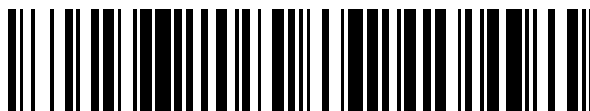


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 333**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2007** **E 11157101 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 2380585**

54 Título: **Métodos para tratar enfermedades autoinmunes**

30 Prioridad:

12.04.2006 US 744713 P

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

05.10.2015

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 Kendall Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

KAPLAN, JOHANNE y
MCPHERSON, JOHN M.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 547 333 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

Métodos para tratar enfermedades autoinmunes

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a métodos para tratar enfermedades autoinmunes. Los métodos de la invención implican el uso de TGF- β latente o de otros agentes que estimulan células T reguladoras, solos o en combinación con agentes de agotamiento de linfocitos, tales como, p. ej., globulina antitimocítica (ATG).

Antecedentes de la invención

10 La producción de anticuerpos contra auto-antígenos y/o células T autorreactivas es una característica común de muchas enfermedades autoinmunes. Los autoanticuerpos y las células T autorreactivas pueden provocar daño grave en los tejidos (p. ej., como en la nefritis lúpica) o pérdida de componentes de la sangre (p. ej., como en la púrpura trombocitopénica).

15 Típicamente, las enfermedades autoinmunes son tratadas con agentes inmunosupresores no específicos, tales como, p. ej., ciclofosfamida, metotrexato, azatioprina y ciclosporina, que impiden que las células inmunes ataquen a órganos y tejidos. Sin embargo, a menudo los agentes inmunosupresores van asociados a efectos secundarios significativos (p. ej., toxicidad, la supresión no deseada del sistema inmune, etc.).

20 Debido a sus efectos inmunosupresores, se ha sugerido el factor de crecimiento beta transformante (TGF- β) como posible agente terapéutico para determinadas enfermedades autoinmunes, incluyendo la esclerosis múltiple y la enfermedad de injerto frente a hospedante. Flanders et al., Clin. Med. Res., 1: 13-20 (2003). También se ha dado a conocer la utilidad de inducir la generación in vitro de células T supresoras (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 6.759.035). Sin embargo, el TGF- β es una citocina pluripotente - además de tener propiedades inmunosupresoras, está implicado en la producción de la matriz extracelular y en otros procesos biológicos. Para un repaso sobre TGF- β , véase, p. ej., Cytokine Reference, ed. Oppenheim et al., Academic Press, San Diego; CA, 2001. La expresión excesiva o persistente de TGF- β desempeña un papel en la fibrosis de órganos (Kapanci et al., Am. J. Resp. Crit. Care Med., 152:2163-2169 (1995); George et al., Prot. Natl. Acad. Sci., 96:2719-12724 (1999); Kuwahara et al., 25 Circulation, 106:130-135 (2002)), mientras que la administración sistémica de TGF- β activo se ha asociado a una toxicidad inaceptable. En particular, en un ensayo clínico de Fase I/II para la esclerosis múltiple progresiva crónica, la administración sistémica de TGF- β 2 activo dio como resultado una toxicidad renal inaceptable, como se evidenció por una reducción de la velocidad de filtración glomerular. Calabresi et al., Neurology, 51:289-292 (1998). Este resultado ha impedido un desarrollo clínico adicional de terapias que implican la administración sistémica de TGF- β activo. En consecuencia, sigue existiendo el reto de emplear selectivamente el potencial inmunosupresor del TGF- β sin incurrir en sus toxicidades presentes. Adicionalmente, sigue existiendo una necesidad de desarrollar métodos para tratar enfermedades autoinmunes que permitan la supresión de inmunidad autorreactiva sin efectos secundarios indeseables. Morishita et al. describen un tratamiento de lupus sistémico eritematoso (SLE) con una globulina antitimocítica (ATG) y ciclosporina A₁, seguido de GM-CSF.

35 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones anejas.

40 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento y la demostración de que se puede usar TGF- β latente para sortear la toxicidad sistémica del TGF- β activo. La activación de TGF- β latente requiere la eliminación del péptido asociado a la latencia (LAP) que puede producirse in vivo a través de una serie de mecanismos, incluyendo la ruptura proteolítica, la exposición a especies de oxígeno reactivas y las interacciones con trombospondina y otras proteínas. Murphy-Ullrich et al., Cytokine Growth Factor Rev., 11:59-69 (2000). Existe la teoría, aunque no asumida para los fines de esta invención, de que dichas condiciones probablemente se producen en áreas de inflamación autoinmune, tal como en el riñón de pacientes con lupus. Debido a que la activación de TGF- β latente se produce en áreas de inflamación y lesión de tejido, el uso de TGF- β latente puede evitar la 45 toxicidad asociada a TGF- β sistémico. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos de la invención implican la administración sistémica de TGF- β inactivo (p. ej., TGF- β latente) a un mamífero, con lo que la activación y/o la acción de TGF- β está limitada a los sitios de inflamación y daño tisular.

50 La presente invención se basa adicionalmente, en parte, en el descubrimiento y la demostración de que el agotamiento de linfocitos por globulina antitimocítica (ATG), seguido de la administración de TGF- β latente es eficaz para mejorar la función renal y aumentar las tasas de supervivencia en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico. Por consiguiente, en algunos casos de la presente descripción, los linfocitos del hospedante son agotados antes de la administración de TGF- β latente para producir el efecto terapéuticamente deseado de la administración de TGF- β latente.

55 Existe la teoría adicional, aunque independiente de los fines de esta invención, de que el efecto terapéutico de TGF- β se alcanza, en parte, debido a los efectos estimulantes del TGF- β sobre el crecimiento de células T reguladoras.

Por lo tanto, en algunos casos de la descripción, se puede administrar otro agente que promueva la expansión de células T reguladoras en lugar de, o además de, TGF- β latente.

5 Esta descripción proporciona métodos para tratar un mamífero (p. ej., un ser humano) con una enfermedad autoinmune, p. ej., lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide (RA). En algunos casos, el tratamiento da como resultado una reducción de la velocidad de progresión de la enfermedad y/o una mejoría en los síntomas. La presente descripción proporciona además métodos para preservar o mejorar la función renal en un mamífero con una enfermedad autoinmune que afecta a la función renal, tal como, p. ej., SLE, síndrome de Goodpasture, síndrome de Wegener y enfermedad de Berger.

En casos más particulares, los métodos de la presente descripción incluyen las siguientes etapas:

- 10 (a) agotar los linfocitos en circulación en un mamífero,
- (b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse ("fase de repoblación"), y
- (c) durante la fase de repoblación, administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de TGF- β latente y/o un agente que promueva la expansión de células T reguladoras.

15 En algunas realizaciones, el agotamiento de linfocitos se logra administrando anticuerpos antitimocíticos (p. ej., Thymoglobulin®, Atgam™, Fresenius™ y Tecelac™) u otro anticuerpo específico para un(os) antígeno(s) expresado(s) en células T.

Una vez que los linfocitos en circulación han sido agotados sustancialmente, se deja que empiecen a repoblarse ("fase de repoblación"). Durante el transcurso de la repoblación, antes de que se complete la repoblación, se administra al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los siguientes agentes: (1) TGF- β latente (p. ej., la forma latente de uno cualquiera de TGF β 1-TGF β 3) y/o (2) uno o más agentes adicionales que promuevan la expansión de células T reguladoras (p. ej., IL-10, IL-10 e IL-4, IL-10 e IFN- α , vitamina D3 y dexametasona, vitamina D3 y micofenolato mofetilo, y rapamicina).

20 En algunos casos, cuando la función renal está comprometida debido a una enfermedad autoinmune, los métodos de tratamiento dan como resultado una mejora de la función renal en el mamífero (p. ej., frenando su pérdida) como se indica a través de, p. ej., un cambio en la tensión arterial sistémica, proteinuria, albuminuria, velocidad de filtración glomerular y/o flujo sanguíneo renal.

25 El sumario anterior y la siguiente descripción detallada son solamente ejemplares y explicativos, y no son restrictivos de la invención, según se reivindica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 La Figura 1 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de los precursores de TGF- β 1 humano (SEQ ID NO: 1), TGF- β 2 (SEQ ID NO: 2) y TGF- β 3 (SEQ ID NO: 3). El TGF- β 2 se muestra en la forma alternativamente ajustada 'larga' en la que se encuentra una inserción de 28 aminoácidos en el dominio pre-pro que comienza en el resto 119. Las secuencias conservadas se encuentran recuadradas. Las flechas indican los sitios de procesamiento proteolítico que da como resultado la ruptura del péptido señal y del fragmento de TGF- β 1 C-terminal maduro. * se refiere al sitio de reconocimiento de integrina RGD encontrado en las proteínas de péptido asociado a la latencia (LAP) de TGF- β 1 y TGF- β 3. + se refiere a restos de cisteína implicados en los enlaces de disulfuro entre las dos proteínas del LAP monoméricas. # se refiere a un resto de cisteína implicado en la formación del enlace de disulfuro sencillo de monómeros de TGF- β .

40 La Figura 2 muestra el efecto terapéutico del tratamiento de combinación de ATG/TGF- β 1 latente sobre la función renal. Se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) dos veces, con tres días de diferencia, 500 μ g de ATG a ratones MRL/MPJ-Tnfrs6^{lpr} (un modelo murino de SLE), con o sin 4 μ g de TGF- β 1 latente en 100 μ l de disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Cuatro microgramos de TGF- β 1 latente corresponden a una dosis de 1 μ g (~0,05 mg/kg) de la porción activa (madura, no asociada a LAP) de la molécula. Cuando se incluye en un tratamiento, el TGF- β 1 latente se administró diariamente durante doce días comenzando once días después de la segunda inyección de ATG. Como control negativo, se trataron ratones con SLE con 500 μ g de inmunoglobulina (Ig) de conejo normal i.p. dos veces, con tres días de diferencia. Un grupo de tratamiento adicional recibió inmunoglobulina de conejo normal y se administró TGF- β 1 latente como se ha indicado anteriormente. Como control positivo, se trataron ratones con SLE con 100 mg/kg i.p. de ciclofosfamida en 200 μ l de disolución salina, semanalmente. La proteinuria fue significativamente menor en ratones con SLE tratados con TGF- β 1 latente y ATG, en comparación con ratones con SLE tratados con ATG solamente, Ig de control + TGF- β 1, o Ig de control solamente. La proteína media total en orina del grupo de tratamiento de combinación se aproximaron al nivel alcanzado con ciclofosfamida, un tratamiento actual para el lupus.

50 La Figura 3 muestra el efecto del tratamiento de combinación sobre el desarrollo de nefropatía grave. Los ratones fueron tratados como se ha descrito anteriormente para la Figura 2. Los ratones con SLE tratados con

ATG y TGF- β 1 latente conjuntamente exhibieron una disminución de la incidencia de proteinuria grave (>500 mg/dl/día) en comparación con los ratones con SLE tratados solamente con ATG, Ig de control + TGF- β 1, o Ig de control solamente.

La Figura 4 muestra el efecto del tratamiento de combinación sobre la función renal. Los ratones fueron tratados como se ha descrito anteriormente para la Figura 2. Los niveles medios de albúmina en orina disminuyeron en ratones con SLE tratados con la combinación de ATG y TGF- β 1 latente en comparación con los ratones con SLE tratados solamente con ATG, Ig de control + TGF- β 1, o Ig de control solamente. El tratamiento de combinación de ATG y TGF- β 1 latente dio como resultado niveles medios de albúmina en orina próximos a los logrados mediante tratamiento con ciclofosfamida.

La Figura 5 muestra el efecto del tratamiento de combinación sobre el desarrollo de nefropatía grave. Los ratones fueron tratados como se ha descrito anteriormente para la Figura 2. El porcentaje de ratones con SLE que presentan albuminuria severa (>10 mg/dl/día) disminuyó en el grupo de tratamiento de combinación en comparación con ATG solamente, Ig de control + TGF- β 1, o Ig de control solamente.

Las Figuras 6A-6E muestran el efecto del tratamiento de combinación sobre el desarrollo de autoanticuerpos. Las flechas indican el inicio del tratamiento. Los ratones fueron tratados como se ha descrito anteriormente para la Figura 2 y como se indica consecuentemente en las Figuras 6A-6E. En general, los ratones con SLE tratados con ATG y TGF- β 1 latente mostraron un retraso considerable en la elevación de títulos de anticuerpos de IgG anti-ADNdc en comparación con los ratones tratados con ATG solamente, con Ig de control + TGF- β 1, o Ig de control solamente.

La Figura 7 muestra el efecto del tratamiento de combinación sobre la supervivencia de ratones con SLE. Los ratones fueron tratados como se ha descrito anteriormente para la Figura 2. Los ratones con SLE tratados con ATG y TGF- β 1 latente sobrevivieron significativamente más tiempo que los ratones con SLE tratados con ATG solamente, Ig de control + TGF- β 1, o Ig de control solamente.

La Figura 8 muestra los datos de supervivencia obtenidos en un estudio de repetición con ratones MRL/MPJ-Tnfrs6^{lpr} tratados como se ha descrito anteriormente para la Figura 2. En este caso, el estudio se extendió hasta las 40 semanas de edad (en lugar de las 24 semanas del primer estudio) para determinar la durabilidad del efecto del tratamiento transitorio con ATG y TGF- β 1 latente. De hecho, el beneficio de la supervivencia persistió, y la supervivencia de ratones tratados con ATG y TGF- β 1 latente fue comparable al obtenido con ciclofosfamida, el control positivo (90% frente a 100%, respectivamente).

La Figura 9A muestra el número absoluto de células CD4⁺ CD25⁺ en cultivos de esplenocitos expuestos a diversos tratamientos. Los esplenocitos se reunieron de diez ratones MRL/lpr con enfermedad activa. Se evaluaron seis condiciones diferentes (8 pocillos/condición): 1) células solamente, 2) ATG (100 μ g/ml) + TGF- β 1 activo (10 ng/ml; Genzyme), 3) ATG solamente (100 μ g/ml), 4) IgG de conejo de control (100 μ g/ml) + TGF- β 1 activo (10 ng/ml), 5) IgG de conejo de control solamente (100 μ g/ml), y 6) TGF- β 1 activo solamente (10 ng/ml). Después de cinco días, se reunieron las réplicas de cada condición de cultivo, se lavaron en disolución salina tamponada con fosfato, se contaron y se tiñeron para el análisis de FACS. Una muestra de 5×10^5 células por tratamiento se tiñó con anti-CD4 de ratón de rata conjugado con Alexa 488, y con anti-CD25 de ratón de rata conjugado con PerCp-Cy5.5, y se analizó mediante citometría de flujo. Se analizó una adquisición de 6.000 linfocitos por tratamiento para tinción en un sistema FACS Calibur (Becton Dickinson, San Diego, CA). Los resultados se expresan como el número absoluto de células por cada fenotipo recuperado en cada condición de cultivo (porcentaje de células positivas para FACS x número total de células recuperadas del cultivo).

La Figura 9B muestra el número absoluto de células CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ en cultivos de esplenocitos tratados como se ha descrito en la Figura 9A. Adicionalmente, para la detección intracelular de FOXP3, las células teñidas para CD4/CD25 superficial se permeabilizaron durante toda la noche y se tiñeron para FOXP3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta descripción proporciona métodos para tratar un mamífero con una enfermedad autoinmune. En casos particulares, dichos métodos incluyen métodos para mejorar la función renal en un mamífero con una enfermedad autoinmune que compromete la función renal. En algunos casos, los métodos de la presente descripción implican la administración sistémica de TGF- β latente a un mamífero, en los que la activación y/o la acción de TGF- β se limitan a los sitios de inflamación y de daño tisular.

En algunos casos, los métodos de la presente descripción comprenden las siguientes etapas:

- (a) agotar los linfocitos en circulación en el mamífero,
- (b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse, y

(c) durante la fase de repoblación de (b), administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de TGF- β latente y/o un agente que promueva la expansión de células T reguladoras.

Agotamiento de linfocitos

5 El agotamiento de los linfocitos circulantes se puede lograr administrando un agente de agotamiento de linfocitos al mamífero, o exponiendo de otro modo al mamífero a condiciones que den como resultado una pérdida de una fracción sustancial de células linfoides (p. ej., linfocitos, células asesinas naturales (NK), monocitos, y/o células dendríticas, etc.) en el mamífero. Los linfocitos que van a ser agotados pueden ser linfocitos T (células T) y/o linfocitos T y B. En la fase de agotamiento, los recuentos de células T se reducen en al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más, y opcionalmente, los recuentos de linfocitos B (células B) se reducen en al menos 30%, 40, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más. En casos preferidos, los linfocitos agotados son predominantemente células T, lo que significa que el porcentaje de células T agotadas es mayor (p. ej., 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces o más) que el porcentaje de células B agotadas.

15 El nivel de agotamiento de linfocitos puede evaluarse fácilmente, por ejemplo, midiendo la cantidad de linfocitos de sangre periférica (PBLs). Los recuentos de linfocitos pueden determinarse usando técnicas de laboratorio clínicas convencionales (p. ej., mediante citometría de flujo). Los valores de referencia para niveles de PBL normales en seres humanos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Tipo de célula	Marcador típico	Media (%)	Intervalo (%)	Media (células/ μ l)	Intervalo (células/ μ l)
Células T totales	CD3	71	55-87	1.586	781-2.391
Células B totales	CD19	5	1-9	277	17-537
Células T colaboradoras	CD4	43	24-62	1.098	447-1.750
Células citotóxicas	CD8	42	19-65	836	413-1.260

20 En algunas realizaciones, el agente de agotamiento de linfocitos es un anticuerpo antilinfocítico, p. ej., anticuerpos anti-células T, p. ej., globulina antitimocítica (ATG), tal como, p. ej., Thymoglobulin®, Atgam™, Fresenius™ y Tecelac™. ATG es un anticuerpo policlonal dirigido contra timocitos. Los productos de ATG comercializados actualmente se producen inyectando timocitos de una especie (p. ej., ser humano) en otra especie (p. ej., conejo o caballo). La ATG se une a proteínas de la superficie celular tales como los antígenos de superficie de linfocitos CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, CD25, HLA DR y HLA clase I (Bourdage et al., Transplantation, 59:1194-1200 (1995)). Se cree que ATG induce inmunosupresión principalmente como resultado del agotamiento de células T (véase, p. ej., Bonnefoy-Bérnard et al., Transplantation, 51:669-673 (1991)), y se ha usado previamente para pretratar pacientes de trasplante para reducir el riesgo de rechazo en el contexto de un trasplante de órganos.

25 Además de ATG, el agente de agotamiento de linfocitos consta de o comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra uno o más antígenos específicos de la superficie de linfocitos, p. ej., anticuerpo anti-CD52 (p. ej., Campath®), anticuerpo anti-CD3 (p. ej., OKT3®), anticuerpo anti-CD4 (OKT™), anticuerpo anti-CD25 (IL-2R) (p. ej., daclizumab), anticuerpo anti-CD5, anticuerpo anti-CD7, anticuerpo anti-TCR, anti-CD2 (p. ej., Siplizumab™) o un anticuerpo contra cualesquiera de otros antígenos de la superficie de linfocitos especificados anteriormente, etc.

En algunas realizaciones, el agente de agotamiento de linfocitos puede ser un corticosteroide.

35 En algunas realizaciones, las condiciones que dan como resultado el agotamiento de linfocitos pueden incluir la exposición a radiación gamma.

También se puede usar una combinación de cualesquiera agentes y/o condiciones adecuados para agotar linfocitos.

Fase de reconstitución

Después de la fase de agotamiento, se permitió que los linfocitos del mamífero comenzaran a repoblarse retirando el agente de agotamiento de linfocitos, o mitigando las condiciones que dieron como resultado la pérdida de linfocitos.

40 Mientras que en algunos casos el agente de la etapa (c) (es decir, TGF- β u otro agente que estimula específicamente células T reguladoras) se puede administrar al mamífero inmediatamente al comienzo de la fase de relleno; en otros casos, el agente se administra después de que se haya producido cierta repoblación. Antes de

que el agente de la etapa (c) sea administrado al mamífero, se puede permitir que los linfocitos se repueblen a menos de 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menor, en comparación con el nivel previo al agotamiento.

- En seres humanos, los linfocitos se repueblan hasta los niveles previos al agotamiento, a diferentes velocidades dependiendo del agente de agotamiento. Por ejemplo, con ATG, una repoblación completa puede tardar dos a cuatro meses, mientras que después del tratamiento con Campath™, la repoblación puede tardar varios años. En consecuencia, en algunas realizaciones, el periodo de tiempo entre el final de la fase de agotamiento de los linfocitos y la administración del agente de la etapa (c) es, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 días; 1, 2, 3, 4 o 5 semanas, o más.

TGF- β

- En ciertos casos, los métodos de la presente descripción implican la administración de TGF- β inactivo que se activa después de la administración. En algunas realizaciones, el TGF- β inactivo se administra en forma de TGF- β latente. En otras realizaciones, el TGF- β inactivo se administra en forma de un ADN que codifica TGF- β que expresa TGF- β activo tras inducción.

- El TGF- β es segregado de forma natural en un denominado “complejo latente pequeño” (100 kDa) en el que el TGF- β biológicamente activo está asociado de forma no covalente a su dominio pro (“péptido asociado a la latencia”, LAP) y en un denominado “complejo latente grande” (220 kDa) que contiene adicionalmente proteína de unión de TGF- β latente (LTBP). Las formas latentes son incapaces de unirse a receptores de TGF- β hasta que TGF- β activo, es decir, maduro, es liberado desde el complejo. Para una revisión más detallada de las formas latentes y del proceso de activación, véase, p. ej., Cytokine Reference, ed. Oppenheim et al., Academic Press, San Diego, CA, 2001, p. 724-725. Como se emplea en la presente memoria, el término “TGF- β latente” se refiere a TGF- β asociado a LAP (covalentemente o no covalentemente) y, opcionalmente, asociado adicionalmente a LTPB (covalentemente o no covalentemente). Por lo tanto, el término se refiere a complejos de TGF- β latente pequeños y grandes. Otras formas de TGF- β inactivo que podrían activarse en las localizaciones y en los periodos de tiempo deseados también serían útiles en los métodos de esta invención. Existen tres isoformas conocidas de TGF- β de mamífero (TGF- β 1 a TGF- β 3), todas las cuales son homólogas entre ellas (60-80% de identidad). En la Tabla 2 se proporciona un listado parcial del número de acceso de proteína para las tres isoformas de mamífero; en la Figura 1 se muestra un alineamiento de TGF- β s humanas.

Tabla 2

Especie	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Humana	PO1137	PO8112	P109600
Ratón	P04202	P27090	P171125
Rata	AAD20222	AAD24484	Q07258
Porcina	AAA616	AAB03850	P15203
Simio	P09533	WFMKB2	

- Los aspectos estructurales y funcionales de TGF- β , así como de los receptores de TGF- β , son bien conocidos. Véase, p. ej., Cytokine Reference, ed. Oppenheim et al., Academic Press, San Diego, CA, 2001. De este modo, las formas inactivadas de TGF- β s modificados que retienen la capacidad de unirse a uno o más receptores de TGF- β (TGF- β RI, TGF- β RII o TGF- β RIII) también serían útiles en los métodos de la presente descripción. Dichas formas inactivadas de TGF- β modificado pueden contener solamente una secuencia de aminoácidos parcial o mutada del TGF- β de origen natural. Por ejemplo, las formas inactivadas de TGF- β modificado pueden contener secuencias nativas en las que se hicieron sustituciones conservativas y/o se eliminaron aminoácidos no esenciales. Por ejemplo, pueden comprender una secuencia que es idéntica en al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% a la porción C-terminal de 112 aminoácidos de SEQ ID NO:n a lo largo de toda la longitud de esta porción C-terminal de SEQ ID NO:n, en la que n = 1, 2 o 3.

Agentes que promueven la expansión de células T reguladoras

- En ciertos casos, los métodos de la presente descripción implican la administración de un agente que promueve la expansión de células T reguladoras. Las células T reguladoras (también conocidas como Tregs o células T supresoras) son células que son capaces de inhibir la proliferación y/o la función de otras células linfoides a través

de mecanismos dependientes del contacto o independientes del contacto (p. ej., producción de citocinas). Se han descrito varios tipos de células T reguladoras, incluyendo células T $\gamma\delta$, células T asesinas naturales (NKT), células T CD8⁺, células T CD4⁺, y células T doble negativas CD4⁻ CD8⁻. Véase, p. ej., Bach et al., *Immunol.*, 3:189-98 (2003). Las células T reguladoras denominadas "de origen natural" son CD4⁺CD25⁺ y expresan el factor de transcripción FOXP3 de la familia forkhead (forkhead caja p3). Además de las CD4⁺ CD25⁺ que expresan FOXP3, también una población minoritaria de células CD8⁺ que expresan FOXP3 son células T reguladoras. Las Tregs CD4⁺ se pueden dividir adicionalmente en células T reguladoras inducidas que segregan interleucina 10 (IL-10) y TGF- β tal como células Tr1 y células T-colaboradoras 3 (Th3). Otros marcadores de la superficie adicionales para células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ incluyen CD45RB, CD38, GITR, TGF- β de la superficie, CTLA4, CD103, CD134 y CD62L. Para una revisión detallada de los diversos tipos de células T reguladoras, véase, p. ej., Wing et al., *Scand. J. Immunol.*, 62(1):1 (2005); Jonuleit et al., *J. Immunol.*, 171:6323-6327 (2003); Horwitz et al., *J. Leukocyte Biol.*, 74:471-478 (2003).

En consecuencia, en algunas realizaciones, las células T reguladoras que están siendo estimuladas incluyen uno o más de los siguientes grupos: (1) células T reguladoras que expresan IL-10; (2) células T reguladoras que expresan TGF- β (incluyendo células Tr1 y células Th3); (3) células CD4⁺CD25⁺ (incluyendo células que tienen marcadores adicionales CD45RB⁺, CD38⁺, GITR, TGF- β de la superficie, CTLA-4, CD103, CD134 y/o CD62L); (4) células T que expresan FOXP3 (incluyendo células CD8⁺ y células CD4⁺); (5) células T $\gamma\delta$; (6) células T NK; y (7) células T doble negativas CD4⁻ CD8⁻.

El TGF- β , además de su actividad inmunosupresora directa, también puede ser capaz de estimular células T reguladoras. Gorelik y Flavell, *Nature Reviews Immunology*, 2:46-53 (2002); Chen et al., *J. Exp. Med.*, 198:1875-1886 (2003); Marie et al., *J. Exp. Med.*, 7:1061-1067 (2005); Huber et al., *J. Immunol.*, 173:6526-6531 (2004).

Los ejemplos de agentes, distintos de TGF- β , que promueven la expansión de células T reguladoras incluyen: (1) IL-10; (2) IL-10 e IL-4; (3) IL-10 e IFN- α ; (4) vitamina D3 y dexametasona; (5) vitamina D3 y micofenolato mofetilo, y (6) rapamicina. (Véase, p. ej., Barrat et al., *J. Exp. Med.*, 195:603-616 (2002); Jonuleit et al., *J. Immunol.*, 171:6323-6327 (2003); Gregori et al., *J. Immunol.*, 167:1945-1953 (2001); Battaglia et al., *Blood*, 105:4743-4748 (2005).)

En algunas realizaciones, un aumento de, p. ej., al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, o más en la expansión de células T reguladoras en presencia de un agente, en oposición a su ausencia, se considera indicativo de la capacidad del agente para promover la expansión de células T reguladoras. TGF- β y otros agentes se pueden evaluar para determinar su capacidad para promover la expansión de células T reguladoras empleando métodos habituales. Los ejemplos de algunos de los ensayos in vitro usados más frecuentemente incluyen los siguientes:

(1) análisis mediante citometría de flujo, en el que la co-expresión de CD4, CD25, y/o FOXP3, y/o CD62L, y/o GITR, y/o CTLA4, y/o TGF- β de la superficie, y/o CD103, y/o CD134 se usa como indicación de un fenotipo de célula T reguladora (véase, p. ej., Jonuleit, más arriba);

(2) inhibición de la proliferación de células T en un sistema de co-cultivo como se describe, p. ej., en Chen et al., *J. Exp. Med.*, 198:1875-1886 (2003). (En este ensayo, las células T reguladoras se añaden a células T respondedoras, y el co-cultivo se estimula con anti-CD3 o con linfocitos alogeneicos. En presencia de células T reguladoras, las células T respondedoras se vuelven incapaces de proliferar en respuesta a estos estímulos. El grado de proliferación se mide típicamente mediante incorporación de timidina tritiada); y

(3) perfil de citocinas como se describe, p. ej., en Barrat, más arriba, y Jonuleit, más arriba. (En este ensayo, un sobrenadante de células T reguladoras cultivadas se analiza para determinar la presencia de citocinas inmunosupresoras tales como, p. ej., IL-10 y TGF- β , que se sabe que son producidas por células T reguladoras).

Usos

Los métodos de la presente descripción se pueden usar para tratar a un mamífero que tenga una enfermedad autoinmune tal como, p. ej., lupus eritematoso sistémico (SLE) y artritis reumatoide autoinmune (RA). Los ejemplos de mamíferos incluyen seres humanos u otros primates (p. ej., chimpancés), roedores (p. ej., ratones, ratas o cobayas), conejos, gatos, perros, caballos, vacas y cerdos. En algunos de los sujetos afectados, se espera que el tratamiento dé como resultado la inhibición de la progresión de la enfermedad y/o una mejoría en los síntomas.

Los ejemplos de enfermedades autoinmunes adicionales incluyen diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM; diabetes tipo I), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de hospedante frente a injerto (GVHD), celiaquía, enfermedad tiroidea autoinmune, síndrome de Sjögren, gastritis autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedades autoinmunes cutáneas, cardiomiopatía autoinmune dilatada, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG), vasculitis (p. ej., arteritis de Takayasu y granulomatosis de Wegener), enfermedades autoinmunes del músculo, enfermedades autoinmunes de los testículos, enfermedad autoinmune de los ovarios, uveítis autoinmune, enfermedad de Graves, soriasis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Addison, tiroiditis de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, y vitiligo.

Es de esperar que los métodos de la presente descripción ralenticen la progresión de la enfermedad autoinmune, mejoren al menos algunos síntomas y/o aumenten la supervivencia. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden dar como resultado una reducción de los niveles de autoanticuerpos, autoanticuerpos productores de células B, y/o células T autorreactivas. La reducción de cualquiera de estos parámetros puede ser, por ejemplo, de al menos 10%, 20%, 30%, 50%, 70% o más respecto a los niveles del pretratamiento.

La presente descripción proporciona además métodos para preservar o mejorar la función renal en un mamífero con una enfermedad autoinmune que compromete la función renal. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes que pueden comprometer la función renal incluyen SLE (p. ej., nefritis lúpica), síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener (síndrome de Wegener), enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), y nefropatía de IgM. En algunos de los pacientes afectados por tales enfermedades, es de esperar que el tratamiento dé como resultado la mejora de la función renal (p. ej., ralentización de la pérdida, conservación o mejora de la misma) como se indica, p. ej., a través de un cambio en la tensión arterial sistémica, proteinuria, albuminuria, velocidad de filtración glomerular y/o flujo sanguíneo renal.

La expresión "función renal" se refiere a la capacidad de un riñón para llevar a cabo sus funciones fisiológicas tales como la filtración a presión, la reabsorción selectiva, la secreción tubular y/o la regulación de la tensión arterial sistémica. Los métodos para evaluar la función renal son bien conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, medidas de la tensión arterial sistémica y de la presión capilar glomerular, proteinuria, albuminuria, hematuria microscópica y macroscópica, nivel de creatinina en suero (p. ej., una fórmula para estimar la función renal en seres humanos es igual a un nivel de creatinina de 2,0 mg/dl a un 50% de la función renal normal, y de 4,0 mg/dl a un 25%), disminución en la velocidad de filtración glomerular (GFR) (p. ej., como se indica a través de la velocidad de aclaramiento de creatinina, o usando ensayos de inulina), y el grado de daño tubular.

Para un repaso detallado de la función renal y estados de enfermedad asociados, véase The Kidney: Physiology and Pathophysiology, ed. Seldin et al., 3ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins Publishers, 2000. Normalmente, se excreta menos de 0,15 g de proteína en la orina en un periodo de 24 horas. Casi todos los tipos de nefropatía provocan una pérdida de proteínas en la orina de leve (hasta 500 mg por día) a moderada (hasta 4 g por día). La concentración normal de albúmina en la orina es menor que 1,0 mg/dl. Generalmente, 30-300 mg/dl de albúmina urinaria se considera microalbuminuria, y más de 300 mg/dl se considera macroalbuminuria. Los valores normales de creatinina en suero son 0,6-1,5 mg/dl para hombres y 0,6-1,1 mg/dl para mujeres. La relación entre los niveles de creatinina, la función renal y la etapa de la nefropatía se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Nivel de creatinina (mg/dl)	Reducción estimada de la función renal	Etapa de la nefropatía
0,6-1,5	Hasta 25%	Reserva renal reducida o disminuida
>1,5	>50%	Insuficiencia renal
4,8	75%	Fallo renal
10	90%	Nefropatía en etapa terminal

Por lo tanto, los métodos de la presente descripción pueden ser útiles en pacientes que tienen una enfermedad autoinmune con una reserva renal reducida o disminuida, una insuficiencia renal, fallo renal o nefropatía en etapa terminal. Por ejemplo, los métodos de la invención se pueden usar en un paciente con niveles de microalbuminuria, macroalbuminuria y/o proteinuria de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 g o más a lo largo de un periodo de 24 horas, y/o niveles de creatinina en suero de aproximadamente 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10 mg/dl o más.

En algunos casos, los métodos de la presente descripción reducen la cantidad de proteína segregada en la orina (proteinuria), la cantidad de albúmina segregada en la orina (albuminuria) y/o los niveles de creatinina en suero del paciente en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o más con respecto a sujetos de control. En otros casos, los métodos de la presente descripción ralentizan la pérdida de función renal en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o más con respecto a sujetos de control. En la presente memoria se describen métodos ilustrativos no limitantes para evaluar la función renal, y, por ejemplo, en el documento WO 01/66140.

Métodos de administración

En los métodos de la presente descripción, la "administración" no se limita a un sistema de suministro particular, y puede incluir, sin limitación, administración parenteral (incluyendo inyección subcutánea, intravenosa, intramedular,

intraarticular, intramuscular o intraperitoneal), rectal, tópica, transdérmica, u oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones, o comprimidos). La administración a un individuo se puede producir en una sola dosis o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una variedad de formas salinas fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéuticamente aceptable como parte de una composición farmacéutica. Las formas salinas fisiológicamente aceptables y los excipientes y técnicas de formulación farmacéutica estándares son bien conocidos por las personas expertas en la técnica (véase, p. ej., Physicians' Desk Reference (PDR®) 2005, 59ª ed., Medical Economics Company, 2004; y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, ed. Gennado et al. 21ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2005).

TGF- β latente también se puede administrar mediante terapia génica (es decir, administrando en un vector apropiado un ADN que codifica TGF- β), por ejemplo como se describe en Kitani et al., J. Exp. Med., 192(1):41-52 (2000).

Las dosis eficaces apropiadas para el TGF- β latente, los agentes que promueven Tregs, y los agentes de agotamiento de linfocitos se elegirán por un médico al cargo del tratamiento y oscilarán aproximadamente desde 0,01 μ g/kg hasta 25 mg/kg, desde 0,1 μ g/kg hasta 10 mg/kg, desde 1 μ g/kg hasta 1 mg/kg, 10 μ g/kg hasta 1 mg/kg, desde 10 μ g/kg y 100 μ g/kg, desde 100 μ g/kg hasta 1 mg/kg, y desde 500 μ g/kg hasta 5 mg/kg. Adicionalmente, las dosis específicas indicadas en los Ejemplos o en el PDR® 2005 y ediciones posteriores pueden usarse para lograr la dosificación deseada. Por ejemplo, los usos actualmente aprobados de Thymoglobulin® en los Estados Unidos de América incluyen el trasplante (de 1 mg/kg a 2,5 mg/kg durante 2-14 días) y anemia aplásica (de 2,5 mg/kg a 3,5 mg/kg durante 5 días).

Las dosis eficaces logradas en un animal pueden convertirse para uso en otro animal, incluyendo seres humanos, usando factores de conversión conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Freireich et al., Cancer Chemother. Reports, 50(4):219-244 (1966) y la Tabla 4 para factores de dosis de área superficial equivalente. Los ejemplos de modelos de enfermedades autoinmunes y métodos apropiados pueden encontrarse, p. ej., en Cohen et al. (ed.) Autoimmune Disease Models, Academic Press, 2005.

Tabla 4

De: A:	Ratón (20 g)	Rata (150 g)	Mono (3,5 kg)	Perro (8 kg)	Ser humano (60 kg)
Ratón	1	0,5	0,25	0,17	0,08
Rata	2	1	0,5	0,25	0,14
Mono	4	2	1	0,6	0,33
Perro	6	4	1,7	1	0,5
Ser humano	12	7	3	2	1

Los siguientes Ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos, y no pretenden ser limitativos.

EJEMPLOS

Evaluación de la potencia de TGF- β 1 activado

Se produjo TGF- β 1 latente humana recombinante en células CHO (Genzyme, Framingham, MA). La alteración de LAP de TGF- β 1 latente se logró mediante acidificación. LAP-TGF- β 1 se diluyó hasta 200 ng/ml en medio de ensayo (DMEM más aminoácidos no esenciales, L-glutamina, pen-strep, y FBS al 10%). Se activaron quinientos microlitros de la muestra diluida añadiendo 100 μ l de HCl 1 N e incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, la muestra se neutralizó con 100 μ l de NaOH 1,2 N/HEPES 0,5M.

La muestra de TGF- β 1 activado se analizó usando el Ensayo de Potencia Celular A549, y se evaluó la actividad en comparación con un control de TGF- β 2 recombinante humano (Genzyme, Framingham, MA). El ensayo de potencia A549 se basa en la liberación inducida por TGF- β 1 de IL-11 por la línea de células epiteliales de pulmón humano, A549, y se describe en Wang et al., Am. J. Physiol., 276:L175-L185 (1999). La liberación de IL-11 a partir de las células A549 en respuesta a TGF- β 1 se midió usando un procedimiento de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Modelo de lupus murino

Animales y Reactivos - Se obtuvieron ratones hembra MRL/lpr de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se recibieron con una edad de 5-6 semanas. ATG se generó mediante inmunización de conejos con timocitos de

ratones Balb/c como se indica a continuación. Los conejos se inmunizaron subcutáneamente con 5×10^7 timocitos recientes en el día 0 y se revacunaron intravenosamente con 5×10^7 timocitos recientes en el día 14. Se reunió suero recolectado en los días 20, 22 y 25, y la fracción de IgG se aisló mediante cromatografía y precipitación con sulfato sódico. Como control negativo se usó una preparación comercial de IgG de conejos no sometidos a tratamiento previo (Sigma, St. Louis, MO). TGF- β 1 latente humana recombinante se produjo en células CHO (Genzyme, Framingham, MA). La ciclofosfamida se adquirió de WVR Scientific Products (West Chester, PA).

Tratamiento - Los animales se monitorizaron para determinar proteinuria, albuminuria y los títulos de anticuerpos IgG para ADN bicatenario (ADNdc) cada tres semanas (véase más abajo). El tratamiento terapéutico se inició cuando los animales comenzaron a desarrollar anticuerpos para ADNdc y/o una proteinuria elevada a las 12-13 semanas de edad. El tratamiento con ATG o con IgG de conejo de control consistió en dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 500 μ g (~25 mg/kg) administradas con tres días de diferencia (días 0 y 3). El TGF- β 1 se administró a partir de los días 14-25 como doce inyecciones i.p. diarias de 4 μ g por ratón. Una dosis de 4 μ g de TGF- β 1 latente corresponde a una dosis de 1 μ g (~0,05 mg/kg) de la porción activa (madura, no asociada a LAP) de la molécula. Como control positivo se usó ciclofosfamida, y se suministró i.p. semanalmente a una dosis de 100 mg/kg a partir de las 12-13 semanas de edad hasta el final del estudio a las 24-25 semanas de edad. Los grupos de tratamiento consistieron en IgG de conejo de control, IgG de conejo de control + TGF- β 1 latente, ATG, ATG + TGF- β 1 latente, o ciclofosfamida, con diez animales por grupo.

Proteinuria y albuminuria - Los niveles de proteína en la orina de ratones individuales se midieron usando un ensayo colorimétrico diseñado para medir la concentración de proteína total. Los niveles de albúmina en la orina se evaluaron con un ensayo ELISA cuantitativo.

Se llevó a cabo una recogida de orina durante 24 horas cada tres semanas colocando los ratones en jaulas metabólicas individuales. La proteinuria se midió usando el kit Microprotein-PR™ de Sigma (St. Louis, MO) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió orina a una disolución de reactivo que contenía complejo de rojo de pirogalol-molibdato. La mezcla se incubó a 37°C durante diez minutos para permitir la unión del reactivo a grupos amino básicos en las proteínas, lo que conduce a un desplazamiento de la absorbancia a 600 nm. El incremento de la densidad óptica (O.D.) a 600 nm es directamente proporcional a la concentración de proteína, y se usó un patrón de referencia para calcular la concentración de proteína de las muestras de ensayo según la siguiente fórmula:

$$\frac{OD_{muestra}}{OD_{patrón}} \times Conc_{patrón} \times Dilución = Conc_{muestra} (mg / dl)$$

Los niveles de albúmina en la orina se evaluaron usando un kit de ELISA competitivo indirecto, según las instrucciones del fabricante (Albuwell M de Exocell Inc, Filadelfia, PA). Brevemente, se añadieron diluciones de dos veces en serie de muestras de orina a pocillos duplicados de una placa de ELISA revestida con albúmina de ratón. A continuación se añadió anticuerpo anti-albúmina de ratón de conejo a los pocillos, permitiendo la competición entre la unión del anticuerpo a la albúmina de la muestra y la albúmina unida al pocillo. A esto le siguió la adición de inmunoglobulina anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) y sustrato de HRP para detectar la cantidad de anticuerpo anti-albúmina de ratón de conejo unido al pocillo. La O.D. a 450 nm fue inversamente proporcional al logaritmo de la cantidad de albúmina en la muestra de orina. La concentración de albúmina en las muestras de orina se obtuvo a partir de una curva patrón obtenida con concentraciones conocidas de albúmina murina.

ELISA anti-ADNdc - Los títulos de anticuerpos IgG para ADNdc en muestras de suero de ratones individuales se midieron mediante ELISA.

Se recogieron muestras de suero de ratones individuales cada tres semanas. Los títulos de anticuerpos para ADNdc se evaluaron mediante ELISA. Se digirió ADN bicatenario de ratón (The Jackson Laboratory) con nucleasa S1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para eliminar cualquier ADN monocatenario, y a continuación se usó para revestir los pocillos de una placa de ELISA de 96 pocillos (100 μ l/pocillo de 1 μ g/ml de ADNdc) toda la noche a 4°C. Las placas se pretrataron con sulfato de protamina al 0,01% en agua (150 μ l/pocillo durante 90 minutos a temperatura ambiente) para facilitar la adhesión del ADN. Tras el revestimiento, las placas se incubaron con tampón de bloqueo de BSA al 2,5% durante una hora a 37°C y se lavaron. A continuación se añadieron cien microlitros de diluciones de dos veces en serie de suero a pocillos duplicados y se incubaron a 37°C durante una hora. Las placas se lavaron y se añadió IgG anti-ratón de cabra conjugada a HRP (Pierce, Rockford, IL) para detectar anticuerpos unidos a ADNdc (37°C durante una hora). Tras lavar, el sustrato de HRP se añadió durante 30 minutos a temperatura ambiente, y la O.D. del producto colorimétrico se leyó a 490 nm con una longitud de onda de referencia de 650 nm en un lector de placas de longitud de onda dual (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El título de anticuerpos se definió como el inverso de la dilución de suero que da una O.D. mayor o igual a 0,1. Se usó suero de ratón normal como control negativo (título <200, la dilución más baja evaluada) y suero de ratones MRL/lpr con lupus envejecidos como control positivo (título de 6400-25600).

- 5 Histología - Los riñones se recogieron para el análisis histológico en el momento del sacrificio programado o durante el transcurso del estudio para animales moribundos que requirieron eutanasia. Los riñones se cortaron en láminas longitudinalmente y se fijaron en formalina tamponada neutra. Secciones de aproximadamente 5 µm se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y colorante de ácido peryódico-Schiff (PAS). Los patólogos adjudicaron una puntuación a los cortes en láminas para la morfología glomerular, la inflamación intersticial y los moldes de proteínas según los sistemas de puntuación descritos en las Tablas 5A y 5B.

Tabla 5A

Glomérulos	
0	Sin lesiones significativas (comparable a OMS clase I)
1	Enfermedad mínima a leve, caracterizada por depósitos mesangiales (comparable a OMS clase IIA)
2	Enfermedad leve a moderada, caracterizada por hiper celularidad con o sin depósitos mesangiales (comparable a OMS clase IIB)
3	Enfermedad moderada a grave, caracterizada por glomerulopatía mesangioproliferativa y capilares de “bucle de alambre” con o sin necrosis fibrinoide de los bucles capilares, ruptura de la cápsula de Bowman e inflamación periglomerular y fibrosis (formación “de media luna”) que afecta a menos del 25% de los glomérulos. A menudo está presente una sinequiación focal de penacho glomerular al epitelio capsular de Bowman, y puede ser el único hallazgo destacable; si la sinequiación es el único hallazgo, se asignará una puntuación de 3 si están afectados menos del 75% de los penachos glomerulares.
4	Enfermedad moderada a grave con las mismas características de la puntuación 3, pero que afecta al 25-50% de los penachos glomerulares
5	Enfermedad grave con las mismas características de la puntuación 3, pero que afecta al 50-75% de los penachos glomerulares
6	Enfermedad grave con las mismas características de la puntuación 3, pero que afecta a más del 75% de los penachos glomerulares
Las puntuaciones 3-6 dividen las puntuaciones de OMS III y IV en cuatro subcategorías	

Tabla 5B

Inflamación intersticial	
0	Sin lesiones significativas
1	Inflamación y fibrosis mínimas a leves
2	Inflamación y fibrosis leves a moderadas
3	Inflamación y fibrosis moderadas a graves
4	Inflamación y fibrosis graves y difusas
Puntuaciones 0-4, basadas en la densidad de la inflamación crónica (linfocitos, células plasmáticas, y macrófagos) con fibrosis dentro del intersticio y rodeando los vasos sanguíneos renales.	

- 10 Estadística - Se llevó a cabo un análisis estadístico usando ensayos de comparación múltiple de Tukey para determinar si existieron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. Los valores de P iguales o menores que 0,05 se aceptaron como estadísticamente significativos.

- 15 Proteinuria y Albuminuria - El tratamiento con ATG o TGF-β1 latente solo (Ig de control + TGF-β1) falló estrepitosamente a la hora de inhibir el desarrollo de proteinuria (Figura 2), aunque al final del estudio se redujo ligeramente la incidencia de proteinuria grave (>500 mg/dl/día) en estos grupos de tratamiento de agente individual

en comparación con los ratones tratados con Ig de control (60-67% frente a 90%, respectivamente) (Figura 3). Por el contrario, el tratamiento con una combinación de ATG y TGF- β 1 latente dio como resultado la inhibición en la incidencia (30% frente a 90%) y la gravedad de la proteinuria, lo que sugiere un efecto sinérgico entre estos dos agentes (Figuras 2 y 3).

5 La reducción observada en los niveles de proteína total en la orina de ratones tratados con la combinación de ATG y TGF- β 1 latente también se vio reflejada en las medidas de los niveles de albúmina en orina (Figuras 4 y 5). La cuantificación mediante ELISA indicó que la incidencia y la gravedad de la albuminuria se vio reducida considerablemente en ratones tratados con la terapia de combinación, en comparación con el grupo de Ig de control negativo o los grupos de terapia de agente individual (ATG, Ig de control + TGF β 1).

10 Anticuerpos para ADNdc - La mayoría de los ratones del grupo de control negativo (Ig de conejo normal), así como de los grupos tratados con TGF- β 1 latente + Ig de control y ATG, desarrollaron gradualmente títulos crecientes de anticuerpos IgG contra ADNdc con cinéticas comparables. A modo de comparación, se produjo un retraso considerable en la aparición de títulos anti-ADNdc en el grupo tratado con la combinación de ATG y TGF- β 1 latente (Figura 6). Se cree que la deposición de los complejos inmunes (complejos ADN-anti-ADN) en los glomérulos desempeña un papel importante en la inflamación y la patología renal característica del lupus. Sin embargo, la inhibición aparente en el desarrollo de anticuerpos para ADNdc en el grupo de tratamiento de combinación no pudo atribuirse completamente a la conservación de la función del riñón, ya que existía una mala correlación entre los títulos de anticuerpos y el grado de proteinuria al final del estudio.

20 Supervivencia - La dosificación con ATG y/o TGF- β 1 latente fue bien tolerada y no dio lugar a ningún episodio adverso obvio. Todas las muertes, excepto la de un animal del grupo de TGF- β 1 latente + Ig de control, estaban asociadas a niveles muy elevados de proteinuria y presumiblemente fueron consecuencia de un fallo renal. Todos los grupos de tratamiento mostraron una mejoría general en la supervivencia cuando se compararon con el grupo tratado con Ig de conejo de control negativo (Figura 7). El grado más elevado de supervivencia (100%) se observó en los grupos de tratamiento con ciclofosfamida y de tratamiento de combinación con ATG/TGF- β 1 latente, seguido de los grupos de tratamiento con ATG (90%) y TGF- β 1 latente + Ig de control (70%). El grupo de Ig de control negativo tuvo solamente un 40% de tasa de supervivencia al final del estudio.

30 Histología - Los resultados de los análisis histológicos se presentan en la Tabla 6. Los ratones tratados con ATG y TGF- β 1 latente exhibieron grados menores de glomerulopatía en comparación con los ratones de control o ratones que recibieron ATG solamente o TGF- β 1 latente e Ig de control. Estos descubrimientos histológicos se correlacionan con los hallazgos clínicos de proteinuria/albuminuria reducidas y de mejoría de la supervivencia en los animales tratados con la combinación.

Se observó una disminución mínima en las puntuaciones de inflamación en los grupos tratados con ATG, TGF- β 1 latente + Ig de control, y la combinación de ATG y TGF- β 1 latente, en comparación con el grupo tratado con IgG de conejo de control solamente.

35 Tabla 6

Grupo de tratamiento	Puntuación de glomérulos	Puntuación de inflamación
IgG de conejo de control	4,3 $\pm$ 1,4	2,8 $\pm$ 0,4
TGF- β 1 latente	3,1 $\pm$ 0,8	2,6 $\pm$ 0,5
ATG	2,7 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,5
ATG + TGF- β 1 latente	2,3 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 0,5
Ciclofosfamida	1,0 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,5

40 Se llevó a cabo un estudio repetido con ratones MRL/MPJ-Tnfrs6^{lpr} siguiendo el mismo régimen de tratamiento como se describe anteriormente. En este caso, el estudio se extendió hasta las 40 semanas de edad (en lugar de las 24 semanas en el primer estudio) para evaluar la durabilidad del efecto del tratamiento transitorio con ATG + TGF- β 1 latente. Los resultados mostraron un beneficio de supervivencia a largo plazo. Se observó una tasa de supervivencia del 90% en ratones tratados con ATG y TGF- β 1 latente, en comparación con un 30% de supervivencia en ratones que recibieron Ig de conejo de control, y un 10% de supervivencia en el grupo tratado con ATG. Esto se compara favorablemente con la ciclofosfamida, que proporcionó un 100% de supervivencia pero requirió inyecciones semanales crónicas en lugar de un único curso temporal de tratamiento con ATG + TGF- β 1 latente (Figura 8).

Se llevó a cabo un estudio similar con ratones NZB/NZWF1, otro modelo de lupus espontáneo. Se usó el mismo régimen de tratamiento y, en estas condiciones, no se observó ningún efecto estadísticamente significativo del tratamiento con ATG y TGF- β 1 latente o con cualquier agente solo, en el curso o gravedad de la enfermedad. Debido a diferencias en las características y la cinética de la enfermedad entre los dos modelos, es probable que el régimen de tratamiento necesite ser optimizado para la raza NZB/NZWF1.

Para investigar el mecanismo de acción que subyace a la actividad de ATG + TGF- β 1, se cultivaron in vitro células de bazo de ratones MRL/lpr con lupus con ATG +/- TGF- β 1, y las células recuperadas se analizaron mediante FACS para determinar la presencia de Tregs. Las células de bazo reunidas procedentes de diez ratones MRL/lpr con enfermedad activa (-25 semanas de edad) se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en medio AIM-V libre de suero (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y glutamina 2 mM. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos que contenían 2 ml de células/pocillo en seis condiciones diferentes (8 pocillos/condición): 1) células solamente, 2) ATG (100 μ g/ml) + TGF- β 1 activo (10 ng/ml; Genzyme), 3) ATG solamente (100 μ g/ml), 4) IgG de conejo de control (100 μ g/ml) + TGF- β 1 activo (10 ng/ml), 5) IgG de conejo de control solamente (100 μ g/ml), y 6) TGF- β 1 activo solamente (10 ng/ml). Se usó TGF- β 1 activo para imitar el proceso de activación que se produciría normalmente in vivo. Las células se incubaron durante cinco días a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, las células de cada condición de cultivo se reunieron, se lavaron en disolución salina tamponada con fosfato, se contaron y se tiñeron para el análisis mediante FACS. Se tiñó un total de 5×10^5 células por muestra con anti-CD4 de ratón de rata conjugado con Alexa 488 (nº de cat. 557667; BD Pharmingen, San Diego, CA) y anti-CD25 de ratón de rata conjugado con PerCp-Cy5.5 (nº de cat. 551071; BD Pharmingen). Para la detección intracelular de FOXP3, las células teñidas para CD4/CD25 superficial se permeabilizaron toda la noche y se tiñeron usando el kit de tinción de FOXP3 (nº de cat. 72-5775) de eBioscience (San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizó una adquisición de 6.000 linfocitos por tratamiento para tinción en un sistema FACS Calibur (Becton Dickinson, San Diego, CA). Los resultados se expresan como el número absoluto de células de cada fenotipo recuperado en cada condición de cultivo (porcentaje de células positivas mediante FACS x número total de células recuperadas del cultivo).

Como se muestra en la Figura 9, el número de células T CD4⁺CD25⁺ recuperadas fue el más elevado en cultivos que contienen ATG + TGF- β 1. Las células T reguladoras expresan típicamente un fenotipo CD4⁺CD25⁺, pero las células T activadas también pueden exhibir este fenotipo. Una tinción de FOXP3 adicional proporciona pruebas adicionales de un fenotipo Treg, y los resultados obtenidos confirmaron que el tratamiento con ATG+TGF- β 1 produjo el mayor más elevado de Tregs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. El tratamiento con ATG solo también pareció conducir a un ligero aumento en esta población (en comparación con las células solas), que se vio potenciado por la adición de TGF- β 1. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el tratamiento con ATG + TGF- β 1 puede promover la expansión de Tregs, y que tales células pueden proporcionar un beneficio terapéutico en condiciones de autoinmunidad.

Modelo murino de artritis

El efecto de ATG +/- TGF- β 1 se evaluó en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno. Para inducir la enfermedad, se inmunizaron ratones DBA/1 (Jackson Laboratory) en el día 0 con colágeno bovino de tipo II (nº de cat. 2002-2, Chondrex) en adyuvante completo de Freund en un volumen total de 100 μ l en la base de la cola. Se administró una inmunización de recuerdo con colágeno en adyuvante incompleto de Freund en el día 22. El tratamiento con ATG o IgG de conejo de control consistió en dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 500 μ g (~25 mg/kg) suministradas con tres días de diferencia (días 23 y 26). TGF- β 1 latente se administró a partir de los días 28-37 como diez inyecciones i.p. diarias de 4 μ g por ratón. Una dosis de 4 μ g de TGF- β 1 latente corresponde a una dosis de 1 μ g (~0,05 mg/kg) de la porción activa (madura, no asociada a LAP) de la molécula. Los grupos de tratamiento incluyeron (1) IgG de conejo de control, (2) IgG de conejo de control + TGF- β 1 latente, (3) ATG, y (4) ATG + TGF- β 1 latente, con diez animales por grupo. Comenzando el día 21, los ratones individualmente se examinaron y se puntuaron en función de los signos clínicos de enfermedad 2-3 veces por semana. La escala de puntuación artrítica se define en la Tabla 7.

Tabla 7

Puntuación de gravedad	Patología general
0	Sin signos de eritema e hinchamiento
1	Eritema e hinchamiento leve confinado a la parte media de la pata (tarsales) o la articulación del tobillo

Puntuación de gravedad	Patología general
2	Eritema e hinchamiento leve que se extiende desde el tobillo hacia la parte media de la pata
3	Eritema e hinchamiento moderado que se extiende desde el tobillo hacia las articulaciones metatarsales
4	Eritema e hinchamiento grave que abarca el tobillo, el pie y los dedos
Cada pata se analiza individualmente, y la puntuación artrítica para un ratón dado es la suma de las puntuaciones para todas las patas (puntuación máxima de 16)	

El tratamiento con ATG sola dio como resultado una reducción en las puntuaciones de enfermedad, y la adición de TGF- β 1 latente no pareció proporcionar un beneficio adicional en las condiciones evaluadas. Los resultados se muestran en la tabla 8.

5 Tabla 8

Puntuación artrítica (Media $\pm$ SEM)

Día	lg de conejo	lg de conejo + TGF- β 1 latente	ATG	ATG + TGF- β 1 latente
22	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
26	2,7 $\pm$ 2,3	3,7 $\pm$ 2,5	2,8 $\pm$ 2,6	5,0 $\pm$ 3,5
29	10,0 $\pm$ 4,2	10,1 $\pm$ 4,3	3,4 $\pm$ 4,9	5,8 $\pm$ 5,3
32	10,5 $\pm$ 4,4	11,6 $\pm$ 3,0	5,5 $\pm$ 6,0	6,6 $\pm$ 5,1
35	10,5 $\pm$ 4,4	12,0 $\pm$ 2,7	6,5 $\pm$ 5,9	7,6 $\pm$ 4,3
39	10,9 $\pm$ 3,9	12,9 $\pm$ 2,0	7,0 $\pm$ 5,5	8,1 $\pm$ 3,3
41	11,0 $\pm$ 4,1	12,5 $\pm$ 2,8	7,3 $\pm$ 5,2	8,8 $\pm$ 3,6
43	11,7 $\pm$ 3,7	13,4 $\pm$ 1,8	7,5 $\pm$ 5,4	8,9 $\pm$ 3,8
46	11,5 $\pm$ 4,5	13,4 $\pm$ 2,8	9,5 $\pm$ 5,1	9,1 $\pm$ 3,5
50	12,7 $\pm$ 3,0	13,5 $\pm$ 2,1	9,5 $\pm$ 4,9	9,0 $\pm$ 3,7
53	12,4 $\pm$ 4,0	13,8 $\pm$ 2,1	9,6 $\pm$ 4,8	9,3 $\pm$ 3,7
57	12,4 $\pm$ 4,0	13,8 $\pm$ 2,1	9,6 $\pm$ 4,8	9,3 $\pm$ 3,7

10 La artritis inducida por colágeno es un modelo animal de corto plazo, en el que el tratamiento tiene lugar en una escala temporal de semanas, en lugar de meses como en el modelo de lupus. Esta escala de tiempo más corta podría ser insuficiente para observar el beneficio añadido de administrar TGF- β 1 con la ATG, que se observa en el modelo de lupus. De este modo, diferentes regímenes de dosificación o una evaluación adicional de modelos animales adicionales pueden demostrar los beneficios de la administración combinada de ATG y TGF- β latente.

Modelo murino de uveítis

El efecto de ATG +/- TGF- β 1 se evaluó en un modelo de ratón de uveítis. Para inducir la enfermedad, se inmunizaron ratones B10.RIII (Jackson Laboratory) subcutáneamente en el día 0 con 100 μ g de los aminoácidos 161-180 de la proteína de unión retinoide interfotorreceptora (IRBP₁₆₁₋₁₈₀) (síntesis a medida, New England Peptide) en adyuvante completo de Freund en dos sitios (entre los omoplatos y en la región pélvica). Comenzando en el día 10, se llevaron a cabo exámenes de fondo de ojos en ratones individuales y se asignó una puntuación de enfermedad. Para llevar a cabo el examen, se dilataron los ojos de los ratones usando una o dos gotas de Mydracyl™ 1% (nº de cat. 1120, JA Webster), y se dejaron reposar en una habitación a oscuras durante aproximadamente cinco minutos. Los ratones fueron sujetos manualmente y se visualizaron las retinas de ambos ojos usando un oftalmoscopio indirecto con una lente de 78 dioptrías. Se asignó una puntuación para inflamación a los ojos usando un sistema de puntuación progresiva entre 0 y 5, como se describe en la Tabla 9.

Tabla 9

Puntuación	Patología general
0	Retina normal
1	Inflamación vascular próxima al nervio óptico
2	>10 lesiones inflamatorias confinadas en un cuadrante del ojo
3	>10 lesiones inflamatorias en más de un cuadrante del ojo
4	Las lesiones inflamatorias están contiguas
5	Desprendimiento de retina

El tratamiento con ATG o IgG de conejo de control se inició al comienzo de la enfermedad (puntuación de 1) y consistió en dos inyecciones i.p. de 500 μ g (~25 mg/kg) administradas con cuatro días de diferencia (días 10 y 14). TGF- β 1 latente se administró a partir de los días 15-27 como trece inyecciones i.p. diarias de 4 μ g por ratón. Una dosis de 4 μ g de TGF- β 1 latente corresponde a una dosis de 1 μ g (~0,05 mg/kg) de la porción activa (madura, no asociada a LAP) de la molécula. Los grupos de tratamiento incluyeron (1) control de disolución salina tamponada con fosfato (PBS), (2) IgG de conejo de control, (3) IgG de conejo de control + TGF- β 1 latente, (4) ATG, y (5) ATG + TGF- β 1 latente, con seis animales por grupo. El tratamiento con ATG sola dio como resultado una reducción en las puntuaciones de enfermedad, y la adición de TGF- β 1 latente no proporcionó un beneficio adicional en las condiciones evaluadas. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Puntuación de uveítis (Media $\pm$ SEM)					
Día	PBS	Ig de conejo	Ig de conejo + TGF- β 1 latente	ATG	ATG + TGF- β 1 latente
8	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
10	1,25 $\pm$ 0,16	1,22 $\pm$ 0,15	1,29 $\pm$ 0,18	1,13 $\pm$ 0,13	1,13 $\pm$ 0,23
14	4,00 $\pm$ 0,00	3,17 $\pm$ 0,32	3,67 $\pm$ 0,22	2,10 $\pm$ 0,48	2,17 $\pm$ 0,34
17	3,81 $\pm$ 0,10	3,00 $\pm$ 0,35	3,58 $\pm$ 0,29	1,75 $\pm$ 0,37	2,00 $\pm$ 0,37
21	3,81 $\pm$ 0,10	2,58 $\pm$ 0,34	3,33 $\pm$ 0,33	1,92 $\pm$ 0,42	2,08 $\pm$ 0,31
24	3,94 $\pm$ 0,06	2,58 $\pm$ 0,42	3,50 $\pm$ 0,34	2,00 $\pm$ 0,41	1,92 $\pm$ 0,36
29	3,75 $\pm$ 0,11	2,27 $\pm$ 0,47	3,33 $\pm$ 0,33	2,08 $\pm$ 0,42	2,00 $\pm$ 0,40

35	3,88 ± 0,09	2,25 ± 0,46	3,33 ± 0,40	1,92 ± 0,40	2,00 ± 0,35
46	3,56 ± 0,13	2,09 ± 0,41	3,25 ± 0,39	2,00 ± 0,44	1,92 ± 0,40
56	3,69 ± 0,12	2,17 ± 0,44	3,25 ± 0,39	1,67 ± 0,38	1,75 ± 0,25

El modelo de uveítis es un modelo animal de corto plazo, en el que el tratamiento tiene lugar en una escala temporal de semanas, en lugar de meses como en el modelo de lupus. Esta escala de tiempo más corta podría ser insuficiente para observar el beneficio añadido de administrar TGF- β 1 con la ATG, que se observa en el modelo de lupus. De este modo, diferentes regímenes de dosificación o una evaluación adicional de modelos animales pueden mostrar los beneficios de la administración combinada de ATG y TGF- β latente.

Otros casos de la presente descripción se describen a continuación, y se denominan como E1 a E21.

E1. Un método para tratar un mamífero con una enfermedad autoinmune, comprendiendo el método:

(a) agotar los linfocitos en circulación en el mamífero,

(b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse, y

(c) durante la fase de repoblación de (b), administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de TGF- β latente y/o otro agente que promueva la expansión de células T reguladoras.

E2. El método de E1, en el que el mamífero es un ser humano.

E3. El método de E2, en el que la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico.

E4. El método de E2, en el que la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple.

E5. El método de E1, en el que los linfocitos agotados son predominantemente células T.

E6. El método de E1, en el que los linfocitos se agotan administrando un agente escogido del grupo que consiste en anticuerpo antitimocítico, anticuerpo anti-CD52, y anticuerpo anti-CD3.

E7. El método de E6, en el que el anticuerpo antitimocítico se escoge del grupo que consiste en Thymoglobulin[®], Atgam[™], Fresenius[™], y Tecelac[™].

E8. El método de E1, en el que las células T reguladoras son células T CD4⁺ CD25⁺.

E9. El método de E1, en el que TGF- β latente comprende TGF- β maduro y uno o ambos de los siguientes:

(a) péptido asociado a la latencia (LAP); y

(b) proteína de unión a TGF- β latente (LTBP).

E10. El método de E1, en el que TGF- β latente es TGF- β 1.

E11. El método de E1, en el que TGF- β latente se administra sistémicamente.

E12. El método de E1, en el que el agente que promueve la expansión de células T reguladoras es uno o más agentes escogidos del grupo que consiste en:

(1) IL-10,

(2) IL-4,

(3) IFN- α ,

(4) vitamina D3,

(5) dexametasona, y

(6) micofenolato mofetilo.

E13. El método de E1, en el que el agente que promueve la expansión de células T reguladoras es rapamicina.

E14. El método de E1, en el que la enfermedad autoinmune está asociada con una pérdida de función renal, y el tratamiento da como resultado la ralentización de la pérdida o la mejora de la función renal del mamífero.

5 E15. El método de E14, en el que la ralentización de la pérdida o la mejora de la función renal está indicada mediante un cambio en la tensión arterial sistémica, proteinuria, albuminuria, velocidad de filtración glomerular y/o flujo sanguíneo renal.

E16. El método de E14, en el que la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, síndrome de Wegener, nefropatía de IgA, nefropatía de IgM, u otra enfermedad autoinmune que altera la función renal.

E17. Un método para tratar un mamífero con una enfermedad autoinmune, que comprende:

- 10 (a) administrar un anticuerpo antilinfocítico al mamífero, reduciendo de ese modo la población de células T de sangre periférica; y
- (b) administrar TGF- β latente al mamífero en una cantidad eficaz para ralentizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas.

E18. Uso de TGF- β latente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad autoinmune.

15 E19. El uso de E18, en el que la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, síndrome de Wegener, nefropatía de IgA, nefropatía de IgM, u otra enfermedad autoinmune que altera la función renal.

E20. El uso de E18, en el que dicho tratamiento incluye la administración de un anticuerpo antilinfocítico.

20 E21. Uso de un anticuerpo antilinfocítico en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, en el que dicho tratamiento incluye la administración de TGF- β latente y/u otro agente que estimula células T reguladoras.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genzyme Corporation

<120> MÉTODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES AUTOINMUNES

25 <130> P33098EP-D1-PCT

<140> No asignado todavía

<141> 2007-04-11

<150> US 60/744.713

<151> 2006-04-12

30 <160> 3

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 391

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 547 333 T3

Met	Pro	Pro	Ser	Gly	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	
1				5					10					15		
Trp	Leu	Leu	Val	Leu	Thr	Pro	Gly	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Thr	
			20					25					30			
Cys	Lys	Thr	Ile	Asp	Met	Glu	Leu	Val	Lys	Arg	Lys	Arg	Ile	Glu	Ala	
		35					40					45				
Ile	Arg	Gly	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Ile	Ala	Ser	Pro	Pro	Ser	
	50					55					60					
Gln	Gly	Glu	Val	Pro	Pro	Gly	Pro	Leu	Pro	Glu	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	
65					70					75					80	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Arg	Asp	Arg	Val	Ala	Gly	Glu	Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	
				85					90					95		
Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Glu	Val	Thr	Arg	Val	Leu	
			100					105					110			
Met	Val	Glu	Thr	His	Asn	Glu	Ile	Tyr	Asp	Lys	Phe	Lys	Gln	Ser	Thr	
		115					120					125				

ES 2 547 333 T3

His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val
130 135 140

Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Arg
145 150 155 160

Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser
165 170 175

Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp
180 185 190

Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp
195 200 205

Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Ile Ser Ala His Cys
210 215 220

Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe
225 230 235 240

Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Thr Ala Ile His Gly Met Asn Arg
245 250 255

Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu
260 265 270

Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser
275 280 285

Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg
290 295 300

Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala
305 310 315 320

Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Ile Asp Thr Gln
325 330 335

Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser
340 345 350

Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val
355 360 365

Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile
370 375 380

Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
385 390

<210> 2

<211> 442

ES 2 547 333 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met His Tyr Cys Val Leu Ser Ala Phe Leu Ile Leu His Leu Val Thr
1 5 10 15

Val Ala Leu Ser Leu Ser Thr Cys Ser Thr Leu Asp Met Asp Gln Phe
20 25 30

Met Arg Lys Arg Ile Glu Ala Arg Ile Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu
35 40 45

Lys Ile Thr Ser Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Glu Val Pro
50 55 60

Pro Glu Val Ile Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Leu Leu Gln Glu
65 70 75 80

Lys Ala Ser Arg Arg Ala Ala Ala Cys Glu Arg Glu Arg Ser Asp Glu
85 90 95

Glu Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Tyr Lys Ile Asp Met Pro Pro Phe Phe
100 105 110

Pro Ser Glu Thr Val Cys Pro Val Val Thr Thr Pro Ser Gly Ser Val
115 120 125

Gly Ser Leu Cys Ser Arg Gln Ser Gln Val Leu Cys Gly Tyr Leu Asp
130 135 140

Ala Ile Pro Pro Thr Phe Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val Arg Phe

ES 2 547 333 T3

145		150		155		160
Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu Val Lys Ala Glu						
		165		170		175
Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg Val Pro Glu Gln						
		180		185		190
Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser Pro						
		195		200		205
Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu Gly						
		210		215		220
Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu His						
		225		230		235
His Lys Asp Arg Asn Leu Gly Phe Lys Ile Ser Leu His Cys Pro Cys						
		245		250		255
Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn Tyr Ile Ile Pro Asn Lys Ser Glu						
		260		265		270
Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr Ser Thr Tyr Thr						
		275		280		285
Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys Lys Asn Ser Gly						
		290		295		300
Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser Tyr Arg Leu Glu						
		305		310		315
Ser Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala Tyr						
		325		330		335
Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr Ile						
		340		345		350
Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly						
		355		360		365
Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr Leu Trp Ser Ser						

ES 2 547 333 T3

370

375

380

Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Asn Pro
385 390 395 400

Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu
405 410 415

Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser
420 425 430

Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
435 440

<210> 3

<211> 412

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Met His Leu Gln Arg Ala Leu Val Val Leu Ala Leu Leu Asn
1 5 10 15

Phe Ala Thr Val Ser Leu Ser Leu Ser Thr Cys Thr Thr Leu Asp Phe
20 25 30

Gly His Ile Lys Lys Lys Arg Val Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu
35 40 45

Ser Lys Leu Arg Ile Thr Ser Pro Pro Glu Pro Thr Val Met Thr His
50 55 60

Val Pro Tyr Gln Val Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Glu Leu Leu
65 70 75 80

Glu Glu Met His Gly Glu Arg Glu Glu Gly Cys Thr Gln Glu Asn Thr
85 90 95

Glu Ser Glu Tyr Tyr Ala Lys Glu Ile His Lys Phe Asp Met Ile Gln
100 105 110

Gly Leu Ala Glu His Asn Glu Leu Ala Val Cys Pro Lys Gly Ile Thr
115 120 125

ES 2 547 333 T3

Ser Lys Val Phe Arg Phe Asn Val Ser Ser Val Glu Lys Asn Arg Thr
 130 135 140
 Asn Leu Phe Arg Ala Glu Phe Arg Val Leu Arg Val Pro Asn Pro Ser
 145 150 155 160
 Ser Lys Arg Asn Glu Gln Arg Ile Glu Leu Phe Gln Ile Leu Arg Pro
 165 170 175
 Asp Glu His Ile Ala Lys Gln Arg Tyr Ile Gly Gly Lys Asn Leu Pro
 180 185 190
 Thr Arg Gly Thr Ala Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Thr Val
 195 200 205
 Arg Glu Trp Leu Leu Arg Arg Glu Ser Asn Leu Gly Leu Glu Ile Ser
 210 215 220
 Ile His Cys Pro Cys His Thr Phe Gln Pro Asn Gly Asp Ile Leu Glu
 225 230 235 240
 Asn Ile His Glu Val Met Glu Ile Lys Phe Lys Gly Val Asp Asn Glu
 245 250 255
 Asp Asp His Gly Arg Gly Asp Leu Gly Arg Leu Lys Lys Gln Lys Asp
 260 265 270
 His His Asn Pro His Leu Ile Leu Met Met Ile Pro Pro His Arg Leu
 275 280 285
 Asp Asn Pro Gly Gln Gly Gly Gln Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Thr
 290 295 300
 Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu
 305 310 315 320
 Tyr Ile Asp Glu Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro
 325 330 335
 Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Leu Arg
 340 345 350
 Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu
 355 360 365
 Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu
 370 375 380
 Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln
 385 390 395 400
 Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
 405 410

REIVINDICACIONES

1. Uso de TGF- β latente y/u otro agente que promueve la expansión de células T reguladoras para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un mamífero seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple, en el que el tratamiento comprende:

- 5 (a) agotar los linfocitos T en circulación en el mamífero,
 (b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse, y
 (c) durante la fase de repoblación de (b), administrar el medicamento al mamífero,

y en el que el agente que promueve la expansión de células T reguladoras es rapamicina o uno o más agentes escogidos del grupo que consiste en (1) IL-10, (2) IL-4, (3) IFN- α , (4) vitamina D3, (5) dexametasona, y (6) micofenolato mofetilo.

10

2. Una composición que comprende TGF- β latente y/u otro agente que promueve la expansión de células T reguladoras, para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un mamífero seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple, en el que el tratamiento comprende:

- 15 (a) agotar los linfocitos T en circulación en el mamífero,
 (b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse, y
 (c) durante la fase de repoblación de (b), administrar la composición al mamífero,

y en el que el agente que promueve la expansión de células T reguladoras es rapamicina o uno o más agentes escogidos del grupo que consiste en (1) IL-10, (2) IL-4, (3) IFN- α , (4) vitamina D3, (5) dexametasona, y (6) micofenolato mofetilo.

20

3. El uso de la reivindicación 1, o de la composición para uso según la reivindicación 2, en el que el mamífero es un ser humano.

4. El uso de la reivindicación 1 o reivindicación 3, o de la composición para uso según la reivindicación 2 o reivindicación 3, en el que los linfocitos se agotan administrando un agente escogido del grupo que consiste en un anticuerpo antitimocítico, un anticuerpo anti-CD52, y un anticuerpo anti-CD3.

25

5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o la composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que las células T reguladoras son células T CD4⁺ CD25⁺.

6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 o 5, o la composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que TGF- β latente comprende TGF- β maduro y uno o ambos de los siguientes:

- 30 (a) péptido asociado a la latencia (LAP); y
 (b) proteína de unión a TGF- β latente (LTBP).

7. El uso de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5 o 6, o la composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que TGF- β latente es TGF- β 1.

8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 6 o 7, o la composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que TGF- β latente se administra sistémicamente.

35

9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 6, 7 u8, o la composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que la enfermedad autoinmune está asociada con una pérdida de función renal, y el tratamiento da como resultado una ralentización de la pérdida o una mejora de la función renal del mamífero.

40

10. El uso de la reivindicación 9, o la composición para uso según la reivindicación 9, en el que la ralentización de la pérdida de o la mejora de la función renal está indicada mediante un cambio en la tensión arterial sistémica, proteinuria, albuminuria, velocidad de filtración glomerular, y/o flujo sanguíneo renal.

11. Uso de TGF- β latente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un mamífero seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple, en el que el tratamiento comprende:

- 45 (a) administrar un anticuerpo antilinfocítico al mamífero, reduciendo de ese modo la población de células T de sangre periférica; y

(b) administrar el medicamento al mamífero en una cantidad eficaz para ralentizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas.

5 12. Una composición que comprende TGF- β latente para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un mamífero seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple, en la que el tratamiento comprende:

(a) administrar un anticuerpo antilinfocítico al mamífero, reduciendo de ese modo la población de células T de sangre periférica; y

(b) administrar la composición al mamífero en una cantidad eficaz para ralentizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas.

10 13. Uso de un agente de agotamiento de linfocitos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un mamífero seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple, en el que dicho tratamiento comprende:

(a) agotar los linfocitos T en circulación en el mamífero mediante la administración del medicamento,

(b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse, y

15 (c) durante la fase de repoblación de (b), administrar TGF- β latente y/u otro agente que promueve la expansión de células T reguladoras al mamífero,

en el que el agente que promueve la expansión de células T reguladoras es rapamicina o uno o más agentes escogidos del grupo que consiste en (1) IL-10, (2) IL-4, (3) IFN- α , (4) vitamina D3, (5) dexametasona, y (6) micofenolato mofetilo.

20 14. Un agente de agotamiento de linfocitos, para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un mamífero seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple, en el que dicho tratamiento comprende:

(a) agotar los linfocitos T en circulación en el mamífero mediante la administración del agente,

(b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse, y

25 (c) durante la fase de repoblación de (b), administrar TGF- β latente y/u otro agente que promueve la expansión de células T reguladoras al mamífero,

en el que el agente que promueve la expansión de células T reguladoras es rapamicina o uno o más agentes escogidos del grupo que consiste en (1) IL-10, (2) IL-4, (3) IFN- α , (4) vitamina D3, (5) dexametasona, y (6) micofenolato mofetilo.

30 15. Uso de un anticuerpo antilinfocítico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un mamífero seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple, en el que el tratamiento comprende:

(a) administrar dicho medicamento al mamífero, reduciendo de ese modo la población de células T de sangre periférica; y

35 (b) administrar TGF- β latente al mamífero en una cantidad eficaz para ralentizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas.

16. Una composición que comprende un anticuerpo antilinfocítico para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un mamífero seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple, en el que el tratamiento comprende:

40 (a) administrar dicha composición al mamífero, reduciendo de ese modo la población de células T de sangre periférica; y

(b) administrar TGF- β latente al mamífero en una cantidad eficaz para ralentizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas.

45

huTGFβ1	MPPSGRLRLPLILPLWLLVLTTPGPPAAQLSTCKTIDMELVKRRRIEATR	50
huTGFβ2	MHYCVLSAF-LILHLV---TV-----ALSLSTCSTLMDQFMKRIEARI	41
huTGFβ3	MMHLQRAL-VVLAALNFATV-----SLSLSTCTULDFGHIKKRVEAIR	44
huTGFβ1	GQILSKIRIASPFSQGEVPPGPLEPAVLALYNSTRD---RVAGESAEP-E	96
huTGFβ2	GQILSKLRITSPF-EDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACE	90
huTGFβ3	GQILSKLRITSPF-EP-TVMTHVEYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCT	92
huTGFβ1	EE-PEADYYAKEVTRVLM-----VETH	125
huTGFβ2	RERSDEEYYAKEVYKIDMPFFPSETVCPVVTTPSGSVGSLCSRQSQVLC	140
huTGFβ3	QENTSEDYAKEIHKFIM-----IQGL	123
huTGFβ1	NEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAPTRLLR-RLKLV-	165
huTGFβ2	GYLDAIPPTFYRPFYRIVRFVDVSAMEKNASNLAKAEFRVFRLLQNPKARVP	190
huTGFβ3	AEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKVRTNLFRAEFVLEVPNPSSKRN	164
huTGFβ1	EQHVELYQKYSNN-----SWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTVGVVQWLS	210
huTGFβ2	EQRTELQILKSKDLTSPTQRYLDSKVVKTRAEGEWLSFDVIDAVHEWLH	240
huTGFβ3	EQRTELQILRPDE-HIAKORYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDITREWLL	213
huTGFβ1	RGGEIDYFRISAFCS-----DSRDNTLQVDINQFTTGR---RG	246
huTGFβ2	HKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIIPNKSEELERFAGIDGTSTYTSQ	290
huTGFβ3	RRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDIL-ENIHEVMEIKFKVDNEDDHGRG	262
huTGFβ1	DLTAI-----HGMNRE--FLLMATPLERAQHLQSSRHRRALLTINYCFS	288
huTGFβ2	DQRTIKSTRKKNSGKTPHLLMLLPSYRLESQ-QTNRRKKRALDAAYCFR	339
huTGFβ3	DLGRLE---KQKDHHNHLILMMIPPHRLDNPGGGQRRKKRALDINYCFR	309
huTGFβ1	STEKNCCVRQLYIDFRKDLGWWIHEPKGYMANFCLGFCPYRLWSIDTOYS	338
huTGFβ2	NVDNCCLEFLYIDFKEDLGWWIHEPKGYMANFCAGACPYRLWSSDTHS	389
huTGFβ3	NLEENCCVRFLYIDERQDLGWWIHEPKGYMANFCSGFCPYRLSADITHS	359
huTGFβ1	KVLAALYNQHNPGASAAFPCCVFDALFPLTIVYYVORKPKVEQLSNMIVKSC	388
huTGFβ2	RVLGLYNTINHEASASPCCVSODLEPLTILYYVIGKTPKIEQLSNMIVKSC	439
huTGFβ3	TVLGLYNTINHEASASECCVFDALFPLTILYYVIGKTPKVEQLSNMIVKSC	409
huTGFβ1	KCS	391
huTGFβ2	KCS	442
huTGFβ3	KCS	412

FIG. 1

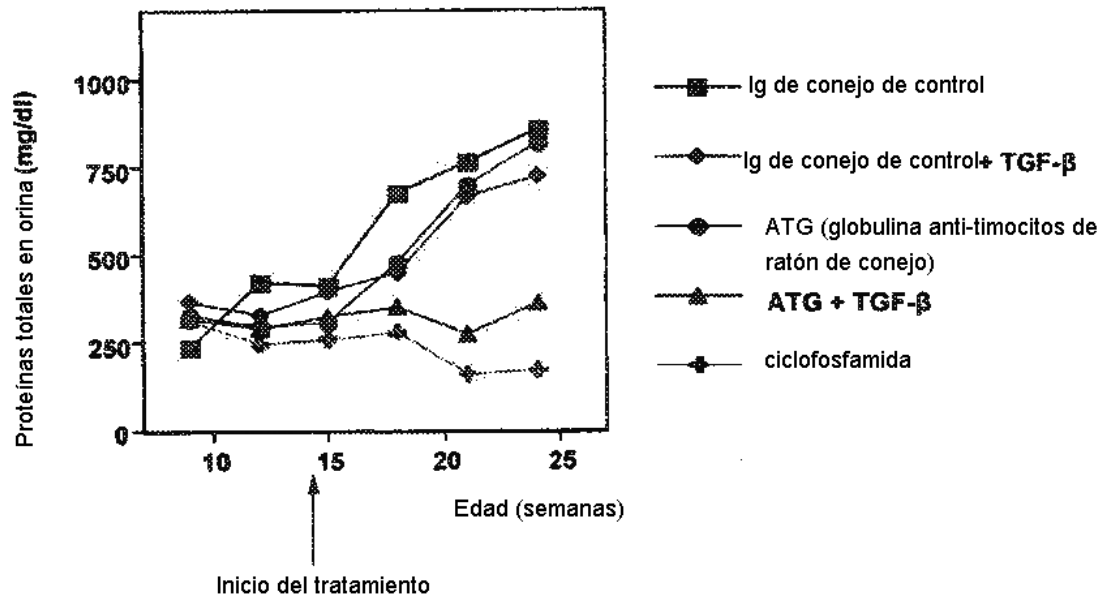


FIG. 2

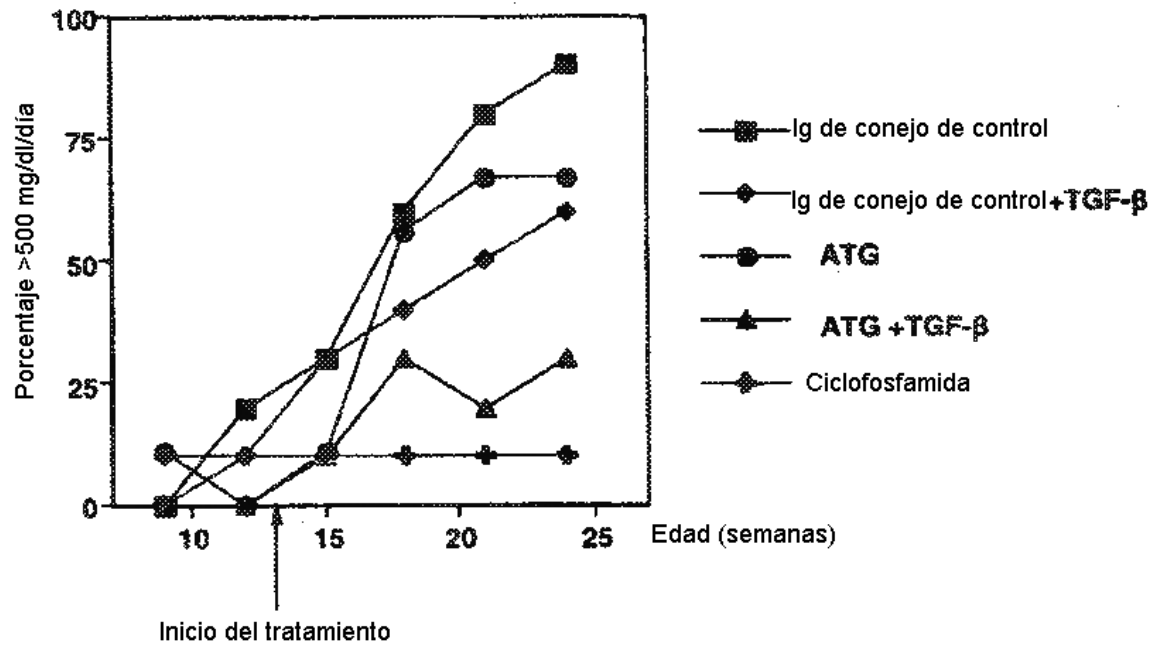


FIG. 3

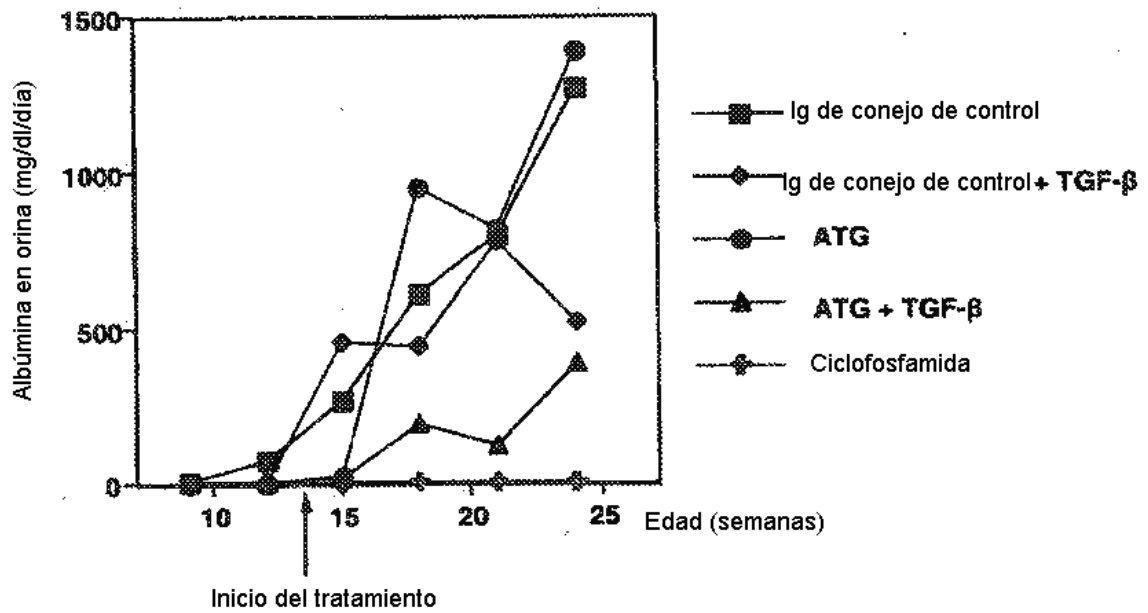
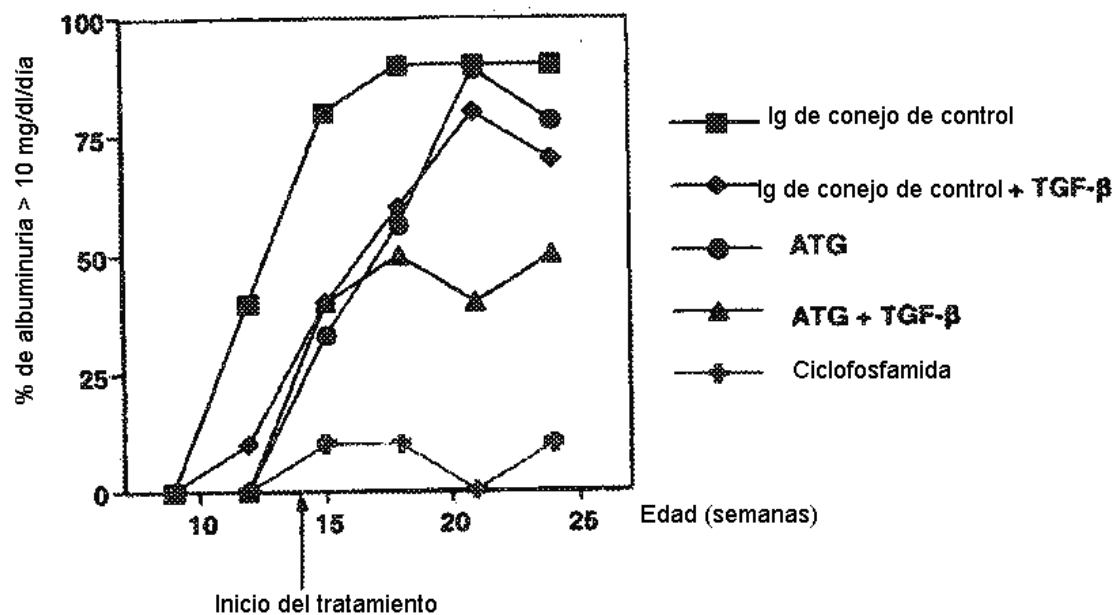


FIG. 4

**FIG. 5**

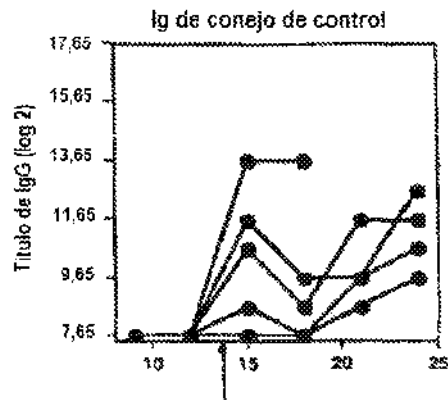


FIG. 6A

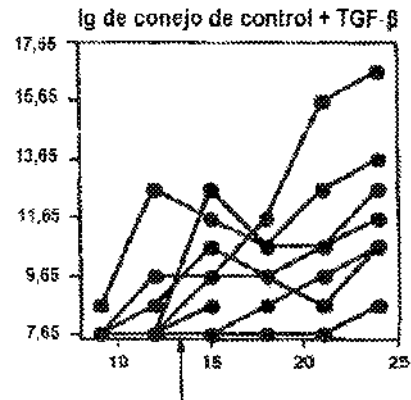


FIG. 6B

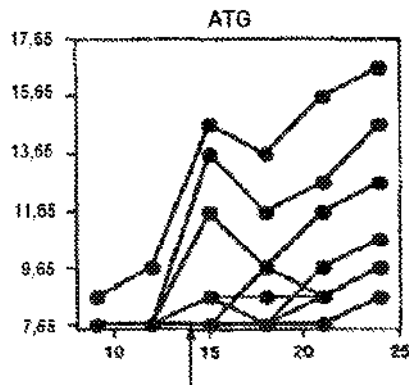


FIG. 6C

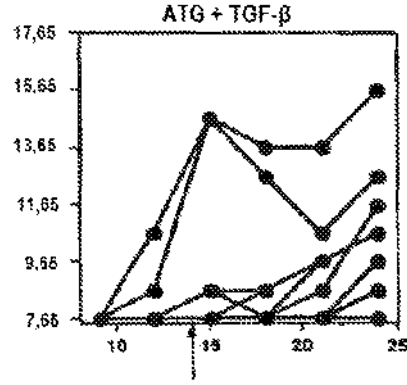


FIG. 6D

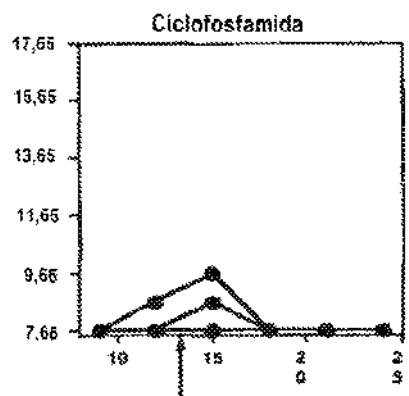


FIG. 6E

Edad
(semanas)

FIGS. 6A-6E

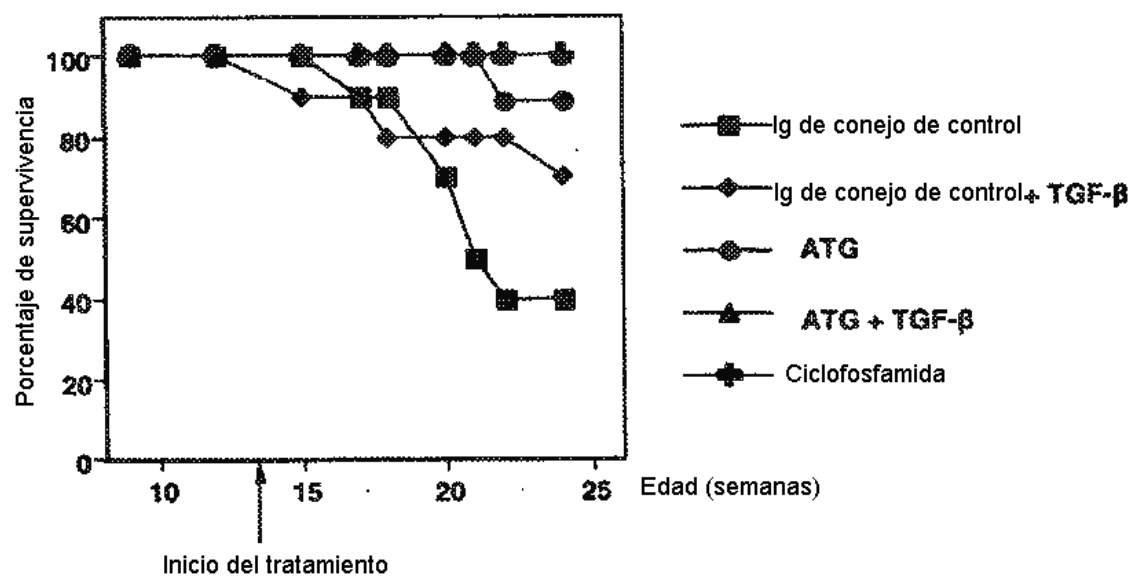
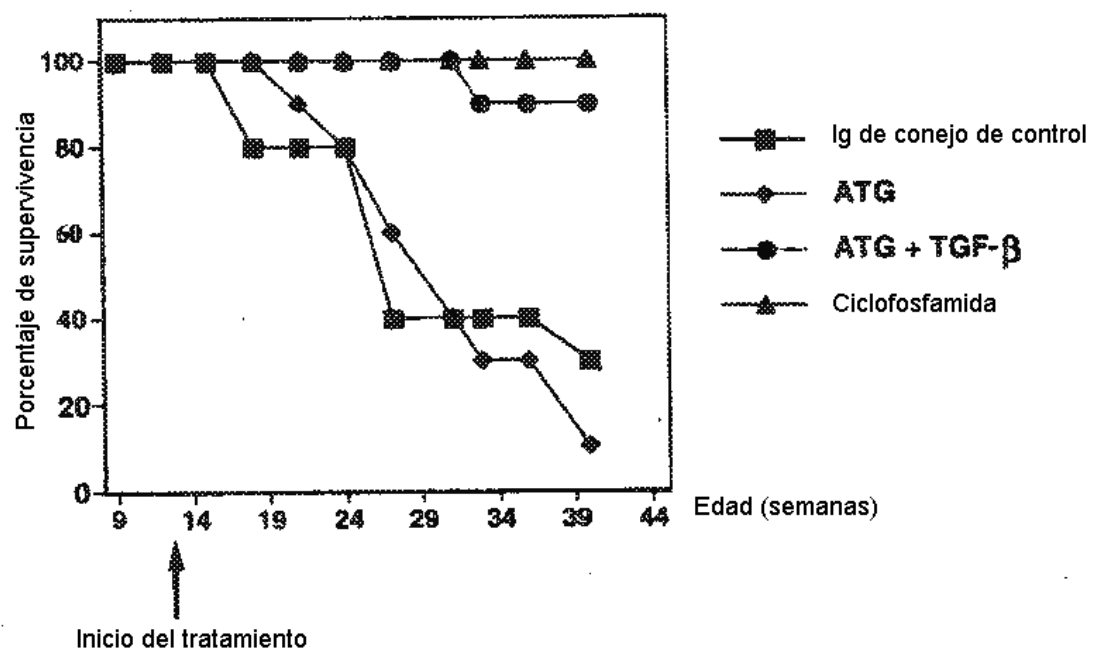


FIG. 7

**FIG. 8**

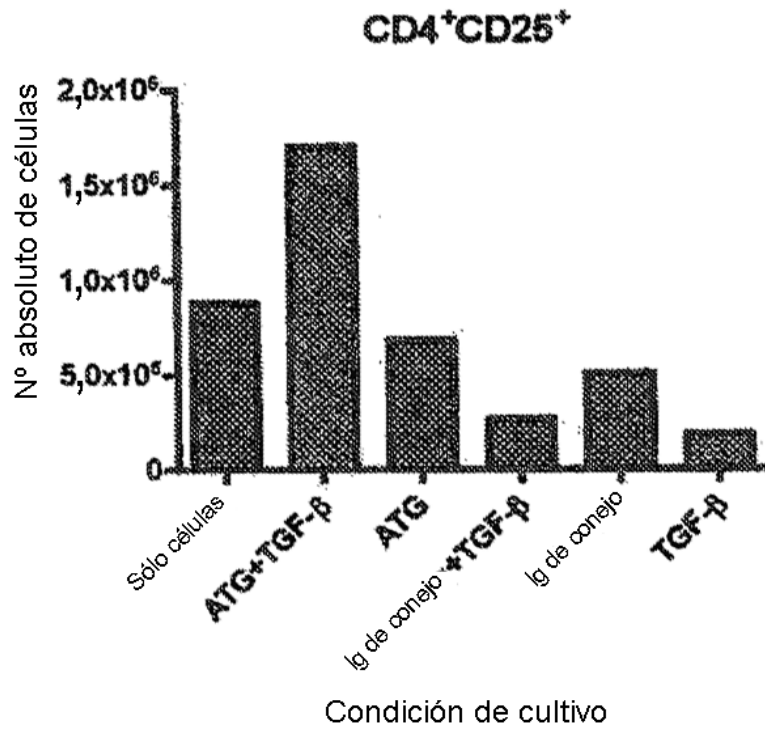


FIG. 9A

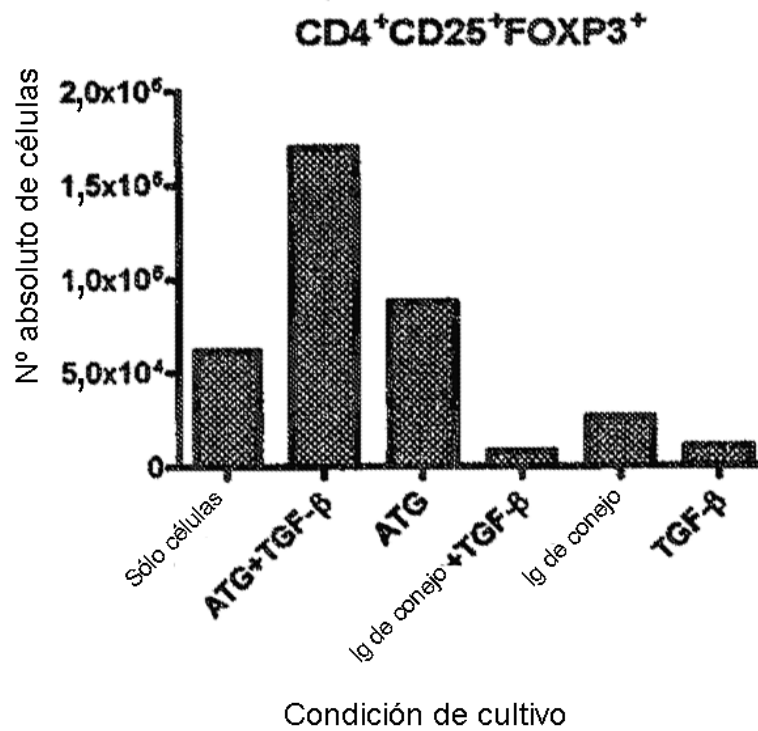


FIG. 9B