

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 985**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2017** **PCT/US2017/046626**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2018** **WO18031947**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2017** **E 17840379 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025** **EP 3497452**

54 Título: **Diagnóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

12.08.2016 US 201662374382 P

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

28.04.2025

73 Titular/es:

**IMMUNOWORK, LLC (100.00%)
10629 Woodbridge St., Unit 210
North Hollywood, CA 91602, US**

72 Inventor/es:

ZHU, QUANSHENG

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

Observaciones:

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

ES 3 014 985 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos N.º 62/374,382, presentada el 12 de agosto de 2016.

10 LISTADO DE SECUENCIAS EN FORMATO ELECTRÓNICO

La presente solicitud se presenta junto con un listado electrónico de secuencias como un archivo de texto ASCII a través de EFS-Web. El listado electrónico de secuencias se proporciona como un archivo titulado IMWO001WOSEQLIST.txt, creado y guardado por última vez el 11 de agosto de 2017, que tiene un tamaño de 72.810 bytes.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Sector

La presente divulgación se refiere, en general, a procedimientos para el diagnóstico de nefropatía membranosa (NM).

Descripción de la técnica relacionada

Las enfermedades autoinmunitarias pueden estar mediadas por linfocitos T, por linfocitos B y pueden estar asociadas con daño a órganos y/o tejidos.

La Patente WO 2010/009457 da a conocer inmunoensayos, reactivos, agentes terapéuticos y procedimientos de diagnóstico de nefropatía membranosa (NM) idiopática basados en autoanticuerpos del suero reactivos contra un receptor de fosfolipasa A2 (PLA2R).

La Patente WO 2015/185949 se refiere a péptidos particulares que tienen una longitud entre 31 y 60 aminoácidos capaces de unirse a anticuerpos anti-PLA2R. Se informa que los péptidos son útiles en la prevención o el tratamiento de la enfermedad renal.

La Patente WO 2015/004603 da a conocer anticuerpos dirigidos contra un péptido derivado de PLA2R específico, útiles en el diagnóstico de la aparición de una enfermedad de nefropatía membranosa (NM) en un individuo.

Kanigicherla et al. informan en Kidney International (2013), 83, 940-948, 2013 International Society of Nephrology, sobre anticuerpos anti-PLA2R útiles en la predicción de la evolución a largo plazo de la nefropatía membranosa idiopática.

Hong et al. publican en Semin. Nephrol. Noviembre de 2013; 33(6): 531-542, sus hallazgos sobre la función del complemento en la nefropatía membranosa. Sugieren que la identificación de anticuerpos anti-PLA2R como probables participantes en la patogénesis de la enfermedad permitirá una investigación centrada de la función del complemento en NM.

Ronco y Debiat informan en The Lancet, volumen 385, 16 de mayo de 2015, sobre los avances en la monitorización y diagnóstico de nefropatía membranosa generados por la determinación de que el receptor de la fosfolipasa A2 (PLA2R) de podocitos es la diana antigénica principal en la nefropatía membranosa adulta autoinmunitaria. Los autores informan que la detección de PLA2R en depósitos inmunitarios permite un diagnóstico retrospectivo de nefropatía membranosa relacionada con PLA2R en biopsias de riñón perdurables, cuyas pruebas tienen un efecto principal en el diagnóstico y monitorización del tratamiento, incluyendo después del trasplante.

CARACTERÍSTICAS

La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de un paciente con nefropatía membranosa (NM). Cualquier referencia a procedimientos de tratamiento, composiciones o kits son únicamente ilustrativas y no son parte de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas. El procedimiento comprende incubar una muestra que contiene linfocitos B de memoria obtenidos del individuo con un epítipo de PLA2R unido a un fluoróforo, detectar una unión del epítipo de PLA2R a las células en la muestra, diagnosticando de este modo la NM en el individuo. El epítipo de PLA2R comprende la SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones del procedimiento, la secuencia del fragmento de PLA2R es tal como se da a conocer en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones del procedimiento, la secuencia del fragmento de PLA2R es tal como se da a conocer en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones del procedimiento, el fragmento de PLA2R es tal como se da a conocer en la SEQ ID NO: 2 y, como mínimo, aproximadamente el 5 % de la secuencia dada a conocer en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones del procedimiento, el fragmento de PLA2R es tal como se da a conocer en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones del procedimiento, el fragmento de PLA2R es tal como se da a conocer en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones del procedimiento, el fragmento de PLA2R es tal como se da a conocer en la SEQ ID NO: 5 y, como mínimo, aproximadamente el 5 % de la secuencia dada a conocer en la SEQ ID NO: 6.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una realización de los dominios estructurales y de plegamiento topológico de PLA2R en una membrana celular.

La figura 2 muestra una realización del plegamiento topológico de PLA2R con el epítipo conformacional dominante.

La figura 3 muestra un esquema de una realización del procesamiento de antígenos y el reclutamiento de linfocitos T cooperadores por linfocitos B.

La figura 4 muestra un esquema de la base molecular de una realización del diseño de un conjugado de epítipo-fármaco (EDC, *epitope-drug conjugate*).

La figura 5 muestra una ilustración esquemática de una realización de un mecanismo de tratamiento de EDC.

La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización del fragmento de PLA2R (SEQ ID NO: 1).

La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización del fragmento de PLA2R (SEQ ID NO: 2).

La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización del fragmento de PLA2R (SEQ ID NO: 3).

La figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización del fragmento de PLA2R (SEQ ID NO: 4).

La figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización del fragmento de PLA2R (SEQ ID NO: 5).

La figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización del fragmento de PLA2R (SEQ ID NO: 6).

La figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización del dominio CysR (SEQ ID NO: 7) de PLA2R.

La figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización de los dominios CysR y FNII (SEQ ID NO: 8) de PLA2R.

La figura 14 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización de los dominios CysR, FNII y CTLD1 (SEQ ID NO: 9) de PLA2R.

La figura 15 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización de los dominios CysR, FNII y CTLD1, 2 (SEQ ID NO: 10) de PLA2R.

La figura 16 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización de los dominios CysR, FNII y CTLD1, 2, 3 (dominios PLA2R-1-5) (SEQ ID NO: 11) de PLA2R.

La figura 17 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización de los dominios CysR, FNII y CTLD1, 2, 3, 4 (SEQ ID NO: 12) de PLA2R.

La figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización del epítipo (SEQ ID NO: 13) de PLA2R contra el cual están presentes autoanticuerpos en pacientes con MN.

La figura 19 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización de PLA2R de longitud completa (SEQ ID NO: 14). La región sombreada indica una realización del epítipo (SEQ ID NO: 13) de PLA2R contra el cual están presentes autoanticuerpos en pacientes con MN. La región subrayada indica una realización de los dominios CysR, FNII y CTLD1 (SEQ ID NO: 9) de PLA2R.

La figura 20 muestra sitios potenciales de glicosilación unidos a N en los 272 aminoácidos N-terminales de PLA2R (SEQ ID NO: 15).

La figura 21 muestra un esquema de una plataforma de desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. El panel superior muestra el diseño de un conjugado de epítipo-fármaco (EDC). El panel central muestra que el EDC se une a los receptores específicos de antígeno en la superficie de los linfocitos B y los linfocitos T. El panel inferior muestra el efecto del EDC sobre las células inmunitarias diana (por ejemplo, muerte celular).

La figura 22 muestra un esquema del suministro de EDC a linfocitos B de memoria que residen en los ganglios linfáticos periféricos.

La figura 23 muestra el diseño de una realización de un conjugado de epítipo de PLA2R-fármaco (EDC).

La figura 24 muestra la detección de linfocitos B de memoria específicos del epítipo de PLA2R en linfocitos B totales aislados de muestras de sangre de pacientes con NMP positivos para PLA2R-Ab.

La figura 25 muestra el efecto del conjugado de epítipo de PLA2R-MMAE sobre linfocitos B aislados de pacientes con NMP positivos para PLA2RAb.

La figura 26 muestra el plegamiento topológico de la desmogleína en la membrana celular. La línea vertical más corta indica la región del epítipo inmunodominante en Dsg1 para la unión de autoanticuerpos (EC1-2) y la línea vertical más larga indica la región inmunodominante en Dsg3 para la unión de autoanticuerpos (EC1-3).

La figura 27 muestra el diseño de una realización de un conjugado de epítipo-fármaco (EDC) para el tratamiento de PV mucocutáneo.

Figura 28. Purificación y unión de autoanticuerpos a los epítopos conjugados con fármacos.

La figura 29 muestra la detección de linfocitos B de memoria específicos de los epítopos de Dsg1 y Dsg3 en linfocitos B totales aislados de muestras de sangre de pacientes con PV mucocutáneo.

La figura 30 muestra el efecto del conjugado de epítipo de Dsg1-MMAE y epítipo de Dsg3-MMAE sobre linfocitos B aislados de pacientes con PV mucocutáneo.

La figura 31 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización de una secuencia de epítipo de Dsg1 (SEQ ID NO: 16) para desarrollar el EDC.

La figura 32 muestra la secuencia de aminoácidos de una realización de una secuencia de epítipo de Dsg3 (SEQ ID NO: 17) para desarrollar el EDC.

DESCRIPCION DETALLADA

Actualmente, no existen tratamientos eficaces para las enfermedades autoinmunitarias, excepto la utilización de dosis elevadas de hormonas esteroideas y agentes inmunosupresores. Estos tratamientos no son específicos, presentan efectos secundarios significativos y, a menudo, no pueden detener la progresión de la enfermedad. El principal desafío de estos tratamientos es la frecuente recidiva de la enfermedad cuando se reduce la dosis de los reactivos (por ejemplo, después de que la enfermedad esté en remisión clínica), lo que perjudica gravemente la función del órgano u órganos afectados.

Una nueva plataforma de desarrollo de fármacos para el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias

La producción de anticuerpos en los linfocitos B se inicia mediante la unión del antígeno a los receptores de linfocitos B de la superficie celular (BCR, *B cell receptors*). La unión inicial del antígeno al BCR induce una cascada de eventos de señalización intracelular que da como resultado la activación de los linfocitos B. La unión del antígeno al BCR desencadena la internalización rápida del complejo BCR-antígeno. Después de la internalización, el complejo BCR-antígeno se clasifica en endosomas tempranos y posteriormente en endosomas tardíos que contienen el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII). Después de la fusión con los lisosomas, estos compartimentos degradan los antígenos en péptidos que se cargan en el MHCII para su presentación a los linfocitos T cooperadores (figura 3). El acoplamiento de linfocitos T cooperadores específicos estimula la producción de anticuerpos por los linfocitos B activados. (figura 3)

Una enfermedad autoinmunitaria se produce debido a una respuesta inmunitaria (por ejemplo, producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B) contra un tejido y/u órgano corporal normal. Se conocen alrededor de 80 tipos de enfermedades autoinmunitarias en los seres humanos y casi cualquier tejido y/u órgano puede verse afectado.

Clínicamente, la frecuente recidiva de las enfermedades autoinmunitarias en pacientes se debe a la presencia de un grupo específico de linfocitos B de memoria que están presentes en un estado inactivo en el cuerpo del paciente y que circulan entre la sangre periférica y los tejidos y/o órganos linfáticos periféricos (por ejemplo, ganglios linfáticos). Después de reencontrarse con un antígeno para el que son específicas, estos linfocitos B de memoria se activan rápidamente y posteriormente se diferencian en células plasmáticas que producen cantidades masivas de anticuerpos causantes de enfermedades (anticuerpos patógenos) en un corto período de tiempo. Además, estos linfocitos B de memoria sirven como células presentadoras de antígenos (APC) que presentan el antígeno procesado a los linfocitos T cooperadores específicos del antígeno, desencadenando y/o mejorando de este modo el daño a los órganos y/o tejidos mediado por linfocitos T. Estos linfocitos B de memoria y linfocitos T específicos del antígeno poseen BCR y receptores de linfocitos T (TCR) únicos y específicos del antígeno, respectivamente, los cuales se unen específicamente al antígeno. Actualmente, no existe ningún tratamiento que pueda dirigirse específicamente a este grupo de linfocitos B de memoria y linfocitos T específicos de antígeno que provocan enfermedades (linfocitos B y linfocitos T de memoria autoinmunitarios). En particular, no existe ningún tratamiento que pueda dirigirse específicamente a este grupo de linfocitos B de memoria autoinmunitarios y linfocitos T autoinmunitarios que circulan entre la sangre periférica y los tejidos y/o órganos linfáticos periféricos (por ejemplo, ganglios linfáticos).

La presente divulgación se refiere a una nueva plataforma de desarrollo de fármacos que se dirige específicamente a este repertorio de células autoinmunitarias en la sangre periférica y los órganos linfáticos periféricos de un individuo/paciente. El direccionamiento a este repertorio de células autoinmunitarias en la sangre periférica y los órganos linfáticos periféricos puede dar como resultado un efecto de tratamiento de por vida.

La parte de un antígeno responsable de la unión a anticuerpos autoinmunitarios es una región específica denominada epítipo. Tal como se utiliza en el presente documento, "epítipo" puede ser un péptido natural, un péptido sintético, un péptido artificial, un biosimilar, un aptámero, un dominio de proteína o una combinación de los mismos. Un epítipo puede ser conformacional o no conformacional. Un epítipo puede ser tanto conformacional como no conformacional. Un epítipo de péptido/proteína puede expresarse de forma recombinante, así como obtenerse en grandes cantidades utilizando una o más técnicas bien conocidas en la técnica de la síntesis y purificación de epítopos. Un epítipo tiene una afinidad elevada por los autoanticuerpos que provocan enfermedades, así como por los BCR específicos de antígeno expresados en linfocitos B de memoria, TCR expresados en linfocitos T cooperadores o ambos.

La presente divulgación también se refiere a conjugados de epítipo-fármaco (EDC), y también da a conocer composiciones, procedimientos y/o kits que comprenden EDC. La presente divulgación se refiere a un EDC que comprende un epítipo peptídico que se dirige a los BCR específicos de antígeno expresados en linfocitos B de memoria, TCR expresados en linfocitos T cooperadores, o ambos (figura 21). El EDC también se puede dirigir a las APC que fagocitan y/o endocitan el EDC (figura 21). Como la plataforma se basa en un epítipo o epítopos que son específicamente reconocidos por las células inmunitarias, la plataforma, según la presente divulgación, se puede adaptar para cualquier enfermedad autoinmunitaria. La figura 21 muestra un esquema de una plataforma de desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. La figura 21 (panel superior) muestra el diseño del EDC. La figura 21 (panel central) muestra que el EDC se une a los receptores específicos de antígeno en la superficie de los linfocitos B y los linfocitos T. El EDC puede internalizarse en las células a través de endocitosis mediada por BCR.

Un EDC, según la presente divulgación, puede comprender un epítipo, un enlazador y un fármaco. El enlazador puede ser estable (es decir, no se hidroliza ni se degrada) en el cuerpo del paciente y/o en la circulación fuera de una célula. El enlazador puede ser escindible, lo que permite la separación del epítipo y el fármaco. El enlazador se puede escindir dentro de una célula. El enlazador se puede escindir fuera de una célula. El enlazador se puede escindir tanto dentro como fuera de una célula. El enlazador se puede escindir parcialmente fuera de una célula y parcialmente dentro de una célula. El enlazador se puede escindir parcialmente fuera de una célula y se puede escindir completamente dentro de una célula. La escisión inicial del enlazador se puede producir fuera de una célula y la escisión final se produce dentro de una célula. Entre los ejemplos no limitantes de enlazadores escindibles se incluyen enlazadores de hidrazona, enlazadores a base de disulfuro y enlazadores peptídicos. Los enlazadores a base de disulfuro se pueden descomponer selectivamente dentro de una célula. Los enlazadores a base de disulfuro se pueden descomponer selectivamente dentro de una célula debido a una mayor concentración intracelular de tioles. Los enlazadores peptídicos pueden ser descompuestos selectivamente dentro de una célula por enzimas intracelulares.

El enlazador puede ser no escindible. Entre los ejemplos no limitantes de enlazadores no escindibles se incluyen enlazadores de tioéter, enlazador de PEG4Mal y similares. El enlazador puede unirse a uno o más aminoácidos en el epítipo. El enlazador puede unirse a un residuo de cisteína en el epítipo. El enlazador puede unirse a un residuo distinto de cisteína (por ejemplo, lisina) en el epítipo. Uno o más sitios en el epítipo para la unión del enlazador pueden ser una o más cisteínas o lisinas accesibles al disolvente o ambas.

También se dan a conocer otros tipos de enlazadores, químicas de conjugación y sitios de conjugación en epítopos para la generación de EDC. Se dan a conocer ejemplos no limitantes en la Patente US 9,156,854 y la Patente US 9,388,408. Entre otros ejemplos no limitantes de enlazadores se incluyen imidoésteres, maleimidas, carbodiimida, piridilditiol, isocianato, isopeptag, SpyTag, SnoopTag y SNAP-tag.

El enlazador puede comprender sitios de unión tanto para el epítipo como para el fármaco para unir los dos componentes. El enlazador puede ser escindible. El enlazador puede ser escindible de uno o ambos del epítipo y del fármaco. El enlazador puede ser no escindible. El enlazador puede ser no escindible de uno o ambos del epítipo y del fármaco.

Se puede introducir un residuo de cisteína libre en el extremo C del epítipo. A continuación, el grupo tio de la cisteína libre se conjuga con un enlazador escindible. El enlazador escindible puede ser un enlazador de valina-citulina. El enlazador de valina-citulina se puede preconjugar con un fármaco (por ejemplo, análogo de duocarmicina). Se puede introducir un residuo de cisteína libre en el extremo C del epítipo y el grupo tio de la cisteína libre se conjuga con un enlazador de valina-citulina escindible preconjugado con un fármaco (por ejemplo, análogo de duocarmicina).

Se puede introducir una secuencia corta de CXPXR en el extremo C del epítipo. El residuo de cisteína se puede convertir en una etiqueta de aldehído de formilglicina. El residuo de cisteína se puede convertir en una etiqueta de aldehído de formilglicina utilizando una enzima generadora de formilglicina. La etiqueta de aldehído de formilglicina se puede conjugar, a continuación, con un fármaco-enlazador mediante un enlace no escindible. La etiqueta de aldehído de formilglicina se puede conjugar con el fármaco-enlazador mediante un enlace no escindible a través de la química de oximas. La etiqueta de aldehído de formilglicina se puede

conjugar con el fármaco-enlazador mediante un enlace no escindible a través de la reacción de Pictet-Spengler. El fármaco en el fármaco-enlazador puede ser un reactivo citotóxico.

- 5 Un fármaco se puede conjugarse con el epítipo en una región fuera del sitio de interacción de BCR/TCR. Un fármaco se puede conjugarse con el epítipo en una región fuera del sitio de interacción de BCR/TCR a uno o más residuos de lisina. Un fármaco se puede conjugarse con el epítipo en una región fuera del sitio de interacción de BCR/TCR a uno o más residuos de lisina a través de enlaces amida a un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) unido a un fármaco-enlazador.
- 10 Los epítipos pueden diseñarse tal como se describe en el ejemplo 4 y el ejemplo 7. Se pueden introducir uno o más sitios de conjugación química en un epítipo. Uno o más sitios de conjugación química pueden ser aminoácidos no naturales. Uno o más sitios de conjugación química pueden incluir uno o más residuos de cisteína.
- 15 El epítipo puede estar en su secuencia de aminoácidos nativa. La secuencia de aminoácidos nativa del epítipo puede modificarse. Por ejemplo, los sitios de glicosilación en un epítipo (por ejemplo, se glicosila la parte extracelular de PLA2R) pueden aumentar el tamaño, el volumen y la complejidad conformacional del epítipo. Los sitios de glicosilación unidos a N potenciales (residuos de Asn subrayados) en los primeros 272 aminoácidos de PLA2R (SEQ ID NO: 15) se muestran en la figura 20, en el epítipo de Dsg1 (SEQ ID NO: 16)
- 20 se muestran en la figura 31 y en el epítipo de Dsg3 (SEQ ID NO: 17) se muestran en la figura 32. El tamaño, el volumen y la complejidad conformacional del epítipo se pueden reducir sustituyendo los sitios de glicosilación potenciales (por ejemplo, en Asn70 y Asn89 en la figura 20) por Gln o cualquier otro aminoácido no glicosilado que no afecte la estructura y/o conformación de la proteína para el reconocimiento de autoanticuerpos.
- 25 Los residuos que están potencialmente glicosilados pueden sustituirse utilizando, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio. Los residuos que están potencialmente glicosilados pueden sustituirse utilizando, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio cuando se utiliza un vector de expresión para expresar un epítipo. Un epítipo puede sintetizarse directamente. Cuando un epítipo se sintetiza directamente, la síntesis de péptidos y/o
- 30 proteínas puede personalizarse, de manera que los residuos potencialmente glicosilados se reemplacen por residuos no glicosilados que no afectarán la estructura y/o conformación de la proteína para el reconocimiento de autoanticuerpos.
- 35 Se pueden realizar modificaciones adicionales al epítipo, por ejemplo, para unir un reactivo (por ejemplo, un fármaco) al epítipo, mejorar la accesibilidad del epítipo a los receptores en la superficie celular y/o mejorar la expresión y el rendimiento de la proteína. Por ejemplo, el epítipo se puede modificar insertando un péptido N-terminal o C-terminal pequeño (aproximadamente de 2 a 10 aminoácidos) o ambos, realizando sustituciones conservadoras y/o no conservadoras, y/o añadiendo una o más secuencias heterólogas para lograr un objetivo deseado.
- 40 Uno o más de los epítipos dados a conocer en el presente documento pueden estar codificados por ácidos nucleicos. El ácido nucleico que codifica el epítipo puede ser un ADNc o un ARNm. El ácido nucleico que codifica el epítipo puede estar comprendido dentro de un vector de expresión de proteínas. El vector de expresión de proteínas puede ser un vector de ADN o un vector de ARN. El vector de expresión de proteínas
- 45 puede ser un vector viral adenoasociado (AAV). El vector de expresión de proteínas puede ser un vector de expresión de células de mamífero. El vector de expresión de proteínas puede ser un vector de expresión de células de insecto. El ácido nucleico que codifica el epítipo comprendido dentro de un vector de expresión de proteínas puede estar unido operativamente a elementos reguladores para regular la expresión del epítipo.
- 50 Entre los elementos reguladores se pueden incluir promotores, terminadores, potenciadores, etc. Tal como se utiliza en el presente documento, "unido operativamente" se refiere a un elemento regulador que controla positiva o negativamente la expresión de una proteína a partir de un ácido nucleico.
- 55 Uno o más de los vectores de expresión de proteínas dados a conocer en el presente documento, así como otros vectores de expresión de proteínas conocidos por un experto en la materia, se pueden utilizar para obtener grandes cantidades de uno o más de los epítipos dados a conocer en el presente documento y fragmentos y variantes de los mismos para su incorporación en uno o más de las composiciones, procedimientos y/o kits dados a conocer en el presente documento. Una variante de un epítipo puede tener una identidad de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 99,99 % con el epítipo. Una variante de
- 60 un epítipo puede tener una identidad de aproximadamente el 65, 70, 57, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,25, 99,5, 99,75, 99,99 % con el epítipo, o un valor con un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.
- 65 El vector de expresión de proteínas puede introducir una etiqueta en el epítipo codificado. Una o más etiquetas pueden permitir la purificación del epítipo. La etiqueta puede estar en el extremo N-terminal. La etiqueta puede estar en el extremo C-terminal. La etiqueta puede estar en los extremos N-terminal y

C-terminal. Entre los ejemplos no limitantes de etiquetas se incluyen proteína de unión a quitina, proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, tiorredoxina, poli(NANP), FLAG, V5, Myc, HA, NE, biotina, proteína transportadora de carboxilo de biotina, GFP, Halo, Nus, Fc, AviTag, calmodulina, poli-Glu, E, S, SBP, Softag 1, Softag 3, Strep, TC, VSV, Ty y Xpress. En algunas realizaciones, la etiqueta es una etiqueta de poli-histidina (poli-His).

El vector de expresión de proteínas puede introducir adicionalmente un sitio de escisión entre el epítipo y la etiqueta para permitir la separación del epítipo de la etiqueta. El sitio de escisión puede ser un sitio proteolítico. El sitio de escisión puede ser un sitio no proteolítico. Entre los ejemplos no limitantes de sitios proteolíticos se incluyen sitios para la proteasa TEV, el factor Xa o la enteropeptidasa. El sitio proteolítico puede ser un sitio de escisión de trombina. Entre los ejemplos no limitantes de otros sitios de escisión por proteasas y no proteasas que se contemplan se incluyen la proteasa del virus de la fiebre aftosa (FMDV, *foot-and-mouth disease virus*), la Arg-C proteinasa, la Asp-N endopeptidasa, BNPS-escatol, caspasas, de especificidad alta a quimotripsina, de especificidad baja a quimotripsina, clostripaína (clostridiopeptidasa B), CNBr, enterocinasa, factor Xa, ácido fórmico, glutamil endopeptidasa, granzima B, hidroxilamina, ácido yodosobenzoico, LysC, LysN, NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico), elastasa de neutrófilos, pepsina, prolina-endopeptidasa, proteinasa K, peptidasa estafilocócica I, termolisina, trombina, tripsina y otras enzimas específicas del sitio conocidas por un experto en la materia.

Se pueden utilizar una o más líneas celulares disponibles en el mercado para expresar el epítipo. Por ejemplo, se puede expresar un epítipo etiquetado con poli-His en células de mamíferos (por ejemplo, células HEK 293) y purificarlo a partir del medio de cultivo celular utilizando columnas de purificación por afinidad de Ni y filtración en gel. A continuación, la etiqueta de poli-His se puede eliminar mediante digestión proteolítica (por ejemplo, utilizando trombina), y el epítipo se puede purificar adicionalmente hasta homogeneidad utilizando cromatografía de filtración en gel para eliminar la enzima trombina, así como la etiqueta de poli-His liberada. La expresión y purificación del epítipo se puede probar en extractos de proteínas utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (figura 23 y figura 28). La expresión del epítipo también se puede probar utilizando transferencia Western (figura 23 y figura 28) utilizando uno o más anticuerpos y/o plasma y/o suero del paciente. El gel de SDS-PAGE se puede teñir con uno o más colorantes de Coomassie (figura 23 y figura 28), colorantes de plata, colorantes de zinc, colorantes fluorescentes y colorantes específicos de grupos funcionales.

Tal como se utiliza en el presente documento, el "fármaco" en el EDC también puede denominarse "agente de tratamiento" (figura 21; panel superior) o "agente". Un fármaco incluye agentes que se utilizan específicamente para la prevención y/o el tratamiento de una o más enfermedades, lo cual no se reivindica en la presente invención. El fármaco puede ser citostático, citotóxico, inmunosupresor o cualquier agente que se pueda utilizar con fines de tratamiento. Por ejemplo, la unión de EDC a TCR puede dar como resultado la inducción de inmunotolerancia por el fármaco o la internalización de EDC en APC puede dar como resultado la muerte de APC (figura 21; panel inferior). La tolerancia inmunitaria puede tener lugar mediante uno o más mecanismos conocidos. Por ejemplo, el fármaco puede evitar la liberación de una o más citocinas por los linfocitos B autoinmunitarios, los linfocitos T o ambos, o inhibe la señalización de citocinas en los linfocitos B autoinmunitarios, los linfocitos T o ambos. Entre los ejemplos no limitantes se incluyen la delección clonal, la edición de receptores, la exclusión folicular y la anergia. El fármaco puede inhibir la presentación de antígenos por los linfocitos B autoinmunitarios a los linfocitos T. El fármaco puede inhibir una o más vías de señalización. Entre los ejemplos no limitantes se incluyen la señalización del receptor IL-6, la señalización de NF- κ B, la señalización del receptor tipo Toll, la señalización del receptor de linfocitos B, la señalización del receptor de linfocitos T y la señalización del inflammasoma. El fármaco puede dirigirse a una o más dianas en dicha una o más vías de señalización. Entre los ejemplos no limitantes se incluyen COX, CCR, receptor de histamina, receptor de interleucina, gp120/CD4, CXCR, PD-1/PD-L1, MALT, LTR, ROS, NOS, TLR, NADPH-oxidasa y Nrf2.

Entre los ejemplos no limitantes de fármacos se incluyen duocarmicina A, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina D, duocarmicina SA, CC-1065, adozelesina, bizelesina, carzelesina, ciclofosfamida, rapamicina, metotrexato, 5-fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida, epirubicina, cisplatino, 5-fluorouracilo o capecitabina, monometil auristatina E (MMAE), antraciclinas, oxaliplatino o bortezumib.

El EDC puede basarse en una inmunotoxina, que es un dominio de direccionamiento a base de anticuerpos fusionado a una toxina bacteriana para eliminar células (Alewine, C., et al, *The Oncologist*, volumen 20, págs. 176-185, 2015). Los EDC a base de inmunotoxinas pueden eliminar células al inhibir la síntesis de proteínas y pueden dirigirse tanto a células que se dividen como a células que no se dividen.

Un fármaco puede ser un reactivo de detección, por ejemplo, fluoróforos. Entre los ejemplos no limitantes se incluyen FITC, hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, azul cascada, azul pacífico, naranja pacífico, amarillo lucifer, NBD, NBD-X, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, Red 613 (PE-Texas Red), proteína de clorofila peridina (PerCP), TruRed (conjugado PerCP-Cy5.5), FluorX,

fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, Texas Red, alofocianina (APC) y conjugados APC-Cy7.

Se pueden diseñar ensayos basados en FACS y/o microscopía para cribar e identificar moléculas pequeñas que se pueden utilizar como fármaco en el EDC. Se puede utilizar un ensayo basado en FACS (basado en el ejemplo 1) para cribar una o más bibliotecas disponibles en el mercado de moléculas pequeñas e identificar moléculas pequeñas que se pueden utilizar como fármaco en el EDC. Se puede utilizar un ensayo basado en microscopía (basado en el ejemplo 2) para cribar una o más bibliotecas disponibles en el mercado de moléculas pequeñas e identificar moléculas pequeñas que se pueden utilizar como fármaco en el EDC.

El fármaco puede ser uno o más de un compuesto químico, un reactivo, una proteína o un péptido que pueden inducir la muerte celular autoinmunitaria. El fármaco puede ser uno o más de ARN antisentido, ARNm, ARNpi o fragmento de ARN para ARNi que puede interferir con la estabilidad, el recambio y/o la traducción del ARNm del anticuerpo en los linfocitos B. El fármaco puede ser un fármaco citotóxico y tiene un efecto citotóxico sobre los linfocitos B y T que da como resultado la muerte celular. La muerte celular se puede producir mediante uno o más de muerte celular programada, apoptosis, macroautofagia, autofagia, necrosis, necroptosis, catástrofe mitótica, muerte celular inducida por activación, anoikis, cornificación, excitotoxicidad, ferroptosis, degeneración walleriana y apoptosis inmunogénica.

Una vez que el EDC se une al receptor específico de antígeno en la superficie del linfocito B de memoria, el complejo de proteína se internaliza a través de endocitosis y, posteriormente, se libera el fármaco conjugado que desencadena los efectos celulares. Cuando el EDC se une al receptor específico de antígeno en la superficie del linfocito T cooperador, induce efectos celulares. Entre los ejemplos no limitantes de efectos celulares se incluyen detención del crecimiento celular, muerte celular, apoptosis, autofagia, tolerancia inmunitaria, etc. El EDC puede ser internalizado por una APC. Un EDC internalizado por una APC puede evitar que la APC presente los antígenos a los linfocitos T.

La interacción entre EDC y BCR/TCR se puede expresar en términos de "afinidad", que se puede definir como la fuerza de unión de un EDC individual a su receptor. La afinidad se expresa como la constante de disociación de equilibrio (K_D), que es la concentración a la que existe equilibrio entre la velocidad de unión del EDC a su receptor y la velocidad de disociación del EDC del receptor. Un valor de K_D más bajo significa una afinidad más alta y viceversa.

La afinidad de EDC por BCR y TCR puede variar de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-13} . La afinidad puede variar de aproximadamente 10^{-4} a aproximadamente 10^{-10} . La afinidad puede variar de aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 10^{-15} . La afinidad puede variar de aproximadamente 10^{-4} a aproximadamente 10^{-10} . La afinidad es de aproximadamente 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} , 10^{-16} , 10^{-17} o 10^{-18} , o un valor dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

Se puede utilizar más de un EDC combinados. Se puede utilizar más de un EDC, en cuyo caso se observa un efecto potenciado sobre las células autoinmunitarias. La potenciación puede ser aditiva o sinérgica. Un efecto sinérgico es mayor que un efecto aditivo. Se observa un efecto aditivo cuando la potenciación es igual a la suma de los efectos individuales de los diversos EDC. Se observa un efecto sinérgico cuando la potenciación es mayor que la suma de los efectos individuales de los diversos EDC. El efecto sinérgico, el efecto aditivo o ambos pueden producirse en pacientes humanos, pacientes no humanos, voluntarios humanos no pacientes, modelos in vivo, modelos ex vivo, modelos in vitro, etc. La potenciación puede variar de aproximadamente <1 a aproximadamente 100 veces. El efecto sinérgico puede ser de aproximadamente 3 a aproximadamente 30 veces. La potenciación puede variar de <1, 1, >1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

Debido a la especificidad del epítipo para los BCR y los TCR, los EDC se dirigen específicamente solo a las células autoinmunitarias que provocan enfermedades (por ejemplo, linfocitos B y T específicos de antígeno) sin afectar la función de las células inmunitarias normales. Por tanto, la plataforma, según la presente divulgación, solo se dirige al repertorio específico de las células autoinmunitarias que provocan enfermedades sin efectos secundarios o con efectos secundarios mínimos o sin efectos secundarios significativos. Por tanto, la progresión de la enfermedad y las recaídas se mitigan, lo que da como resultado efectos protectores duraderos.

El EDC puede ser de cualquier intervalo de tamaño molecular. Por ejemplo, el tamaño puede variar de aproximadamente 2,5 kDa a aproximadamente 75 kDa. El tamaño puede variar de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 500 kDa. El tamaño puede variar de aproximadamente 250 kDa a aproximadamente 2.500 kDa. El tamaño puede ser de aproximadamente 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250 o 2500 kDa, o un valor dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

La figura 22 muestra un esquema de administración de EDC a linfocitos B de memoria que residen en los ganglios linfáticos periféricos. A efectos de administrar EDC de manera eficaz a los pacientes y conseguir un acceso máximo de EDC a los linfocitos B de memoria, los EDC, según la presente divulgación, se diseñan en el intervalo molecular de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 70 kDa. Cuando el tamaño molecular de EDC está dentro de un intervalo de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 70 kDa, el EDC puede drenarse directamente a la linfa aferente cuando se administra por vía subcutánea y/o intradérmica (Pape, K.A., et al; Roozendaal, R., et al). Por tanto, el tamaño de EDC puede variar de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 70 kDa. El tamaño de EDC puede ser de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 kDa, o un valor dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

Quando se administra por vía subcutánea y/o intradérmica, el EDC en el intervalo de tamaño de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 70 kDa drena directamente a la linfa aferente (figura 22). Por tanto, la vía de administración del EDC en el intervalo de tamaño de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 70 kDa puede ser subcutánea, intradérmica o ambas para administrarlo directamente a la linfa aferente.

Quando se administra por vía subcutánea y/o intradérmica, el EDC en el intervalo de tamaño de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 70 kDa drena directamente a la linfa aferente y encuentra y se une a los linfocitos B de memoria en los ganglios linfáticos directamente sin la ayuda de células presentadoras de antígenos (figura 22). Por lo tanto, la vía de administración de EDC en el intervalo de tamaño de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 70 kDa puede ser subcutánea, intradérmica o ambas para administrarlo directamente a la linfa aferente y administrarlo directamente a los linfocitos B de memoria en los ganglios linfáticos sin la ayuda de células presentadoras de antígenos.

Los EDC dentro de un intervalo de peso molecular de aproximadamente 14 kDa a aproximadamente 70 kDa pueden drenarse rápidamente a los ganglios linfáticos para dirigirse a los linfocitos B de memoria específicos de antígeno (y linfocitos T) cuando se administran por vía subcutánea y/o intradérmica. Sin embargo, los EDC pueden administrarse a los pacientes por todas las vías de administración posibles dependiendo de la necesidad. Por ejemplo, se contempla la administración de EDC a través de una o más de la vía tópica, parenteral, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebelosa, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intramuscular, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratecal, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, en bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica.

En algunos pacientes, los niveles de autoanticuerpos circulantes son elevados, por ejemplo, pacientes con enfermedad autoinmunitaria activa. Durante la enfermedad activa, los autoanticuerpos están presentes en la circulación del paciente y el paciente está experimentando los efectos de la enfermedad. Los autoanticuerpos circulantes pueden neutralizar los efectos de un EDC, especialmente cuando se administra por vía intravenosa, uniéndose al epítipo en el EDC. Además, los autoanticuerpos pueden formar complejos inmunitarios con EDC dando como resultado efectos secundarios no deseados. Por tanto, especialmente durante el estado activo de la enfermedad y/o cuando pueden estar presentes altos niveles de autoanticuerpos en la circulación del sujeto, la vía de administración preferente es una o más de subcutánea, intradérmica u oral. En dichos pacientes, las vías de administración subcutánea y/o intradérmica minimizan la posibilidad de neutralización del EDC por los autoanticuerpos y maximizan la posibilidad de que el EDC alcance los linfocitos B de memoria (y los linfocitos T) en los tejidos y/o órganos linfoides (figura 22). Una vez que la fase activa de la enfermedad ha pasado y el paciente está en un estado de remisión con niveles bajos de anticuerpos circulantes, se le puede administrar al paciente EDC por vía intravenosa para dirigirse a las células autoinmunitarias que circulan en la periferia, además de administrar EDC por vía intradérmica y/o subcutánea.

Sin embargo, en algunos pacientes, puede ser necesario administrar EDC a través de una combinación de vías (por ejemplo, pénfigo vulgar). En dichos pacientes, el EDC se administra después de que los títulos de autoanticuerpos en la circulación del paciente disminuyan. Por ejemplo, después de que los títulos de autoanticuerpos en la circulación del paciente disminuyan, el EDC se puede administrar en un enfoque combinado de vías intradérmica, subcutánea e intravenosa.

La enfermedad activa de un paciente se puede tratar mediante terapias alternativas hasta que los niveles de autoanticuerpos circulantes se reducen de forma natural en base a la semivida del anticuerpo debido al reciclaje, la degradación o ambos, después de lo cual se administra el EDC. En situaciones en las que la enfermedad activa del paciente se ha tratado mediante terapias alternativas, el EDC se puede administrar mediante una o más de las vías intradérmica, subcutánea, oral o intravenosa.

Se puede administrar EDC a pacientes a los que se les administraron terapias alternativas y que están en

remisión. En tales situaciones, se puede administrar EDC para eliminar cualquier población remanente de linfocitos B de memoria y linfocitos T causantes de la enfermedad y, de este modo, prevenir posibles recidivas futuras de la enfermedad.

- 5 La plataforma de desarrollo de fármacos, según la presente divulgación, se puede utilizar para prevenir y/o tratar de manera eficaz cualquier enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos T y linfocitos B. La plataforma de desarrollo de fármacos, según la presente divulgación, se puede utilizar para diagnosticar, prevenir y/o tratar de manera eficaz cualquier enfermedad autoinmunitaria específica de antígeno, que incluyen, pero sin limitarse a las mismas, enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, nefritis anti-GBM/anti-TBM, síndrome antifosfolípido, angioedema autoinmunitario, disautonomía autoinmunitaria, encefalomiелitis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED, *Autoimmune inner ear disease*), miocarditis autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, retinopatía autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, neuropatía axonal y neuronal (AMAN, *Axonal & neuronal neuropathy*), enfermedad de Baló, enfermedad de Behcet, penfigoide mucoso benigno, penfigoide ampoloso, enfermedad de Castleman (CD, *Castleman disease*), enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP, *Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*), osteomielitis multifocal crónica recurrente (CRMO, *Chronic recurrent multifocal osteomyelitis*), Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de Cogan, enfermedad por crioaglutininas, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis por Coxsackie, síndrome CREST, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, esofagitis eosinofílica (EoE), fascitis eosinofílica, eritema nodoso, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evans, fibromialgia, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), miocarditis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, granulomatosis con poliangitis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein (HSP, *Henoch-Schonlein purpura*), herpes gestacional o penfigoide gestacional (PG), hipogammaglobulinemia, nefropatía por IgA, enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, púrpura trombocitopénica inmunitaria (ITP, *Immune thrombocytopenic purpura*), miositis por cuerpos de inclusión (IBM, *Inclusion body myositis*), cistitis intersticial (IC, *Interstitial cystitis*), artritis juvenil, diabetes juvenil (diabetes tipo 1), miositis juvenil (JM, *Juvenile myositis*), enfermedad de Kawasaki, síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, enfermedad de IgA lineal (LAD, *Linear IgA disease*), lupus, enfermedad de Lyme crónica, enfermedad de Ménière, poliangitis microscópica (MPA, *Microscopic polyangiitis*), enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD, *Mixed connective tissue disease*), úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, esclerosis múltiple, miastenia gravis, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica, neutropenia, penfigoide cicatricial ocular, neuritis óptica, reumatismo palindrómico (PR, *Palindromic rheumatism*), PANDAS, degeneración cerebelosa paraneoplásica (PCD, *Paraneoplastic cerebellar degeneration*), hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH, *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*), síndrome de Parry Romberg, Pars planitis (uveítis periférica), síndrome de Parsonnage-Turner, pénfigo, neuropatía periférica, encefalomiелitis perivenosa, anemia perniciosa (PA, *Pernicious anemia*), síndrome POEMS, poliarteritis nudosa, síndromes poliglandulares tipo I, II, III, polimialgia reumática, polimiositis, síndrome posinfarto de miocardio, síndrome pospericardiotomía, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, dermatitis por progesterona, psoriasis, artritis psoriásica, aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA, *Pure red cell aplasia*), pioderma gangrenoso, fenómeno de Raynaud, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, policondritis recidivante, síndrome de piernas inquietas (RLS, *Restless legs syndrome*), fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, escleritis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, autoinmunidad del esperma y testicular, síndrome de la persona rígida (SPS, *Stiff person syndrome*), endocarditis bacteriana subaguda (SBE, *Subacute bacterial endocarditis*), síndrome de Susac, oftalmía simpática (OS, *Sympathetic ophthalmia*), arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica (TTP, *Thrombocytopenic purpura*), síndrome de Tolosa-Hunt (THS, *Tolosa-Hunt syndrome*), mielitis transversa, diabetes tipo 1, colitis ulcerosa (UC, *Ulcerative colitis*), enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (UCTD, *Undifferentiated connective tissue disease*), uveítis, vasculitis, vitiligo, granulomatosis de Wegener (o granulomatosis con poliangitis (GPA)).

55 Se contemplan el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de otras enfermedades inmunitarias, incluidas aquellas en las que la función de una o más células inmunitarias está sesgada, lo que da como resultado una enfermedad del sistema inmunitario que no es necesariamente una enfermedad autoinmunitaria. Por tanto, la plataforma de desarrollo de fármacos del presente documento también se puede utilizar para prevenir y/o tratar de manera eficaz enfermedades que no son enfermedades autoinmunitarias. La plataforma se dirige a enfermedades autoinmunitarias humanas. Se puede dirigir a enfermedades autoinmunitarias de seres no humanos. Entre los ejemplos no limitantes de seres no humanos se incluyen perros, gatos, conejos, ratones, cobayas, monos, vacas, ovejas, cabras y cebras. La plataforma de la presente divulgación también se puede dirigir a enfermedades del sistema inmunitario que no son enfermedades autoinmunitarias en seres humanos y no humanos.

65 El paciente puede haber tenido una enfermedad autoinmunitaria durante aproximadamente 1 mes a aproximadamente 5 años. El paciente puede haber tenido una enfermedad autoinmunitaria durante

aproximadamente 1, 2, 3 o 4 semanas, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

El paciente puede no haber recibido previamente ningún tratamiento para una enfermedad autoinmunitaria. El paciente puede haber recibido previamente tratamiento (ya sea con fármacos inmunosupresores u hormonas esteroideas o ambos) para una enfermedad autoinmunitaria. El paciente puede haber sido tratado previamente con éxito con fármacos inmunosupresores u hormonas esteroideas o ambos para una enfermedad autoinmunitaria. El paciente puede haber sido tratado previamente con éxito con fármacos inmunosupresores u hormonas esteroideas o ambos para una enfermedad autoinmunitaria, sin embargo, la enfermedad autoinmunitaria ha reaparecido. El paciente puede haber sido tratado previamente sin éxito con fármacos inmunosupresores u hormonas esteroideas o ambos para una enfermedad autoinmunitaria.

La edad del paciente puede variar de aproximadamente 20 años a aproximadamente 95 años. La edad del paciente puede variar de aproximadamente 5 años a aproximadamente 70 años. La edad del paciente es menor de 5 años. La edad del paciente puede ser mayor de 70 años. La edad del paciente puede ser de aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 años, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente. El paciente puede ser un hombre. La paciente puede ser una mujer.

El EDC se puede proporcionar en forma de una composición. La composición de EDC se puede formular para administración a través de una o más vías de administración descritas en el presente documento. Las composiciones pueden ser, sin limitaciones, soluciones inyectables estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes.

Las composiciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y viales. Las soluciones y suspensiones inyectables se pueden preparar a partir de uno o más de polvos, gránulos, cápsulas y comprimidos estériles. También se contemplan otras composiciones no limitantes, tales como las que se administran mediante aerosol o nebulizador y parches cutáneos. La eficacia de las composiciones se puede probar en voluntarios humanos no pacientes, modelos in vivo, modelos ex vivo, modelos in vitro, antes de administrarlas a pacientes humanos, pacientes no humanos o ambos.

Un EDC se puede administrar diariamente, semanalmente, quincenalmente o mensualmente. El EDC se puede administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces al día.

La duración del tratamiento con un EDC puede variar de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 4 meses. Dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la duración del tratamiento con un EDC puede ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 semanas, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

La eficacia del tratamiento puede variar de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 95 %, según lo determinado por el nivel de autoanticuerpos circulantes y/o la cantidad de células inmunitarias específicas de epítipo (por ejemplo, linfocitos B y T) en el paciente. La eficacia del tratamiento puede ser de aproximadamente el 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente, según lo determinado por el nivel de autoanticuerpos circulantes y/o la cantidad de células inmunitarias específicas de epítipo (por ejemplo, linfocitos B y T) en el paciente.

El volumen de la composición de EDC puede variar de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 10 ml. El volumen de la composición de EDC puede variar de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 100 ml. El volumen de la composición de EDC puede ser de aproximadamente 0,005, 0,0075, 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 100 o 150 ml, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

Debido a la afinidad y especificidad muy elevadas de los EDC, por ejemplo, para los BCR y los TCR, y la accesibilidad a ubicaciones relativamente inaccesibles en el cuerpo, en algunas realizaciones, el tratamiento eficaz de una enfermedad autoinmunitaria se consigue con una dosis mucho menor del fármaco en el EDC en comparación con cuando el fármaco en el EDC se administra solo. Adicionalmente, la duración del tratamiento requerida con un EDC es mucho más corta en comparación con cuando el fármaco en el EDC se administra solo. Por ejemplo, cuando el fármaco en el EDC es un fármaco antineoplásico/antitumoral, la dosis inicial de EDC es aproximadamente $1/10^8$ parte de la dosis a la que se utiliza el fármaco en el EDC para el tratamiento de tumores sólidos.

Como los EDC tienen un acceso mucho mejor al BCR en la circulación periférica y en los tejidos/órganos linfoides periféricos, la dosis inicial del fármaco en forma de EDC puede ser mucho menor que la dosis del fármaco por sí solo (por ejemplo, para tumores/cánceres en ubicaciones relativamente inaccesibles del cuerpo). Por ejemplo, la dosis inicial del fármaco en forma de EDC puede ser de aproximadamente $1/5^a$, $1/10^a$, $1/15^a$, $1/20^a$, $1/25^a$, $1/30^a$, $1/35^a$, $1/40^a$, $1/45^a$, $1/50^a$, $1/55^a$, $1/60^a$, $1/65^a$, $1/70^a$, $1/75^a$, $1/80^a$, $1/85^a$, $1/90^a$, $1/95^a$, $1/100^a$, $1/200^a$, $1/250^a$, $1/500^a$, $1/1000^a$, $1/2000^a$ o $1/5000^a$ parte, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente, de la dosis a la que se utilizaría el fármaco en el EDC para el tratamiento de la enfermedad.

Dichas una o más opciones de tratamiento a base de EDC dadas a conocer en el presente documento pueden ser rápidamente eficaces, requieren una dosis mucho menor y causan efectos adversos mínimos en comparación con el tratamiento con fármacos inmunosupresores y/o esteroides.

Una dosis unitaria de EDC puede variar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. En algunas realizaciones, una dosis unitaria de EDC puede variar de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Una dosis unitaria de EDC para dirigirse a los linfocitos B puede variar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Una dosis unitaria de EDC para dirigirse a los linfocitos T puede variar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Una dosis unitaria de EDC puede ser de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mg/kg, o un valor dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

El EDC se puede administrar como una dosis diaria única. El EDC se puede administrar como más de una dosis por día. El número de dosis por día puede variar de una a seis. El número de dosis por día puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Los EDC en el presente documento se pueden utilizar para extraer y/o eliminar células autoinmunitarias circulantes durante la plasmaféresis, la aféresis y la leucorreducción.

Diagnóstico y monitorización del paciente después del tratamiento

El diagnóstico de la enfermedad y la monitorización de la progresión de la enfermedad después del tratamiento son fundamentales para determinar las opciones de tratamiento del paciente, la respuesta del paciente al tratamiento y la gestión de la enfermedad del paciente.

En algunos casos, el diagnóstico y la monitorización de la progresión de la enfermedad del paciente después del tratamiento se realizan utilizando procedimientos dolorosos e invasivos. Por ejemplo, el diagnóstico y la monitorización del paciente después del tratamiento de la progresión de la nefropatía membranosa (NM) se basan completamente en biopsias de riñón, que son invasivas y pueden causar hemorragia renal grave y muchos otros efectos secundarios.

Los EDC dados a conocer en el presente documento son para el diagnóstico no invasivo y/o mínimamente invasivo y la monitorización después del tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

Los EDC para el diagnóstico no invasivo y/o mínimamente invasivo y la monitorización después del tratamiento de enfermedades autoinmunitarias comprenden uno o más epítomos dados a conocer en el presente documento. El epítomo puede estar en solución o inmovilizado en un sustrato, o ambos. El sustrato puede ser cualquiera de una variedad de sustratos, tales como columnas, perlas, microesferas, tiras de prueba o placas de múltiples pocillos que se sabe que son útiles para ensayos para el diagnóstico y la monitorización después del tratamiento. En algunas realizaciones, el diagnóstico y la monitorización después del tratamiento de enfermedades autoinmunitarias se basan en uno o más ensayos. El ensayo puede ser uno o más de un inmunoensayo, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), FACS, ImmunoSpot ligado a enzimas (ELISPOT), radioinmunoensayo, inmunoensayo magnético.

En algunas realizaciones, uno o más epítomos dados a conocer en el presente documento se pueden unir a un sustrato (por ejemplo, una placa de ELISA) utilizando procedimientos estándar. Se puede recoger una muestra de paciente que contiene linfocitos B (por ejemplo, sangre) durante una visita a una clínica utilizando procedimientos clínicos estándar. Las muestras de paciente se pueden añadir a la placa de ELISA a diferentes diluciones (por ejemplo, $1/10^o$, $1/100^o$, $1/1000^o$, etc.) con muestras de control apropiadas. Después de la incubación estándar, la placa de ELISA se puede leer utilizando un lector de placas estándar.

Puede haber un aumento detectable de autoanticuerpos antiepítomo en la muestra del paciente en relación con la muestra de control. Un aumento detectable de autoanticuerpos antiepítomo de, como mínimo, el 10 % en relación con la muestra de control indica la presencia de una enfermedad autoinmunitaria en el paciente. El aumento detectable de autoanticuerpos antiepítomo en la muestra del paciente puede ser mayor del 10 % en relación con la muestra de control. El aumento detectable de autoanticuerpos antiepítomo en la muestra

del paciente puede variar de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 15 % en relación con la muestra de control. El aumento detectable de autoanticuerpos antiepítipo en la muestra del paciente puede ser de aproximadamente el 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 % en relación con la muestra de control, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

Hay un aumento detectable de autoanticuerpos antiepítipo en la muestra del paciente en relación con una muestra de control. El aumento de autoanticuerpos antiepítipo en una muestra del paciente es detectable utilizando uno o más de la composición, procedimientos y/o kits para el diagnóstico dados a conocer en el presente documento. Tal como se utiliza en el presente documento, "muestra de control" se refiere a una muestra que es representativa de niveles normales de autoanticuerpos antiepítipo o que se obtiene de un individuo que se sabe que está libre de la enfermedad autoinmunitaria.

En algunas realizaciones, la muestra del paciente puede ser, por ejemplo, un fluido corporal (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo y linfa), una muestra de biopsia de un tejido y/o un órgano afectado por una enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede realizar una biopsia de riñón en un paciente con NM. En algunas realizaciones, se puede realizar una biopsia de una lesión mucocutánea en un paciente con pénfigo vulgar.

Un ensayo basado en microscopía para el diagnóstico y la monitorización después del tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria puede comprender la obtención de muestras de sangre del paciente. Utilizando uno o más EDC del presente documento la muestra de sangre puede analizarse tal cual o pueden aislarse una o más poblaciones específicas de células (por ejemplo, linfocitos B totales o linfocitos T totales) utilizando una o más técnicas de purificación celular (por ejemplo, FACS) conocidas en la técnica anterior para el análisis para detectar la presencia de células autoinmunitarias en el paciente. Por ejemplo, pueden utilizarse uno o más EDC del presente documento para detectar la presencia de linfocitos B productores de autoanticuerpos en la muestra del paciente (ejemplo 5; figura 24, y ejemplo 8; figura 29). También pueden utilizarse uno o más EDC del presente documento para detectar los niveles de autoanticuerpos en un paciente.

En algunas realizaciones, el ensayo también se puede adaptar para monitorizar el estado de una enfermedad autoinmunitaria en un paciente y/o la capacidad de respuesta a una o más de las opciones de tratamiento dadas a conocer en el presente documento. Por ejemplo, se puede recoger una muestra de sangre, suero y/o plasma de un paciente en un primer punto temporal. El primer punto temporal puede ser la primera visita del paciente a la clínica y el paciente no ha sido diagnosticado con una enfermedad autoinmunitaria y nunca ha sido tratado previamente para la enfermedad autoinmunitaria.

En algunas realizaciones, el primer punto temporal puede ser anterior al inicio de una o más opciones de tratamiento dadas a conocer en el presente documento, en el que el paciente se haya sometido previamente a otras formas de tratamiento. Después del inicio de una o más opciones de tratamiento dadas a conocer en el presente documento, se puede recoger entonces una muestra de sangre un paciente en un segundo punto temporal, así como en puntos temporales posteriores adicionales.

La cantidad de linfocitos B productores de autoanticuerpos antiepítipo en la muestra del paciente se puede comparar en los diversos puntos temporales. Una disminución en la cantidad de linfocitos B productores de autoanticuerpos en la muestra del paciente en el segundo y/o puntos temporales posteriores en relación con el primer punto temporal es indicativa de una mejora de la enfermedad. Una disminución en la cantidad de linfocitos B productores de autoanticuerpos en la muestra del paciente en el segundo y/o puntos temporales posteriores en relación con el primer punto temporal puede ser indicativa de la eliminación de linfocitos B productores de autoanticuerpos y del 100 % del tratamiento de la enfermedad. La eliminación de células autoinmunitarias y la mejora de la enfermedad pueden variar de aproximadamente el 50 % al 100 %. La eliminación de células autoinmunitarias y la mejora de la enfermedad puede ser de aproximadamente el 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 %. La eliminación de células autoinmunitarias puede ser del 100 % después de solo una ronda de tratamiento. Cuando la eliminación de células autoinmunitarias es baja después de una ronda de tratamiento (por ejemplo, por debajo del 50 %), se pueden proporcionar una o más rondas adicionales de tratamiento para eliminar las células autoinmunitarias y/o se puede administrar al paciente una o más terapias adicionales.

La eficacia de un EDC puede probarse in vitro utilizando muestras de pacientes antes de administrar el EDC a los pacientes. Por ejemplo, la eficacia de un EDC se prueba en linfocitos B aislados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) de pacientes (figura 25; ejemplo 6, y figura 30; ejemplo 9). Se utiliza un EDC que comprende un fluoróforo (por ejemplo, FITC) para detectar la presencia de linfocitos B productores de autoanticuerpos en muestras de pacientes (paneles de la izquierda en la figura 25 (muestras de pacientes con NM) y figura 30 (muestras de pacientes con pénfigo vulgar) antes de exponer las muestras a un EDC que comprende un fármaco citotóxico. A continuación, las muestras de pacientes se tratan con un EDC que comprende un fármaco citotóxico (por ejemplo, MMAE). A

continuación, el EDC que comprende el fluoróforo se utiliza para determinar la eficacia del EDC que comprende un fármaco citotóxico de los linfocitos B productores de autoanticuerpos en muestras de pacientes (paneles centrales en la figura 25 (muestras de pacientes con NM) y figura 30 (muestras de pacientes con pénfigo vulgar)).

La eficacia del EDC que comprende un fármaco citotóxico para eliminar los linfocitos B productores de autoanticuerpos del paciente puede ser del 100 % (paneles centrales en la figura 25 (muestras de pacientes con NM) y figura 30 (muestras de pacientes con pénfigo vulgar)). La eficacia puede variar de aproximadamente el 50 % al 100 %. La eficacia puede ser de aproximadamente el 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 %. Cuando la eficacia después de una primera ronda de tratamiento no es del 100 %, se pueden realizar una o más rondas adicionales de tratamiento y se puede realizar una reevaluación de la eficacia después de cada ronda de tratamiento.

En algunas realizaciones, los uno o más EDC que comprenden un fluoróforo se utilizan como herramientas de diagnóstico para determinar la cantidad de células específicas de epítipo en un paciente. Por ejemplo, la figura 24 muestra la utilización de un EDC basado en el epítipo de PLA2R y FITC como una herramienta de diagnóstico para determinar la presencia de linfocitos B autoinmunitarios en la circulación periférica de pacientes con NM. La figura 29 muestra la utilización de un EDC basado en el epítipo de Dsg y FITC como una herramienta de diagnóstico para determinar la presencia de linfocitos B autoinmunitarios en la circulación periférica de pacientes con PV.

En algunas realizaciones, los uno o más EDC que comprenden un fluoróforo se utilizan como herramientas de diagnóstico para determinar la cantidad de células autoinmunitarias específicas de epítipo en un paciente en un primer punto temporal. Si la cantidad de células autoinmunitarias específicas de epítipo en el paciente en un primer punto temporal está por encima de un umbral predeterminado (lo que indica que el paciente requiere una o más terapias para la enfermedad), se le puede administrar al paciente uno o más EDC que comprenden un fármaco ya sea por sí solo o en combinación con una o más terapias complementarias. La cantidad de células autoinmunitarias específicas de epítipo se vuelve a evaluar en un segundo punto temporal utilizando los uno o más EDC que comprenden un fluoróforo. Si la cantidad de células autoinmunitarias específicas de epítipo en el segundo punto temporal está por debajo del umbral predeterminado, se interrumpe el tratamiento. Si la cantidad de células autoinmunitarias específicas de epítipo en el segundo punto temporal está por encima del umbral predeterminado, se continúa el tratamiento y se realiza una evaluación posterior.

La presencia de células autoinmunitarias en un paciente se puede detectar en sangre, otros fluidos biológicos y biopsias de tejidos y órganos (por ejemplo, recogidas durante una cirugía). Los EDC se pueden utilizar para detectar cualquier población celular que pueda unirse a un epítipo (por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, otras células en PBMC y células en otros fluidos biológicos).

En algunas realizaciones, la plataforma del presente documento se puede adaptar a cualquier péptido, dominio de proteína, moléculas pequeñas y otros ligandos (por ejemplo, dominios de ligando o ligandos peptídicos que se unen a receptores específicos).

En algunas realizaciones, el nivel/cantidad de linfocitos B productores de autoanticuerpos en los pacientes se puede calcular utilizando programas informáticos automatizados estándar. En algunas realizaciones, el nivel de linfocitos B productores de autoanticuerpos se puede comparar antes y después del tratamiento con una o más opciones de tratamiento dadas a conocer en el presente documento. En algunas realizaciones, uno o más epítopos dados a conocer en el presente documento se pueden producir y purificar en grandes cantidades, y se pueden fabricar placas de ELISA de calidad comercial estándar y utilizarlas como un procedimiento de rutina para el diagnóstico y la monitorización del paciente después del tratamiento en un laboratorio clínico.

El ensayo es no invasivo y/o mínimamente invasivo, simple, eficiente en términos de tiempo, rentable y se puede realizar de manera rutinaria en un laboratorio clínico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ensayo se puede realizar sin la necesidad de una biopsia renal invasiva, tal como la que se utiliza para pacientes con NM.

Se puede diseñar un ensayo ELISA específico del epítipo de PLA2R para el cribado e identificación de moléculas pequeñas para el tratamiento de NM. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden identificar moléculas pequeñas que bloquean específicamente la unión de autoanticuerpos de PLA2R a PLA2R. Por ejemplo, una realización de la placa de ELISA proporcionada en el presente documento se puede utilizar para cribar una o más bibliotecas disponibles en el mercado de moléculas pequeñas.

Dichas una o más bibliotecas disponibles en el mercado de moléculas pequeñas pueden comprender, sin limitación, metabolitos (por ejemplo, de alcaloides, glucósidos y lípidos), péptidos, fenoles naturales (por ejemplo, flavonoides), policétidos, terpenos, esteroides y tetrapirroles.

Cualquiera de las composiciones y/o procedimientos descritos en el presente documento se proporciona como uno o más kits. El kit puede comprender uno o más polipéptidos, anticuerpos, sondas y otros reactivos de ensayo descritos en el presente documento. El kit puede incluir el soporte sólido al que se pueden unir o inmovilizar los reactivos de ensayo. Los reactivos se pueden etiquetar, opcionalmente, con un marcador detectable. El kit puede comprender, además, uno o más recipientes para contener, almacenar y/o transportar los polipéptidos, anticuerpos, sondas y otros reactivos descritos en el presente documento.

Se dan a conocer composiciones, procedimientos y/o kits que se dirigen específicamente a las células inmunitarias específicas de epítipo (por ejemplo, linfocitos B y T) y las eliminan. Se pueden seleccionar y tratar uno o más pacientes utilizando las composiciones, procedimientos y/o kits dados a conocer en el presente documento para dirigirse específicamente a las células inmunitarias que reconocen epítopos (por ejemplo, linfocitos B y T) y eliminarlas del paciente.

Nefropatía membranosa (NM)

La nefropatía membranosa (NM) (también denominada NM primaria o NM idiopática) es una enfermedad glomerular común. La incidencia de NM es elevada en pacientes mayores de 40 años. La recidiva frecuente de la enfermedad es el principal desafío del tratamiento clínico. No existen tratamientos eficaces, excepto la utilización de dosis elevadas de hormonas esteroides e inmunosupresores y los pacientes progresan a insuficiencia renal en 5 a 10 años con el tratamiento actual. Existen de 4.000 a 6.000 casos nuevos por año en los EE. UU., 10.000 casos nuevos por año en Europa y 80.000 casos nuevos por año en todo el mundo.

La NM es una enfermedad glomerular autoinmunitaria. Recientemente se determinó que el mecanismo que provoca la enfermedad de la NM se debe a la unión a un receptor de membrana, el receptor de fosfolipasa A2 (PLA2R), en la superficie de los podocitos renales de anticuerpos autoinmunitarios circulantes (autoanticuerpos) generados por linfocitos B productores de autoanticuerpos. Más del 70 % de los pacientes son causados por autoanticuerpos anti-PLA2R. La NM a menudo reaparece y provoca insuficiencia renal en 5 a 10 años.

Los tratamientos clínicos actuales para la NM utilizan fármacos inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina, rituximab, clorambucilo, tacrolimus, ciclofosfamida, micofenolato de mofetilo) u hormonas esteroides (por ejemplo, corticosteroides). Sin embargo, ambas opciones de tratamiento no son específicas y producen efectos secundarios significativos. A menudo, tiene lugar la recidiva de la enfermedad cuando se reduce la dosis de estos tratamientos. Además, en muchos pacientes, estos tratamientos no son eficaces. Por lo tanto, sigue existiendo una gran necesidad de un tratamiento específico para la NM sin efectos secundarios perjudiciales.

Recientemente se determinó que el mecanismo que causa la enfermedad de NM se debe a la unión de autoanticuerpos circulantes a PLA2R en la superficie de los podocitos renales. Adicionalmente, los polimorfismos M292V y H300D en el dominio 1 similar a lectina de tipo C (CTLD1) y G1106S en la región de unión entre CTLD6 y CTLD7 pueden correlacionarse con la aparición de NM en pacientes (Kao, L., et al).

El nivel de anticuerpos en el plasma de pacientes con NM está directamente relacionado con la gravedad de la enfermedad y la respuesta del paciente al tratamiento médico. Por tanto, existe la necesidad de eliminar los linfocitos B productores de autoanticuerpos del paciente para tratar la enfermedad, a la vez que, de manera simultánea, se evitan efectos secundarios perjudiciales.

PLA2R es una proteína de membrana integral grande con un peso molecular de aproximadamente 180-185 kDa (SEQ ID NO: 14). En la figura 1 se proporciona una topología propuesta de PLA2R basada en el receptor de manosa. PLA2R contiene una parte extracelular grande glicosilada que interactúa con el ligando, un único dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta (figura 1). La parte extracelular grande se puede dividir adicionalmente en 10 dominios: un dominio rico en cisteína (CysR), un dominio tipo II similar a fibronectina (FnII) y 8 dominios similares a lectina de tipo C repetidos (CTLD) en tándem (figura 1).

La figura 1 indica la posición de los aminoácidos que delimitan los diversos dominios (indicados por flechas) de PLA2R. Las secuencias de aminoácidos de algunos de los dominios se proporcionan en las SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 12 (figura 12 - figura 17). El epítipo de PLA2R (SEQ ID NO: 13), que es reconocido por autoanticuerpos en pacientes con NM, está ubicado en la parte extracelular del receptor, es conformacional y sensible a la reducción, y tiene una afinidad muy elevada por los autoanticuerpos.

Sin embargo, el epítipo de PLA2R (figura 18; SEQ ID NO: 13) cuando se expresa por sí solo no se pliega adecuadamente en la conformación correcta. La inclusión de los dos primeros dominios permite un plegamiento conformacional adecuado del antígeno. La proteína PLA2R de longitud completa (figura 19; SEQ ID NO: 14) tampoco se puede expresar y purificar a gran escala, ya que no es bioquímicamente estable. Sin embargo, los dominios 1-3 y hasta los dominios 1-6 son adecuados para expresar y obtener grandes

cantidades de proteína. Los dominios 1-5 proporcionan una expresión óptima de la proteína. Por ejemplo, se puede obtener una conformación plegada de manera adecuada utilizando la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 9.

La producción de autoanticuerpos anti-PLA2R en pacientes con NM se debe a la activación y expansión de una población específica de linfocitos B que porta BCR específicos que reconocen un epítipo en PLA2R. La población específica de linfocitos B se activa cuando es acoplada por una población específica de linfocitos T cooperadores que porta un receptor de linfocitos T específico para el mismo epítipo de PLA2R. Estos linfocitos B y T específicos representan solo una pequeña fracción del repertorio total de linfocitos B y T.

Tratamiento de NM mediante el direccionamiento a linfocitos B y T

La eliminación de los autoanticuerpos anti-PLA2R de los pacientes puede aliviar los efectos patológicos de los autoanticuerpos. Sin embargo, la eliminación de los autoanticuerpos de un paciente aún deja al paciente vulnerable a la recidiva de la enfermedad. Esto se debe a que los linfocitos B productores de autoanticuerpos PLA2R continúan produciendo los autoanticuerpos a pesar de la eliminación de los autoanticuerpos causantes de la enfermedad de la sangre del paciente. Por lo tanto, el direccionamiento específico a las células inmunitarias que reconocen el epítipo de PLA2R (por ejemplo, linfocitos B y T) puede eliminar la producción de autoanticuerpos patógenos sin afectar la función normal de otras células inmunitarias.

Las composiciones, procedimientos y/o kits se pueden dirigir específicamente a las células inmunitarias que reconocen el epítipo de PLA2R y las eliminan. Las composiciones, procedimientos y/o kits se pueden dirigir específicamente a los linfocitos B que reconocen el epítipo de PLA2R y los eliminan. Las composiciones, procedimientos y/o kits se pueden dirigir específicamente a los linfocitos T que reconocen el epítipo de PLA2R y los eliminan. Las composiciones, procedimientos y/o kits se pueden dirigir específicamente a los linfocitos B y T que reconocen el epítipo de PLA2R y los eliminan.

Los tratamientos actuales para la NM no son específicos, presentan efectos secundarios significativos y recidivas frecuentes de la enfermedad. Los EDC del presente documento para la NM son específicos, presentan efectos secundarios mínimos o inexistentes y eliminan las recidivas de la enfermedad.

El paciente presenta, como mínimo, un síntoma clínico de NM. Entre los síntomas de NM se incluyen uno o más entre síndrome nefrótico, edema (hinchazón en cualquier zona del cuerpo), proteinuria, aspecto espumoso de la orina (debido a grandes cantidades de proteína), micción (excesiva durante la noche), fatiga, falta de apetito y aumento de peso.

El paciente puede haber tenido NM durante aproximadamente 1 mes a aproximadamente 5 años. El paciente puede haber tenido NM durante aproximadamente 1, 2, 3 o 4 semanas, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

El paciente puede no haber recibido previamente ningún tratamiento para NM. El paciente puede haber recibido previamente tratamiento (ya sea con fármacos inmunosupresores u hormonas esteroides o ambos) para NM. El paciente puede haber sido tratado previamente con éxito con fármacos inmunosupresores u hormonas esteroides o ambos para NM. El paciente puede haber sido tratado previamente sin éxito con fármacos inmunosupresores u hormonas esteroides o ambos para NM.

El paciente puede someterse a una biopsia renal para confirmar que el paciente tiene MN. El paciente puede someterse a una biopsia renal incluso si hay un aumento detectable de autoanticuerpos anti-PLA2R en la muestra del paciente en relación con la muestra de control. En algunas realizaciones, el paciente puede no someterse a una biopsia renal si hay un aumento detectable de anti-PLA2R en la muestra del paciente en relación con la muestra de control.

El PLA2R de longitud completa (figura 19; SEQ ID NO: 14) es difícil de purificar y, por lo tanto, tiene una aplicación limitada en entornos clínicos. Por tanto, las composiciones, los procedimientos y/o los kits para eliminar linfocitos B productores de autoanticuerpos de una muestra de paciente pueden comprender un fragmento purificado de PLA2R de longitud completa. El fragmento puede comprender CysR, Fnll y uno o más CTLD (figura 2).

El fragmento comprende, como mínimo, los dominios 1-5 de PLA2R. En algunas realizaciones, la secuencia del fragmento es tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 1 (aproximadamente 658 aminoácidos de longitud) (figura 6). La secuencia de un fragmento es tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de un fragmento es tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 2 (figura 7) y aproximadamente del 5 % a aproximadamente el 95 % de la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 3 (figura 8). La secuencia de un fragmento es tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 2 (figura 7) y aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de la secuencia proporcionada en la SEQ ID

NO: 3 (figura 8).

La secuencia de un fragmento es tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 4 (aproximadamente 805 aminoácidos de longitud) (figura 9). La secuencia de un fragmento es tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 5 (figura 10). La secuencia de un fragmento es tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 5 (figura 10) y aproximadamente del 5 % a aproximadamente el 95 % de la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6 (figura 11). La secuencia de un fragmento es tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 5 y aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6 (figura 11).

Las composiciones, procedimientos y/o kits que se dirigen específicamente a las células inmunitarias que reconocen el epítipo de PLA2R y las eliminan comprenden uno o más fragmentos de PLA2R dados a conocer en el presente documento como portador de uno o más fármacos (EDC) (figura 4). Los fragmentos de PLA2R dirigirían específicamente el fármaco a los linfocitos B específicos y los linfocitos T cooperadores correspondientes que son responsables de la producción de autoanticuerpos anti-PLA2R en pacientes. El EDC puede unirse a los receptores específicos en los linfocitos B y T de la superficie y entrar en las células a través de endocitosis.

Se puede introducir un residuo de cisteína libre en el extremo C del fragmento de PLA2R. A continuación, el grupo tio de la cisteína libre se conjuga con un enlazador escindible. El enlazador escindible puede ser un enlazador de valina-citrulina. El enlazador de valina-citrulina se puede preconjugar con un fármaco. El fármaco puede ser un análogo de duocarmicina. En algunas realizaciones, se introduce un residuo de cisteína libre en el extremo C del fragmento de PLA2R y el grupo tio de la cisteína libre se conjuga con un enlazador de valina-citrulina escindible preconjugado con un análogo de duocarmicina.

Se puede introducir una secuencia corta de CXPXR en el extremo C del fragmento de PLA2R. El residuo de cisteína se puede convertir en una etiqueta de aldehído de formilglicina. El residuo de cisteína se puede convertir en una etiqueta de aldehído de formilglicina utilizando una enzima generadora de formilglicina. La etiqueta de aldehído de formilglicina se puede conjugar, a continuación, con un fármaco-enlazador mediante un enlace no escindible. La etiqueta de aldehído de formilglicina se puede conjugar con el fármaco-enlazador mediante un enlace no escindible a través de la química de oximas. La etiqueta de aldehído de formilglicina se puede conjugar con el fármaco-enlazador mediante un enlace no escindible a través de la reacción de Pictet-Spengler. El fármaco en el fármaco-enlazador puede ser un reactivo citotóxico.

Un fármaco se puede conjugar con el fragmento de PLA2R en una región fuera del sitio de interacción de BCR. Un fármaco se puede conjugar con el fragmento de PLA2R en una región fuera del sitio de interacción de BCR a uno o más residuos de lisina. Un fármaco se puede conjugar con el fragmento de PLA2R en una región fuera del sitio de interacción de BCR a uno o más residuos de lisina a través de enlaces amida a un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) unido a un fármaco-enlazador.

Por ejemplo, el EDC se puede administrar en la circulación del paciente por vía intravenosa. La unión del EDC a los linfocitos B productores de autoanticuerpos que reconocen PLA2R puede desencadenar la internalización rápida del complejo receptor-EDC a través de endocitosis (figura 5). La unión del EDC a los linfocitos T que reconocen PLA2R desencadena la internalización rápida del complejo receptor-EDC a través de endocitosis. En el endosoma, el complejo receptor-EDC internalizado se digiere provocando la liberación del fármaco conjugado. El fármaco liberado provoca, a continuación, la muerte de los linfocitos B productores de autoanticuerpos que reconocen PLA2R (figura 5). El fármaco liberado puede provocar, a continuación, la muerte de los linfocitos T que reconocen PLA2R. El fármaco puede provocar la muerte de los linfocitos B y T por apoptosis. El fármaco puede provocar la muerte de los linfocitos B y T mediante mecanismos no apoptóticos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos no son limitantes y se presentan únicamente para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto en la materia a realizar y utilizar la presente invención. Los ejemplos no tienen por objeto limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Se recoge sangre de un paciente con NM. Se aíslan linfocitos B totales de la sangre. Se utiliza FACS para identificar y separar células que expresan el receptor para el epítipo de PLA2R. Se añade EDC a las células que portan el receptor para el epítipo de PLA2R. Las células que no expresan el receptor para el epítipo de PLA2R se utilizan como control. El EDC se añade a cada población celular a una dosis que es la 1/1.000ª parte de la dosis normal del fármaco en el EDC. Las poblaciones de células se incuban durante una noche con el EDC. Las células que expresan el receptor para el epítipo de PLA2R son destruidas por el EDC, mientras que las células que no expresan el receptor no se ven afectadas y sobreviven. Las células se

pueden teñir con azul de tripano para evaluar la eficacia del EDC en la destrucción de células que expresan el receptor para el epítipo de PLA2R.

Ejemplo 2

Se recoge sangre de un paciente con NM. Las células que expresan el receptor para el epítipo de PLA2R se marcan con un epítipo de PLA2R marcado con fluorescencia. Las células marcadas y no marcadas se separan mediante microscopía. Las células no marcadas se utilizan como control. El EDC se añade a cada población celular a una dosis que es la 1/1.000ª parte de la dosis normal del fármaco en el EDC. Las poblaciones de células se incuban durante una noche con el EDC. Las células que expresan el receptor para el epítipo de PLA2R son destruidas por el EDC, mientras que las células que no expresan el receptor no se ven afectadas y sobreviven. Las células se pueden teñir con azul de tripano para evaluar la eficacia del EDC en la destrucción de células que expresan el receptor para el epítipo de PLA2R.

Ejemplo 3

En un ejemplo, después del tratamiento con una o más opciones de tratamiento proporcionadas en el presente documento, un paciente con NM se recuperó en aproximadamente 1 mes en comparación con aproximadamente 6 meses con regímenes de tratamiento anteriores. La recuperación del paciente se midió por los niveles de proteína en la orina.

Ejemplo 4 - Diseño de un epítipo de PLA2R modificado para conjugación química específica del sitio

El epítipo de PLA2R contiene, como mínimo, 3 dominios, a saber, el dominio rico en cisteína N-terminal (CysR), el dominio tipo II similar a la fibronectina (FnII) y el dominio 1 similar a la lectina tipo C (CTLD1) (figura 1, figura 2 y figura 23). La naturaleza de la interacción o interacciones del epítipo con autoanticuerpos y/o receptor de linfocitos B (BCR) no ha quedado clara. Es fundamental que la conjugación de una sustancia química con el epítipo no interfiera con la interacción anticuerpo-antígeno.

Para conseguir esto, se desarrolló un sitio específico en el epítipo de PLA2R para la conjugación. Específicamente, se diseñó una cisteína libre en la cola C-terminal del epítipo para desarrollar un sitio específico para la conjugación química. También se diseñaron un sitio de escisión por TEV y una etiqueta de His (6 residuos de histidina) en la proteína C-terminal del epítipo a la cisteína introducida para la purificación de proteínas. La figura 23 (arriba) muestra un esquema del diseño de una construcción de epítipo de PLA2R modificado para la purificación de proteínas y la conjugación a fármacos. La figura 23 (centro) muestra un esquema de cómo se conjuga un fármaco (agente citotóxico) con el epítipo de PLA2R purificado.

La evaluación de la expresión de proteínas mostró que el epítipo de PLA2R modificado se expresó bien y reaccionó fuertemente a los autoanticuerpos anti-PLA2R, lo que indica que la cisteína introducida no tuvo efecto en el plegamiento del epítipo. A continuación, la construcción se expresó en las células HEK293 y la proteína del epítipo se purificó utilizando columnas de níquel y filtración en gel, seguidas de escisión por TEV para eliminar la etiqueta de His. A continuación, la proteína se acopló con un agente fluorescente (por ejemplo, FITC) o un reactivo citotóxico (por ejemplo, monometil auristatina E (MMAE)).

La figura 23 (arriba) muestra el diseño de una construcción de epítipo de PLA2R modificado para la purificación de proteínas y la conjugación de fármacos. Se introdujo un sitio de conjugación específico del sitio en el epítipo de PLA2R, seguido de un sitio de escisión por TEV y una etiqueta de His en el diseño de EDC con PLA2R. La figura 23 (centro) muestra cómo se conjuga un fármaco con el epítipo de PLA2R purificado. La proteína del epítipo purificada se conjugó con un agente citotóxico de una manera específica del sitio. La figura 23 (abajo) muestra la pureza de la proteína del epítipo de PLA2R después de la purificación. Las proteínas del epítipo de PLA2R conjugadas se purificaron y se resolvieron en SDS-PAGE. El epítipo se analizó en una SDS-PAGE al 7 % que mostró una única banda de proteína en el peso molecular correcto (aproximadamente 37 kDa) (figura 23; abajo a la izquierda).

En un experimento separado (figura 23; abajo a la derecha), se resolvieron cantidades iguales de proteínas de epítipo, epítipo conjugado con FITC y epítipo conjugado con MMAE en una SDS-PAGE en condiciones no reductoras, se transfirieron a una membrana y se sondaron con un suero de paciente que contenía autoanticuerpos anti-PLA2R. Las proteínas de epítipo de PLA2R no conjugadas y conjugadas se resolvieron en una SDS-PAGE al 4-20 % en condiciones no reductoras y se sondaron con un suero de paciente que contenía autoanticuerpos anti-PLA2R (figura 23, abajo a la derecha). Los resultados mostraron que el epítipo de PLA2R conjugado con fármaco se unía fuertemente a los autoanticuerpos con tanta fuerza como el epítipo de PLA2R no conjugado (figura 23; abajo a la derecha).

La transferencia Western con autoanticuerpos anti-PLA2R mostró que el epítipo de PLA2R reaccionó fuertemente con autoanticuerpos anti-PLA2R, lo que indica que la cisteína introducida no había afectado el plegamiento del epítipo (figura 23 (abajo a la derecha; transferencia Western)). A continuación, la

construcción se expresó en las células HEK293 y la proteína del epítipo se purificó utilizando columnas de níquel y filtración en gel, seguidas de escisión por TEV para eliminar la etiqueta de His. A continuación, la proteína se acopló con un agente fluorescente (por ejemplo, FITC) o un reactivo citotóxico (por ejemplo, monometil auristatina E (MMAE)) (figura 23).

Ejemplo 5 - Evaluación de la unión del epítipo de PLA2R-FITC a los linfocitos B de memoria aislados de pacientes con NMP

La NMP es una enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos B. Los autoanticuerpos patógenos son secretados por las células plasmáticas derivadas de un grupo de linfocitos B de memoria que poseen receptores de linfocitos B (BCR) únicos que se unen específicamente al epítipo de PLA2R. Para distinguir este grupo de linfocitos B de memoria y evaluar si el conjugado de fármaco con el epítipo de PLA2R podría unirse de manera efectiva a los BCR en la superficie de este grupo de linfocitos B de memoria, se realizó un ensayo de unión utilizando el análisis de epítipo de PLA2R-FITC en los linfocitos B totales aislados de muestras de sangre de pacientes con NMP. Los linfocitos B totales aislados de la sangre periférica del paciente se cultivaron durante una noche en el medio RPMI suplementado con suero bovino fetal y antibióticos a 37 °C, 5 % de CO₂. A continuación, las células se dispersaron pipeteando hacia arriba y hacia abajo, se recogieron y se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo. Posteriormente, las células se incubaron con epítipo de PLA2R-FITC en PBS durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS enfriado en hielo y se obtuvieron imágenes con un microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La figura 24 muestra una población de linfocitos B que se marcaron con epítipo de PLA2R-FITC, lo que indica la presencia de una población específica de linfocitos B de memoria que se unen al epítipo de PLA2R en pacientes con NMP, y la fuerte unión de epítipo de PLA2R-FITC a los BCR en la superficie de estos linfocitos B de memoria.

Ejemplo 6 - Evaluación de la eficacia de epítipo de PLA2R-MMAE en los linfocitos B de memoria aislados de pacientes con MNP

Se evaluó la eficacia del epítipo de PLA2R-MMAE en la eliminación de los linfocitos B de memoria específicos del epítipo de PLA2R aislados de pacientes con NMP. La MMAE es un potente agente citotóxico que bloquea la polimerización de la tubulina provocando la muerte celular. La MMAE se ha utilizado para desarrollar un conjugado anticuerpo-fármaco, Brentuximab vedotin (nombre comercial Adcetris) para el tratamiento del linfoma, y fue aprobado por la FDA en 2011. Los linfocitos B totales aislados de la sangre periférica del paciente se cultivaron durante una noche en medio RPMI y, a continuación, se dividieron en partes iguales en dos pocillos en una placa de cultivo celular de 12 pocillos (2 ml/por pocillo). Un pocillo de células se incubó con MMAE y el otro se incubó con el epítipo de PLA2R-MMAE durante 24 horas en una incubadora de cultivo celular. A continuación, se recogieron las células de ambos pocillos, se lavaron con PBS enfriado en hielo y se incubaron con el epítipo de PLA2R-FITC durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS enfriado en hielo y se obtuvieron imágenes con un microscopio fluorescente a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm.

La preincubación con MMAE solo dio como resultado que varios linfocitos B se tiñeran con el epítipo de PLA2R-FITC (figura 25). Por el contrario, la preincubación con el epítipo de PLA2R-MMAE no mostró tinción con el epítipo de PLA2R-FITC, lo que indica el direccionamiento específico y la eliminación de los linfocitos B de memoria específicos del epítipo de PLA2R por el epítipo de PLA2R-MMAE (figura 25). Las imágenes de microscopio óptico de linfocitos B tratados con el epítipo de PLA2R-MMAE también indicaron que el EDC produjo poco efecto en la mayoría de los linfocitos B (figura 25).

Ejemplo 7 - Desarrollo de un tratamiento con EDC para el pénfigo vulgar (no según la presente invención)

A efectos de conservar los sitios de unión a calcio en el epítipo de Dsg3, que son críticos para la unión a autoanticuerpos, se seleccionaron los dominios EC1-4 de Dsg3 (450 aminoácidos; figura 32; SEQ ID NO: 17) como el epítipo para la conjugación con fármacos. A efectos de desarrollar un sitio de conjugación específico en EC1-4 de Dsg3, todas las cisteínas endógenas (subrayadas en la figura 32) se reemplazaron por un aminoácido estructuralmente similar, la serina. Además, se reemplazaron 2 sitios de N-glicosilación endógenos (Asn61 y Asn131; subrayados en la figura 32) por un aminoácido estructuralmente similar, la glutamina. Se adoptó el mismo enfoque para diseñar el epítipo de Dsg1 para la conjugación con fármacos, y se seleccionaron los dominios EC1-3 de Dsg1 modificados (336 aminoácidos) (figura 31; SEQ ID NO: 16). Los epítopos generados se denominaron Dsg1 EC1-3 y Dsg3 EC1-4. El peso molecular del epítipo Dsg1 EC1-3 fue de aproximadamente 35 kDa y el peso molecular del epítipo Dsg3 EC1-4 fue de aproximadamente 60 kDa.

A continuación, se diseñó una cisteína libre en la cola C-terminal de cada uno de los epítopos para desarrollar un sitio específico para la conjugación química. También se diseñaron un sitio de escisión por TEV y una etiqueta de His (6 His) en la proteína del epítipo después de la cisteína introducida para la purificación de la proteína (figura 27).

Los epítomos diseñados se expresaron en las células HEK 293 y se purificaron a partir de los medios de cultivo utilizando columnas de afinidad de níquel y filtración en gel, seguidas de escisión por TEV para eliminar la etiqueta de His (figura 28, panel izquierdo; azul de Coomassie). A continuación, los epítomos se acoplaron con un agente fluorescente (por ejemplo, FITC) o un reactivo citotóxico (por ejemplo, MMAE).

Debido a que los autoanticuerpos para Dsg1 y Dsg3 se unen, de manera preferente, a las proteínas Dsg1 o Dsg3 no desnaturalizadas, las formas conjugadas con FITC o MMAE purificadas de los dos epítomos antes del tratamiento con TEV se mezclaron con un suero de paciente con PV mucocutáneo en tampón PBS para formar complejos inmunitarios y, a continuación, se inmunoprecipitaron con las perlas de proteína G. Se mezclaron cantidades iguales de las formas conjugadas purificadas de los epítomos de Dsg1 y Dsg3 (antes de la escisión con TEV) con un suero de paciente con PV mucocutáneo en tampón PBS durante 2 horas a 4 °C y se inmunoprecipitaron con perlas de proteína G. Las perlas se lavaron exhaustivamente y los epítomos unidos se eluyeron con tampón de muestra con SDS, se resolvieron en una SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se sondaron con un anticuerpo anti-etiqueta de His (figura 28, paneles central y derecho; transferencia Western). Los resultados de la transferencia Western mostraron que los epítomos diseñados y conjugados químicamente de Dsg1 y Dsg3 reaccionaron fuertemente con los autoanticuerpos y fueron inmunoprecipitados bien por las perlas de proteína G, lo que indica que el diseño y la conjugación química de las proteínas del epítomo no tuvieron interferencia con las interacciones autoanticuerpo-antígeno.

Ejemplo 8 - Evaluación de la unión del epítomo de Dsg-FITC a los linfocitos B de memoria aislados de pacientes con PV mucocutáneo

Se evaluó la capacidad de unión del epítomo Dsg-FITC a los BCR específicos en los linfocitos B de memoria aislados de muestras de sangre de pacientes con PV mucocutáneo. Se aislaron en primer lugar células mononucleares de sangre periférica de la sangre completa utilizando centrifugación por densidad (Histopaque-1077), seguida de un aislamiento de linfocitos B totales utilizando un kit de aislamiento negativo de linfocitos B. Los linfocitos B totales aislados se cultivaron, a continuación, durante una noche en el medio RPMI suplementado con suero bovino fetal y antibióticos a 37 °C, 5 % de CO₂. A continuación, se procesaron las células, se tiñeron con el epítomo de Dsg-FITC en PBS durante 1 hora a 4 °C y se obtuvieron imágenes bajo un microscopio fluorescente a la longitud de onda de excitación de 488 nm y la longitud de onda de emisión de 520 nm. La figura 29 muestra que el epítomo de Dsg-FITC tiñó fuertemente un grupo de linfocitos B, lo que indica la fuerte unión del epítomo de Dsg-FITC a los BCR en la superficie de estos linfocitos B de memoria.

Ejemplo 9 - Evaluación de la eficacia del epítomo de Dsg-MMAE en los linfocitos B de memoria aislados de pacientes con PV mucocutáneo (no según la presente invención)

Se evaluó la eficacia del epítomo de Dsg1 y Dsg3 conjugados con MMAE para eliminar los linfocitos B de memoria específicos del epítomo de Dsg1 y Dsg3, respectivamente, aislados de los pacientes con PV mucocutáneo. Los linfocitos B totales aislados de la sangre periférica del paciente se cultivaron durante una noche en medio RPMI y, a continuación, se dividieron en partes iguales en dos pocillos en una placa de cultivo celular de 12 pocillos (2 ml/por pocillo). Un pocillo de células se incubó con MMAE y el otro se incubó con epítomo de Dsg1 y Dsg3-MMAE durante 24 horas en una incubadora de cultivo celular. A continuación, se recogieron las células de ambos pocillos, se lavaron con PBS enfriado en hielo y se incubaron con epítomo de Dsg1 y Dsg3-FITC durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS enfriado en hielo y se obtuvieron imágenes con un microscopio fluorescente a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm.

La preincubación con MMAE sola dio como resultado que varios linfocitos B se tiñeran con epítomo de Dsg1 y Dsg3-FITC (figura 30). Por el contrario, la preincubación con epítomo de Dsg1 y Dsg3-MMAE no mostró tinción con epítomo de Dsg1 y Dsg3-FITC, lo que indica el direccionamiento específico y la eliminación de los linfocitos B de memoria específicos de epítomo de Dsg1 y Dsg3 por epítomo de Dsg1 y Dsg3-MMAE (figura 30). Las imágenes de microscopio óptico de linfocitos B tratados con epítomo de Dsg1 y Dsg3-MMAE también indicaron que EDC produjo poco efecto en la mayoría de los linfocitos B (figura 30).

Tal como se utilizan en el presente documento, los encabezados de las secciones son solo para fines organizativos y no deben interpretarse, de ninguna manera, como limitantes de la materia descrita. Cuando las definiciones de los términos en las referencias incorporadas parezcan diferir de las definiciones proporcionadas en las presentes enseñanzas, prevalecerá la definición proporcionada en las presentes enseñanzas. Se entenderá que hay un "aproximadamente" implícito antes de las temperaturas, concentraciones, tiempos, etc., descritos en las presentes enseñanzas, de modo que las desviaciones leves e insustanciales están dentro del alcance de las presentes enseñanzas en el presente documento.

En la presente solicitud, la utilización del singular incluye el plural, a menos que se indique específicamente lo contrario. Además, la utilización de "comprender", "comprende", "que comprende", "contener", "contiene",

“que contiene”, “incluir”, “incluye” y “que incluye” no pretende ser limitante.

Tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el” o “la” incluyen referencias plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en el presente documento, “aproximadamente” significa una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta en un 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 %, con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

Aunque la presente invención se ha dado a conocer en el contexto de determinadas realizaciones y ejemplos, los expertos en la materia entenderán que la presente invención se extiende más allá de las realizaciones específicamente dadas a conocer a otras realizaciones alternativas y/o utilidades de la presente invención y modificaciones obvias y equivalentes de la misma. Debe entenderse que diversas características y aspectos de las realizaciones dadas a conocer se pueden combinar con, o sustituir por, otros a efectos de formar modos o realizaciones variables de la presente invención dada a conocer. Por tanto, se pretende que el alcance de la presente invención dada a conocer en el presente documento no se limite a las realizaciones dadas a conocer particulares descritas anteriormente, sino que se defina únicamente por las reivindicaciones.

Debe entenderse, sin embargo, que esta descripción detallada, si bien indica realizaciones preferentes de la presente invención, se proporciona sólo a modo de ilustración.

La terminología utilizada en la descripción presentada en el presente documento no pretende ser interpretada de ninguna manera limitada o restrictiva. Más bien, la terminología simplemente se utiliza junto con una descripción detallada de realizaciones de los sistemas, procedimientos y componentes relacionados. Además, las realizaciones pueden comprender varias características novedosas, ninguna de las cuales es responsable únicamente de sus atributos deseables o se cree que es esencial para la práctica de las invenciones descritas en el presente documento.

Los expertos en la materia entenderán que las concepciones y realizaciones específicas descritas en la descripción anterior pueden utilizarse fácilmente como base para modificar o diseñar otras realizaciones para llevar a cabo los mismos propósitos de la presente invención.

Todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente solicitud tienen significados utilizados habitualmente en la técnica, a menos que se especifique lo contrario. Tal como se utilizan en la presente solicitud, las siguientes palabras o frases tienen los significados especificados.

Tal como se utiliza en el presente documento, un “marcador detectable” o “marcador” es una molécula unida a un reactivo o sintetizada como una parte de él. Esta molécula debería ser detectable de forma única y permitirá que el reactivo se detecte como resultado. Estos restos detectables son a menudo radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes, enzimas, haptenos o incluso secuencias de oligonucleótidos únicas.

Tal como se utiliza en el presente documento, “polipéptido” incluye proteínas, fragmentos de proteínas y péptidos, ya sean aislados de fuentes naturales, producidos mediante técnicas recombinantes o sintetizados químicamente. Los polipéptidos comprenden habitualmente, como mínimo, aproximadamente 6 aminoácidos. Los polipéptidos más cortos, por ejemplo, aquellos de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, se denominan habitualmente “péptidos”.

Un polipéptido de la presente invención puede, en algunas realizaciones, comprender una variante de una proteína nativa. Una “variante” de polipéptido, tal como se utiliza en el presente documento, es un polipéptido que difiere de una proteína nativa en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones, de modo que la eficacia terapéutica del polipéptido no se ve sustancialmente disminuida. En otras palabras, la eficacia puede verse mejorada o no sufrir modificaciones, en relación con la proteína nativa, o puede verse disminuida en menos del 50 % y, de manera preferente, menos del 20 %, en relación con la proteína nativa. Entre las variantes preferentes se incluyen aquellas en las que se han eliminado una o más partes, tales como una secuencia líder N-terminal. Entre otras variantes preferentes se incluyen variantes en las que se ha eliminado una parte pequeña (por ejemplo, 1-30 aminoácidos, de manera preferente, 5-15 aminoácidos) del extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína madura. Las variantes de polipéptidos muestran, de manera preferente, como mínimo, aproximadamente el 70 %, de manera más preferente, como mínimo, aproximadamente el 90 % y, de la manera más preferente, como mínimo, aproximadamente el 95 % de identidad (determinada tal como se describió anteriormente) con los polipéptidos identificados. Tal como se conoce en la técnica, las variantes también se pueden seleccionar para optimizar la afinidad del polipéptido por un compañero de unión.

De manera preferente, una variante contiene sustituciones conservadoras. Una “sustitución conservadora” es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo

que un experto en la materia de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no sufrieran cambios sustanciales. Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar, en general, en base a la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservadores incluyen: (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr; (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; (4) Lys, Arg, His; y (5) Phe, Tyr, Trp, His. Una variante puede contener también, o de manera alternativa, cambios no conservadores. En una realización preferente, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, delección o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes pueden modificarse también (o de manera alternativa) mediante, por ejemplo, la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima sobre la inmunogenicidad, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.

La terminología utilizada en la descripción presentada en el presente documento no pretende ser interpretada de ninguna manera limitada o restrictiva. Más bien, la terminología simplemente se utiliza junto con una descripción detallada de las realizaciones de los sistemas, procedimientos y componentes relacionados. Además, las realizaciones pueden comprender varias características novedosas, ninguna de las cuales es la única responsable de sus atributos deseables o se cree que es esencial para la práctica de las invenciones descritas en el presente documento.

Debe entenderse, sin embargo, que esta descripción detallada, si bien indica realizaciones preferentes de la presente invención, se proporciona sólo a modo de ilustración.

Referencias

Patente US 8,507,215 B2

Beck, L.H., et al, N Engl J Med, volumen 361, págs. 11-21, 2009.

Beck, L.H., et al, J Am Soc Nephrol, volumen 22, págs. 1543-1550, 2011.

Kao, L., et al, J Am Soc Nephrol, volumen 26, nº. 2, págs. 291-301, 2015.

Ohshima, B., et al, J Invest Dermatol, volumen 132, págs. 1158-1168, 2012.

Alewine, C., et al, The Oncologist, volumen 20, págs. 176-185, 2015.

Pape, K.A., et al, Immunity, volumen 26, págs. 491-502, 2007.

Roozendaal, R., et al, Immunity, volumen 30, págs. 264-276, 2009.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnóstico de la nefropatía membranosa (NM) en un individuo que comprende:

5 incubar una muestra que contiene linfocitos B de memoria obtenidos del individuo con un epítipo de PLA2R unido a un fluoróforo, y
detectar una unión del epítipo de PLA2R a las células en la muestra,
diagnosticando de este modo la NM en el individuo,
10 en el que el epítipo de PLA2R comprende la SEQ ID NO: 13.

2. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fluoróforo se selecciona entre el grupo que consiste en FITC, hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, azul cascada, azul pacífico, naranja pacífico, amarillo lucifer, NBD, NBD-X, R-ficoeritrina (PE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, Red 613 (PE-Texas Red), proteína de clorofila peridina (PerCP), TruRed (conjugado PerCP-Cy5.5), FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, TRITC, X-rodamina, lisamina rodamina B, Texas Red, alofocianina (APC) y conjugados APC-Cy7.

3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que el fluoróforo es FITC.

20 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la unión se detecta utilizando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o microscopía de fluorescencia.

5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra es una muestra de sangre, linfa o una muestra de biopsia renal.

25 6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el epítipo de PLA2R comprende la SEQ ID NO: 9.

FIG. 1

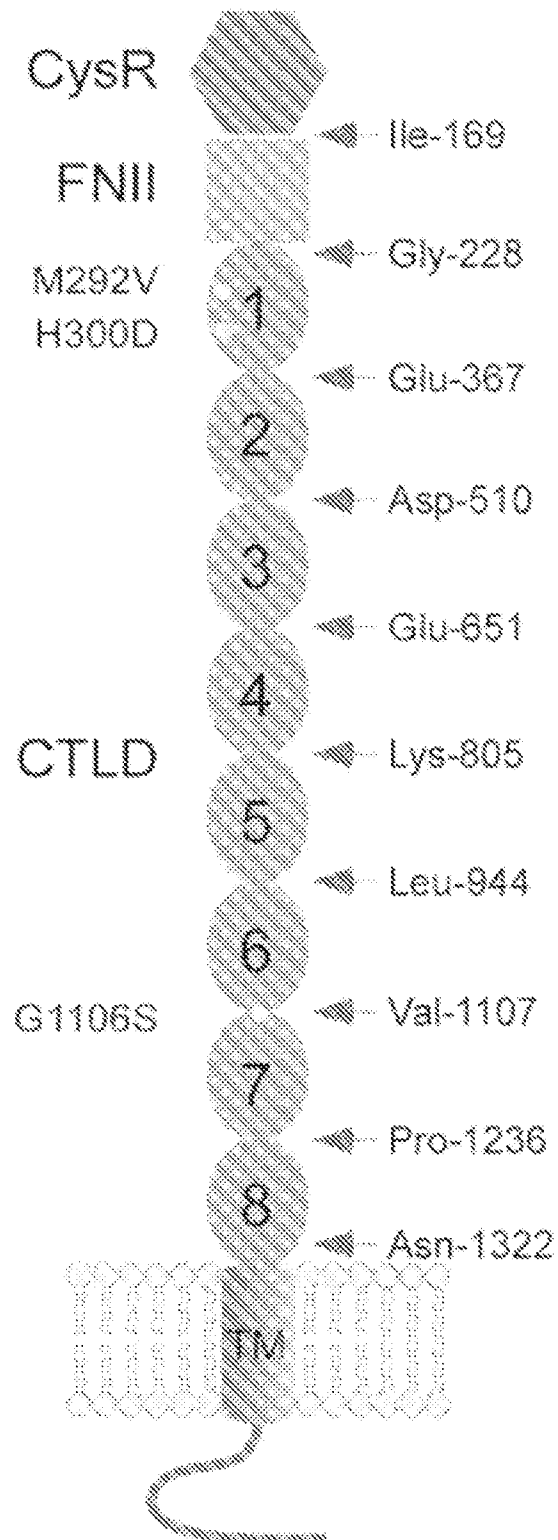


FIG. 2

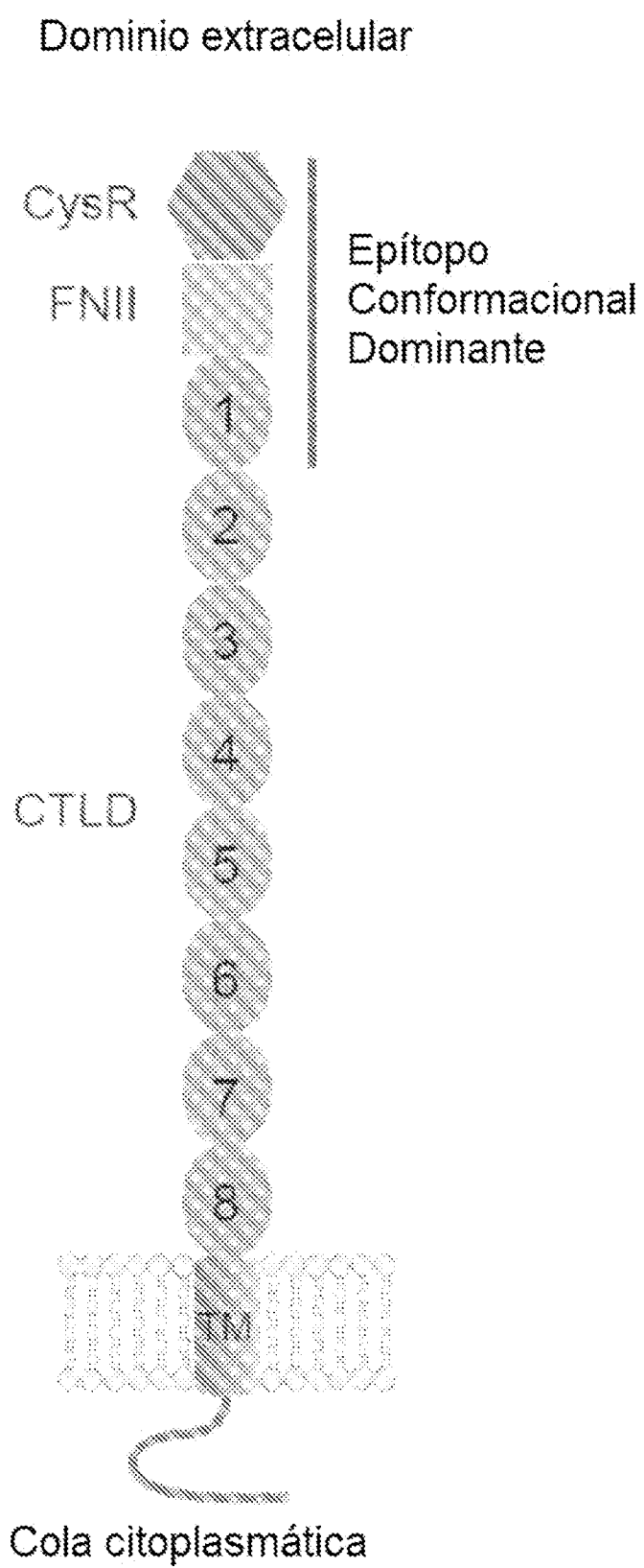


FIG. 3

Producción de anticuerpos en linfocitos B

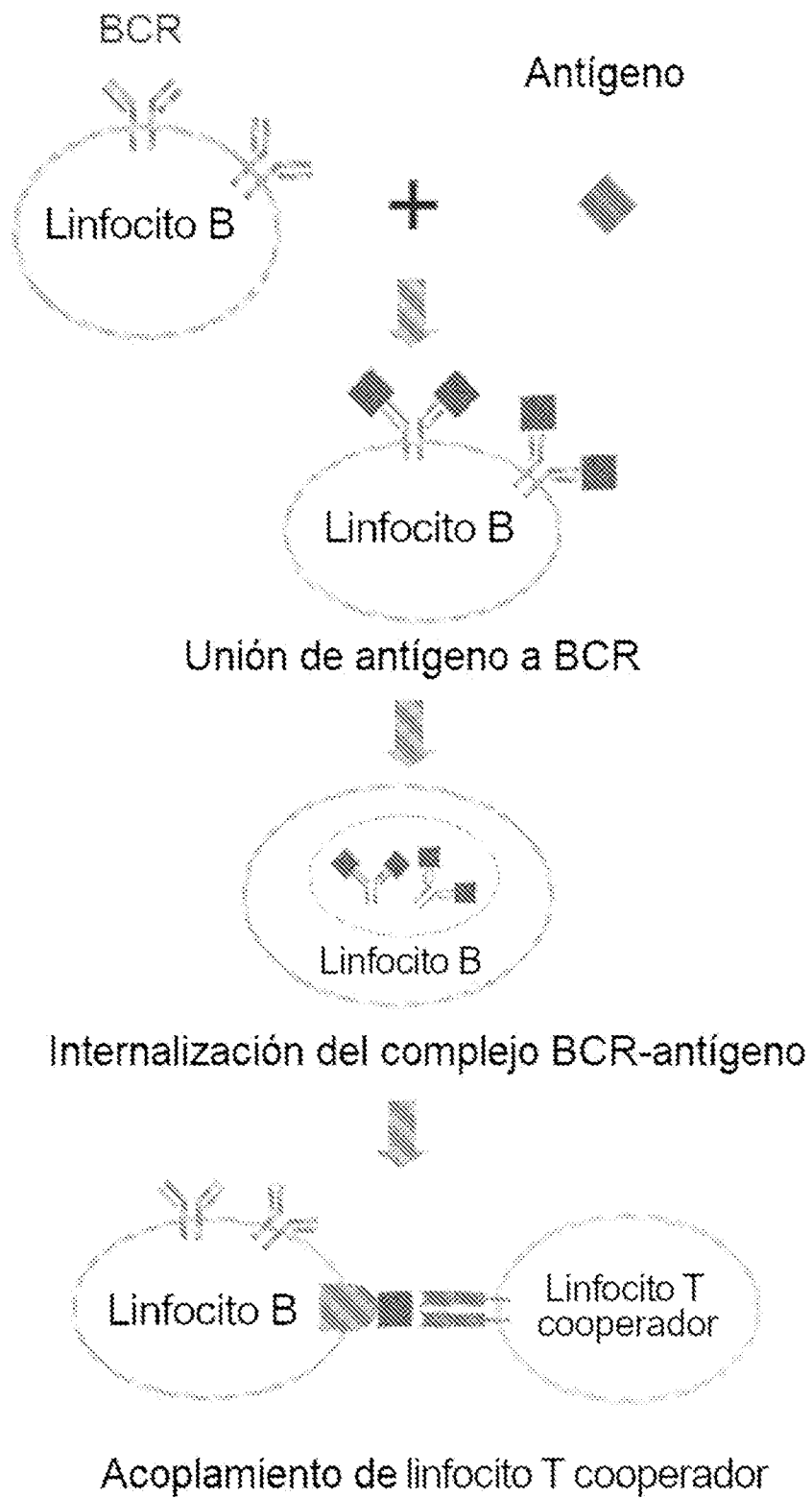


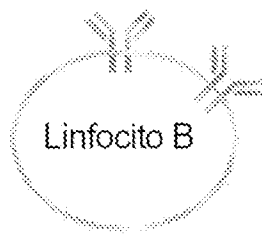
FIG. 4

Los linfocitos B productores de anticuerpos
y los correspondientes linfocitos T
cooperadores portan receptores específicos
para la unión al epítipo de PLA2R

Fármaco

Enlazador

Epítipo  Agente citotóxico



+

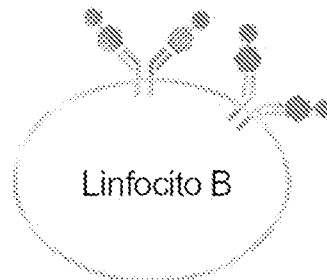


FIG. 5

Linfocito B

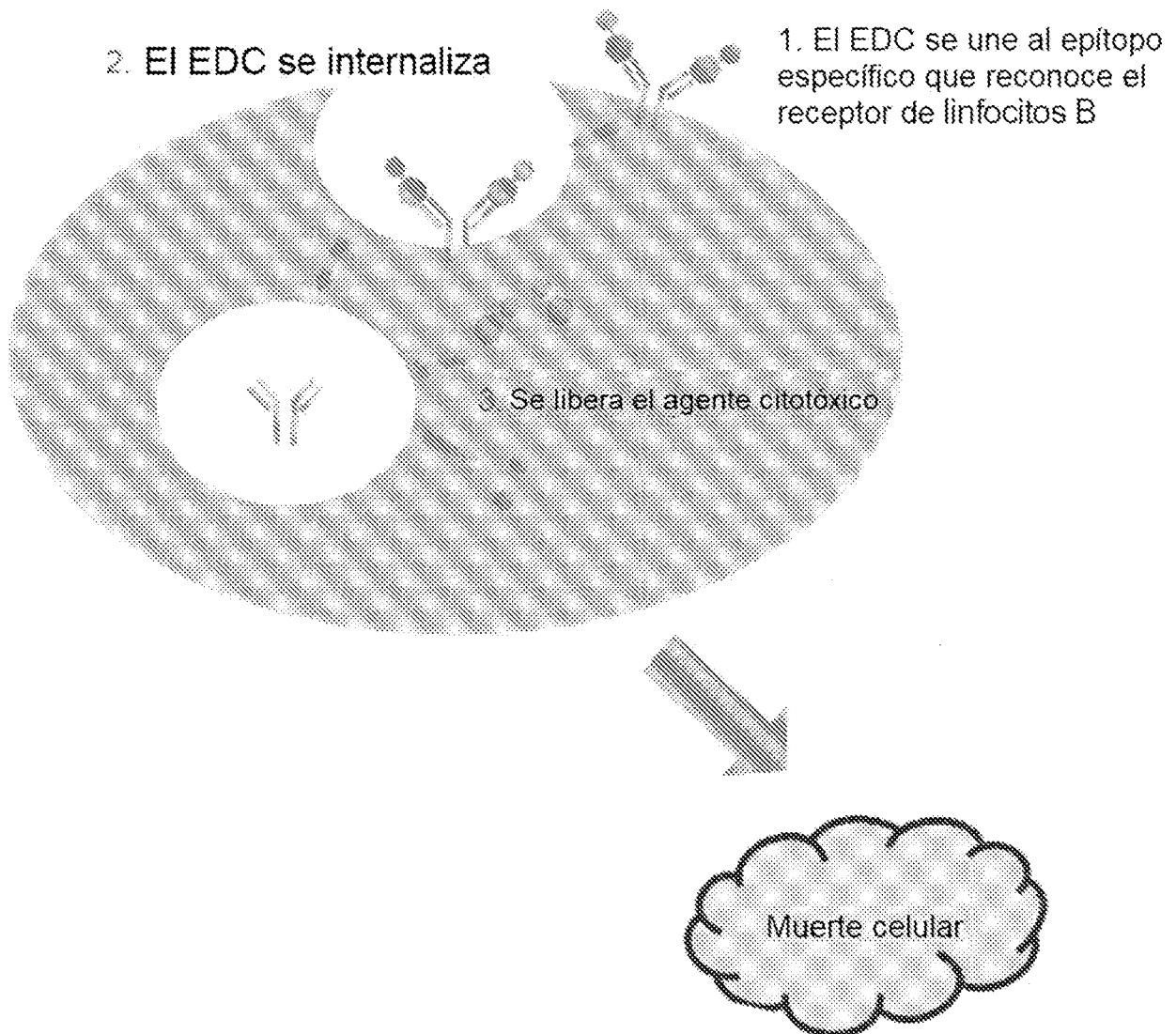


FIG. 6

MLLSPSLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI
 QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAP EQP
 LSLYEC DSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
 YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMF PFQYNHQWHHECTREGRE
 DDLLWCATTSRYERDEK WGFCPDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL
 LSSL SWSEAHSSCQM QGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ
 LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS
 RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLO
 KEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSN
 KIPVSFEWSNDSSVIFTNWHTLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKN C
 EERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDOASSG
 YYCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKP
 VGQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKA
 MSLCKQPVENQEKA EYEER (SEQ ID NO: 1)

FIG. 7

MLLSPSLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMF PFQYNHQWHHECTREGRE
DDLLWCATTSRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL
LSSLWSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS
RDCESTLPYICKKYLNHIDHE (SEQ ID NO: 2)

FIG. 8

IVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQKEEKTWHEALRSCQADNSA
LIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSNKIPVSFEWSNDSSVIFTNWH
TLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNCEERLFYICKKAGHVLSDAESG
CQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSGYCPCPALVTITNRFEQAFITSLI
SSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKPVGQKPEPVQYTHWNTHQPR
YSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKAMSLCKQPVENQEKAEEER
(SEQ ID NO: 3)

FIG. 9

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI
 QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP
 LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
 YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFQYNHQWHHECTREGRE
 DDLLWCATTSTRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL
 LSSLWSSEAHSSCOMQGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ
 LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS
 RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLO
 KEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSN
 KIPVSFEWSNDSSVIFTNWHTLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNC
 EERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSG
 YYCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKP
 VGQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKA
 MSLCKQPVENQEKA EYEERWPFHPCYLDWESEPGLASCFKVFHSEKVL
 MKRTWREAEAFCEEFGAHLASFHIEEENFVNELLHSKFNWTEERQFWI
 GFNKRNPLNAGSWEWSDRTPVSSFLDNTYFGEDARNCAVYKANKTLL
 PLHCGSKREWICKIPRDVKPK (SEQ ID NO: 4)

FIG. 10

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI
QAGKSVLTLENCKOANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFPPQYNHQWHHECTREGRE
DDLLWCATTSTRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL
LSSLWSSEAHSSCOMQGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS
RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVE (SEQ ID NO: 5)

FIG. 11

KDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQKEEKTWHEALRSCQADNSALIDI
TSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSNKIPVSFEWSNDSSVIFTNWHLE
PHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNCEERLFYICKKAGHVLSDAESGCQ
EGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSGYCPCPALVTITNRFEQAFITSLISS
VVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKPVGQKPEPVQYTHWNTHQPRYS
GGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKAMSLCKQPVENQEKA EYEERWPF
HPCYLDWESEPLGLASCFKVFHSEKVL MKRTWREAEAFCEEFGAHLASFA
HIEEENFVNELLHSKFNWTEERQFWIGFNKR NPLNAGSWEWSDRTPVVS
SFLDNTYFGEDARNCAVYKANKTLLPLHCGSKREWICKIPRDVKPK (SEQ
ID NO: 6)

FIG. 12

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAP EQP
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
YGSGGGDICEYLHKDLHTI (SEQ ID NO: 7)

FIG. 13

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAP EQP
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFPFQYNHQWHHECTREGRE
DDLLWCATTSTRYERDEKWGFCDPTSAEVG (SEQ ID NO: 8)

FIG. 14

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFPPQYNHQWHHECTREGRE
DDLLWCATTSTRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL
LSSLWSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS
RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVE (SEQ ID NO: 9)

FIG. 15

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAP EQP
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFFPQYNHQWHHECTREGRE
DDLLWCATTSTRYERDEKWFPCPDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL
LSSLWSSEAHSSCOMQGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS
RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLO
KEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSN
KIPVSFEWSNDSSVIFTNWHLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNC
EERLFYICKKAGHVLSD (SEQ ID NO: 10)

FIG. 16

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI
 QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP
 LSLYEC DSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
 YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMF PFQYNHQWHHECTREGRE
 DLLWCATT SRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL
 LSSLWSSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ
 LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS
 RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLO
 KEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSN
 KIPVSFEWSNDSSVIFTNWHTLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNC
 EERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSG
 YYCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKP
 VGQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKA
 MSLCKQPVENQE (SEQ ID NO: 11)

FIG. 17

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSES LKKCI
 QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFS APEQP
 LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
 YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFPPQYNHQWHHECTREGRE
 DDLLWCATTSTRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL
 LSSLWSSEAHSSCQMQGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ
 LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS
 RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQ
 KEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSN
 KIPVSFEWSNDSSVIFTNWHTLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNC
 EERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSG
 YYCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKP
 VGQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKA
 MSLCKQPVENQEKA EYEERWPFHPCYLDWESEPGLASCFKVFHSEKVL
 MKRTWREAEAFCEEFGAHLASF AHIEEENFVNELLHSKFNWTEERQFWI
 GFNKRNPLNAGSWEWSDRTPVVSSFLDNTYFGEDARNCAVYKANKTLL
 PLHCGSKREWICKIPRDVKPK (SEQ ID NO: 12)

FIG. 18

CDTIWEKDLNSHICYQFNLLSSLWSSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFI
REHMSSKTVEVWMGLNQLDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFV
EDHCGTFSSFMPSAWRSRDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVE (SEQ ID NO:
13)

FIG. 19

MLLSPSLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIOSESLLKKCI
 QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPROP
 LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLOYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS
 YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFPOYNHWHHECTREGRE
 DDLLWCATTSTRYERDEKWGFCPDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL
 LSSLWSSEAHSSOMOGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQL
 DEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRSR
 DCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLOK
 EEKTWHEALRSCOADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSNK
 IPVSFEWSNDSSVIFTNWHLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNC
 ERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSGY
 YCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKPV
 GQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKAM
 SLCKQPVENQEKAEYEERWPFHPCYLDWESEPGLASCFKVFHSEKVL
 KRTWREAEAFCEEFGAHLASFHIEEENFVNELLHSKFNWTEERQFWIG
 FNKRNPLNAGSWEWSDRTPVVSFLDNTYFGEDARNCAVYKANKTLLPL
 HCGSKREWICKIPRDVKPKIPFWYQYDVPWLFYQDAEYLFHTFASEWLN
 FEFVCSWLHSDLLTIHSAHEQEFIHSHKIKALSKYGASWWIGLQEERANDEF
 RWRDGTPIYQNWDTGRERTVNNQSQRCGFISITGLWGSEECVSMP
 SICKRKKVWVWIEKKKDTPKQHGTCPKGWLIFNYKCLLLNIPKDPSSWKN
 WTHAQHFCAEEGGTLVAIESEVEQAFITMNLFGQTTSVWIGLQNDDET
 WLNGKPVVYSNWSPFDIINIPSHNTTEVQKHIPLCALLSSNPNFHFTGKW
 YFEDCGKEGYGFVCEKMQDTS GHGVNTSDMYPMPNTLEYGNRTYKIINA
 NMTWYAAIKTCLMHKAQLVSITDQYHQSFLLTVLNLRLGYAHWIGLFTTDN
 GLNFDWSDGTKSSFTFWKDEESSLLGDCVFADSNRGRWHSTACESFLQG
 AICHVPPETROSEHPELCSETSIPWIKFKSNCYSFSTVLDSMSFEAAHEFC
 KKEGSNLLTIKDEAENAFLEELFAFGSSVQMVWLNAQFDGNNETIKWFD
 GTPTDQSNWGIKPDYDFKPHHCVALRIPEGLWQLSPCQEKKGFKM
 EADIHTAEALPEKGPSHSIPLAVVLTIVIVAICTLSFCIYKHNGGFFRRLAG
 FRNPYYPATNFSTVYLEENILISDLEKSDQ (SEQ ID NO: 14)

FIG. 20

MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAE LCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNC
 ECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQ
 PEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENNEATERIYHFVVG
 QMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQF
 PGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAV
 AGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI (SEQ ID NO: 15)

Posición	Residuo	Puntuación	Predicción
48	<u>N</u> CE	-0,32701759	No glicosilado
70	<u>N</u> SS	0,37511271	Glicosilado potencial
78	<u>N</u> QC	-0,35326057	No glicosilado
89	<u>N</u> TT	0,24039211	Glicosilado potencial
133	<u>N</u> EA	-0,58545335	No glicosilado

FIG. 21

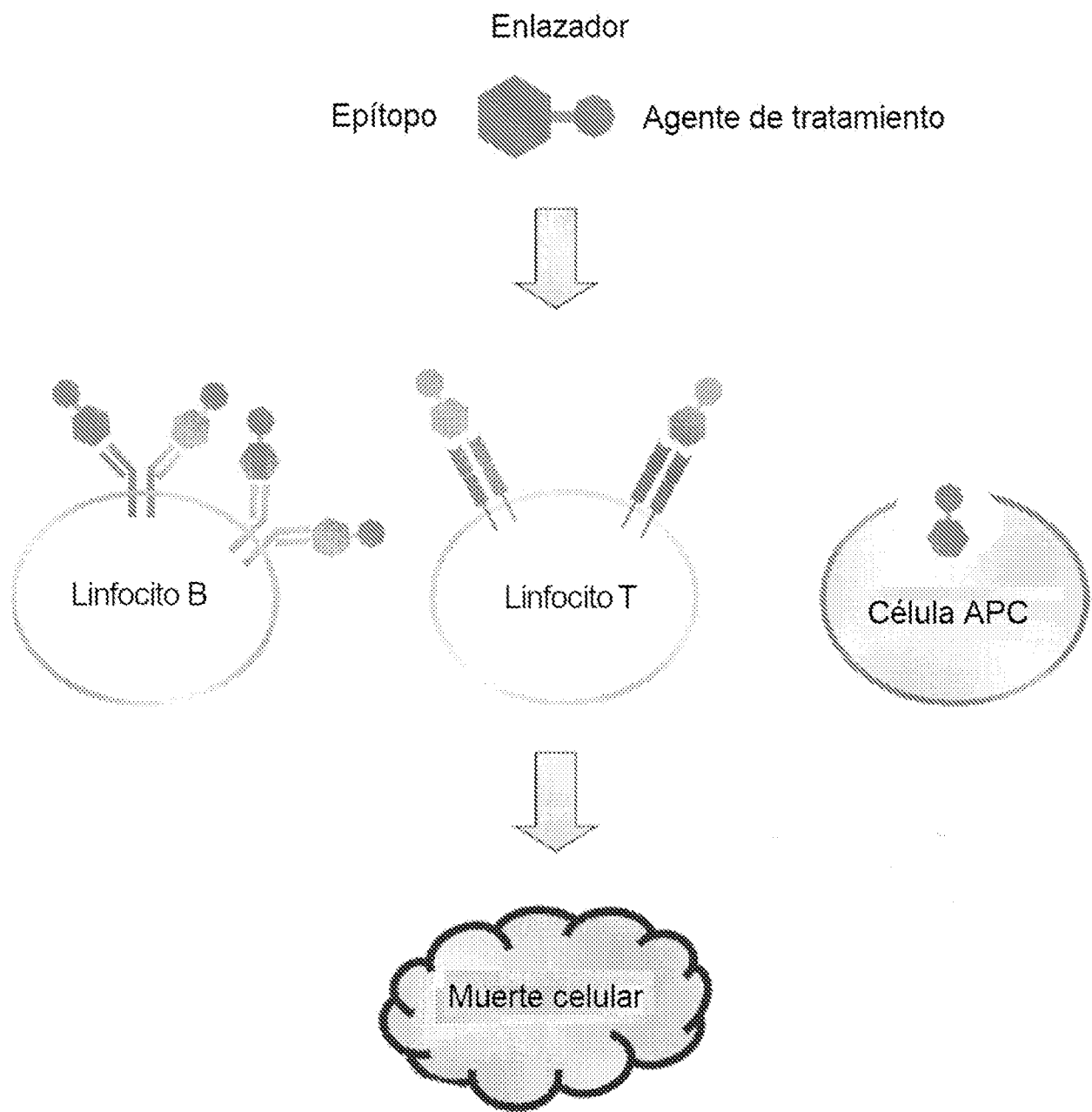


FIG. 22

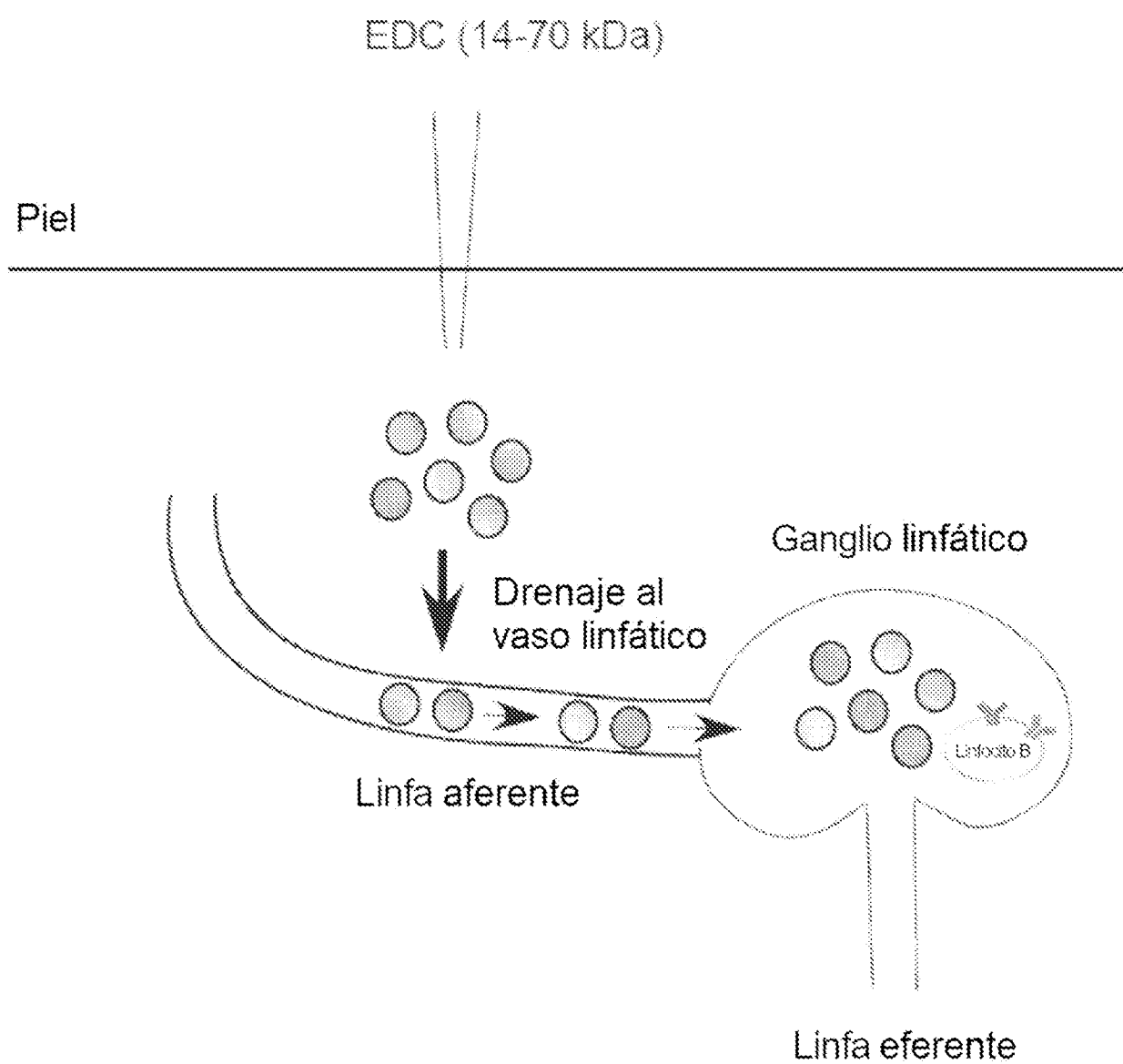


FIG. 23

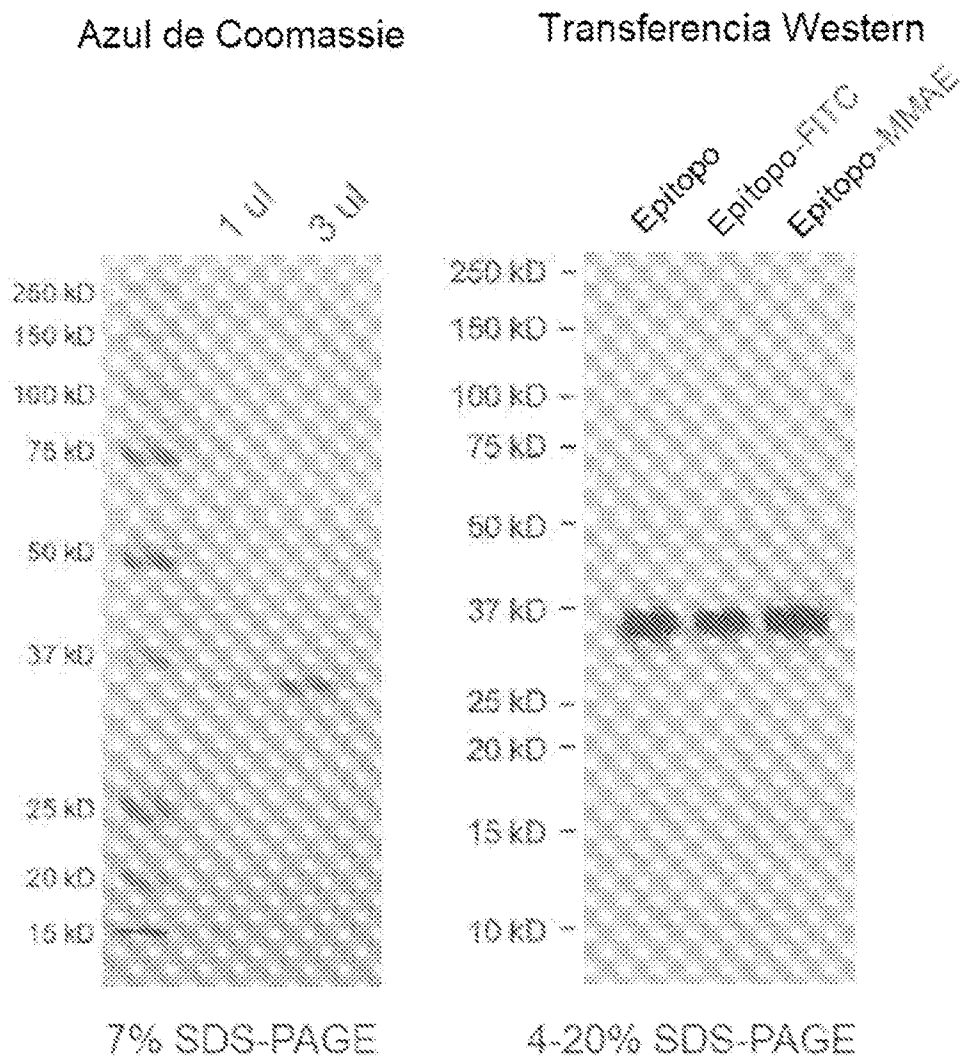
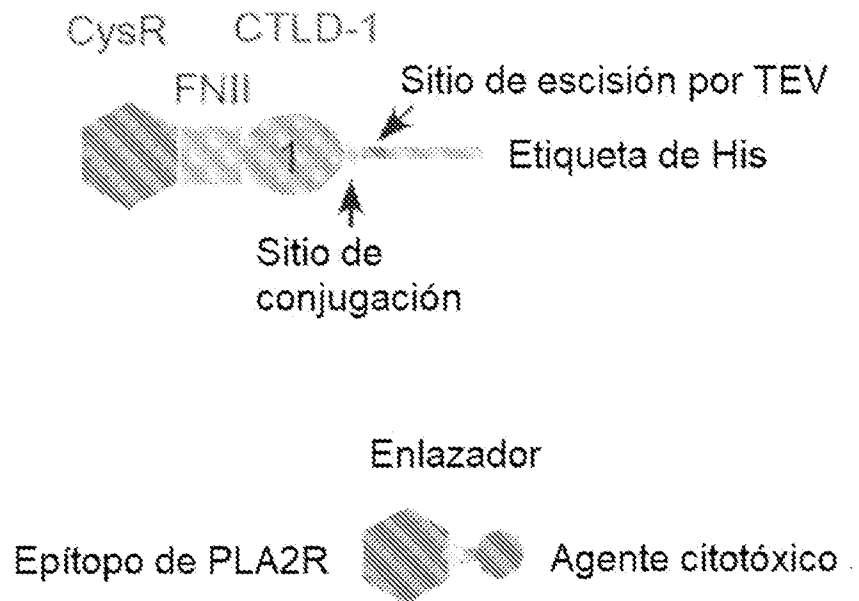


FIG. 24

Enlazador

Epítipo de PLA2R

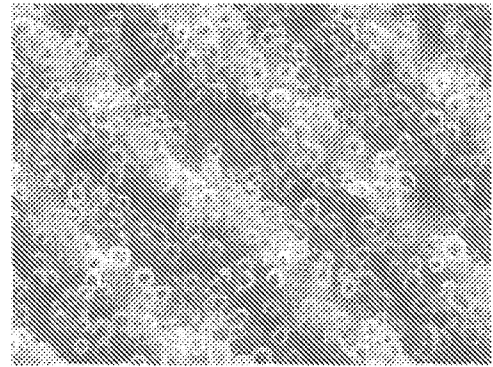
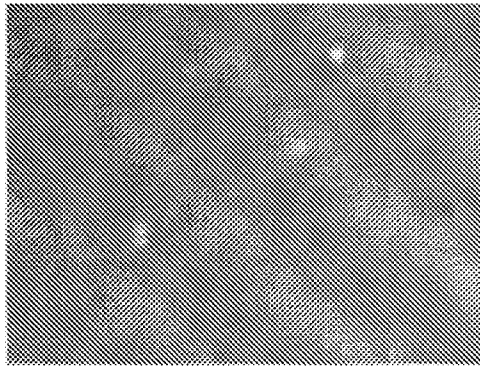


FITC

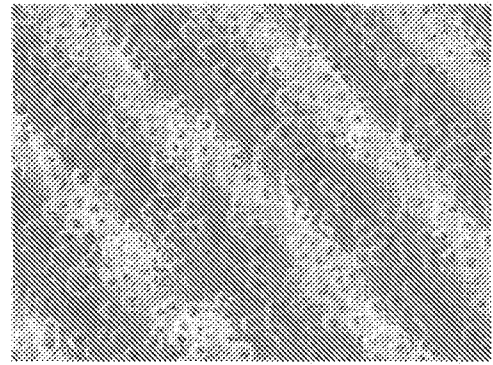
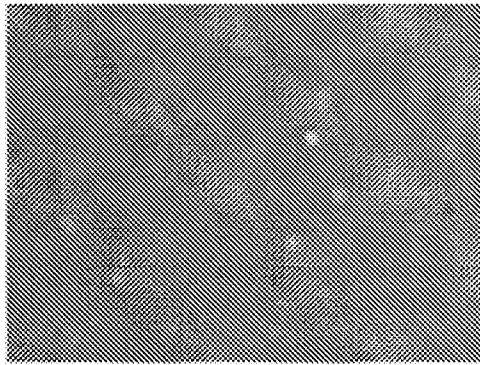
Microscopio de
fluorescencia

Microscopio
óptico

Paciente 1



Paciente 2



Paciente 3

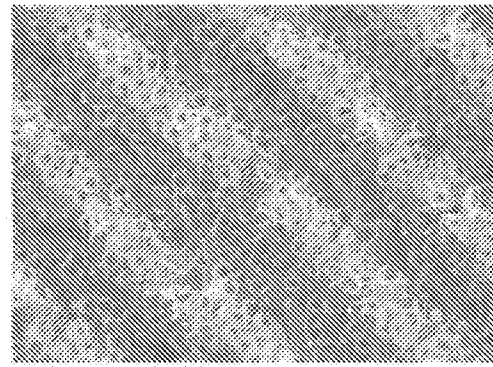
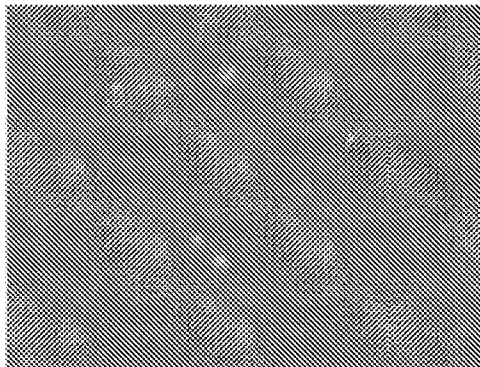


FIG. 25

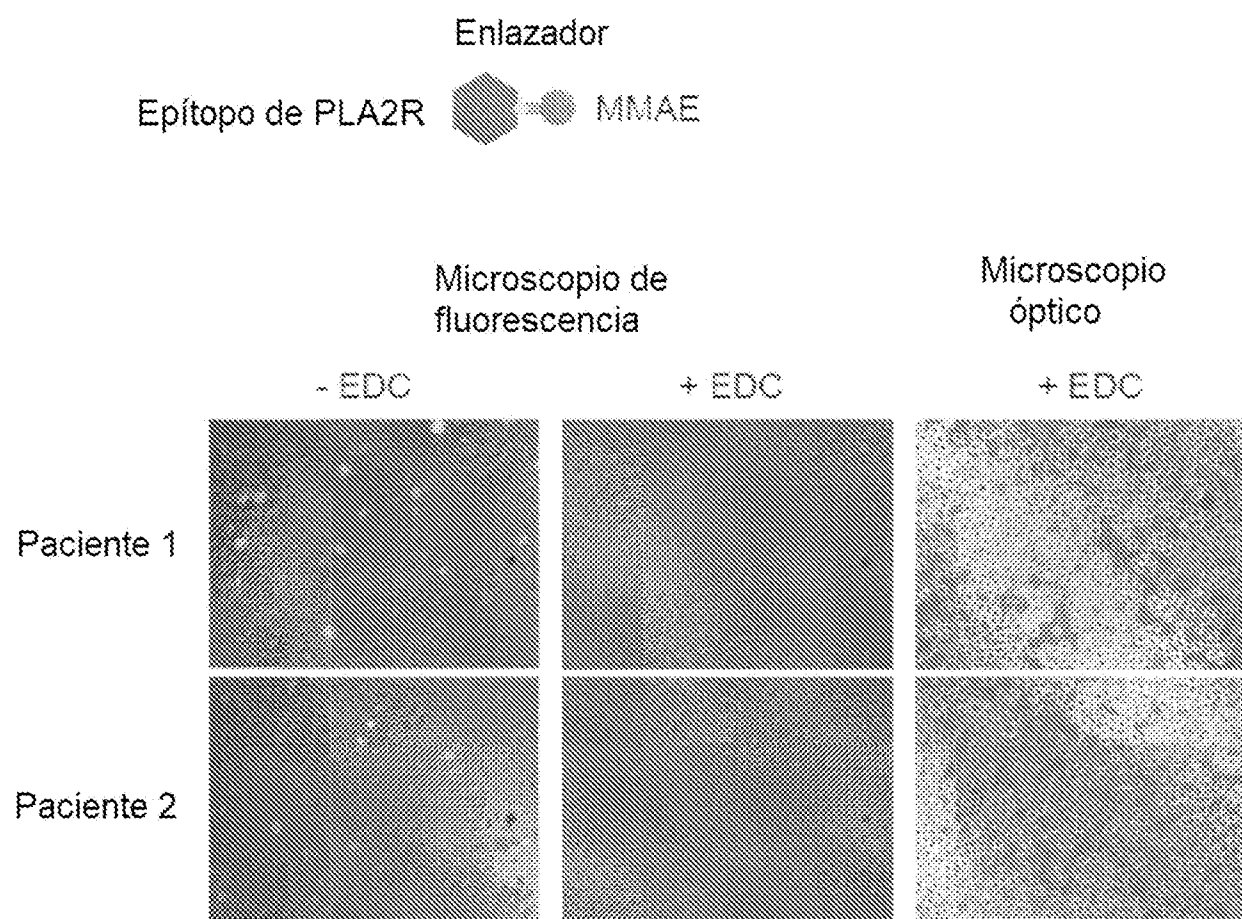


FIG. 26

Dominios extracelulares de cadherina

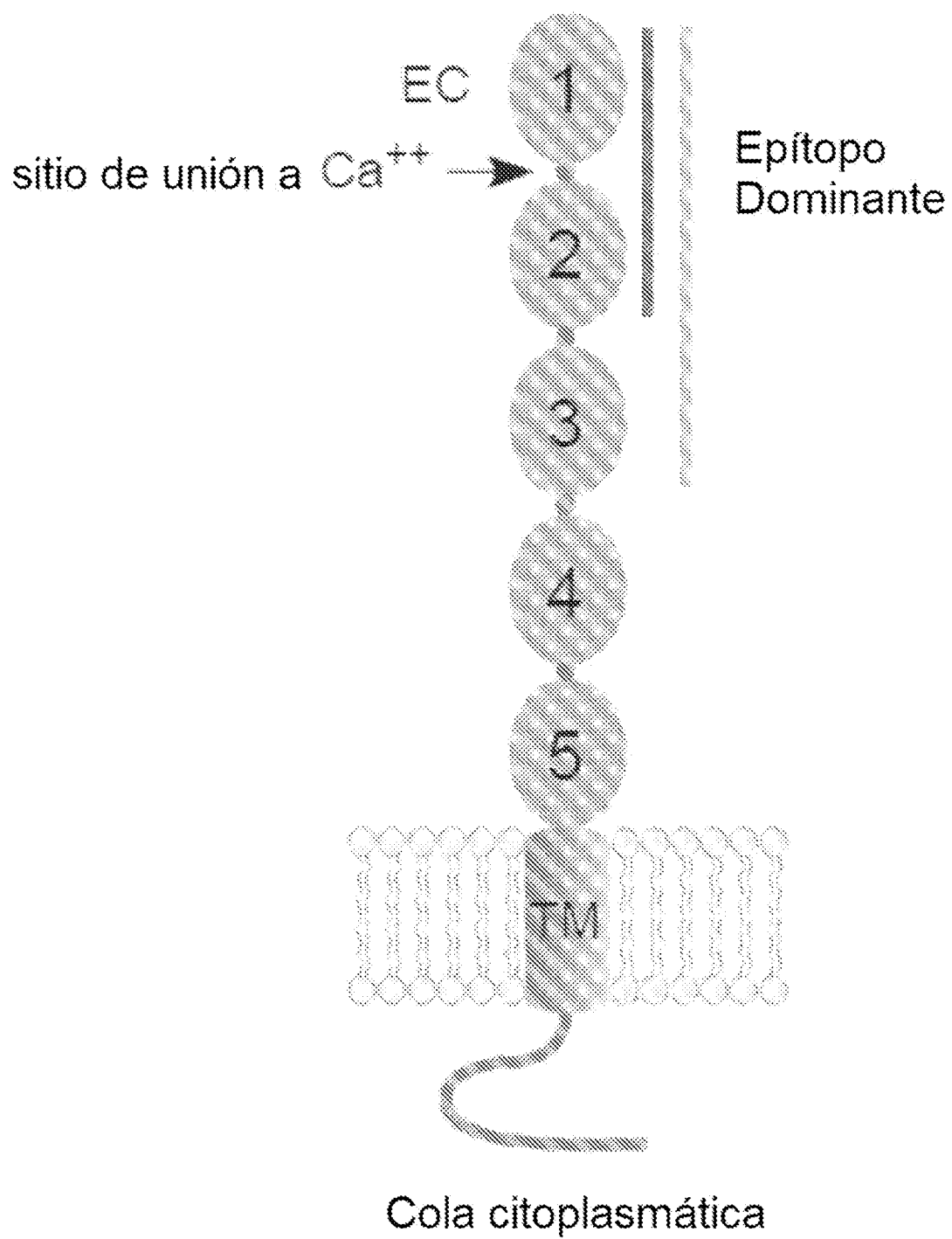
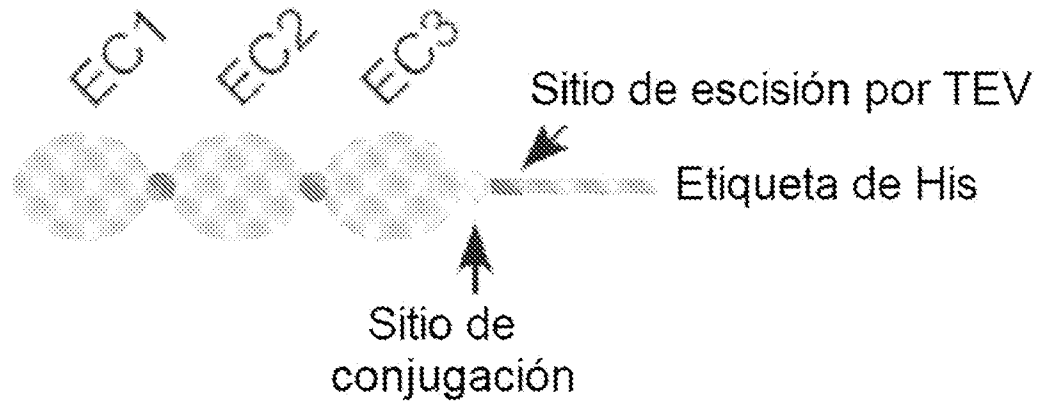
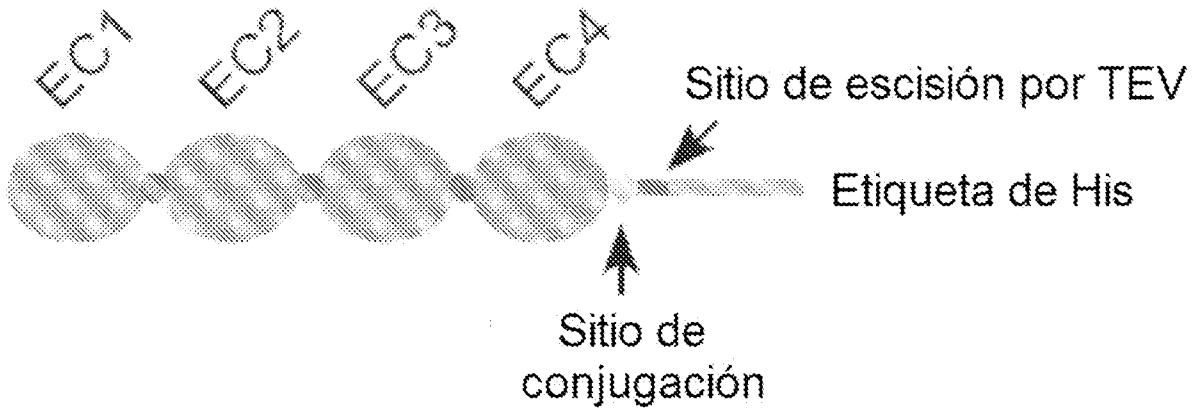


FIG. 27

Dsg1

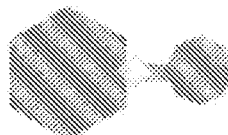


Dsg3



Enlazador

Epítipo de Dsg



Agente citotóxico

FIG. 28

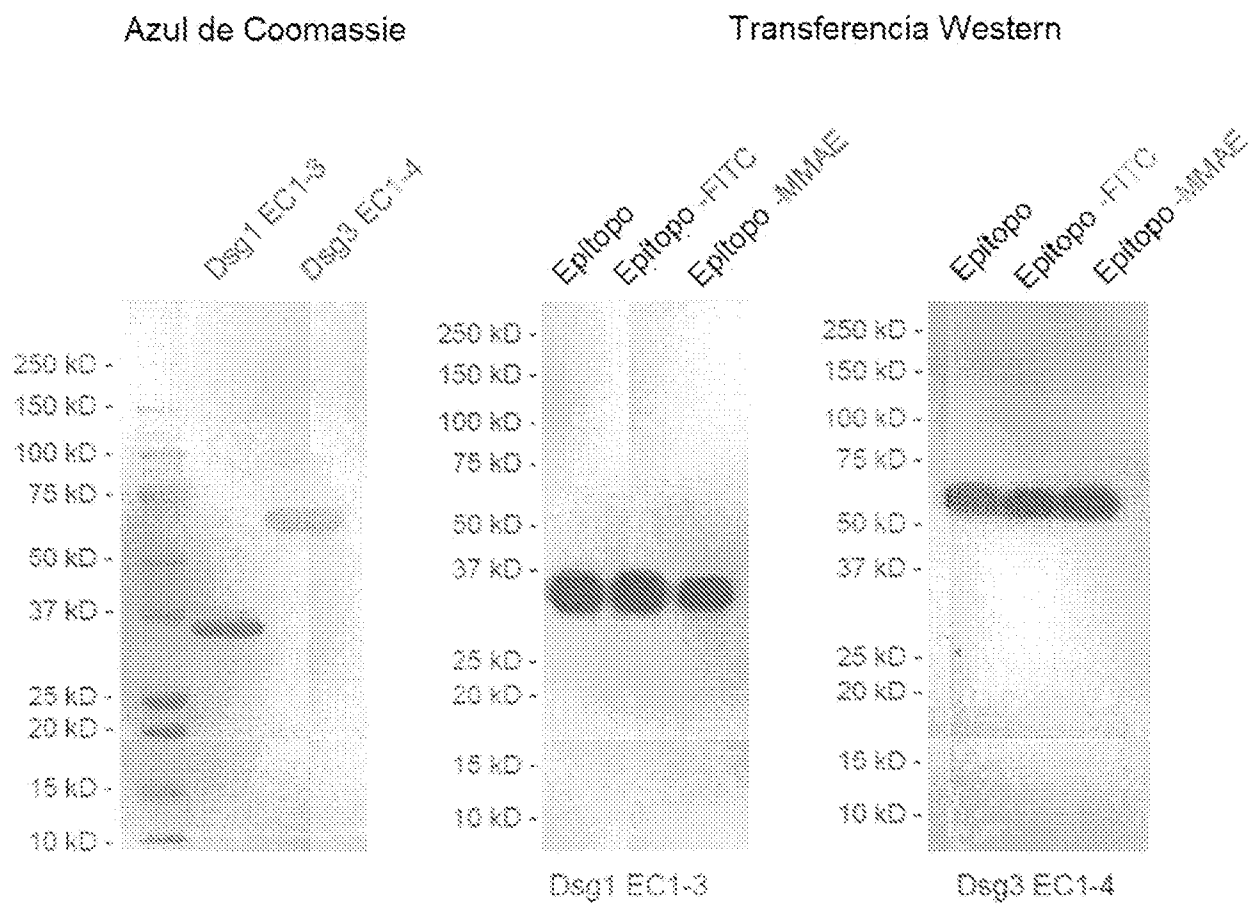


FIG. 29

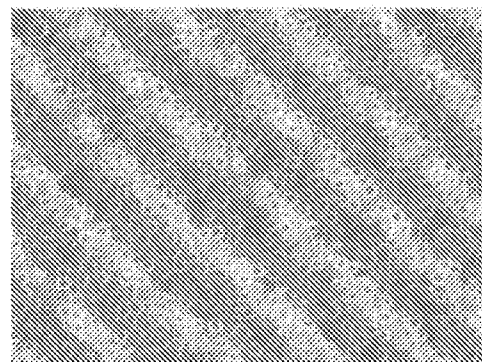
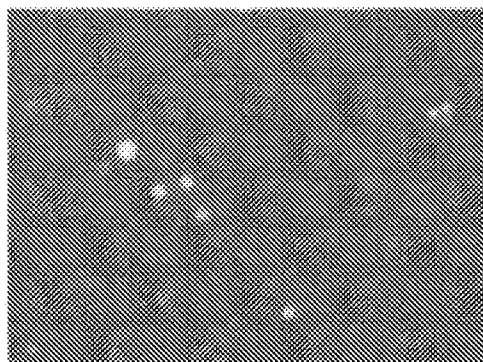
Enlazador



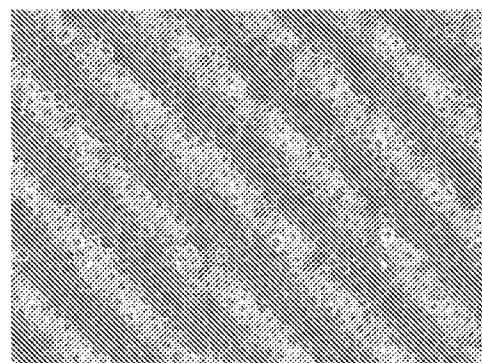
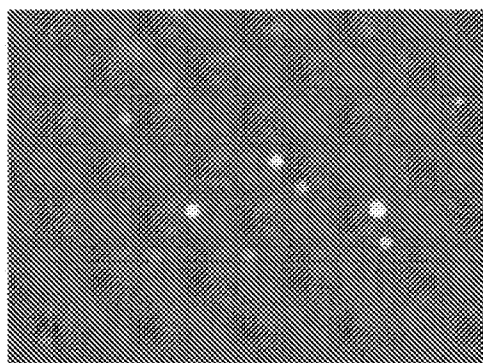
Microscopio de
fluorescencia

Microscopio
óptico

Paciente 1



Paciente 2



Paciente 3

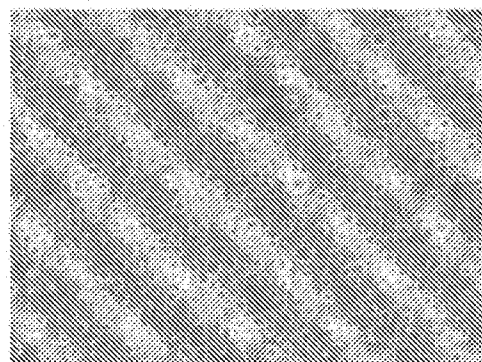
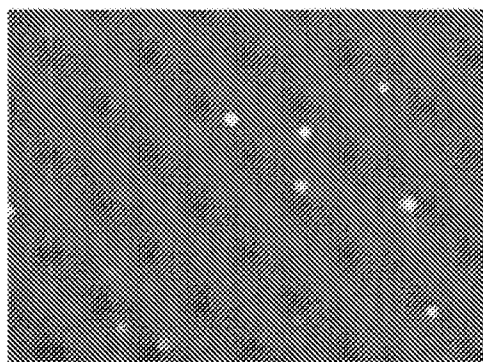


FIG. 30

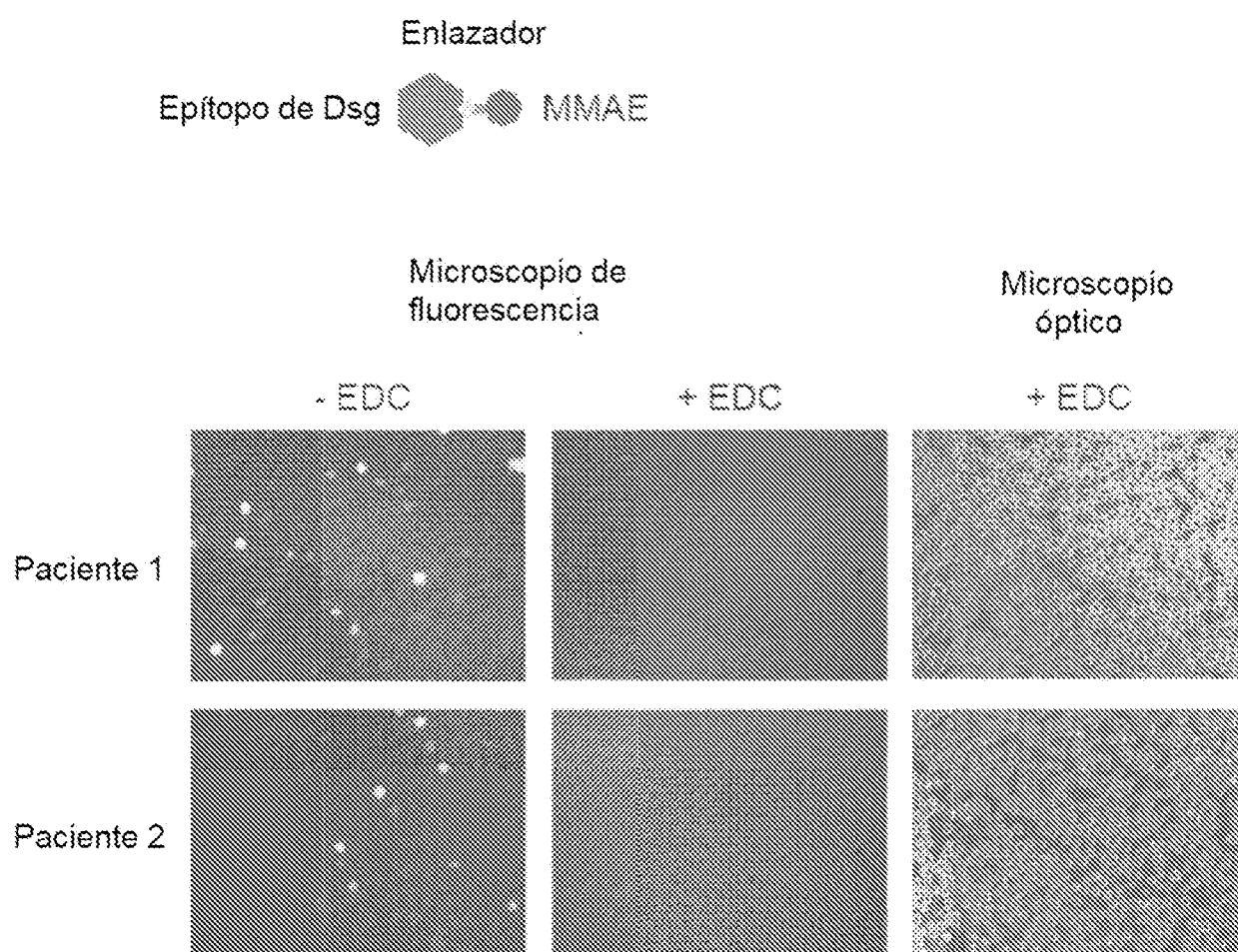


FIG. 31

EWIKFAAAQREGEDNSKRNP¹IAKIHSDQ²AANQQV³TYRISGVGIDQPPY⁴GIF
VINQKTGEIN⁵ITSIVDREVTPFFIIYQ⁶RALNSMGQDLERPLELRVRVLDINDN
PPVFSMATFAGQIEENS⁷NANTLVMILNATDADEPNNLNSKIAFKIIRQE⁸PSD
SPMFIINRNTGEIRTMNNFLDREQYGQYALAVRGSDRDGGADGMSAECE⁹
Q¹⁰NIKILDVNDNIPYMEQSSYTIEIQENTLNSN¹¹LLEIRVIDLDEEF¹²SANWMAVI
FFISGNEGNWFEIEMNERTNVGILKVVKPLDY¹³EAMQSLQLSIGVRNKA¹⁴EF
HHSIMSQYKLKAS¹⁵ISVTVLNVIEGPVF (SEQ ID NO: 16)

FIG. 32

EWWKFAKPCREGEDNSKRNP¹IAKITS²DYQATQKITYRISGVGIDQPPFGIF
 VVDKNTGDINITAIVDREETPSFLITCRALNAQGLDVEKPLILTVKILDINDNP
 PVFSQQIFMGEIEENSASNSLVMILNATDADEPNHLNSKIAFKIVSQEPAG
 TPMFLLSRNTGEVRTLTNSLDREQASSYRLVSGADKDGEGGLSTQCECN
 IKVKDVNDNFPMFRDSQYSARIEENILSSELLRFQVTDLDEEYTDNWLAVY
 FFTSGNEGNWFEIQTDPRTNEGILKVVKALDYEQLQSVKLSIAVKNKAEFH
 QSVISRYRVQSTPVTIQVINVREGIAFRPASKTFTVQKGISSKKLVDYILGT
 YQAIDEDTNKAASNVKYVMGRNDGGYLMIDSKTAEIKFVKNMNRDSTFIV
 NKTITAEVLAIDEYTGKTSTGTVYVRVPDFNDNCPTAVLEK (SEQ ID NO:
 17)