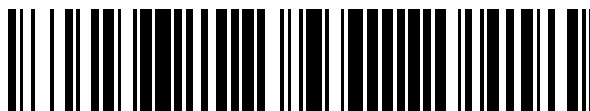


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 957**

51 Int. Cl.:
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09741834 .7**
96 Fecha de presentación: **28.04.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2288372**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2011**

54 Título: **Una muteína de IL-2 para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria**

30 Prioridad:
08.05.2008 DE 102008023820

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2012

73 Titular/es:
AiCuris GmbH & Co. KG
Friedrich-Ebert-Strasse 475
42117 Wuppertal, DE

72 Inventor/es:
PAULSEN, Daniela;
BRUNNER, Nina y
BRAY, Dorothy

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 378 957 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

Una muteína de IL-2 para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria

La presente invención se refiere a un agente para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria.

5 Las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por una reacción excesiva del sistema inmunitario contra tejidos del propio organismo. El sistema inmunitario reconoce erróneamente tejido del propio organismo como cuerpos extraños que ha de combatir. De esta manera se producen graves reacciones inflamatorias que pueden llevar a daños en órganos afectados por las mismas.

10 Los linfocitos T o células T desempeñan un papel importante para la diferenciación entre estructuras del propio organismo y extrañas, que se “instruyen” en el timo, acoplarse sólo a moléculas de superficie celular propias, las denominadas moléculas de MHC, y en este sentido tolerar estructuras del propio organismo. Estos procesos se denominan “delección clonal” y “selección clonal”. Durante la primera selección en el timo sobreviven sólo aquellas células T que pueden reconocer las moléculas de MHC sobre las membranas celulares del propio organismo, no siendo sin embargo la unión tan sólida que pudiera llevar a la activación de las células T. Las células T que no pueden unirse a o reconocer en absoluto las moléculas de MHC propias, se eliminan. En el caso de la delección clonal que tiene lugar igualmente en el timo se eliminan aquellas células T que pueden reconocer “de forma infalible” y unirse de manera sólida a las moléculas de MHC del propio organismo de tal manera que se activarían, lo que por último llevaría a la destrucción de células del propio organismo. Este proceso es una de aquellas medidas que adopta el sistema inmunitario para poder proteger lo “propio” y combatir lo “extraño”.

20 En el caso de las enfermedades autoinmunitarias, un grupo de células T se comporta de forma diferente. Además de la defensa que todavía funciona de organismos y moléculas extrañas atacan también ahora estructuras del propio organismo. Los órganos o tejidos se perciben como extraños. Las consecuencias pueden ser distintas: siempre que se vean afectadas estructuras vitales se desarrollará de forma mortal una enfermedad autoinmunitaria. El sistema inmunitario dirige su defensa contra estas estructuras, se ponen en marcha reacciones de defensa tanto celulares como humorales, se forman autoanticuerpos, lo que tiene como consecuencia que, con el transcurso del tiempo, los órganos afectados pierdan su función. La mayoría de las veces el sistema inmunitario se debilita, y el organismo será propenso a todas clases de enfermedades. En determinadas circunstancias está también perturbado el reconocimiento de cuerpos extraños, de manera que ya no puede impedirse de manera efectiva la propagación de células cancerosas degeneradas, y los afectados son propensos a enfermedades infecciosas. En el transcurso de la enfermedad, las células del sistema inmunitario destruyen las estructuras del propio organismo, mientras que los mecanismos de reparación del organismo, intentan, a ser posible, renovar las partes de órganos dañados. Este ataque erróneo del sistema de defensa se prolonga sin tratamiento, por regla general, durante toda la vida o hasta la completa destrucción de la estructura objetivo.

25 Las causas precisas de las enfermedades autoinmunitarias no están claras a pesar de la investigación intensiva. Hipótesis reconocidas parten de la base de que las enfermedades autoinmunitarias se adquieren por predisposición genética, por ejemplo por la presencia de determinadas variantes de moléculas de MHC, en combinación con influencias externas. Si en el organismo del afectado existen tales factores genéticamente relacionados, y se agregan además factores ambientales desfavorables tales como un gran estrés, infecciones, embarazo etc., pueden desencadenarse enfermedades autoinmunitarias.

40 El sistema inmunitario está compuesto por distintas células que pueden combatir agentes infecciosos que hayan penetrado en el organismo. El mecanismo de la respuesta inmunitaria comprende la activación de células especializadas y la adquisición de funciones efectoras, tales como la citotoxicidad de determinadas células T, que expresan la denominada glicoproteína transmembrana CD8 y por ello se denominan células T CD8⁺.

45 Las células T reguladoras (T_{Reg}), anteriormente denominadas también células T supresoras, son un subgrupo especializado de células T. Tienen la función de reprimir la activación del sistema inmunitario y regular de esta manera la tolerancia propia del sistema inmunitario. De esta manera impiden en el organismo sano la generación de enfermedades autoinmunitarias. Se describieron distintas poblaciones de células T Reg, incluyendo aquellas que expresan las proteínas CD4, CD25 y Foxp3 y por lo tanto se denominan células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Además se describen células T_{Reg} que, si bien expresan CD4 y Foxp3, en cambio no CD25, las denominadas células T CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺.

50 Lan y col. (2005), Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity, *Autoimmun. Rev.* 4(6), páginas 351 a 363, describen un modelo de ratón, en el que el agotamiento de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ lleva al desarrollo espontáneo de enfermedades autoinmunitarias.

55 Chatila T.A. (2005), Role of regulatory T cells in human diseases, 116(5), páginas 949 a 959, describen que una deficiencia congénita de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺, mediante una mutación en el gen que codifica para la proteína Foxp3, contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunitarias.

Una visión general de las células T reguladoras se encuentra en la revista “Nature Immunology”, que se ha publicado en marzo de 2005.

Las enfermedades autoinmunitarias se tratan según el órgano afectado. A este respecto el principio fundamental de la terapia causal es mitigar la actividad del sistema inmunitario mediante la administración de inmunosupresores, por ejemplo cortisona. Estas sustancias se caracterizan por múltiples interacciones y efectos secundarios sistémicos, por lo que intentó desarrollar varios medicamentos que influyen específicamente en mecanismos que participan en los acontecimientos de la enfermedad. Ejemplos de ello son natalizumab e infliximab. Natalizumab es un anticuerpo monoclonal e inhibidor selectivo de IgG4, una molécula de adhesión que se encuentra en la superficie de los glóbulos blancos. Natalizumab inhibe la migración de los glóbulos blancos en el foco de inflamación y se usa para el tratamiento de formas especialmente agresivas de esclerosis múltiple que transcurre de manera recidivante. Infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico frente al factor de necrosis tumoral α (TNF α), que desempeña un papel clave en las reacciones inflamatorias autoinmunitarias. Infliximab se usa en artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedad de Bechterew y psoriasis.

En Ehrenstein y col. (2004), Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy, J. Exp. Med., Vol. 200, N° 3, páginas 277-285, se describe que infliximab puede mejorar como anticuerpo monoclonal dirigido frente a TNF α la terapia de la artritis reumatoide.

Lo mismo se propone por Nadkarni y col. (2007), Anti-TNF α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β , JEM Vol. 204, páginas 33-39.

Bresson y col. (2006) proponen tratar la diabetes de tipo I mediante la administración combinada de un anticuerpo específico anti-CD3 ϵ y de un péptido proinsulina.

Vandenbark y col. (2008), Therapeutic vaccination with a trivalent T-cell receptor (TCR) peptide vaccine restores deficient FoxP3 expression and TCR recognition in subjects with multiple sclerosis, Immunology Vol. 123, páginas 66-78, describen una mejora del control de la respuesta autorreactiva en la esclerosis múltiple tras la vacunación de los pacientes con determinados péptidos de TCR.

Aunque estas nuevas sustancias actúan de forma muy específica, pueden producirse efectos secundarios graves, por ejemplo la aparición de la leucoencefalopatía multifocal progresiva. Por este motivo natalizumab se retiró del mercado sólo tres meses después de su aprobación inicial en los EE.UU. Los costes de estos nuevos principios activos son muy elevados. 300 mg de natalizumab cuestan actualmente más de 2.000 euros. 200 mg de infliximab cuestan aproximadamente 1.700 euros.

Con este trasfondo, un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo fármaco para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria, con el que se eviten en la medida de lo posible las desventajas del estado de la técnica. Especialmente se proporciona un fármaco tal que se caracteriza por una buena tolerabilidad y baja toxicidad.

Estos objetivos se alcanzan mediante la provisión de una muteína de interleucina-2 humana (muteína de hIL-2), que está numerada de manera correspondiente al tipo natural de hIL-2 y en cada caso presenta una sustitución de aminoácido específica en al menos una de las posiciones 20, 88 ó 126.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que una muteína de hIL-2 de este tipo presenta un alto potencial terapéutico, que puede aprovecharse para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades autoinmunitarias. De este modo, pudieron demostrar por ejemplo en distintos planteamientos experimentales que la muteína de hIL-2 en un ser vivo induce selectivamente la unión de células T reguladoras, tales como CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺.

Sorprendentemente, la muteína de hIL-2 según la invención muestra una actividad claramente superior sobre las células T reguladoras que el tipo natural de hIL-2. Esto se muestra especialmente en el caso de altas concentraciones.

Para la muteína de hIL-2 según la invención, en el documento WO 99/60128 se da a conocer que es más fuerte en el receptor de IL-2 de triple cadena (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) que en el receptor de IL-2 de doble cadena (IL-2R $\beta\gamma$). Tal como los inventores pudieron mostrar ahora por primera vez, la muteína de hIL-2 según la invención induce con respecto al tipo natural de hIL-2, pero sorprendentemente refuerza asimismo la unión de tales células T reguladoras, que carecen de la subunidad α del receptor de IL-2 (CD25) (CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺). Esta subpoblación contribuye adicionalmente a reprimir la activación del sistema inmunitario y de esta manera a regular la autotolerancia del sistema inmunitario. La muteína de hIL-2 según la invención presenta de este modo esencialmente una potencia mayor como principio activo para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que el tipo natural de hIL-2.

Además la muteína de hIL-2 según la invención presenta, con respecto al tipo natural de hIL-2, la ventaja adicional de que activa selectivamente células T frente a linfocitos citolíticos naturales (células NK) y de esta manera presenta un perfil de toxicidad reducido y un índice terapéutico elevado. La muteína de hIL-2 según la invención es de esta manera esencialmente más tolerable que el tipo natural de hIL-2; véase el documento WO 99/60128.

Asimismo, por medio de las células T CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺, pudo mostrarse por primera vez que la muteína de hIL-2 según la invención, en contraposición al tipo natural de hIL-2, sorprendentemente no tiene ningún efecto o sólo un

efecto reducido sobre la proliferación de células T citotóxicas CD8 positivas, que también se denominan células T CD8 “naïve, central memory, early differentiated” y “late differentiated”. En este sentido esto es ventajoso, dado que las células T citotóxicas CD8⁺ se han hecho responsables de procesos inflamatorios crónicos persistentes en enfermedades autoinmunitarias; véase Liu y col. (2007), Multiple Sclerosis, 13, S. 149, y Haeghele y col. (2007), Neuroimmunol, 183, S. 168). La muteína de hIL-2 según la invención impide por lo tanto con respecto al tipo natural de hIL-2 un refuerzo adicional de esta reacción inflamatoria provocada por células T CD8⁺, lo que representa una ventaja de tolerabilidad adicional.

Tal como pudieron mostrar también los inventores, la muteína de hIL-2 según la invención estimula además la actividad específica de antígeno de las células inmunitarias. Esto tiene la ventaja de que por medio de la muteína de hIL-2 se estimulan de forma selectiva células inmunitarias específicas de enfermedad y con ello se limita el efecto sistémico de la inmunoterapia. De esta manera se impide también que con la administración de la muteína de hIL-2 se induzcan otras enfermedades.

Además, los inventores, por medio de un modelo de ratón para la diabetes mellitus de tipo I, pudieron mostrar que puede impedirse el brote de una enfermedad autoinmunitaria mediante el tratamiento con la muteína de hIL-2 según la invención.

El objetivo en el que se basa la invención se alcanza completamente con ello.

Según la invención, por “tipo natural” de la interleucina-2 humana (tipo natural de hIL-2) se entiende un polipéptido o proteína que presenta la secuencia de aminoácidos de 133 aminoácidos, que se encuentra en IL-2 humana nativa (sin el péptido señal que consiste en 20 aminoácidos N terminales adicionales). El tipo natural de hIL-2 puede expresarse tanto de forma nativa como recombinante. La secuencia de aminoácidos de tipo natural de hIL-2 se describe en Fujita y col. (1983), PNAS USA 80, páginas 7437-7441, concretamente con y sin una metionina N terminal adicional, que está presente necesariamente cuando la proteína se expresa en *E. coli* como fracción intracelular. La secuencia de aminoácidos del tipo natural de hIL-2 se indica en el protocolo de secuencias adjunto con SEQ ID N° 1. La secuencia de nucleótidos del ADNc, que codifica para hIL-2, está indicada en el protocolo de secuencias adjunto con SEQ ID N° 2.

Según la invención, por una “muteína” de interleucina-2 humana (muteína de hIL-2) se entiende un polipéptido o proteína en el que se efectuaron sustituciones específicas con respecto al tipo natural de hIL-2. La identificación de las posiciones en las que se efectuaron las sustituciones depende de las posiciones de los aminoácidos en el tipo natural de hIL-2, que pueden deducirse por ejemplo de la SEQ ID N° 1. Por consiguiente, en la posición 1 se encuentra una alanina (A), en la posición 2 una prolina (P), en la posición 133 una treonina (T) etc. El resto ácido aspártico (D) en la posición 20 (“D20”) puede estar sustituido por ejemplo por un resto isoleucina (I) o una histidina (H), de modo que se forman muteínas de IL-2, que se denominan hIL-2-D20I o hIL-2-D20H.

Se entiende que la muteína de hIL-2 según la invención puede estar sustituida en varias de las posiciones mencionadas 20, 88 ó 126, de modo que se generan mutantes de combinación que son especialmente adecuados para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o para la inducción de células T reguladoras.

Según la invención, una muteína de hIL-2 comprende también un polipéptido modificado, por ejemplo una muteína de hIL-2 glicosilada. La muteínas de hIL-2 glicosiladas se dan a conocer por ejemplo en las solicitudes de patente estadounidenses 09/310.026 y 10/051.657.

Por una “sección” de muteína de hIL-2 se entiende un polipéptido tal, en el que con respecto a la muteína de hIL-2 faltan de manera N y/o C terminal uno o varios aminoácidos, pero éste presenta, no obstante, aún una actividad biológica suficiente de la muteína de hIL-2 para usarse según la invención para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades autoinmunitarias. Esta actividad se considera suficiente cuando la sección presenta al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 % y de manera sumamente preferente al menos el 95 % de la actividad de la muteína de hIL-2 para la inducción de células T reguladoras. La actividad de la muteína de hIL-2 puede medirse de manera sencilla por medio del procedimiento conocido por el experto. Un procedimiento de este tipo se da a conocer por ejemplo en el documento WO 99/60128, ejemplos 3 a 5 del mismo.

En el caso de las sustituciones en las posiciones mencionadas no se trata de sustituciones conservativas, mediante las que se intercambia un aminoácido por otro con propiedades bioquímicas similares.

En el caso de la sustitución en la posición 20 no se trata de aquella en la que se intercambia el ácido aspártico (D) por un ácido glutámico (E). En el caso de la sustitución en la posición 88 no se trata de aquella en la que se intercambia la asparagina (N) por una alanina (A), prolina (P), glicina (G), glutamina (Q), serina (S) o treonina (T). Asimismo, en el caso de la sustitución en la posición 126 no se trata de aquella en la que se sustituye la glutamina (Q) por una alanina (A), prolina (P), glicina (G), asparagina (N), serina (S) o treonina (T). Estas sustituciones no modificarían o sólo de forma insignificante la actividad biológica del tipo natural de hIL-2.

En las posiciones mencionadas no se efectúa ninguna de tales sustituciones que proporcionen los sitios para la reticulación intramolecular o uniones por puentes disulfuro incorrectas. Por tanto, en el caso de la sustitución de la

5 muteína de hIL-2 según la invención en la posición 20 no se trata de aquella en la que se intercambia el ácido aspártico (D) por arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), cisteína (C), ácido glutámico (E), glicina (G), leucina (L), lisina (K), fenilalanina (F), prolina (P), treonina (T) o triptófano (W). En el caso de la sustitución en la posición 88 no se trata de aquella en la que se intercambia la asparagina (N) por ácido aspártico (D), cisteína (C), glutamina (Q), triptófano (W) o prolina (P). En el caso de la sustitución en la posición 126 no se trata de aquella en la que se intercambia la glutamina (Q) por una alanina (A), histidina (H), triptófano (W), cisteína (C), glutamina (Q), ácido glutámico (E) o lisina (K).

10 La muteína de hIL-2 según la invención puede producirse mediante cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica. Tales procedimientos incluyen la construcción de una secuencia de ADN que codifica para la muteína de IL-2 según la invención y comprende por ejemplo la secuencia de nucleótidos SEQ ID N° 2 y la expresión de esta secuencia en un huésped adecuado. Este procedimiento lleva a las muteínas según la invención en forma recombinante. No obstante, la muteína según la invención puede producirse también mediante síntesis química o una combinación de síntesis química y tecnología de ADN recombinante. La producción de la muteína según la invención se describe con todo detalle en el documento WO 99/60128, ejemplos de realización 1 y 2 del mismo.

15 Una de las muteínas de hIL-2 específicas según la invención, en las que en la posición 88 se intercambia la asparagina (N) por una arginina (R) (hIL-2-N88R), se encuentra a disposición del experto con el nombre de BAY50-4798; véase Shanafelt y col. (2000), A T-cell-selective interleukin 2 mutein exhibits potent antitumor activity and is well tolerated in vivo, *Nat. Biotechnol.* Vol. 18, páginas 1197-1202. La secuencia de aminoácidos de hIL-2-N88R está indicada en el protocolo de secuencias adjunto con SEQ ID N° 3.

20 Los conocimientos de los inventores fueron especialmente tan sorprendentes porque en el estado de la técnica no puede encontrarse ninguna indicación sobre una actividad correspondiente de la muteína de IL-2.

De este modo, en el documento WO 99/60128, para la muteína hIL-2-N88R, se da a conocer que ésta puede activar selectivamente células T frente a linfocitos citotóxicos naturales y puede reducir la formación de metástasis en el pulmón.

25 En el documento WO 02/00243 se describe una formulación estable, que contiene histidina, libre de albúmina, para la muteína hIL-2- N88R.

En el documento US 2002/0164300 se describe una variante glicosilada de la muteína hIL-2-N88R.

30 El uso de la muteína de hIL-2 según la invención para el tratamiento y/o la profilaxis controlados de enfermedades autoinmunitarias o para la activación selectiva de células T reguladoras en un ser vivo, ni se describe ni se sugiere en el estado de la técnica.

Incluso para el tipo natural humano de IL-2 no existen conocimientos correspondientes.

35 Van der Vliet y col. (2007), Effects of the administration of high-dose interleukin-2 on immunoregulatory cell subsets in patients with advanced melanoma and renal cell cancer, *Clin. Cancer Res.* Vol. 13, páginas 2100-2108, describen que en el caso de la administración de altas dosis de IL-2 se reduce su eficacia terapéutica para el tratamiento de tumores.

Ahmadzadeh y Rosenberg (2006), IL-2 administration increases CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients, *Blood*, Vol. 107, páginas 2409-2414, proponen mejorar la eficacia terapéutica del tipo natural humano de IL-2 en pacientes con tumores de tal manera que se eliminen las células T reguladoras de los pacientes.

40 Este planteamiento no ha resultado sin embargo prometedor; véase Powell y col. (2007), Inability to mediate prolonged reduction of regulatory T cells after transfer of autologous CD25 depleted PBMC and interleukin-2 after lymphodepleting chemotherapy, *J. Immunother.* Vol. 30, páginas 438-447.

Antony and Restifo (2005), CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2, *J. Immunother.* Vol. 28, páginas 120-128, rechazan más bien la IL-2 como agente inmunoterápico y describen incluso que la administración de IL-2 puede inducir autoinmunidad.

45 Knoechel y col. (2005), Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen, *JEM* Vol. 202, páginas 1375-1386 apuntan en la misma dirección y proponen incluso un antagonismo de IL-2, es decir una inhibición de los mecanismos de IL-2, para tratar la fase temprana de enfermedades autoinmunitarias.

50 En el estado de la técnica no se encuentra por lo tanto ningún punto de referencia que sugiera la solución según la invención.

De este modo, los inventores han reconocido también que los efectos terapéuticos de la muteína de hIL-2 pueden ser diferentes según la indicación y la concentración usada. Una alta concentración de hIL-2 puede ser ventajosa para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, sin embargo estar contraindicada en la terapia de enfermedades tumorales.

En el caso del uso según la invención mediante la sustitución en la posición 88 se intercambia una asparagina por una arginina (hIL-2-N88R), o por una glicina (hIL-2-N88G), o por una isoleucina (hIL-2-N88I), y/o mediante la sustitución en la posición 20 se intercambia un ácido aspártico por una histidina (hIL-2-D20H), o por una isoleucina (hIL-2-D20I), o por una tirosina (hIL-2-D20Y), o mediante la sustitución en la posición 126 se intercambia una glutamina por una leucina (hIL- 2-Q126L).

Estas medidas tienen la ventaja de que se usa una muteína de hIL-2 según la invención tal, que se caracteriza porque activa de manera especialmente selectiva células T frente a linfocitos citolíticos naturales y porque presenta un alto potencial terapéutico y una baja toxicidad. Estas propiedades de las muteínas de hIL-2 según la invención preferidas se describen en el documento WO 99/60128.

Según la invención se prefiere cuando la muteína de hIL2 presenta al menos una sustitución de aminoácido adicional en una posición cualquiera, a excepción de las posiciones 20, 88 ó 126, de modo que la muteína de hIL-2 sustituida adicionalmente de este tipo, que es idéntica al menos al 80 %, preferentemente al 85 %, más preferentemente al 90 %, más preferentemente al 95 %, de manera sumamente preferente al 99 % a la secuencia de aminoácidos de la muteína de hIL-2, que no está sustituida con respecto al tipo natural de hIL-2, excepto en al menos una de las posiciones 20, 88 ó 126.

Esta medida tiene la ventaja de que se proporcionan estructuras primarias alternativas que opcionalmente son más sencillas de sintetizar que la muteína de hIL-2, que excepto en al menos una de las posiciones 20, 88 ó 126 corresponde por lo demás al tipo natural de hIL-2. Para obtener un polipéptido con la actividad biológica de la muteína de hIL-2 y por lo tanto un fármaco para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria, no es forzosamente necesario proporcionar un polipéptido que presente una secuencia de aminoácidos que sea idéntica al 100 % a la secuencia de aminoácidos de la muteína de hIL-2 según la invención. Más bien es suficiente cuando se proporciona una identidad suficientemente alta, siendo tolerables opcionalmente pérdidas de actividad moderadas, pero preferentemente se mantiene al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de la actividad. Las identidades indicadas se refieren a una sección de la muteína de hIL-2 según la invención con ≥ 10 aminoácidos. El grado de homología puede determinarse fácilmente por medio de procedimientos conocidos por el experto, por ejemplo un análisis de BLAST o por medio del módulo MegAlign del programa Lasergene de DNASTar Inc.

Según la invención se prefiere también cuando en el caso de la sustitución de aminoácido adicional en una posición cualquiera, a excepción de las posiciones 20, 88 ó 126, se trata de una sustitución de aminoácido conservativa.

Esta medida tiene la ventaja de que se proporcionan otras variantes de la muteína de hIL-2 según la invención, que presentan una actividad altamente suficiente para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades autoinmunitarias o para la inducción de células T reguladoras en un ser vivo. El experto conoce que las sustituciones conservativas no tienen ningún efecto o únicamente un efecto mínimo sobre la estructura secundaria o terciaria de la muteína. Tales sustituciones conservativas comprenden las que se describen por Dayhoff en "The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5", Natl. Biomedical Research. Por ejemplo, pueden intercambiarse entre sí aminoácidos que pertenecen a uno de los siguientes grupos, es decir forman un cambio conservativo:

- alanina (A), prolina (P), glicina (G), asparagina (N), serina (S), treonina (T);
- cisteína (C), serina (S), tirosina (Y), treonina (T);
- valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), alanina (A), fenilalanina (F);
- lisina (K), arginina (R), histidina (H);
- fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), histidina (H); y
- ácido aspártico (D), ácido glutámico (E).

En el caso del agente para la inducción de la formación de células T reguladoras en un ser vivo se trata preferentemente de un fármaco que presenta un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Esta medida tiene la ventaja de que el agente se proporciona ya en una forma tal que posibilita una aplicación directa en el ser vivo, preferentemente un ser humano.

En el estado de la técnica se describen ampliamente vehículos farmacéuticamente aceptables; véase Row y col. (2006), Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5ª edición, Pharmaceutical Press and American Pharmacists' Association; Bauer y col. (1999), Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. Una formulación especialmente preferida es aquella que se da a conocer en el documento WO 02/00243. Esta formulación está libre de albúmina y la estabilización de la muteína de hIL-2 o de sección de la misma tiene lugar con histidina. Preferentemente el fármaco acabado presenta los siguientes componentes en las siguientes concentraciones: muteína de hIL-2 o una sección de la misma = 0,1-5 mg/ml;

histidina = 0,08-1,6 % en peso; NaCl = 0-0,9 % en peso; sacarosa = 1-10 % en peso; glicina = 0-0,3 % en peso, y presenta un valor de pH de aproximadamente 5 a 6,5.

Según una configuración especial el fármaco presenta adicionalmente un inmunosupresor.

- 5 El fármaco puede usarse para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades autoinmunitarias debido a la especial potencia de la muteína de hIL-2 según la invención ya como monopreparación. Una monopreparación de este tipo presenta la muteína de hIL-2 según la invención como único principio activo. Los vehículos, disolventes (tampones, agua etc.), adyuvantes etc. farmacéuticamente aceptables, no son principios activos en este contexto.

Esta medida tiene la ventaja de que el índice terapéutico del fármaco según la invención se eleva de nuevo agregando un inmunosupresor clásico.

- 10 Se prefiere cuando el inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en glucocorticoide, incluyendo decortin, prednisol; azatioprina; ciclosporina A; micofenolato de mofetilo; tacrolimus; anticuerpos anti-globulina de linfocitos T, anticuerpos anti-CD3, incluyendo muromonab; anticuerpos anti-CD25, incluyendo basiliximab y daclizumab; anticuerpos anti-TNF- α , incluyendo infliximab y adalimumab; azatioprina; metotrexato; ciclosporina; sirolimus; everolimus; fingolimod; CellCept; Myfortic; ciclofosfamida.

- 15 Esta medida tiene la ventaja de que se usa un inmunosupresor tal que presenta una eficacia terapéutica de manera demostrable en enfermedades autoinmunitarias y se encuentra disponible suficientemente en el estado de la técnica.

- 20 Adicionalmente se prefiere si la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en: diabetes-mellitus de tipo I, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, gastritis crónica, enfermedad de Crohn, enfermedad de Basedow, enfermedad de Bechterew, psoriasis, miastenia grave, hepatitis autoinmunitaria, APECED, síndrome de Chrug-Strauss, colitis ulcerosa, glomerulonefritis, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, liquen escleroso, lupus eritematoso sistémico, PANDAS, fiebre reumática, sarcoidosis, síndrome de Sjörgren, síndrome de la persona rígida, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, vitiligo, enteropatía autoinmunitaria, síndrome de Goodpasture, dermatomiositis, polimiositis, alergia autoinmunitaria, asma y reacción autoinmunitaria tras trasplantes de órganos.

Esta medida tiene la ventaja de que se proporciona un fármaco tal que puede usarse para el tratamiento y/o la profilaxis de las enfermedades autoinmunitarias más importantes.

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un fármaco para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria que presenta la muteína de hIL-2 según la invención.

- 30 Las propiedades y ventajas descritas en el contexto del uso según la invención así como las definiciones sirven de la misma manera para el fármaco según la invención.

Asimismo se da a conocer un agente para la formación de células T reguladoras (T_{Reg}) en un ser vivo que presenta la muteína de hIL-2 según la invención o una sección de la misma.

- 35 Las ventajas y propiedades así como definiciones del uso según la invención sirven de manera correspondiente para el agente según la invención.

- 40 Además se dan a conocer procedimientos para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria en un ser vivo y para la formación de células T reguladoras (T_{Reg}) en un ser vivo que presentan en cada caso las siguientes etapas: (a) proporcionar una muteína de interleucina-2 humana (muteína de hIL-2) o una sección de la misma, (b) administrar la muteína de hIL-2 o la sección de la misma en un ser humano, y (c) opcionalmente repetir las etapas (a) y (b), tratándose en el caso de la muteína de hIL-2 o la sección de la misma de la muteína de hIL-2 según la invención o una sección de la misma.

En el caso del ser vivo se trata preferentemente de un mamífero, más preferentemente de un ser vivo humano.

- 45 Las propiedades y ventajas así como definiciones descritas en el contexto del uso según la invención sirven de la misma manera para los procedimientos mencionados anteriormente para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria en un ser vivo y para la formación de células T reguladoras (T_{Reg}) en un ser vivo.

- 50 Se da a conocer además un procedimiento para la formación de células T reguladoras (T_{Reg}) *in vitro*, que presenta las siguientes etapas: (a) proporcionar una muteína de interleucina-2 humana (muteína de hIL-2) o una sección de la misma, (b) poner en contacto la muteína de hIL-2 o la sección de la misma con células mononucleares de sangre periférica (PBMC), y (c) opcionalmente repetir las etapas (a) y (b), tratándose en el caso de la muteína de hIL-2 o la sección de la misma de la muteína de hIL-2 según la invención o una sección de la misma.

La puesta en contacto de hIL-2 o la sección de la misma con las PBMC puede tener lugar en cualquier medio adecuado para el cultivo de las PBMC.

Las propiedades y ventajas así como definiciones descritas en el contexto del uso según la invención sirven de la misma manera para el procedimiento mencionado anteriormente para la formación de células T reguladoras (T_{Reg}) *in vitro*.

5 Asimismo se da a conocer un procedimiento para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria en un ser vivo, que presenta las siguientes etapas: (a) proporcionar una muteína de interleucina-2 humana (muteína de hIL-2) o una sección de la misma, (b) poner en contacto la muteína de hIL-2 o la sección de la misma con células mononucleares de sangre periférica que proceden de un primer ser vivo (PBMC), (c) incubar la muteína de hIL-2 o la sección de la misma con las PBMC, para obtener una población de células que presenta las células T reguladoras (T_{Reg}), y (d) añadir la población de células a un segundo ser vivo, tratándose en el caso de la muteína de hIL-2 o la sección de la misma de la muteína de hIL-2 según la invención o una sección de la misma.

El primer ser vivo y el segundo ser vivo presentan preferentemente idéntico grupo sanguíneo, prefiriéndose especialmente cuando en el caso del primer y del segundo ser vivo se trata de seres vivos o individuos idénticos.

15 En este caso es ventajoso que en el caso de la adición o reinfusión de la población de células no se produzca ninguna reacción inmunitaria indeseada contra las células y el procedimiento tiene por lo tanto especialmente pocos efectos secundarios.

Las propiedades y ventajas así como definiciones descritas en el contexto del uso según la invención sirven de la misma manera para el procedimiento mencionado anteriormente para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria en un ser vivo.

20 A continuación se explica en detalle la invención por medio de ejemplos de realización que tiene carácter meramente a modo de ejemplo y que no limitan el alcance de la invención. A este respecto se hace referencia a las figuras adjuntas, en las que se representa la siguiente:

la figura 1 muestra que hIL-2-N88R en sujetos de prueba sanos a la misma dosificación o dosificación menor en comparación con Proleukin induce un mayor aumento de las células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reguladoras;

la figura 2 muestra que hIL-2-N88R en sujetos de prueba sanos a la misma dosificación o dosificación menor en comparación con Proleukin induce un mayor aumento de las células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reguladoras;

30 la figura 3 muestra que hIL-2-N88R en pacientes con melanoma a la misma dosificación o dosificación menor en comparación con Proleukin induce un mayor aumento de las células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reguladoras;

35 la figura 4 muestra que hIL-2-N88R en pacientes con melanoma a la misma dosificación o dosificación menor en comparación con Proleukin induce un mayor aumento de las células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reguladoras;

40 la figura 5 muestra que hIL-2-N88R en pacientes con esclerosis múltiple a la misma dosificación o dosificación menor en comparación con Proleukin induce un mayor aumento de las células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reguladoras;

45 la figura 6 muestra que hIL-2-N88R en pacientes con esclerosis múltiple a la misma dosificación o dosificación menor en comparación con Proleukin induce un mayor aumento de las células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reguladoras;

la figura 7 muestra que hIL-2-N88R en pacientes con esclerosis múltiple a la misma dosificación o dosificación mayor en comparación con Proleukin induce un menor aumento de las células T CFSE bajo/CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺ citotóxicas;

50 la figura 8 muestra que hIL-2-N88R en sujetos de prueba sanos a la misma dosificación o dosificación mayor en comparación con Proleukin induce un menor aumento de las células T CFSE bajo/CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺ citotóxicas;

55 la figura 9 muestra que hIL-2-N88R en el modelo de ratón de diabetes de tipo I en comparación con el tipo natural de hIL-2 lleva a un mayor aumento porcentual de células Foxp3⁺ dentro de las células CD4⁺ (A). Estas células CD4⁺Foxp3⁺ presentan además una mayor expresión de CD25 (B);

60 la figura 10 muestra que hIL-2-N88R en el modelo de ratón de diabetes de tipo I, en contraposición al tipo natural de hIL-2, impide el desarrollo de la diabetes.

Ejemplos de realización

1. Material y métodos

1.1 Separación de PBMC de sangre completa para su uso *in vitro*

5 Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sujetos de prueba sanos, pacientes con melanoma o EM se separan de la sangre por medio de medio de separación de linfocitos (Histopaque, Sigma Aldrich). Para ello se transfieren dos tubos de sangre (7 ó 10 ml) de los mismos sujetos de prueba o pacientes en un tubo estéril de 50 ml y se rellena con RPMI 1640 (InVitrogen, N° 14190-69) hasta 30 ml. A continuación se estratifican 30 ml de la sangre diluida sobre 15 ml de una solución en gradiente de densidad (densidad = 1,077; Histopaque, Sigma Aldrich, N° 10771).

10 Tras una centrifugación a 400 g durante 40 min a 20 °C sin parar se recogieron dos “Ringe de glóbulos blancos” y en se transfirieron a un tubo estéril de 50 ml y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS; InVitrogen N° 14190-169). En el caso de una contaminación con glóbulos rojos se realiza una lisis de RBC (“*red blood cells*”); se añaden 2 ml de solución de lisis de RBC al sedimento celular, con agitación suave a temperatura ambiente tiene lugar una incubación durante 2 min, seguido de un proceso de lavado con un gran volumen de medio completo (RPMI 1640 con suero de ternero fetal al 10 %).

15 El número de leucocitos vivos se determina mediante tinción por exclusión por medio de azul de tripano (InVitrogen N° 15250-061) y un hemocitómetro (FisherBioblock A2759B).

1.2 Marcaje con CFSE

20 Tras el recuento se lavan las células dos veces en PBS y se resuspenden en PBS a una concentración de 1×10^6 células/ml. Se añade CFSE (InVitrogen N° C1157) en una concentración final de 0,5 μ M. Tras una incubación de 10 minutos en la oscuridad a 37 °C se lavan las células marcadas con CFSE tres veces con medio completo reciente a 4 °C y se resuspenden a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio completo para sembrar en placa.

1.3 Estimulación de las PBMC *in vitro*

25 Las PBMC o bien quedan sin estimular o bien se estimulan con tipo natural de hIL-2 (Proleukin) o hIL-2-N88R (BAY 50-4798; Charge N°PR312C008) con o sin un conjunto de péptidos sintéticos, que se derivan de las proteínas específicas de melanoma gp100, TRP-2, MART-1 y tirosinasa o la proteína específica para esclerosis múltiple (EM) MOG, añadiéndose cada péptido en una concentración final de 2,5 μ M (péptido de melanoma) o 30 μ g/ml (péptido de EM).

El estimulador y el péptido se añaden en las siguientes 23 condiciones:

30 Tabla 1: Condiciones para la estimulación de las PBMC

Condición	Estimulador	Concentración final	
1	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; N° PR312C008)	10^{-11} M	sin péptidos
2	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; N° PR312C008)	10^{-11} M	péptidos
3	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; N° PR312C008)	10^{-9} M	sin péptidos
4	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; N° PR312C008)	10^{-9} M	péptidos
5	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; N° PR312C008)	10^{-8} M	sin péptidos

ES 2 378 957 T3

(continuación)

Condición	Estimulador	Concentración final	
6	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; Nº PR312C008)	10 ⁻⁸ M	péptidos
7	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; Nº PR312C008)	10 ⁻⁷ M	sin péptidos
8	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; Nº PR312C008)	10 ⁻⁷ M	péptidos
9	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; Nº PR312C008)	10 ⁻⁶ M	sin péptidos
10	hIL-2-N88R (BAY 50-4798; Nº PR312C008)	10 ⁻⁶ M	péptidos
11	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻¹¹ M	sin péptidos
12	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻¹¹ M	péptidos
13	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻⁹ M	sin péptidos
14	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻⁹ M	péptidos
15	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻⁸ M	sin péptidos
16	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻⁸ M	péptidos
17	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻⁷ M	sin péptidos
18	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻⁷ M	péptidos
19	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻⁶ M	sin péptidos
20	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻⁶ M	péptidos
21	PHA	5 µg/ml	
22	No det.		
23	Péptido solo		péptidos

A continuación se cultivaron las células durante seis días a 37 °C y a una atmósfera con un contenido en CO₂ del 5 %.

Ensayo de proliferación y fenotipado en el citómetro de flujo FC500

5 La tinción de las células con anticuerpos marcados con fluorescencia sobre moléculas de la superficie celular posibilita examinar la proliferación de un subgrupo específico de linfocitos (marcadores de memoria y de activación, véase la tabla 2). La inmunotinción con anticuerpos marcados con fluorocromo (PE: ficoeritrina, ECD: rojo PE-Texas, APC: alofococianina, PC7: PE-Cy7) tiene lugar antes y después de seis días del cultivo con los estimuladores.

10 En el sexto día se realizan las dos primeras tinciones (1 y 1iso) con células no marcadas con CFSE (CFSE: éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína); las otras tinciones tienen lugar en células marcadas con CFSE.

Tabla 2: Esquema de color de las PBMC

	PE		ECD	APC	PC7
1	CD25		CD45	Foxp3	CD4
1iso	CD25		CD45	IgG2a de rata	CD4
2	CD127		CD45	CD25	CD4
3	CD3		CD45	CD25	CD8
4	CD16			CD56	CD3
5	CCR7		CD3	CD45RA	CD4
6	CCR7		CD3	CD45RA	CD8
7	CD8		CD3	CD45RO	CD4
	PE		ECD	APC	PC7
1	CD25		CD3	Foxp33	CD4
1iso	CD25		CD3	IgG2a de rata	CD4
2	CD8		CD3	CD25	CD4
3	CCR7		CD3	CD45RA	CD4
4	CD8		CD3	CD45RO	CD4

CD25-PE, Foxp3-APC y IgG2a de rata-APC proceden de ebiosciences; CD25⁺APC, CD45RA-APC y CD45RO-APC se adquirieron den BD Biosciences. Todos los demás anticuerpos proceden de Beckman-Coulter, Francia.

15 1.5 Modelo de ratón de diabetes de tipo I

Ratones NOD (“*Non-obese diabetes*”) de 12 semanas de edad se tratan diariamente con muteína de hIL-2 o tipo natural de hIL-2. Animales control negativo se trataron de manera análoga con solución salina fisiológica (solución salina). Los grupos de tratamiento consistían 3 - 5 animales. En el día 0 a 15 se aplicó a los ratones una cantidad de 5K o 25K unidades de muteína de hIL-2 o tipo natural de hIL-2. A partir del día 17, en los grupos de tratamiento con 5K unidades se aumentó hasta 100K unidades (= 6,112 µg). El tratamiento de los otros animales con 25K unidades se mantuvo invariable. La última dosificación se efectuó en el día 31. En un experimento paralelo se trató desde el día 0 hasta el día 31 con una dosis fija de 25K unidades. La diabetes se detectó por medio de monitorización del nivel de glucosa en la orina. Se extrajeron muestras de sangre de los ratones en el día 17 y el día 30. Se analizaron las muestras en FACS por medio de tinción Anti-CD4, Anti-CD25 así como Anti-FoxP3 y con ello se determinó la cantidad en porcentaje de las células Foxp3⁺ entre las células T CD4⁺ así como la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la expresión de CD25 en células CD4⁺Foxp3⁺.

20

25

2. Resultados

2.1 Inducción de células T reguladoras mediante hIL-2-N88R

5 Como sistema *in vivo* adecuado, para someter a prueba el efecto de las muteínas según la invención, se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC consisten en células T (- 75 % de CD4- y CD8-positivas) y células B y NK (~ 2S % positivas) y forman por lo tanto una población celular que representa adecuadamente el sistema inmunitario.

10 PBMC de seis sujetos de prueba sanos (10^6 células/ml) se estimularon con tipo natural de IL-2 (Proleukin) o IL-2-N88R [BAY 50-4798, Charge N° PR312C008 ("BAYN° C008")] a concentraciones que se encontraban entre 10^{-11} y 10^{-6} M, o en el control positivo con el mitogen no específico fitohemaglutinina ("PHA") a una concentración de 5 μ g/ml o con medio de cultivo solo ("Med"). En el día 0 y en el sexto día tras la estimulación se determinó el porcentaje de las células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reguladoras dentro de los linfáticos CD3⁺. El resultado está representado en la figura 1 y la siguiente tabla 3.

Condiciones		Valor medio	D.E.	
Día 0		Día 0	1,367	2,060
Día 6		Med	0,683	0,741
	hIL-2-N88R (BAY N° C008)	10^{-11} M	1,483	1,017
		10^{-9} M	1,783	1,153
		10^{-8} M	3,267	1,596
		10^{-7} M	6,483	2,642
		10^{-6} M	5,200	2,375
	Tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10^{-11} M	2,183	1,030
		10^{-9} M	3,067	1,255
		10^{-8} M	3,600	1,330
		10^{-7} M	4,600	1,992
		10^{-6} M	4,967	2,199
	PHA	5 μ g/ml	1,400	1,081
	Péptido solo		1,340	0,680

15 Tabla 3: Cantidad en porcentaje de las células T CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tras la estimulación; Valores medios de seis sujetos de prueba sanos; D.E.: Desviación estándar

A partir de este experimento se deduce que hIL-2-N88R a concentraciones de 10^{-7} M y 10^{-6} M lleva a una clara inducción de la subpoblación de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. La inducción es en este caso claramente mayor que en el caso de una estimulación de las PBMC mediante el tipo natural de hIL-2.

20 En un segundo planteamiento se sometió a ensayo el aumento de la subpoblación de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tras la estimulación con hIL-2-N88R en comparación con el tipo natural de hIL-2. El resultado está representado en la figura 2 o la siguiente tabla 4.

	Condiciones		Valor medio	D.E.
Día 0		Día 0	0,317	0,402
Día 6		Med	0,133	0,151
	hIL-2-N88R (BAY N° C008)	10 ⁻¹¹ M	0,200	0,141
		10 ⁻⁹ M	0,320	0,179
		10 ⁻⁸ M	0,517	0,354
		10 ⁻⁷ M	0,917	0,601
		10 ⁻⁶ M	5,250	3,141
	Tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻¹¹ M	1,000	1,864
		10 ⁻⁹ M	0,717	0,293
		10 ⁻⁸ M	1,000	0,429
		10 ⁻⁷ M	1,433	0,403
		10 ⁻⁶ M	2,533	0,903
	PHA	5 µg/ml	0,700	1,715
	Péptido solo		0,160	0,089

Tabla 4: Cantidad en porcentaje de las células T CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tras la estimulación; Valores medios de seis sujetos de prueba sanos

- 5 También se muestra en este caso que la estimulación con hIL-2-N88R lleva aun claro aumento de la subpoblación de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, que a concentraciones de 10⁻⁶ M es claramente mayor que una estimulación con el tipo natural de hIL-2.

2.2 hIL-2-N88R induce células T reguladoras en pacientes con melanoma

- 10 A continuación se sometió a ensayo si la muteína de hIL-2 según la invención N88R también estimula la actividad específica de antígeno de células inmunitarias. Para ello se estimularon PBMC (10⁶ células/ml) de tres pacientes con melanoma con hIL-2-N88R (BAY 50-4798, Charge N°PR312C008) o tipo natural de hIL-2 (Proleukin) a concentraciones que se encontraban entre 10⁻¹¹ y 10⁻⁶ M, en presencia o ausencia de un conjunto de péptidos asociados con el melanoma, con PHA 5 µg/ml o con medio de cultivo solo. A continuación se determinaron las subpoblaciones de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ o CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. El resultado está
- 15 representado en la figura 3 y la tabla 5 o la figura 4 y la tabla 6.

Condiciones		Valor medio	D.E.	
Día 0		Día 0	2,800	2,052
Día 6		Med	1,133	0,839
	hIL-2-N88R (BAY N° C008)	10 ⁻¹¹ M	1,833	1,185
		10 ⁻¹¹ M + pept.	2,467	0,666
		10 ⁻⁹ M	3,000	1,015
		10 ⁻⁹ M + pept.	3,033	0,379
		10 ⁻⁸ M	3,600	0,819
		10 ⁻⁸ M + pept.	5,567	2,499
		10 ⁻⁷ M	6,100	0,458
		10 ⁻⁷ M + pept.	6,233	0,058
		10 ⁻⁶ M	7,533	2,413
		10 ⁻⁶ M + pept.	8,533	3,225
	Tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻¹¹ M	2,767	0,751
		10 ⁻¹¹ M + pept.	2,500	0,985
		10 ⁻⁹ M	3,333	0,802
		10 ⁻⁹ M + pept.	3,433	1,102
		10 ⁻⁸ M	4,133	0,862
		10 ⁻⁸ M + pept.	3,633	1,002
		10 ⁻⁷ M	4,367	1,201
		10 ⁻⁷ M + pept.	4,300	0,755
		10 ⁻⁶ M	6,667	1,405
		10 ⁻⁶ M + pept.	5,600	1,323
PHA	5 µg/ml	1,400	0,346	
Péptido solo		1,667	1,060	

Tabla 5: Cantidad en porcentaje de las células T CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tras la estimulación; Valores medios de tres pacientes con melanoma

Condiciones		Valor medio	D.E.	
Día 0		Día 0	0,567	0,643
Día 6		Med	0,133	0,231
	hIL-2-N88R (BAY N° C008)	10 ⁻¹¹ M	0,267	0,462
		10 ⁻¹¹ M + pept.	0,333	0,252
		10 ⁻⁹ M	0,300	0,265
		10 ⁻⁹ M + pept.	0,500	0,300
		10 ⁻⁸ M	0,500	0,265
		10 ⁻⁸ M + pept.	0,800	0,700
		10 ⁻⁷ M	0,900	0,436
		10 ⁻⁷ M + pept.	0,677	0,306
		10 ⁻⁶ M	4,100	1,682
		10 ⁻⁶ M + pept.	3,200	1,646
	Tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻¹¹ M	0,267	0,208
		10 ⁻¹¹ M + pept.	0,200	0,100
		10 ⁻⁹ M	0,967	0,603
		10 ⁻⁹ M + pept.	0,967	0,451
		10 ⁻⁸ M	1,633	1,002
		10 ⁻⁸ M + pept.	1,400	0,624
		10 ⁻⁷ M	1,400	0,656
		10 ⁻⁷ M + pept.	1,533	0,702
		10 ⁻⁶ M	2,733	1,861
		10 ⁻⁶ M + pept.	2,600	1,473
PHA	5 µg/ml	0,000	0,000	
Péptido solo		0,200	0,100	

Tabla 6: Cantidad en porcentaje de las células T CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tras la estimulación; Valores medios de tres pacientes con melanoma

- 5 A este respecto se mostró que la administración de hIL-2-88R también en pacientes con melanoma lleva a un claro aumento de las células T reguladoras. Éste es, en el caso de la subpoblación CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ a concentraciones de 10⁻⁷ M y 10⁻⁶ M, y en el caso de la subpoblación CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ a una concentración de 10⁻⁶ M claramente mayor que en el caso de una estimulación con concentraciones correspondientes del tipo natural de IL-2 (Proleukin).

2.3 hIL-2-N88R induce células T reguladoras en pacientes con esclerosis múltiple

- 10 A continuación se sometió a ensayo si la muteína de hIL-2 según la invención N88R también estimula la actividad específica de antígeno de células inmunitarias. Para ello se estimularon PBMC (10⁶ células/ml) de tres pacientes con esclerosis múltiple con hIL-2-N88R (BAY 50-4798, Charge N°PR312C008) o tipo natural de hIL-2 (Proleukin) a concentraciones que se encontraban entre 10⁻¹¹ y 10⁻⁶ M, en presencia o ausencia de un péptido asociado con la esclerosis múltiple, con PHA 5 µg/ml o con medio de cultivo solo. A continuación se determinaron las subpoblaciones de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ o CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. El resultado está
- 15

representado en la figura 5 y la tabla 7 o la figura 6 y la tabla 8.

Condiciones		Valor medio	D.E.		
Día 0		Día 0	0,95	0,21	
Día 6		Med	3,55	1,91	
	hIL-2-N88R (BAY N° C008)	10 ⁻¹¹ M	3,8	0,99	
		10 ⁻¹¹ M + pept.	4,2	2,40	
		10 ⁻⁹ M	6,1	2,40	
		10 ⁻⁹ M + pept.	9,05	5,02	
		10 ⁻⁸ M	9,75	2,19	
		10 ⁻⁸ M + pept.	11,15	3,32	
		10 ⁻⁷ M	11,95	5,30	
		10 ⁻⁷ M + pept.	9,9	1,70	
		10 ⁻⁶ M	7,9	1,41	
		10 ⁻⁶ M + pept.	9,3	1,41	
		Tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻¹¹ M	6,3	2,55
			10 ⁻¹¹ M + pept.	8,8	4,10
	10 ⁻⁹ M		8,25	0,49	
	10 ⁻⁹ M + pept.		8,45	1,20	
	10 ⁻⁸ M		8,15	2,47	
	10 ⁻⁸ M + pept.		9,55	3,04	
	10 ⁻⁷ M		8,8	3,39	
	10 ⁻⁷ M + pept.		8,8	3,25	
	10 ⁻⁶ M		9,45	0,78	
	10 ⁻⁶ M + pept.		7,6	1,84	
	PHA	5 µg/ml	5,5	3,68	
	Péptido solo		3,95	2,19	

Tabla 7: Cantidad en porcentaje de las células T CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tras la estimulación; Valores medios de dos pacientes con esclerosis múltiple.

Condiciones		Valor medio	D.E.	
Día 0		Día 0	0,35	0,35
Día 6		Med	0,14	0,14
	hIL-2-N88R (BAY N° C008)	10 ⁻¹¹ M	0,28	0,28
		10 ⁻¹¹ M + pept.	0,14	0,14
		10 ⁻⁹ M	0,07	0,07
		10 ⁻⁹ M + pept.	0,07	0,07
		10 ⁻⁸ M	0,28	0,28
		10 ⁻⁸ M + pept.	0,00	0,00
		10 ⁻⁷ M	0,14	0,14
		10 ⁻⁷ M + pept.	0,14	0,14
		10 ⁻⁶ M	4,10	4,10
		10 ⁻⁶ M + pept.	2,90	2,90
	Tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻¹¹ M	0,00	0,00
		10 ⁻¹¹ M + pept.	0,07	0,07
		10 ⁻⁹ M	0,07	0,07
		10 ⁻⁹ M + pept.	0,00	0,00
		10 ⁻⁸ M	0,14	0,14
		10 ⁻⁸ M + pept.	0,14	0,14
		10 ⁻⁷ M	0,28	0,28
		10 ⁻⁷ M + pept.	0,21	0,21
		10 ⁻⁶ M	0,07	0,07
		10 ⁻⁶ M + pept.	0,85	0,85
	PHA	5 µg/ml	0,07	0,07
	Péptido solo		0,07	0,07

Tabla 8: Cantidad en porcentaje de las células T CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tras la estimulación; Valores medios de dos pacientes con esclerosis múltiple

5 Se mostró que la administración de hIL-2-88R también en pacientes con esclerosis múltiple lleva a un claro aumento de las células T reguladoras. Éste es, en el caso de la subpoblación CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ a una concentración de 10⁻⁸ M y 10⁻⁷ M, y en el caso de la subpoblación CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ a una concentración de 10⁻⁶ M, claramente mayor que en el caso de una estimulación con concentraciones correspondientes del tipo natural de IL-2 (Proleukin).

10 2.4 hIL-2-N88R induce sólo una proliferación mínima de células T CD8⁺ citotóxicas en pacientes con esclerosis múltiple y en sujetos de prueba sanos

Además se sometió a ensayo la estimulación de células T de memoria central CD8⁺ citotóxicas. Para ello se trataron PBMC de sujetos de prueba sanos o pacientes con esclerosis múltiple, tal como se describe en 2.3. Se analizó la cantidad en porcentaje de las células T CFSE bajo/CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺. El resultado está representado en la figura 7 y la tabla 9 así como la figura 8 y la tabla 10.

ES 2 378 957 T3

Condiciones		Valor medio	D.E.	
Día 0		Día 0	2,45	1,06
Día 6		Med	0,95	0,21
	hIL-2-N88R (BAY N° C008)	10 ⁻¹¹ M	1,3	0,57
		10 ⁻¹¹ M + pept.	1,2	1,13
		10 ⁻⁹ M	3,55	2,47
		10 ⁻⁹ M + pept.	0,5	0,14
		10 ⁻⁸ M	3,3	1,41
		10 ⁻⁸ M + pept.	1,2	0,71
		10 ⁻⁷ M	10,5	7,50
		10 ⁻⁷ M + pept.	9,1	0,71
		10 ⁻⁶ M	22,9	9,76
		10 ⁻⁶ M + pept.	1	0,28
	Tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻¹¹ M	5,2	7,35
		10 ⁻¹¹ M + pept.	3,1	0,28
		10 ⁻⁹ M	14,3	15,56
		10 ⁻⁹ M + pept.	19,45	2,90
		10 ⁻⁸ M	36,5	1,98
		10 ⁻⁸ M + pept.	41,85	2,47
		10 ⁻⁷ M	54,8	8,49
		10 ⁻⁷ M + pept.	54,85	12,94
		10 ⁻⁶ M	58,05	1,06
		10 ⁻⁶ M + pept.	98,2	0,85
	PHA	5 µg/ml	0,55	0,07
Péptido solo		2,45	1,06	

Tabla 9: Cantidad en porcentaje de las células T CFSE bajo/CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺ tras la estimulación; Valores medios de dos pacientes con esclerosis múltiple.

Condiciones		Valor medio	D.E.	
Día 6	Med	0,23	0,23	
	hIL-2-N88R (BAY N° C008)	10 ⁻¹¹ M	0,27	0,06
		10 ⁻¹¹ M + pept.	1,73	2,23
		10 ⁻⁹ M	0,43	0,23
		10 ⁻⁹ M + pept.	0,80	0,72
		10 ⁻⁸ M	2,13	1,86
		10 ⁻⁸ M + pept.	2,07	1,17
		10 ⁻⁷ M	3,83	4,02
		10 ⁻⁷ M + pept.	5,77	6,30
		10 ⁻⁶ M	17,43	17,31
		10 ⁻⁶ M + pept.	17,87	12,97
	tipo natural de hIL-2 (Proleukin)	10 ⁻¹¹ M	1,53	1,23
		10 ⁻¹¹ M + pept.	2,37	2,57
		10 ⁻⁹ M	18,20	23,35
		10 ⁻⁹ M + pept.	16,93	10,96
		10 ⁻⁸ M	43,30	36,72
		10 ⁻⁸ M + pept.	37,80	20,80
		10 ⁻⁷ M	38,53	25,53
		10 ⁻⁷ M + pept.	32,37	20,90
		10 ⁻⁶ M	37,93	27,66
		10 ⁻⁶ M + pept.	30,83	21,51
	PHA	5 µg/ml	96,07	1,79
	Péptido solo		1,83	1,59

Tabla 10: Cantidad en porcentaje de las células T CFSE bajo/CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺ tras la estimulación; Valores medios de tres sujetos de prueba sanos

5 hIL-2-88-R lleva, en pacientes con esclerosis múltiple así como en sujetos de prueba sanos, en contraposición al tipo natural de hIL-2, a una proliferación sólo mínima de células T CD8⁺ de memoria central, concretamente cada concentración sometida a ensayo.

2.5 El tratamiento con muteína de hIL-2 impide el desarrollo de diabetes de tipo I en el modelo animal

10 El tratamiento de ratones NOD con hIL-2-N88R lleva, en comparación con el tipo natural de hIL-2, a una cantidad en porcentaje mayor de células Foxp3⁺ dentro de las células CD4⁺ (figura 9 (A)). Estas células CD4⁺Foxp3⁺ positivas presentan además una mayor expresión de CD25 (figura 9 (B)). La figura 10 muestra que el tratamiento con hIL-2-N88R en el modelo de ratón de diabetes de tipo I, en contraposición con el tipo natural de hIL-2, impide el desarrollo de la diabetes en todos los ratones del grupo de tratamiento.

3. Conclusión

15 Los experimentos realizados por los inventores aclaran que, en el caso de las muteínas de hIL-2 según la invención

y secciones de las mismas, debido a su potencial para la inducción de células T reguladoras (T_{Reg}), se trata de sustancias que son adecuadas para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria o para la inducción de T_{Reg} en un ser vivo así como para la formación de T_{Reg} *in vitro*. Esto se muestra por los inventores no sólo *in vitro* sino también *in vivo*.

5 **Protocolo de secuencias**

<110> AiCuris GmbH & Co. KG Wuppertal, Alemania

<120> Agente para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria y para la formación de células T reguladoras

<130> 1043P108

10 <160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1          5          10          15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
                20          25          30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
        35          40          45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50          55          60

```

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 2

<211> 465

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcat gactaagtc ttgcacttgt caciaaacagt 60
 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 120
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 180
 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 240
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta 300
 agaccagggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaaactaaa gggatctgaa 360
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 420
 tggattacct tttgtcaaag catcatctca acactgactt gataa 465

<210> 3

<211> 133

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220> MUTAGEN

<223> hIL-2-N88R

<400> 3

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una muteína de interleucina-2 humana (muteína de hIL-2), que está numerada de manera correspondiente al tipo natural de hIL-2 y que presenta una sustitución de aminoácido en al menos una de las posiciones 20, 88 ó 126, para la producción de un fármaco para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria, **caracterizado porque**
- mediante la sustitución en la posición 88 se intercambia una asparagina por una arginina (hIL-2-N88R), o por una glicina (hIL-2-N88G), o por una isoleucina (hIL-2-N88I),
 - 10 - mediante la sustitución en la posición 20 se intercambia un ácido aspártico por una histidina (hIL-2-D20H), o por una isoleucina (hIL-2-D20I), o por una tirosina (hIL-2-D20Y), y
 - mediante la sustitución en la posición 126 se intercambia una glutamina por una leucina (hIL-2-Q126L).
2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el fármaco presenta adicionalmente un inmunosupresor.
3. Uso según la reivindicación 2, **caracterizado porque** el inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en: glucocorticoide, incluyendo decortin, prednisol; azatioprina; ciclosporina A; micofenolato de mofetilo; tacrolimus; anti-
 15 globulina de linfocitos T, anticuerpos anti-CD3, incluyendo muromonab; anticuerpos anti-CD25, incluyendo basiliximab y daclizumab; anticuerpos anti-TNF- α , incluyendo infliximab y adalimumab; azatioprina; metotrexato; ciclosporina; sirolimus; everolimus; fingolimod; CellCept; Myfortic; ciclofosfamida.
4. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en:
- 20 diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, gastritis crónica, enfermedad de Crohn, enfermedad de Basedow, enfermedad de Bechterew, psoriasis, miastenia grave, hepatitis autoinmunitaria, APECED, síndrome de Chrug-Strauss, colitis ulcerosa, glomerulonefritis, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, liquen escleroso, lupus eritematoso sistémico, PANDAS, fiebre reumática, sarcoidosis, síndrome de Sjörgren, síndrome de la persona rígida, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, vitiligo, enteropatía autoinmunitaria, síndrome de
 25 Goodpasture, dermatomiositis, polimiositis, alergia autoinmunitaria, asma y reacción autoinmunitaria tras trasplantes de órganos.
5. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el fármaco presenta un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Fármaco para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria, **caracterizado porque** presenta
 30 la muteína de hIL-2 según el uso según una de las reivindicaciones 1 a 5.

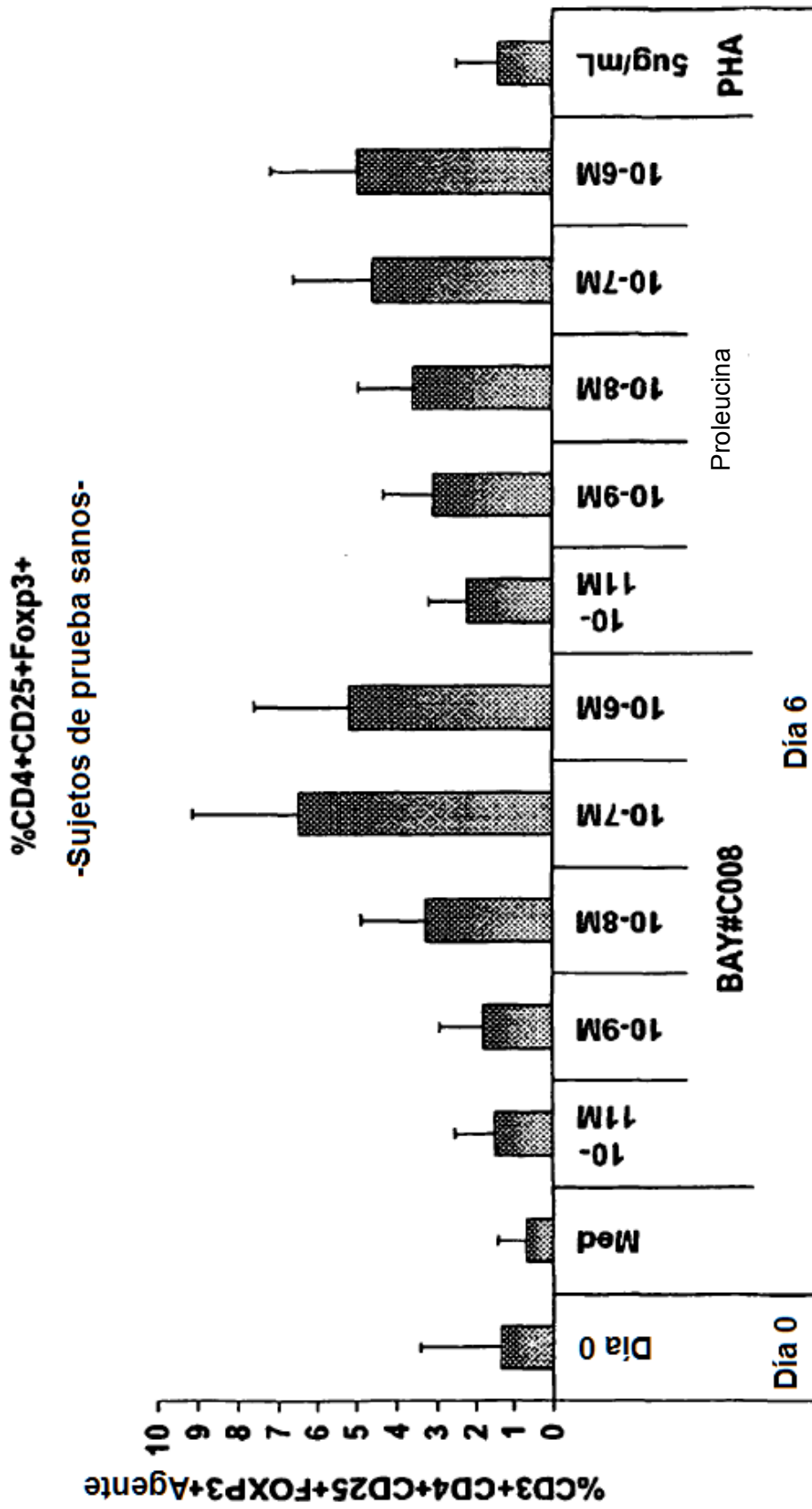


Fig. 1

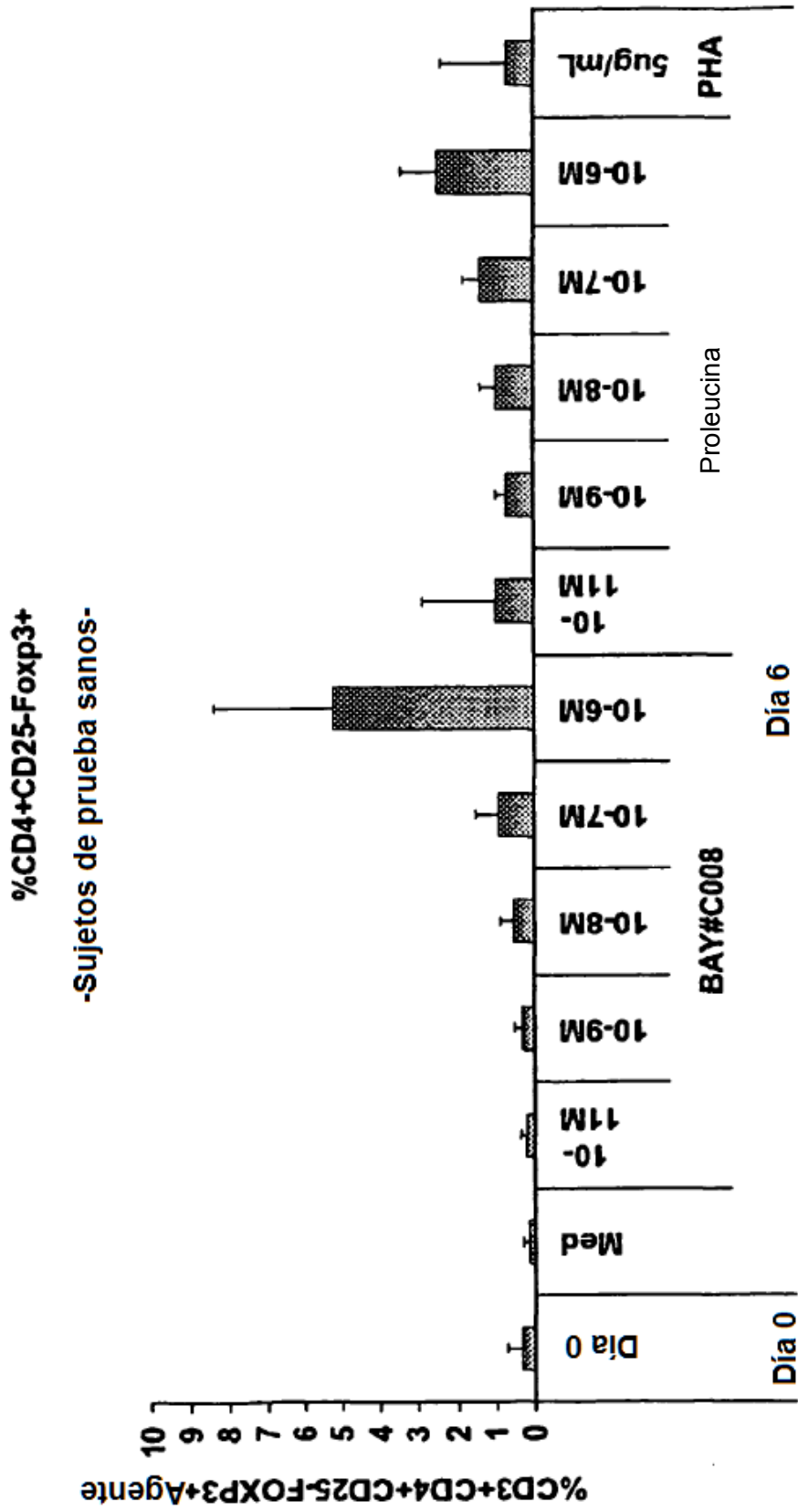


Fig. 2

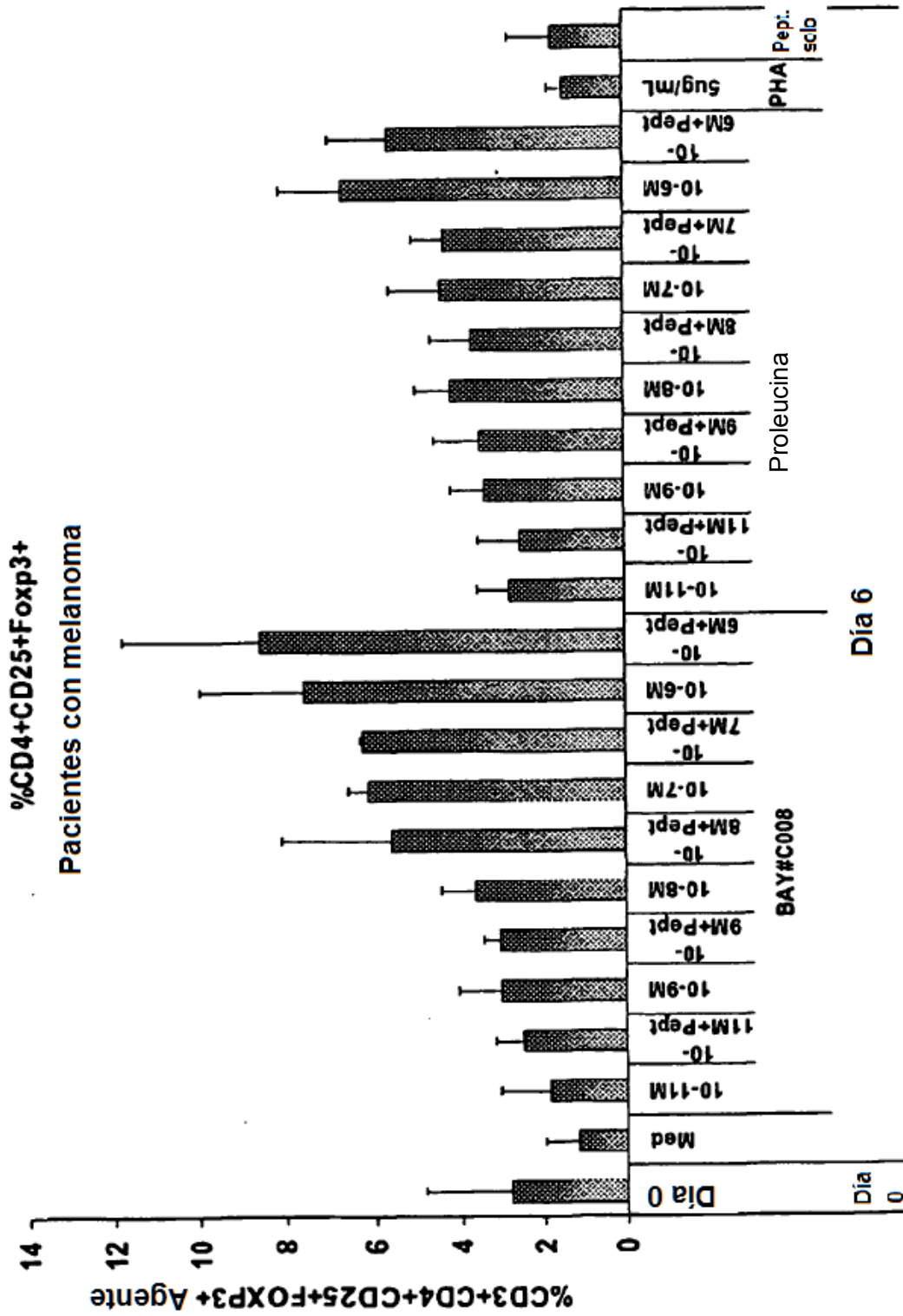


Fig. 3

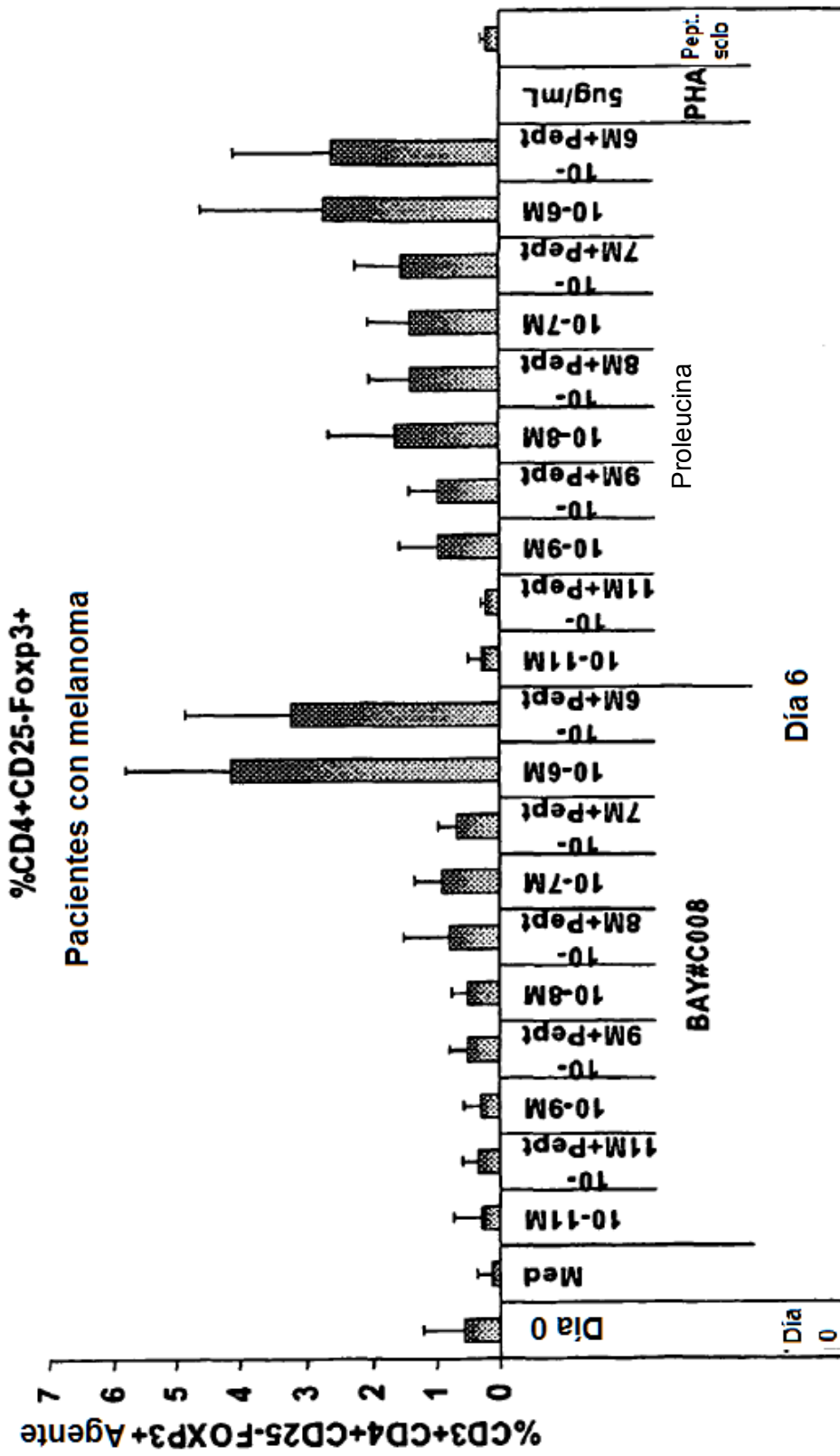


Fig. 4

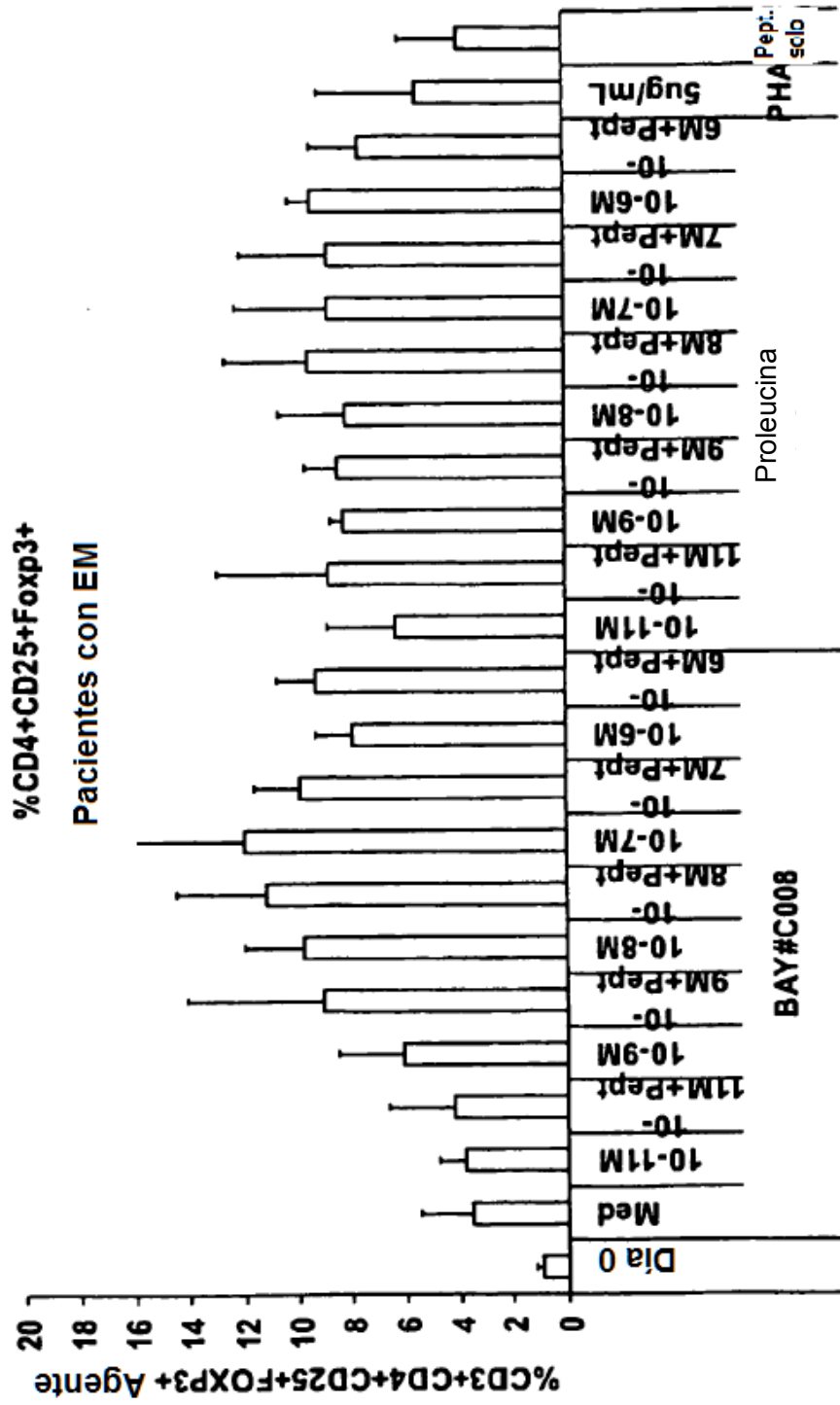


Fig. 5

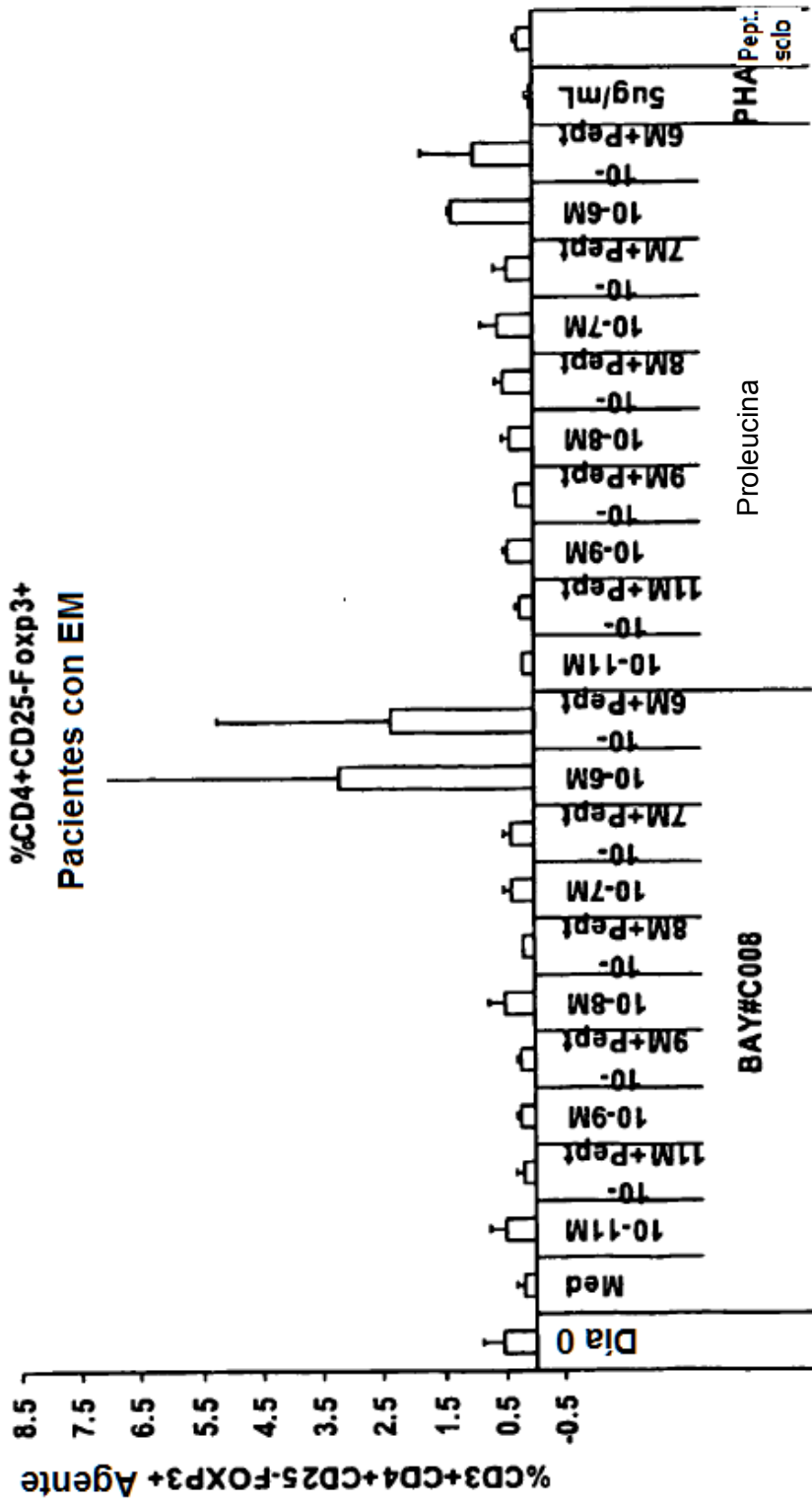


Fig. 6

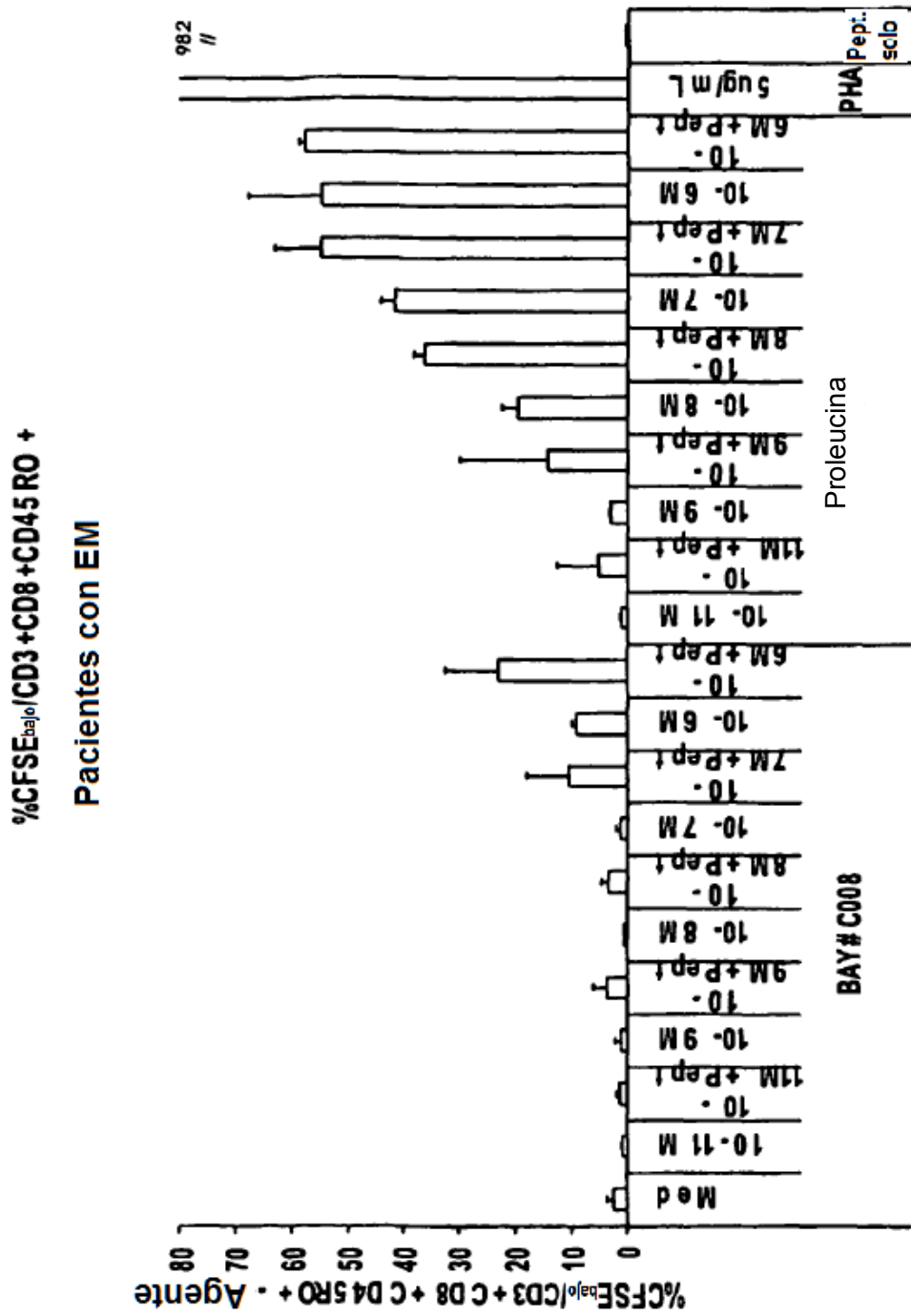


Fig. 7

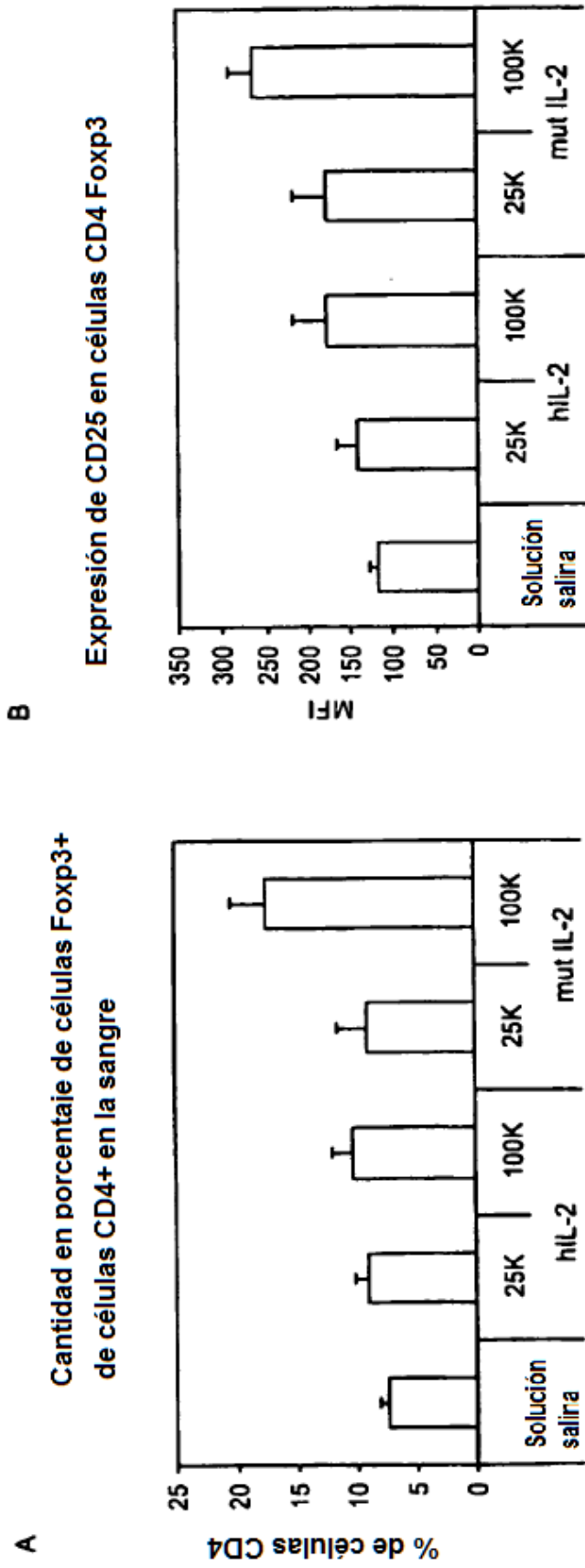


Fig. 9

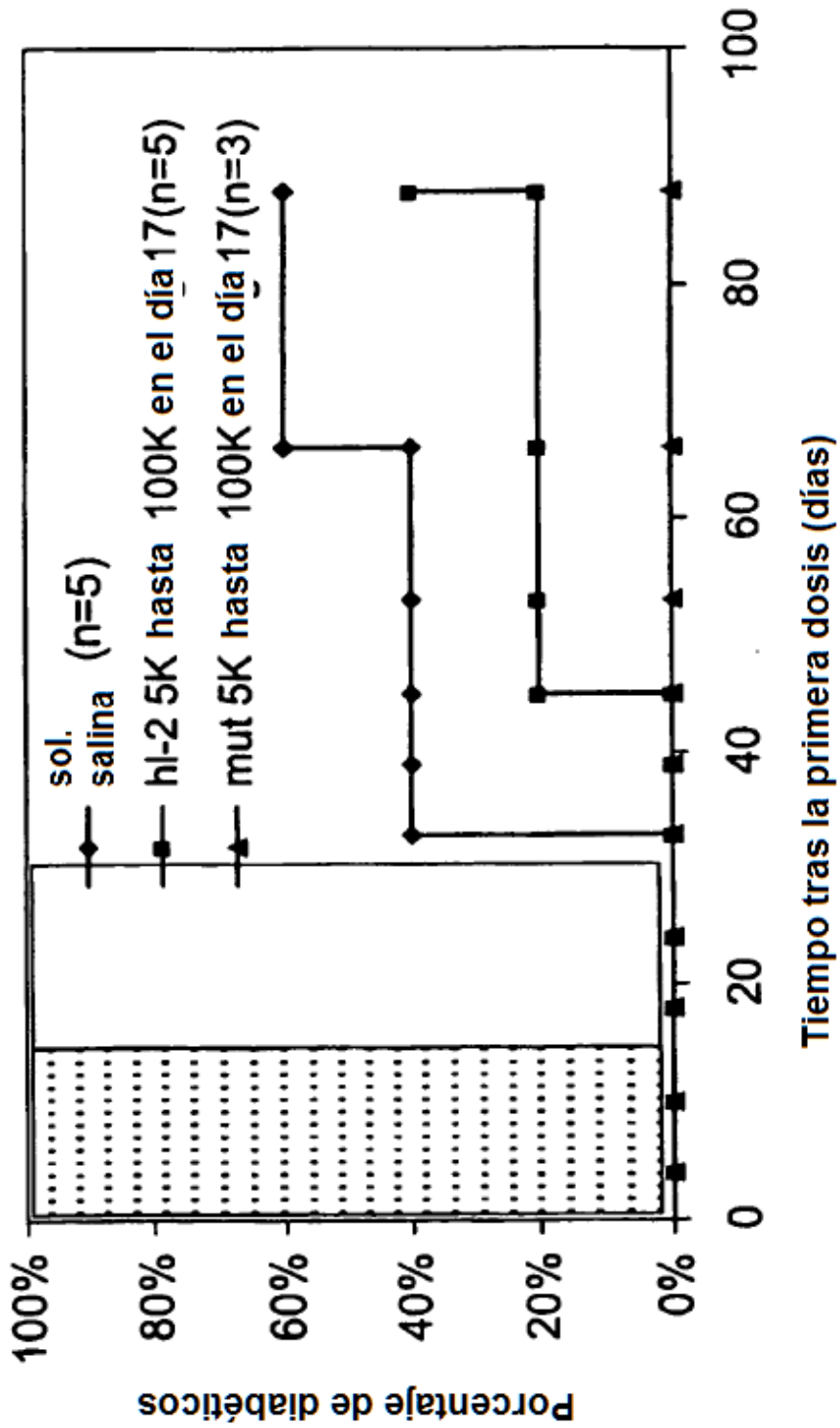


Fig. 10