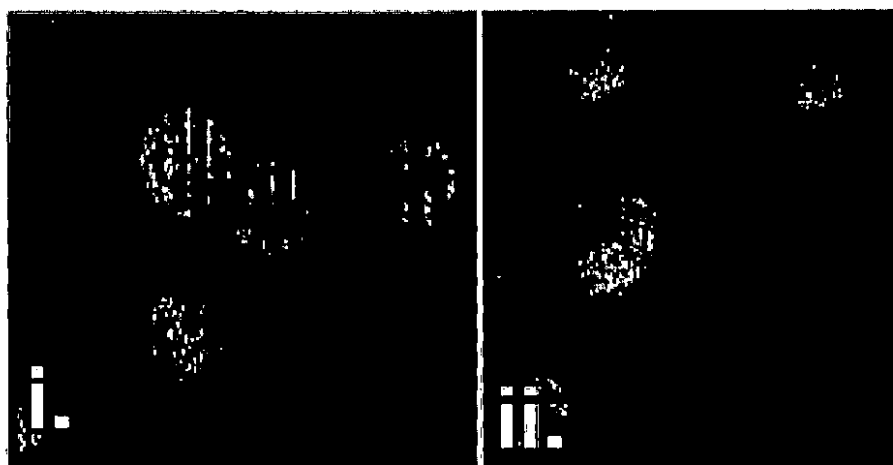


FIG. 1C

000127

4/15

*FIG. 1D*

- 000128

000129

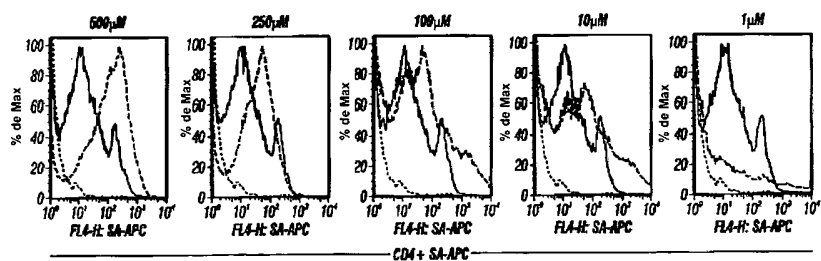
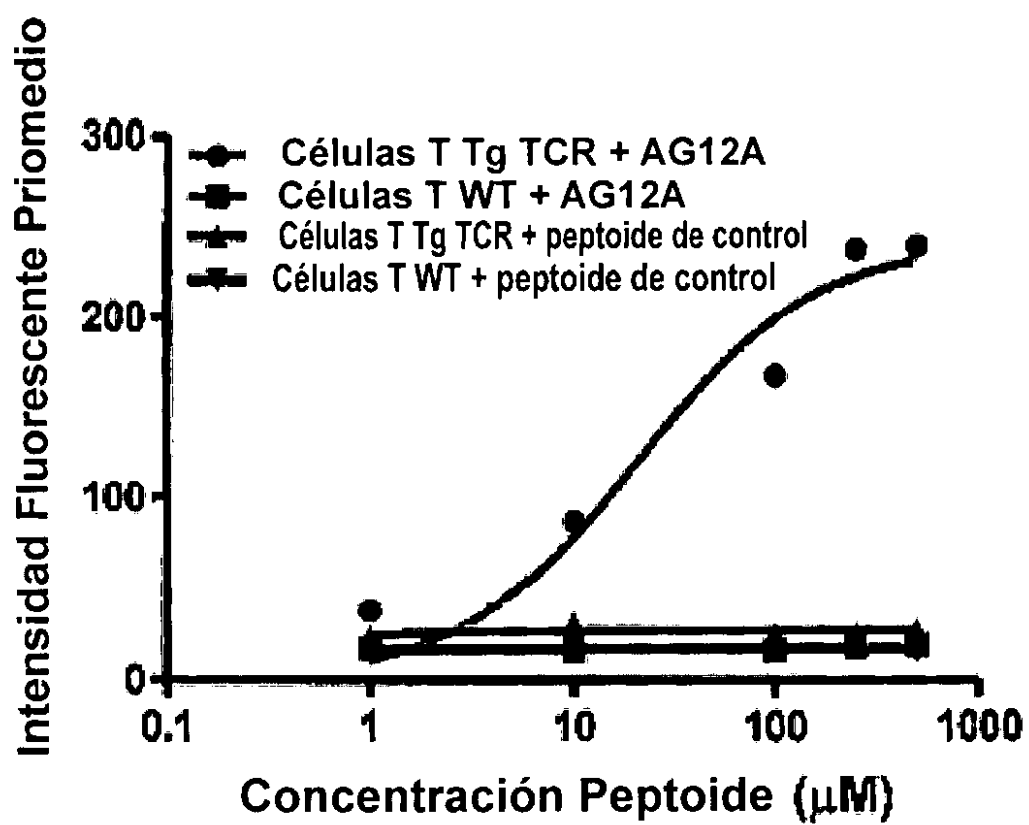


FIG. 2A

6/15

**FIG. 2B**

000130

7/15

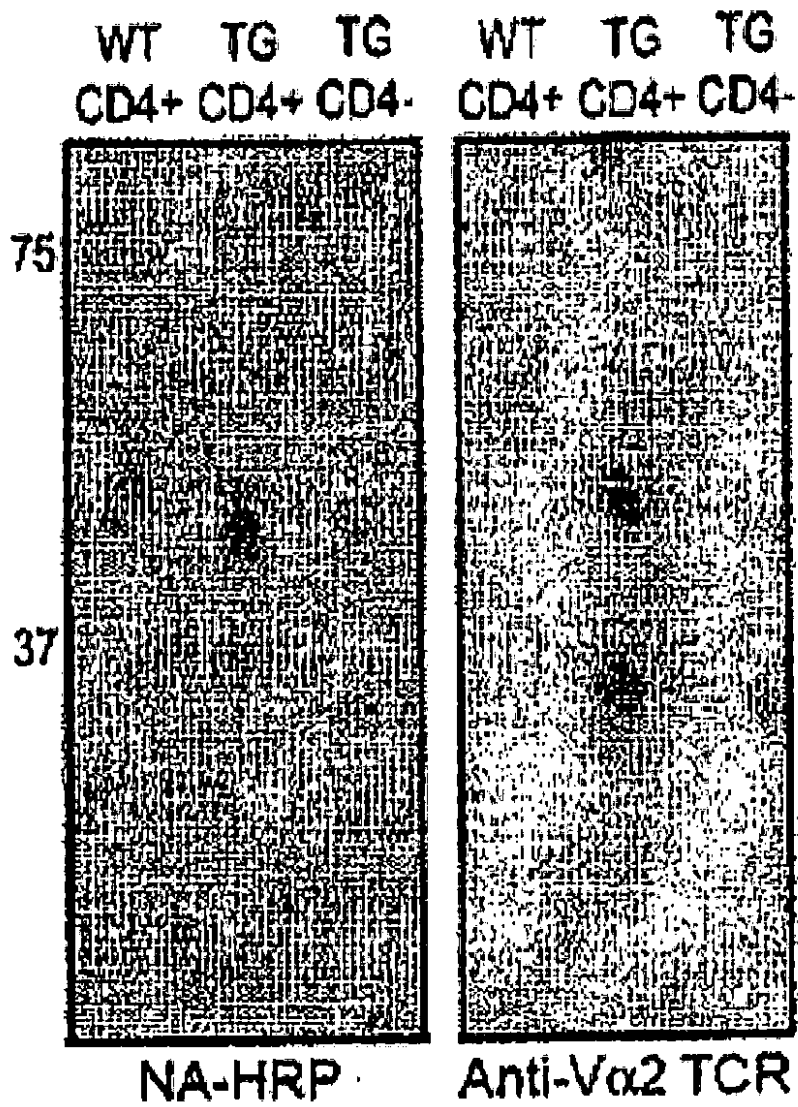


FIG. 2C

000131

8/15

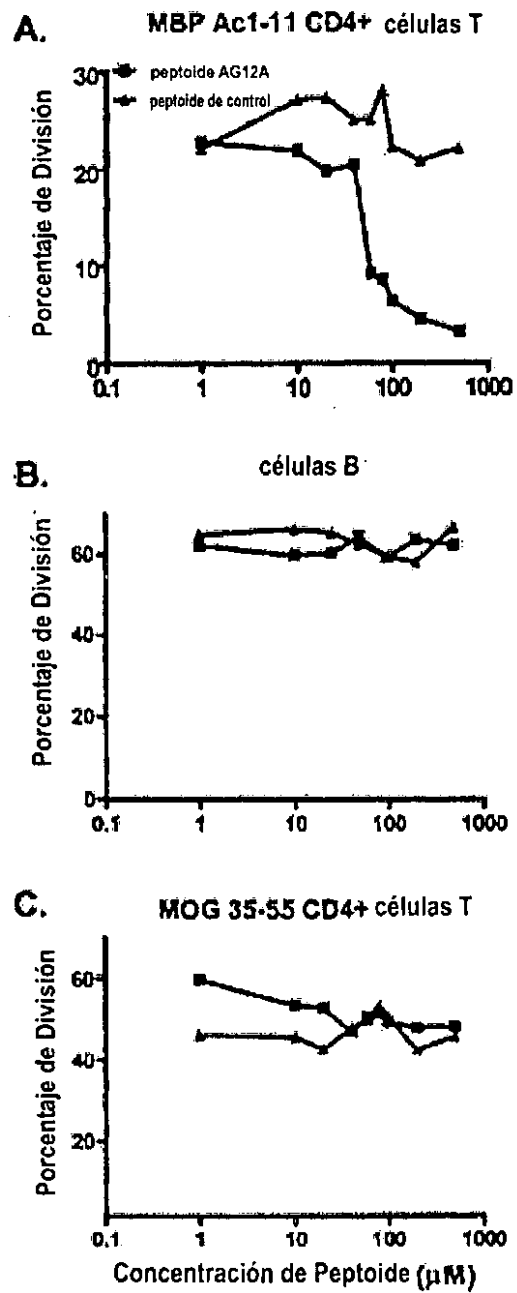
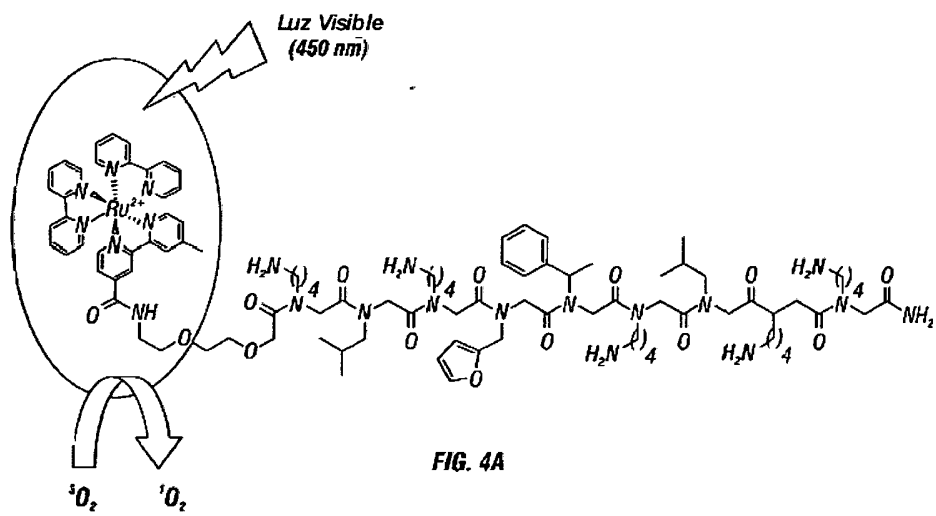


FIG. 3

000132

000133



10/15

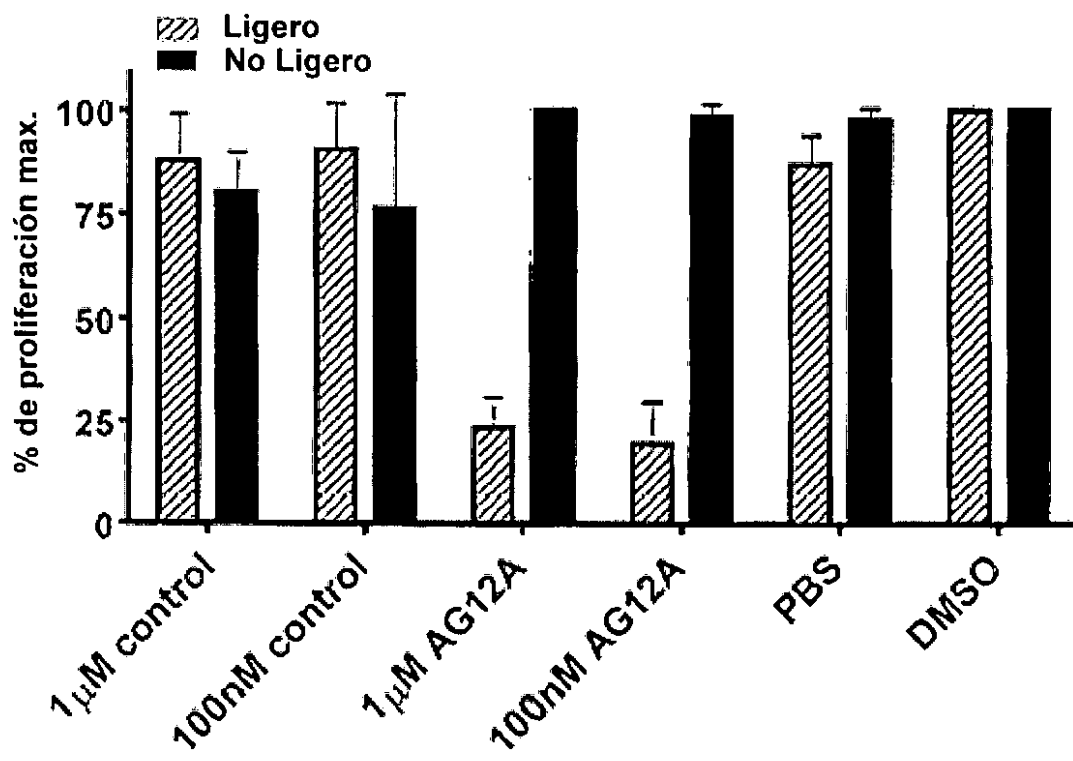


FIG. 4B

000134

11/15

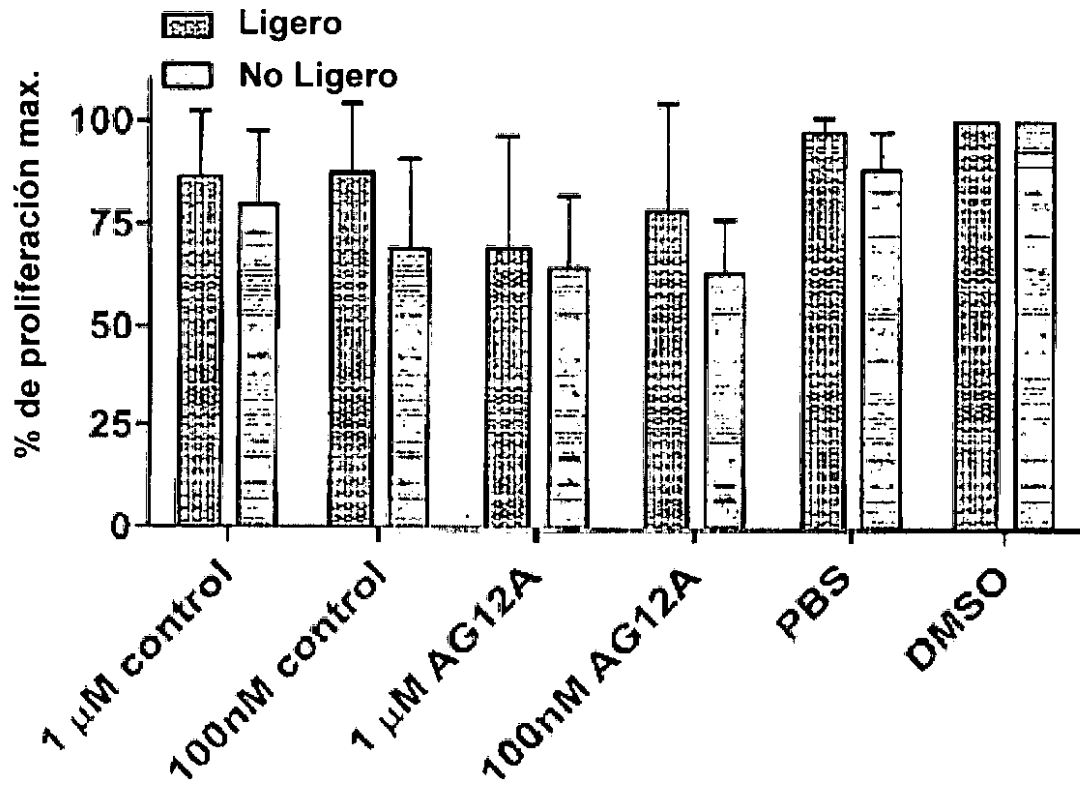


FIG. 4C

000135

12/15

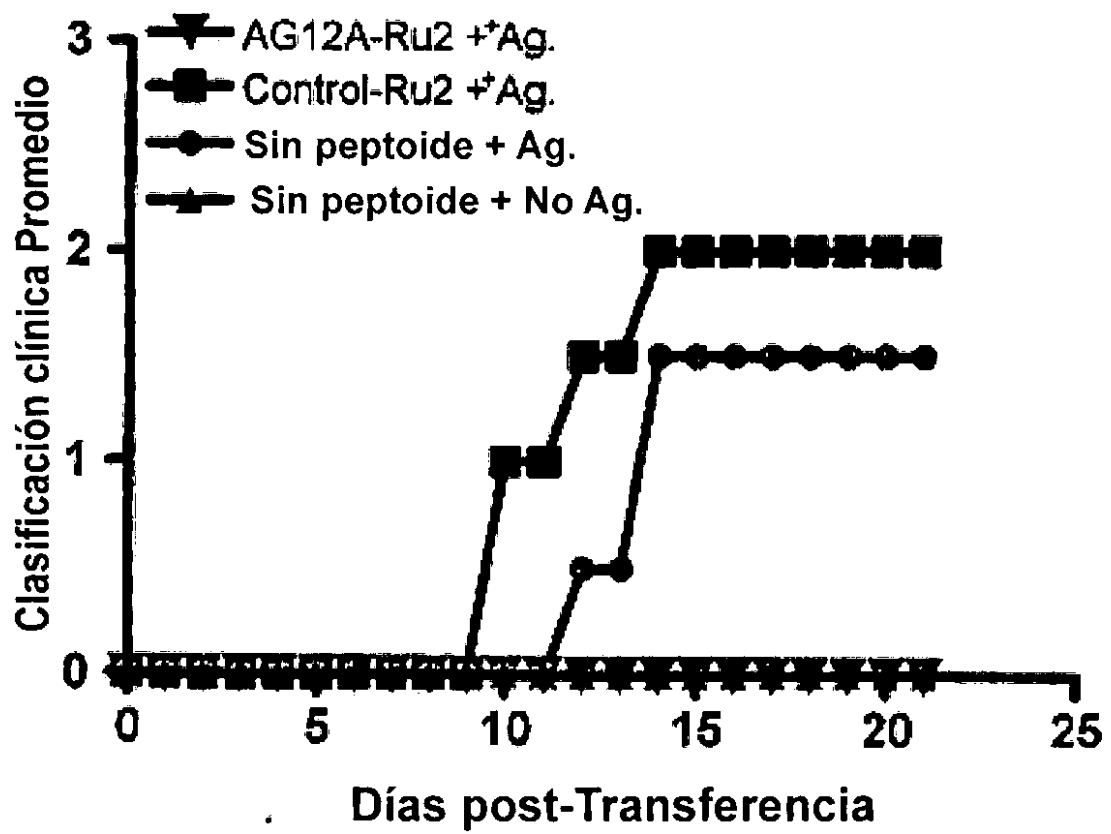


FIG. 4D

000136

13/15

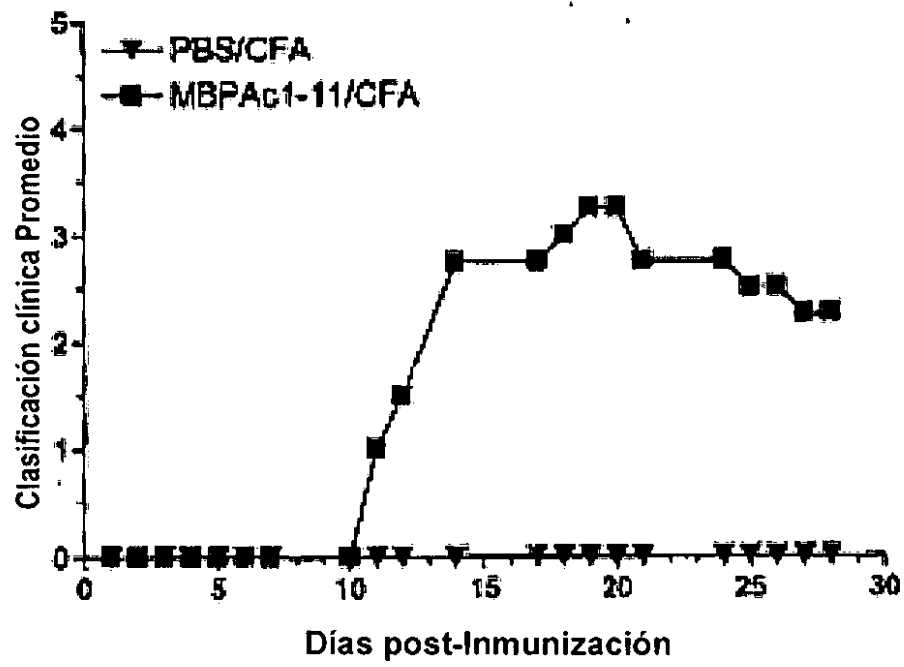


FIG. 5A

000137

14/15

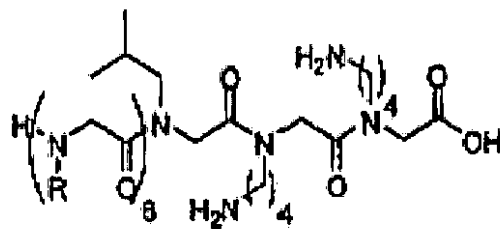
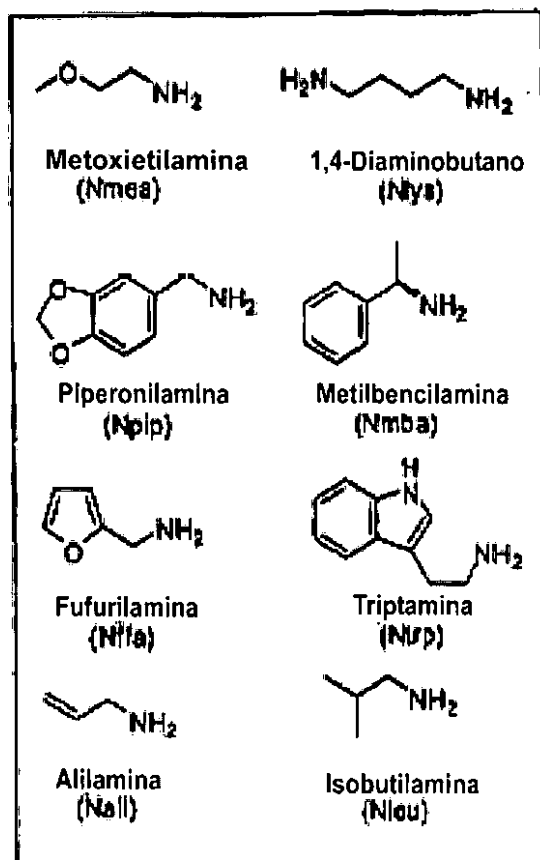
262,144 (8⁶) Compuestos

FIG. 5B

000138

CC(C)CN(C)C(=O)N(CC1=CC=CC=C1O)C(=O)N(CC2=CC=CC=C2O)C(=O)N(CC3=CC=CC=C3O)C(=O)N(CC4=CC=CC=C4O)C(=O)N(CC5=CC=CC=C5O)C(=O)N(CC6=CC=CC=C6O)C(=O)N(CC7=CC=CC=C7O)C(=O)N(CC8=CC=CC=C8O)C(=O)N(CC9=CC=CC=C9O)C(=O)N(CC10=CC=CC=C10O)C(=O)N(CC11=CC=CC=C11O)C(=O)N(CC12=CC=CC=C12O)C(=O)N(CC13=CC=CC=C13O)C(=O)N(CC14=CC=CC=C14O)C(=O)N(CC15=CC=CC=C15O)C(=O)N(CC16=CC=CC=C16O)C(=O)N(CC17=CC=CC=C17O)C(=O)N(CC18=CC=CC=C18O)C(=O)N(CC19=CC=CC=C19O)C(=O)N(CC20=CC=CC=C20O)C(=O)N(CC21=CC=CC=C21O)C(=O)N(CC22=CC=CC=C22O)C(=O)N(CC23=CC=CC=C23O)C(=O)N(CC24=CC=CC=C24O)C(=O)N(CC25=CC=CC=C25O)C(=O)N(CC26=CC=CC=C26O)C(=O)N(CC27=CC=CC=C27O)C(=O)N(CC28=CC=CC=C28O)C(=O)N(CC29=CC=CC=C29O)C(=O)N(CC30=CC=CC=C30O)C(=O)N(CC31=CC=CC=C31O)C(=O)N(CC32=CC=CC=C32O)C(=O)N(CC33=CC=CC=C33O)C(=O)N(CC34=CC=CC=C34O)C(=O)N(CC35=CC=CC=C35O)C(=O)N(CC36=CC=CC=C36O)C(=O)N(CC37=CC=CC=C37O)C(=O)N(CC38=CC=CC=C38O)C(=O)N(CC39=CC=CC=C39O)C(=O)N(CC40=CC=CC=C40O)C(=O)N(CC41=CC=CC=C41O)C(=O)N(CC42=CC=CC=C42O)C(=O)N(CC43=CC=CC=C43O)C(=O)N(CC44=CC=CC=C44O)C(=O)N(CC45=CC=CC=C45O)C(=O)N(CC46=CC=CC=C46O)C(=O)N(CC47=CC=CC=C47O)C(=O)N(CC48=CC=CC=C48O)C(=O)N(CC49=CC=CC=C49O)C(=O)N(CC50=CC=CC=C50O)C(=O)N(CC51=CC=CC=C51O)C(=O)N(CC52=CC=CC=C52O)C(=O)N(CC53=CC=CC=C53O)C(=O)N(CC54=CC=CC=C54O)C(=O)N(CC55=CC=CC=C55O)C(=O)N(CC56=CC=CC=C56O)C(=O)N(CC57=CC=CC=C57O)C(=O)N(CC58=CC=CC=C58O)C(=O)N(CC59=CC=CC=C59O)C(=O)N(CC60=CC=CC=C60O)C(=O)N(CC61=CC=CC=C61O)C(=O)N(CC62=CC=CC=C62O)C(=O)N(CC63=CC=CC=C63O)C(=O)N(CC64=CC=CC=C64O)C(=O)N(CC65=CC=CC=C65O)C(=O)N(CC66=CC=CC=C66O)C(=O)N(CC67=CC=CC=C67O)C(=O)N(CC68=CC=CC=C68O)C(=O)N(CC69=CC=CC=C69O)C(=O)N(CC70=CC=CC=C70O)C(=O)N(CC71=CC=CC=C71O)C(=O)N(CC72=CC=CC=C72O)C(=O)N(CC73=CC=CC=C73O)C(=O)N(CC74=CC=CC=C74O)C(=O)N(CC75=CC=CC=C75O)C(=O)N(CC76=CC=CC=C76O)C(=O)N(CC77=CC=CC=C77O)C(=O)N(CC78=CC=CC=C78O)C(=O)N(CC79=CC=CC=C79O)C(=O)N(CC80=CC=CC=C80O)C(=O)N(CC81=CC=CC=C81O)C(=O)N(CC82=CC=CC=C82O)C(=O)N(CC83=CC=CC=C83O)C(=O)N(CC84=CC=CC=C84O)C(=O)N(CC85=CC=CC=C85O)C(=O)N(CC86=CC=CC=C86O)C(=O)N(CC87=CC=CC=C87O)C(=O)N(CC88=CC=CC=C88O)C(=O)N(CC89=CC=CC=C89O)C(=O)N(CC90=CC=CC=C90O)C(=O)N(CC91=CC=CC=C91O)C(=O)N(CC92=CC=CC=C92O)C(=O)N(CC93=CC=CC=C93O)C(=O)N(CC94=CC=CC=C94O)C(=O)N(CC95=CC=CC=C95O)C(=O)N(CC96=CC=CC=C96O)C(=O)N(CC97=CC=CC=C97O)C(=O)N(CC98=CC=CC=C98O)C(=O)N(CC99=CC=CC=C99O)C(=O)N(CC100=CC=CC=C100O)C(=O)N(CC101=CC=CC=C101O)C(=O)N(CC102=CC=CC=C102O)C(=O)N(CC103=CC=CC=C103O)C(=O)N(CC104=CC=CC=C104O)C(=O)N(CC105=CC=CC=C105O)C(=O)N(CC106=CC=CC=C106O)C(=O)N(CC107=CC=CC=C107O)C(=O)N(CC108=CC=CC=C108O)C(=O)N(CC109=CC=CC=C109O)C(=O)N(CC110=CC=CC=C110O)C(=O)N(CC111=CC=CC=C111O)C(=O)N(CC112=CC=CC=C112O)C(=O)N(CC113=CC=CC=C113O)C(=O)N(CC114=CC=CC=C114O)C(=O)N(CC115=CC=CC=C115O)C(=O)N(CC116=CC=CC=C116O)C(=O)N(CC117=CC=CC=C117O)C(=O)N(CC118=CC=CC=C118O)C(=O)N(CC119=CC=CC=C119O)C(=O)N(CC120=CC=CC=C120O)C(=O)N(CC121=CC=CC=C121O)C(=O)N(CC122=CC=CC=C122O)C(=O)N(CC123=CC=CC=C123O)C(=O)N(CC124=CC=CC=C124O)C(=O)N(CC125=CC=CC=C125O)C(=O)N(CC126=CC=CC=C126O)C(=O)N(CC127=CC=CC=C127O)C(=O)N(CC128=CC=CC=C128O)C(=O)N(CC129=CC=CC=C129O)C(=O)N(CC130=CC=CC=C130O)C(=O)N(CC131=CC=CC=C131O)C(=O)N(CC132=CC=CC=C132O)C(=O)N(CC133=CC=CC=C133O)C(=O)N(CC134=CC=CC=C134O)C(=O)N(CC135=CC=CC=C135O)C(=O)N(CC136=CC=CC=C136O)C(=O)N(CC137=CC=CC=C137O)C(=O)N(CC138=CC=CC=C138O)C(=O)N(CC139=CC=CC=C139O)C(=O)N(CC140=CC=CC=C140O)C(=O)N(CC141=CC=CC=C141O)C(=O)N(CC142=CC=CC=C142O)C(=O)N(CC143=CC=CC=C143O)C(=O)N(CC144=CC=CC=C144O)C(=O)N(CC145=CC=CC=C145O)C(=O)N(CC146=CC=CC=C146O)C(=O)N(CC147=CC=CC=C147O)C(=O)N(CC148=CC=CC=C148O)C(=O)N(CC149=CC=CC=C149O)C(=O)N(CC150=CC=CC=C150O)C(=O)N(CC151=CC=CC=C151O)C(=O)N(CC152=CC=CC=C152O)C(=O)N(CC153=CC=CC=C153O)C(=O)N(CC154=CC=CC=C154O)C(=O)N(CC155=CC=CC=C155O)C(=O)N(CC156=CC=CC=C156O)C(=O)N(CC157=CC=CC=C157O)C(=O)N(CC158=CC=CC=C158O)C(=O)N(CC159=CC=CC=C159O)C(=O)N(CC160=CC=CC=C160O)C(=O)N(CC161=CC=CC=C161O)C(=O)N(CC162=CC=CC=C162O)C(=O)N(CC163=CC=CC=C163O)C(=O)N(CC164=CC=CC=C164O)C(=O)N(CC165=CC=CC=C165O)C(=O)N(CC166=CC=CC=C166O)C(=O)N(CC167=CC=CC=C167O)C(=O)N(CC168=CC=CC=C168O)C(=O)N(CC169=CC=CC=C169O)C(=O)N(CC170=CC=CC=C170O)C(=O)N(CC171=CC=CC=C171O)C(=O)N(CC172=CC=CC=C172O)C(=O)N(CC173=CC=CC=C173O)C(=O)N(CC174=CC=CC=C174O)C(=O)N(CC175=CC=CC=C175O)C(=O)N(CC176=CC=CC=C176O)C(=O)N(CC177=CC=CC=C177O)C(=O)N(CC178=CC=CC=C178O)C(=O)N(CC179=CC=CC=C179O)C(=O)N(CC180=CC=CC=C180O)C(=O)N(CC181=CC=CC=C181O)C(=O)N(CC182=CC=CC=C182O)C(=O)N(CC183=CC=CC=C183O)C(=O)N(CC184=CC=CC=C184O)C(=O)N(CC185=CC=CC=C185O)C(=O)N(CC186=CC=CC=C186O)C(=O)N(CC187=CC=CC=C187O)C(=O)N(CC188=CC=CC=C188O)C(=O)N(CC189=CC=CC=C189O)C(=O)N(CC190=CC=CC=C190O)C(=O)N(CC191=CC=CC=C191O)C(=O)N(CC192=CC=CC=C192O)C(=O)N(CC193=CC=CC=C193O)C(=O)N(CC194=CC=CC=C194O)C(=O)N(CC195=CC=CC=C195O)C(=O)N(CC196=CC=CC=C196O)C(=O)N(CC197=CC=CC=C197O)C(=O)N(CC198=CC=CC=C198O)C(=O)N(CC199=CC=CC=C199O)C(=O)N(CC200=CC=CC=C200O)C(=O)N(CC201=CC=CC=C201O)C(=O)N(CC202=CC=CC=C202O)C(=O)N(CC203=CC=CC=C203O)C(=O)N(CC204=CC=CC=C204O)C(=O)N(CC205=CC=CC=C205O)C(=O)N(CC206=CC=CC=C206O)C(=O)N(CC207=CC=CC=C207O)C(=O)N(CC208=CC=CC=C208O)C(=O)N(CC209=CC=CC=C209O)C(=O)N(CC210=CC=CC=C210O)C(=O)N(CC211=CC=CC=C211O)C(=O)N(CC212=CC=CC=C212O)C(=O)N(CC213=CC=CC=C213O)C(=O)N(CC214=CC=CC=C214O)C(=O)N(CC215=CC=CC=C215O)C(=

FIG. 6

000139



(51) International Patent Classification:

G01N 33/50 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2010/036537

(22) International Filing Date:

28 May 2010 (28.05.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/182,368 29 May 2009 (29.05.2009) US
61/260,608 12 November 2009 (12.11.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM [US/US]; 201 West 7th St., Austin,
TX 78701 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GOCKE, Anne, R.
[US/US]; c/o Office For Technology Development, Ut

Southwestern Medical Center At Dallas, 5323 Harry
Hines Boulevard, Dallas, TX 75390 (US). UDUGAMA-
SOORIYA, D., Gomika [LK/US]; c/o UT Southwestern
Medical Center At Dallas, 5323 Harry Hines Boulevard,
Dallas, TX 75390 (US). KODADEK, Thomas [US/US];
The Scripps Research Institute, Scripps Florida, 130
Scripps Way, #3A2, Jupiter, FL 33458 (US).

(74) Agent: LANDRUM, Charles, P.; Fulbright & Jaworski
L.L.P., 600 Congress Ave., Suite 2400, Austin, TX 78701
(US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: PEPTOID LIGANDS FOR ISOLATION AND TREATMENT OF AUTOIMMUNE T-CELLS

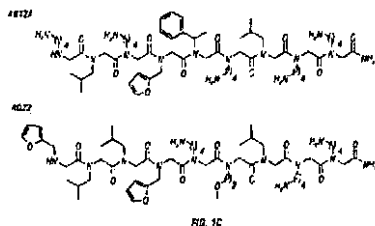
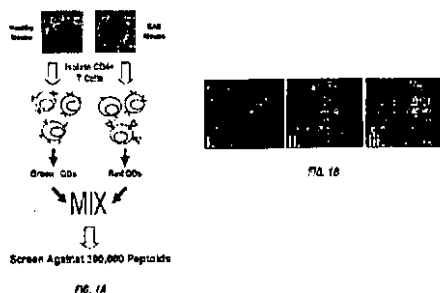


FIG. 1B

(57) Abstract: The present invention provides for the identification of autoreactive T cell populations from individuals having autoimmune diseases, such as multiple sclerosis and EAE. Peptoids recognized by autoreactive T cells can be used to identify various types of autoimmune disease, and can also be used to target therapies against such populations.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2010/036537

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

HIGHLANDER, Steven, L.
Fulbright & Jaworski L.L.P.
98 San Jacinto Boulevard
Suite 1100
Austin, TX 78701-4255
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
19 September 2011 (19.09.2011)Applicant's or agent's file reference
UTFD.P2121WOInternational application No.
PCT/US2010/036537

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
28 May 2010 (28.05.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

OPKO HEALTH, INC.
4400 Biscayne Blvd.
Miami, FL 33137
United States of America

US

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 has been added as applicant for all designated States except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office☐ the International Searching Authority☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority☒ the designated Offices concerned☐ the elected Offices concerned☐ other:

000141

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Ben Ghachem Riadh

e-mail pt04.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 04

Facsimile No. +41 22 338 89 95

PATENTE DE INVENCION ☐

MOI

Fecha: 2011-10-11 14:54:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI 0
Act. 411 PRESENTACION Folios: 141

☐ Indicación que se solicita una patente.

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Descripción de la invención

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒ Indicación que se solicita una PCT

☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒ Dibujos de ser estos pertinentes

☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita Diseño industrial

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐