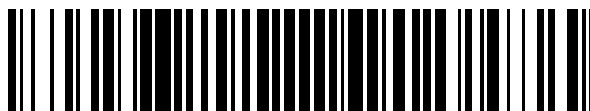


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 481**

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 07760469 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2012814**

54 Título: **Métodos de tratamiento de enfermedades autoinmunes**

30 Prioridad:

12.04.2006 US 744713 P

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

20.09.2013

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:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 423 481 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 de tratamiento de enfermedades autoinmunes

Campo de la Invención

5 Esta invención se refiere a métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Los métodos de la invención implican el uso de TGF- β latente o de otros agentes que estimulen células T reguladoras, solos o en combinación con agentes de agotamiento de linfocitos, tales como, p. ej., globulina anti-timocito (ATG, del inglés "anti-thymocyte globulin").

Antecedentes de la invención

10 La producción de anticuerpos contra auto-antígenos y/o células T autorreactivas es una característica común a muchas enfermedades autoinmunes. Los autoanticuerpos y las células T autorreactivas pueden provocar graves daños 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 la transformación del factor de crecimiento beta (TGF- β) como posible agente terapéutico para determinadas enfermedades autoinmunes, que incluyen la esclerosis múltiple y la enfermedad de injerto-contra-hospedante. Flanders et al., Clin. Med. Res., 1: 13-20 (2003). También se ha publicado la utilidad de inducir la generación de células T *in vitro* (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N° 6.759.035). Sin embargo, el TGF- β es una citocina pluripotente que además presenta propiedades inmunosupresoras, está implicado en la producción de matriz extracelular y en otros procesos biológicos. Para una revisión 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 una función 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., 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, según se evidenció por una reducción de la velocidad de filtración glomerular. Calabresi et al., Neurology, 51: 289-292 (1998). Este resultado ha perjudicado un desarrollo clínico adicional de terapias que implican la administración sistémica de TGF- β activo. Por consiguiente, sigue existiendo el reto de aprovechar 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 no deseados.

35 La antitimocito globulina se usa en combinación con ciclosporina para tratar el lupus eritematoso sistémico (Morishita et al., Journal of International Medical Research, 25: 219-223 (1997). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 95 páginas 12516-12521, octubre de 1998, "Gene therapy in allergic encephalomyelitis using myelin basic protein-specific T cells engineered to express latent transforming growth factor- β 1" describe que células T transducidas con TGF- β 1 latente activada por MBP (pero no en reposo) retrasaron y aliviaron significativamente el desarrollo de EAE.

SUMARIO DE LA INVENCION

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

45 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 latencia (LAP, del inglés "latency-associated peptide") que puede producirse *in vivo* a través de una serie de mecanismos que incluyen la ruptura proteolítica, la exposición a especies de oxígeno reactivas e interacciones con trombospondina y otras proteínas. Murphy-Ulrich et al., Cytokine Growth Factor Rev., 11: 59-69 (2000). Existe la teoría, aunque no asumida para los propósitos de esta invención, de que dichas condiciones probablemente se producen en áreas de inflamación autoinmune, tal como en el riñón de pacientes de 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 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, donde la activación y/o la acción de TGF- β está limitada a los sitios de inflamación y daño tisular.

55 La presente invención se basa adicionalmente, en parte, en el descubrimiento y la demostración de que el agotamiento de linfocitos por anti-timocito globulina (ATG) seguido de la administración de TGF- β latente es eficaz para mejorar la función renal y aumentar la tasa de supervivencia en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la descripción, los linfocitos del hospedante son agotados

antes de la administración de TGF- β latente, de tal modo que se produzca el efecto terapéuticamente deseado de la administración de TGF- β latente.

Existe la teoría adicional, aunque no asumida para los propósitos de esta invención, de que el efecto terapéutico de TGF- β se alcanza, en parte, debido a los efectos estimuladores del TGF- β sobre el crecimiento de células T reguladoras. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la descripción, se puede administrar otro agente que promueve la expansión de células T reguladoras en lugar de, o además de, TGF- β latente.

Esta descripción proporciona métodos para tratar un mamífero (p. ej., un humano) con una enfermedad autoinmune, p. ej., lupus eritematoso sistémico (SLE, del inglés "systemic lupus erythematosus"), artritis reumatoide (RA, del inglés "rheumatoid arthritis"). En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado una reducción de la velocidad de progresión de la enfermedad y/o una mejoría en los síntomas. La 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 realizaciones más particulares, los métodos de la descripción incluyen las siguientes etapas:

(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 efectiva de TGF- β latente y/o un agente que promueve la expansión de células T reguladoras.

En algunas realizaciones, el agotamiento de linfocitos se logra administrando anticuerpos anti-timocito (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 efectiva 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 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 mofetil, y rapamicina).

En algunas realizaciones, 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 presión sanguínea sistémica, proteinuria, albuminuria, velocidad de filtración glomerular y/o flujo sanguíneo renal.

El anterior resumen y la siguiente descripción detallada solamente son ejemplos explicativos, y no restrictivos, de la invención reivindicada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: muestra un alineamiento de secuencias de aminoácido 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 dividida 'larga' en la que se observa una inserción de 28 aminoácidos en el dominio pre-pro que comienza en el residuo 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 a al sitio de reconocimiento de integrina RGD encontrado en las proteínas de péptido asociado a latencia (LAP) de TGF- β 1 y TGF- β 3. + se refiere a residuos de cisteína implicados en los enlaces de disulfuro entre las dos proteínas LAP monoméricas. # se refiere a un residuo de cisteína implicado en la formación del enlace de disulfuro sencillo de monómeros de TGF- β .

Figura 2: muestra el efecto terapéutico del tratamiento de combinación de ATG/TGF- β 1 latente sobre la función renal. Se inyectaron 500 μ g de ATG a ratones MRL/MPJ-Tnfrs6^{lpr} (un modelo murino de SLE) intraperitonealmente (i.p.) dos veces, con tres días de diferencia, con o sin 4 μ g de TGF- β 1 latente en 100 μ L de salino tamponado con fosfato (PBS, del inglés "phosphate buffered saline"). 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, ratones SLE fueron tratados 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 SLE con 100 mg/kg i.p. de ciclofosfamida en 200 μ L de salino semanalmente. La proteinuria fue significativamente menor en ratones SLE tratados con TGF- β 1 latente y ATG, en comparación con ratones SLE tratados con ATG solamente, control de Ig+TGF- β 1 o control de Ig solamente. Las proteínas medias

totales en orina del grupo de tratamiento de combinación se aproximaron al nivel alcanzado con ciclofosfamida, un tratamiento actual para el lupus.

5 **Figura 3:** muestra el efecto del tratamiento de combinación sobre el desarrollo de enfermedad renal grave. Los ratones fueron tratados como se ha descrito anteriormente para la Figura 2. Los ratones SLE tratados con ATG y TGF- β 1 latente conjuntamente exhibieron un descenso de la incidencia de proteinuria grave (>500 mg/dL·día) en comparación con los ratones SLE tratados solamente con ATG, control de Ig+TGF- β 1 o control de Ig solamente.

10 **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 SLE tratados con la combinación de ATG y TGF- β 1 latente en comparación con los ratones SLE tratados solamente con ATG, control de Ig+TGF- β 1 o solamente Ig. 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.

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

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

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

30 **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 temporal con ATG y TGF- β 1 latente. De hecho, el beneficio de 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).

35 **Figura 9A:** muestra el número absoluto de células CD4⁺ CD25⁺ en cultivos de esplenocitos expuestos a varios tratamientos. Los esplenocitos fueron agrupados a partir de diez ratones MRL/lpr con enfermedad activa. Se evaluaron seis condiciones diferentes (8 pocillos/condición): 1) solamente células, 2) ATG (100 μ g/mL) + TGF- β 1 activo (10 ng/mL; Genzyme), 3) solamente ATG (100 μ g/mL), 4) control de IgG de conejo (100 μ g/mL) + TGF- β 1 activo (10 ng/mL), 5) control de solamente IgG de conejo (100 μ g/mL), y 6) solamente TGF- β 1 activo (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 contabilizaron y se tiñeron para análisis FACS. Se tiñó una muestra de 5×10^6 células por tratamiento con CD4-Alexa 488 anti-ratón de rata y con CD25-PerCp-Cy5.5 anti-ratón de rata, y se analizó mediante citometría de flujo. Se analizó una adquisición de 6.000 linfocitos por tratamiento para tinción sobre 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).

40 **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 fueron permeabilizadas durante una noche y teñidas para FOXP3.

Descripción detallada de la invención

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

En algunas realizaciones, los métodos de la descripción comprenden las siguientes etapas:

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

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

Agotamiento de linfocitos

5 El agotamiento de los linfocitos en circulación se puede conseguir administrando un agente de agotamiento de linfocitos al mamífero, o exponiendo al mamífero a condiciones que den como resultado una pérdida de una fracción sustancial de células linfocíticas (p. ej., linfocitos, células asesinas naturales (NK, del inglés "natural killers"), 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 un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, un 95% o más, y opcionalmente, los recuentos de linfocitos B (células B) se reducen en al menos un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, un 95% o más. En realizaciones preferidas, los linfocitos agotados predominantemente son células T, lo que significa que el porcentaje de células T agotadas es superior (p. ej., 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces o más) al porcentaje de células B agotadas.

15 El nivel de agotamiento de linfocitos puede determinarse fácilmente, por ejemplo, midiendo la cantidad de linfocitos sanguíneos periféricos (PBL, del inglés "peripheral blood lymphocytes"). Los recuentos de linfocitos pueden determinarse usando técnicas de laboratorio clínico convencionales (p. ej., mediante citometría de flujo). Los valores de referencia para niveles de PBL normales en 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 El agente de agotamiento de linfocitos puede ser un anticuerpo antilinfocitos, p. ej., anticuerpos anti-células T, p. ej., globulina anti-timocito (ATG), tal como, p. ej., Thymoglobulin[®], Atpgam[™], 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., humana) en otra especie (p. ej., conejo o caballo). La ATG se une a proteínas de superficie celular tales como los antígenos superficiales de linfocito CD2, CD3, CD4, CD8, CD11 a, CD18, CD25, HLA DR y HLA clase I (Bourdage et al., Transplantation, 59: 1194-1200 (1995)). Se cree que la ATG induce inmunosupresión principalmente como resultado del agotamiento celular (véase, p. ej., Bonnefoy-Bernard 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.

30 Además de la ATG, el agente de agotamiento de linfocitos consta de o comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido a uno o más antígenos superficiales de linfocito específicos, 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 cualesquier otros antígenos superficiales de linfocito especificados anteriormente, etc.

El agente de agotamiento de linfocitos puede ser un corticosteroide.

35 Las condiciones que dan como resultado el agotamiento de linfocitos pueden incluir la exposición a radiación gamma.

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

Fase de reconstitución

40 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.

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 en el inicio de la fase de relleno, en otros casos el agente se administra después de que se haya producido algo de repoblación. Antes de

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

5 En humanos, los linfocitos se repueblan hasta los niveles de pre-agotamiento a diferentes velocidades dependiendo del agente de agotamiento. Por ejemplo, con ATG, una repoblación completa puede llevar de dos a cuatro meses, mientras que después de tratamiento con Campath™, la repoblación puede llevar varios años. Por consiguiente, 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, de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 días; 1, 2, 3, 4 ó 5 semanas, o más.

TGF-β

10 En determinadas realizaciones, los métodos de la 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.

15 El TGF-β es secretado de forma natural en el denominado "complejo latente pequeño" (100 kDa) en el que el TGF-β biológicamente activo está asociado de forma no covalente a su pro dominio (péptido asociado a latencia, LAP) y en el denominado "complejo latente grande" (220 kDa) que adicionalmente contiene 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 del complejo. Para una revisión más detallada de las formas latentes y el proceso de activación, véase, p. ej., Cytokine Reference, ed. Oppenheim et al., Academic Press, San Diego, CA, 2001, pág. 724-725. Tal 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 los periodos de tiempo deseados también serían útiles en los métodos de esta invención. Existen tres isoformas conocidas de TGF-β de mamífero (de TGF-β1 a TGF-β3), 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-βs humanas.

Tabla 2

Especies	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β3
Humana	P01137	PO8112	P109600
Ratón	P04202	P27090	P171125
Rata	AAD20222	AAD24484	Q07258
Porcino	AAA616	AAB03850	P15203
Simio	P09533	WFMKB2	

30 Los aspectos estructurales y funcionales del 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. Por tanto, los formas inactivas de TGF-βs modificados que mantienen la capacidad de unirse a uno o más receptores de TGF-β (TGF-βRI, TGF-βRII o TGF-βRIII) también serían útiles en los métodos de la descripción. Dichas formas inactivas de TGF-β modificado pueden contener solo una secuencia de aminoácidos parcial o mutada del TGF-β natural. Por ejemplo, las formas inactivas 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 un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% a la porción C-terminal de 112 aminoácidos de SEQ ID NO: n en toda la longitud de dicha porción C-terminal de SEQ ID NO: n, donde n = 1, 2 ó 3.

Agentes que promueven la expansión de Células T reguladoras

40 En determinadas realizaciones, los métodos de la 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 linfocíticas a través de mecanismos dependientes de contacto o independientes de contacto (p. ej., producción de citocinas). Se han descrito varios tipos de células T reguladoras, que incluyen células T γ δ, células T asesinas naturales (NKT), células

5 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 "naturales" 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 menor de células CD8⁺ que expresan FOXP3 son células T reguladoras. Las Tregs CD4⁺ se pueden dividir adicionalmente en células T reguladoras inducidas que secretan interleucina 10 (IL-10) y TGF-β tal como células Tr1 y células T-colaboradoras 3 (Th3). Otros marcadores superficiales para células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ incluyen CD45RB, CD38, GITR, TGF-β superficial, 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).

10 Por consiguiente, 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 (que incluye células Tr1 y células Th3); (3) células CD4⁺CD25⁺ (que incluyen células que presentan los marcadores adicionales CD45RB⁺, CD38⁺, GITR, TGF-β superficial, CTLA-4, CD103, CD134 y/o CD62L); (4) células T que expresan FOXP3 (que incluye células CD8⁺ y células CD4⁺); (5) células T γδ; (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 and 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).

20 Los ejemplos de agentes, diferentes al 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 mofetil, 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).)

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

30 (1) análisis de citometría de flujo, donde se usa la co-expresión de CD4, CD25, y/o FOXP3, y/o CD62L, y/o GITR, y/o CTLA4, y/o TGF-β superficial, y/o CD103, y/o CD134 como indicación de un fenotipo de célula T reguladora (véase, p. ej., Jonuleit, ver anterior);

35 (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 son añadidas a células T de respuesta y el co-cultivo es estimulado con anti-CD3 o con linfocitos allogeneicos. En presencia de células T reguladoras, las células T de respuesta se vuelven incapaces de proliferar en respuesta a dichos estímulos. El grado de proliferación se determina típicamente mediante incorporación de timidina tritiada); y

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

Usos

45 Los métodos de la 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 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.

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

55 Es de esperar que los métodos de la descripción frenen 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 un 10%, 20%, 30%, 50%, 70% o más respecto a los niveles pretratamiento.

5 La descripción además proporciona 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 de lupus), 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 dichas enfermedades, es de esperar que el tratamiento dé como resultado la mejoría de la función renal (p. ej., frenar la pérdida, preservar o mejorar la misma) como se indica, p. ej., a través de un cambio en la presión sanguínea sistémica, proteinuria, albuminuria, velocidad de filtración glomerular y/o flujo sanguíneo renal.

10 El término "función renal" se refiere a la capacidad de un riñón para llevar a cabo funciones fisiológicas tales como la filtración a presión, la reabsorción selectiva, la secreción tubular y/o la regulación de la presión sanguínea sistémica. Los métodos para determinar la función renal son bien conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, medidas de la presión sanguínea sistémica y de la presión capilar glomerular, proteinuria, albuminuria, hematuria microscópica y macroscópica, nivel de creatinina en suero (p. ej., una fórmula que estima la función renal en humanos iguala un nivel de creatinina de 2,0 mg/dL a un 50% de función renal normal y 4,0 mg/dL a un 25%), disminución en la velocidad de filtración glomerular (GFR) (p. ej., indicada a través de la velocidad de eliminación de creatinina, o usando ensayos de inulina), y el grado de daño tubular.

15 Para una revisión detallada 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 escreta menos de 0,15 g de proteína en la orina en un periodo de 24 horas. Casi todos los tipos de enfermedad renal provocan una pérdida de proteínas en orina entre leve (de hasta 500 mg al día) y moderada (de hasta 4 g al día). La concentración normal de albúmina en la orina es inferior a 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 de 0,6-1,5 mg/dL en hombres y 0,6-1,1 mg/dL en mujeres. La relación entre los niveles de creatinina, la función renal y la etapa de la enfermedad renal se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

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

30 Por lo tanto, los métodos de la descripción pueden ser útiles en pacientes que tienen una enfermedad autoinmune con una reserva renal reducida o disminuida, una insuficiencia renal, fallo renal o enfermedad renal en etapa final. Por ejemplo, los métodos de la invención se pueden usar en un paciente con niveles de microalbuminuria, macroalbuminuria y/o proteinuria de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 g ó más o 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.

35 En algunas realizaciones, los métodos de la descripción reducen la cantidad de proteína secretada en la orina (proteinuria), la cantidad de albúmina secretada en la orina (albuminuria) y/o los niveles patentes de creatinina en suero en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% ó más respecto a sujetos de control. En otras realizaciones, los métodos de la descripción frenan la pérdida de función renal en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% ó más respecto a sujetos de control. En la presente memoria se describen métodos ilustrativos, no limitantes, para determinar la función renal, así como, por ejemplo, en el documento WO 01/66140.

Métodos de Administración

45 En los métodos de la invención, la "administración" no se limita a un sistema de administración particular y puede incluir, sin limitación, administración parenteral (que incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramedular, intraarticular, intramuscular o intraperitoneal), rectal, tópica, transdermal 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

5 un vehículo y/o aditivo farmacéuticamente aceptable formando parte de una composición farmacéutica. Las formas salinas fisiológicamente aceptables y los excipientes y técnicas de formulación farmacéutica estándares son bien conocidos por los especialistas 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).

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

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

15 Las dosis efectivas logradas para un animal pueden convertirse para uso en otro animal, incluyendo humanos, usando los 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: Para:	Ratón (20g)	Rata (150g)	Mono (3,5 kg)	Perro (8 kg)	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
Humano	12	7	3	2	1

20

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

EJEMPLOS

Determinación de la potencia de TGF-β1 activado

25 Se produjo TGF-β1 latente humana recombinante en células CHO (Genzyme, Framingham, MA). La disrupción de LAP de TGF-β1 latente se logró mediante acidificación. Se diluyó el LAP-TGF-β1 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 µL de HCl 1 N y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, la muestra se neutralizó con 100 µL de NaOH 1,2 N/HEPES 0,5M.

30 La muestra de TGF-β1 activado se analizó usando el Ensayo de Potencia Celular A549 y se determinó la actividad en comparación con un control de TGF-β2 humano recombinante (Genzyme, Framingham, MA). El ensayo de potencia A549 se basa en la liberación inducida por TGF-β1 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 desde células A549 en respuesta a TGF-β1 se midió usando un procedimiento ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Modelo murino de lupus

35 **Animales y Reactivos** - Se obtuvieron ratones MRL/lpr hembra de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se recibieron con una edad de 5-6 semanas. Se generó ATG mediante inmunización de conejos con timocitos de ratón Balb/c como se indica a continuación. Los conejos fueron inmunizados subcutáneamente con 5×10^7 timocitos nuevos en el día 0 y fueron inyectados intravenosamente con 5×10^7 timocitos nuevos en el día 14. Se reunió suero recolectado los días 20, 22 y 25 y se aisló la fracción de IgG mediante cromatografía y precipitación con sulfato sódico. Se usó una preparación comercial de IgG de conejos jóvenes como control negativo (Sigma, St. Louis, MO).
40 Se produjo TGF-β1 latente humana recombinante en células CHO (Genzyme, Framingham, MA). La ciclofosfamida se adquirió de VWR Scientific Products (West Chester, PA).

45 **Tratamiento** - Los animales fueron monitorizados para determinar proteinuria, albuminuria y los títulos de anticuerpos IgG para ADN de doble cadena (ADNs) cada tres semanas (ver más adelante). El tratamiento terapéutico se inició cuando los animales comenzaron a desarrollar anticuerpos para ADNs y/o una proteinuria elevada a las 12-13 semanas de edad. El tratamiento con ATG o IgG de conejo de control consistió en dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 500 µg (~25 mg/kg) administradas por separado (días 0 y 3). El TGF-β1 se administró a partir de los días

14-25 como doce inyecciones i.p. diarias de 4 µg por ratón. Una dosis de 4 µg de TGF-β1 latente corresponde a una dosis de 1 µg (~0,05 mg/kg) de la porción activa (madura, no asociada a LAP) de la molécula. Se usó la ciclofosfamida como control positivo y se administró i.p. semanalmente con 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 un control de IgG de conejo, un control de IgG de conejo + TGF-β1 latente, ATG, ATG + TGF-β1 latente o ciclofosfamida, con diez animales por grupo.

Niveles de proteinuria y albuminuria - Se midieron los niveles de proteínas en orina de ratones individuales usando un ensayo colorimétrico diseñado para medir la concentración de proteína total. Los niveles de albúmina en la orina se determinaron con un ensayo ELISA cuantitativo.

Se llevó a cabo una recolección de orina de 24 horas cada tres semanas colocando los ratones en jaulas metabólicas individuales. Se midió la proteinuria 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. Se incubó la mezcla a 37°C durante diez minutos para permitir la unión del reactivo a grupos amino básicos sobre las proteínas, lo que conduce a un desplazamiento de la absorbancia a 600 nm. El aumento de la densidad óptica (D.O.) 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:

$$\frac{DO_{muestra}}{DO_{patrón}} \times Conc_{patrón} \times Dilución = Conc_{muestra} \text{ (mg/dL)}$$

Se determinaron los niveles de albúmina en la orina usando un kit ELISA competitivo indirecto, siguiendo las instrucciones del fabricante (Albuwell M de Exocell Inc, Filadelfia, PA). Brevemente, se añadieron series de diluciones a la mitad de las muestras de orina a pocillos duplicados de una placa ELISA cubierta con albúmina de ratón. A continuación se añadió anticuerpo de albúmina anti-ratón de conejo a los pocillos, permitiendo la competencia entre la unión del anticuerpo a la albúmina de la muestra y la albúmina unida al pocillo. Esto vino seguido de la adición de inmunoglobulina anti-conejo conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) y sustrato de HRP para detectar la cantidad de anticuerpo de albúmina anti-ratón de conejo unida al pocillo. La D.O. a 450 nm era inversamente proporcional al logaritmo de la cantidad de albúmina de la muestra de orina. La concentración de albúmina en las muestras de orina se obtuvo a partir de una curva de calibrado obtenida con concentraciones conocidas de albúmina murina.

ELISA anti-ADNds - Se midieron los títulos de anticuerpo IgG para ADNds en muestras de suero de ratones individuales mediante ELISA.

Se recolectaron muestras de suero de ratones individuales cada tres semanas. Los títulos de anticuerpos para ADNds fueron determinados mediante ELISA. Se digirió ADN de cadena doble de ratón (The Jackson Laboratory) con nucleasa S1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para eliminar cualquier ADN de cadena sencilla y a continuación se usó para recubrir los pocillos de una placa ELISA de 96 pocillos (100 µL/pocillo de 1 µg/mL de ADNds) durante una noche a 4°C. Las placas fueron pretratadas con sulfato de protamina al 0,01% en agua (150 µL/pocillo durante 90 minutos a temperatura ambiente) para facilitar la adhesión del ADN. Tras el recubrimiento, las placas fueron incubadas 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 en serie a la mitad de suero a pocillos duplicados y se incubaron a 37°C durante una hora. Las placas fueron lavadas y se añadió IgG anti-ratón de cabra conjugada a HRP (Pierce, Rockford, IL) para detectar anticuerpos ligados a ADNds (37°C durante una hora). Tras el lavado, se añadió el sustrato de HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la D.O. del producto colorimétrico 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 la recíproca de la dilución de suero que proporciona una D.O. superior o igual a 0,1. Se usó suero de ratón normal como control negativo (título <200, la menor dilución evaluada) y suero de ratones MRL/lpr envejecidos y con lupus como control positivo (título de 6400-25600).

Histología - Se extrajeron los riñones para análisis histológico en el momento programado para el sacrificio o durante el curso del estudio para los animales moribundos que requirieron eutanasia. Los riñones fueron cortados en láminas longitudinalmente y se fijaron en formalina tamponada neutra. Se tiñeron secciones de aproximadamente 5 µm con hematoxilina y eosina (H&E) y manchas de ácido peryódico-Schiff (PAS). Los patólogos adjudicaron una puntuación a las láminas referida a 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 WHO clase I)
1	Enfermedad mínima a ligera, caracterizada por depósitos mesangiales (comparable a WHO clase IIA)
2	Enfermedad ligera a moderada, caracterizada por hiper celularidad con o sin depósitos mesangiales (comparable a WHO clase IIB)
3	Enfermedad de moderada a grave, caracterizada por glomerulopatía mesangioproliferativa y capilares de "alambre enrollado" con o sin necrosis fibrinoide de los lazos capilares, ruptura de cápsula de Bowman e inflamación periglomerular y fibrosis (formación "de media luna") que afecta a menos del 25% de los glomérulos. A menudo se produce una synechiation focal de agrupación glomerular al epitelio capsular de Bowman y puede ser el único descubrimiento destacable; si la synechiation es el único descubrimiento, se asignará una puntuación de 3 si están afectadas menos del 75% de las agrupaciones glomerulares.
4	Enfermedad de moderada a grave con las mismas características de la puntuación 3, pero que afecta al 25-50% de las agrupaciones glomerulares
5	Enfermedad grave con las mismas características de la puntuación 3, pero que afecta al 50-75% de las agrupaciones glomerulares
6	Enfermedad grave con las mismas características de la puntuación 3, pero que afecta a más del 75% de las agrupaciones glomerulares
Las puntuaciones 3-6 dividen las puntuaciones de WHO III y IV en cuatro sub-categorías	

Tabla 5B

Inflamación intersticial	
0	Sin lesiones significativas
1	Inflamación y fibrosis mínimas a ligeras
2	Inflamación y fibrosis ligeras 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.	

- 5 **Estadística** - Se llevó a cabo un análisis estadístico usando ensayos de comparación múltiple de Tukey para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. Se aceptaron valores P iguales o inferiores a 0,05 como estadísticamente significativos.

- 10 **Proteinuria y Albuminuria** - El tratamiento con ATG o TGF- β 1 latente solo (control de Ig + TGF β 1) 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 sencillo en comparación con los ratones tratados con control de Ig (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).

La reducción observada en los niveles de proteínas totales 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).

5 La cuantificación 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 control negativo de Ig o los grupos de terapia de agente sencillo (ATG, control de Ig + TGF β 1).

10 *Anticuerpos para ADNds* - 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 ADNds con cinéticas comparables. A modo de comparación, se produjo un retardo considerable en la aparición de títulos anti-ADNds 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 DNA-anti-DNA desempeña una función importante en la inflamación y la patología renal característica del lupus. Sin embargo, la aparente inhibición en el desarrollo de anticuerpos para ADNds en el grupo de tratamiento de combinación no podía atribuirse completamente a la preservación 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.

15 *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 mayor grado 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 presentó solo un 40% de tasa de supervivencia al final del estudio.

20 *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 y los ratones que recibieron ATG solamente o TGF- β 1 latente e Ig de control. Estos descubrimientos histológicos se correlacionan con las observaciones clínicas de proteinuria/albuminuria reducidas y de mejoría de la supervivencia en los animales del tratamiento de combinación.

25 Se anotó un descenso mínimo 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 solamente con IgG de conejo de control.

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

35 Se llevó a cabo un estudio repetido con ratones MRL/MPJ-Tnfrs6^{lpr} siguiendo el mismo régimen de tratamiento descrito anteriormente. 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 temporal 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).

40 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 dichas condiciones, no se observó ningún efecto estadísticamente significativo del

tratamiento con ATG y TGF- β 1 latente o de un agente por separado, en el curso de la 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 cepa NZB/NZWf1.

5 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 fueron analizadas mediante FACS para determinar la presencia de Tregs. Las células de bazo agrupadas procedentes de diez ratones MRL/lpr con enfermedad activa (~25 semanas de edad) fueron resuspendidas 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 estreptomina y glutamina 2 mM. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos que contenían 2 mL de células/pocillo en seis condiciones diferentes (8 pocillos/condición): 1) solamente células, 2) ATG (100 μ g/mL) + TGF- β 1 activo (10 ng/mL; Genzyme), 3) solamente ATG (100 μ g/mL), 4) control de IgG de conejo (100 μ g/mL) + TGF- β 1 activo (10 ng/mL), 5) control de solamente IgG de conejo (100 μ g/mL), y 6) solamente TGF- β 1 activo (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 con un 5% de CO₂. A continuación se reunieron células de cada condición de cultivo, se lavaron en salino tamponado con fosfato, se contabilizaron y se tiñeron para análisis FACS. Se tiñeron un total de 5×10^5 células por muestra con CD4-Alexa 488 anti-ratón de rata (N° de cat. 557667; BD Pharmingen, San Diego, CA) y CD25-PerCp-Cy5.5 anti-ratón de rata (N° de cat. 551071; BD Pharmingen). Para la detección intracelular de FOXP3, las células teñidas para CD4/CD25 superficial fueron permeabilizadas durante una noche y teñidas usando el kit de tinción FOXP3 (N° 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 sobre 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).

25 Como se muestra en la Figura 9, el número de células T CD4⁺CD25⁺ recuperadas máximo en los cultivos que contienen ATG + TGF- β 1. Las células T reguladoras típicamente expresan un fenotipo CD4⁺CD25⁺ pero las células T activadas también pueden exhibir dicho fenotipo. Una tinción de FOXP3 adicional proporciona una evidencia adicional de un fenotipo Treg y los resultados obtenidos confirmaron que el tratamiento con ATG+TGF- β 1 produjo el mayor número de Tregs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. El tratamiento solamente con ATG también resultó conducir a un ligero aumento de dicha 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 dichas células pueden proporcionar un beneficio terapéutico en condiciones de autoinmunidad.

Modelo murino de artritis

35 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 (N° de cat. 2002-2, Chondrex) en adyuvante de Freund completo en un volumen total de 100 μ L en la base de la cola. Se realizó una inmunización por inyección con colágeno en adyuvante de Freund incompleto 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) administradas por separado (días 23 y 26). El TGF- β 1 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, se examinaron los ratones individualmente y se asignaron puntuaciones en función de los signos clínicos de enfermedad 2-3 veces por semana. La escala de puntuación artrítica se define en la Tabla 7.

45

50

Tabla 7

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

Se analiza individualmente cada zarpa y la puntuación artrítica para un ratón dado es la suma de las puntuaciones para todas las zarpas (puntuación máxima de 16)

5 El tratamiento solamente con ATG dio como resultado una reducción en las puntuaciones de enfermedad y la adición de TGF-β1 latente no proporcionó un beneficio adicional en las condiciones evaluadas. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8

Día	Puntuación artrítica (Media ± SEM)			
	Ig de conejo	Ig de conejo + TGF-β1 latente	ATG	ATG + TGF-β1 latente
22	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
26	2,7 ± 2,3	3,7 ± 2,5	2,8 ± 2,6	5,0 ± 3,5
29	10,0 ± 4,2	10,1 ± 4,3	3,4 ± 4,9	5,8 ± 5,3
32	10,5 ± 4,4	11,6 ± 3,0	5,5 ± 6,0	6,6 ± 5,1
35	10,5 ± 4,4	12,0 ± 2,7	6,5 ± 5,9	7,6 ± 4,3
39	10,9 ± 3,9	12,9 ± 2,0	7,0 ± 5,5	8,1 ± 3,3
41	11,0 ± 4,1	12,5 ± 2,8	7,3 ± 5,2	8,8 ± 3,6
43	11,7 ± 3,7	13,4 ± 1,8	7,5 ± 5,4	8,9 ± 3,8
46	11,5 ± 4,5	13,4 ± 2,8	9,5 ± 5,1	9,1 ± 3,5
50	12,7 ± 3,0	13,5 ± 2,1	9,5 ± 4,9	9,0 ± 3,7
53	12,4 ± 4,0	13,8 ± 2,1	9,6 ± 4,8	9,3 ± 3,7
57	12,4 ± 4,0	13,8 ± 2,1	9,6 ± 4,8	9,3 ± 3,7

5 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-β1 con la ATG, observado en el modelo de lupus. Por tanto, diferentes regímenes de dosificación o una evaluación adicional de modelos animales pueden demostrar los beneficios de la administración combinada de ATG y TGF-β latente.

Modelo murino de uveítis

10 El efecto de ATG +/- TGF-β1 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 µg de los aminoácidos 161-180 de la proteína de unión retinoide interfotoreceptora (IRBP₁₆₁₋₁₈₀) (síntesis a medida, New England Peptide) en adyuvante de Freund completo en dos sitios (entre los omoplatos y la región pélvica). Comenzando 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 un cuarto 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 de inflamación a los ojos usando un sistema de puntuación progresiva entre 0 y 5, tal 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

20 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 µg (□25 mg/kg) administradas con cuatro días de diferencia (días 10 y 14). El TGF-β1 se administró a partir de los días 15-27 como trece inyecciones i.p. diarias de 4 µg por ratón. Una dosis de 4 µg de TGF-β1 latente corresponde a una dosis de 1 µg (□0,05 mg/kg) de la porción activa (madura, no asociada a LAP) de la molécula. Los grupos de tratamiento incluyeron (1) control de salino tamponado con fosfato, (2) IgG de conejo de control, (3) IgG de conejo de control + TGF-β1 latente, (4) ATG, y (5) ATG + TGF-β1 latente, con seis animales por grupo. El tratamiento solamente con ATG dio como resultado una reducción en las puntuaciones de enfermedad y la adición de TGF-β1 latente no proporcionó un beneficio adicional en las condiciones evaluadas. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

Día	Puntuación de uveítis (Media ± SEM)				
	PBS	Ig de conejo	Ig de conejo + TGF-β1 latente	ATG	ATG + TGF-β1 latente
8	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
10	1,25 ± 0,16	1,22 ± 0,15	1,29 ± 0,18	1,13 ± 0,13	1,13 ± 0,23
14	4,00 ± 0,00	3,17 ± 0,32	3,67 ± 0,22	2,10 ± 0,48	2,17 ± 0,34
17	3,81 ± 0,10	3,00 ± 0,35	3,58 ± 0,29	1,75 ± 0,37	2,00 ± 0,37

Puntuación de uveítis (Media \pm SEM)					
Día	PBS	lg de conejo	lg de conejo + TGF- β 1 latente	ATG	ATG + TGF- β 1 latente
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 \pm 0,09	2,25 \pm 0,46	3,33 \pm 0,40	1,92 \pm 0,40	2,00 \pm 0,35
46	3,56 \pm 0,13	2,09 \pm 0,41	3,25 \pm 0,39	2,00 \pm 0,44	1,92 \pm 0,40
56	3,69 \pm 0,12	2,17 \pm 0,44	3,25 \pm 0,39	1,67 \pm 0,38	1,75 \pm 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, observado en el modelo de lupus. Por tanto, diferentes regímenes de dosificación o una evaluación adicional de modelos animales pueden demostrar los beneficios de la administración combinada de ATG y TGF- β latente.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genzyme Corp.
Kaplan, Johanne
McPherson, John M.

<120> MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

<130> 7680.52-304

<140> No asignado aún

<141> 2007-04-11

<150> 60/744.713

<151> 2006-04-12

<160> 3

<170 > Versión PatentIn 3.2

<210> 1

<211> 391

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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 2 423 481 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

ES 2 423 481 T3

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
 <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
 145 150 155 160

Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu Val Lys Ala Glu
 165 170 175

ES 2 423 481 T3

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
 225 230 235 240

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
 305 310 315 320

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
 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

ES 2 423 481 T3

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
 <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

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

ES 2 423 481 T3

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. El uso de TGF- β 1 latente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico en un mamífero, donde el tratamiento comprende:
 - (a) agotar los linfocitos en circulación del mamífero mediante la administración de un anticuerpo anti-timocito,
 - (b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse, y
 - (c) durante la fase de repoblación de (b), administrar el medicamento al mamífero.
2. Una composición que comprende TGF- β 1 latente, para uso en el tratamiento de lupus eritematoso sistémico en un mamífero, donde el tratamiento comprende:
 - (a) agotar los linfocitos en circulación del mamífero mediante la administración de un anticuerpo anti-timocito,
 - (b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse, y
 - (c) durante la fase de repoblación de (b), administrar la composición al mamífero.
3. El uso de la reivindicación 1, o de la composición de la reivindicación 2 para uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde los linfocitos que deben agotarse son predominantemente células T.
4. El uso de la reivindicación 1 ó la reivindicación 3, o de la composición de la reivindicación 2 o la reivindicación 3 para uso según la reivindicación 2 ó la reivindicación 3, donde el TGF- β 1 latente comprende TGF- β 1 maduro y:
 - (a) péptido asociado a latencia (LAP); o
 - (b) péptido asociado a latencia (LAP) y proteína de unión a TGF- β latente (LTBP).
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, o de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el TGF- β 1 latente debe administrarse sistémicamente.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 ó 5, o de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, donde el mamífero es un humano.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5 ó 6, o de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, donde el mamífero presenta una función renal comprometida y el tratamiento da como resultado que se frene la pérdida, o que se preserve, o que mejore, la función renal del mamífero.
8. El uso de la reivindicación 7 ó de la composición de la reivindicación 7 para uso según la reivindicación 7, donde el frenado de la pérdida de la función renal, o su mejoría, vienen indicados por un cambio en la presión sanguínea sistémica, la proteinuria, la albuminuria, la velocidad de filtración glomerular y/o el flujo sanguíneo renal.
9. El uso de un anticuerpo anti-timocito para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico en un mamífero, donde dicho tratamiento comprende:
 - (a) agotar los linfocitos en circulación en el mamífero mediante la administración de un medicamento,
 - (b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse, y
 - (c) durante la fase de repoblación de (b), administrar TGF- β 1 latente al mamífero.
10. Un anticuerpo anti-timocito, para uso en el tratamiento de lupus eritematoso sistémico en un mamífero, donde dicho tratamiento comprende:
 - (a) agotar los linfocitos en circulación en el mamífero mediante la administración del anticuerpo,
 - (b) permitir que los linfocitos comiencen a repoblarse, y
 - (c) durante la fase de repoblación de (b), administrar TGF- β 1 latente al mamífero.

		↓	
huTGFβ1	MPPSGRLRLPLLPPLWLLVLTTPGPPAAGLSTCKTIDMELVKKRIEAIR		50
huTGFβ2	MHYCVLSAF-LILHLV---TV-----ALSLSTCSTLDMDQFMKRIEART		41
huTGFβ3	MKMLQRAL-VVLALLNFATV-----SLSLSTCTILDGFHIKKRVEAIR		44
huTGFβ1	GQILSKLRIASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRD---RVAGESAEP-E		96
huTGFβ2	GQILSKLKITSPP-EDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRRAACE		90
huTGFβ3	GQILSKLRITSPP-EP-TVMTHVPEYQVLALYNSTRLELLEEMHGEREEGCT		92
huTGFβ1	FE-PEADYYAKEVTRVLM-----VETH		125
huTGFβ2	RERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSETVCPVVTTPSGSVGSLCSRQSQVLC		140
huTGFβ3	QENTESEYYAKEIHKFDM-----IQGL		123
huTGFβ1	NEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAPLRLLR-RLKLV-		165
huTGFβ2	GYLDAIPPTFYRPFYRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLLQNPKARVP		190
huTGFβ3	AEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSVEKNRNLFRAEFRVLRVNPSSKRN		164
huTGFβ1	EQHVELYQKYSNN-----SWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVROWLS		210
huTGFβ2	EQRIELYQILKSKDLTSPTRQYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAMHEWLH		240
huTGFβ3	EORIELFQILRPDE-HIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVIREWLL		213
huTGFβ1	RGGEIEGFRISAHCSC-----DSRDNTLQVDINGFTTGR---RG		246
huTGFβ2	HKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYII PNKSELEARFAGIDGTSTYTSG		290
huTGFβ3	RRESNLGLEISTHCPCHTFQPNGDIL-ENIHEVMEIKFKGVNEDDHGRG		262
huTGFβ1	DLTAI-----HGMNRF--FLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDITNYCFS	+ +	288
huTGFβ2	DQKTIKSTRKKNKSGKTPHLLMLLPSYRLESQ-QTNRRKKRALDAAYCFR		339
huTGFβ3	DLGRLK---KQKDHNEPHLILMMI PPHRLDNPQGGGQRKKRALDITNYCFR		309
huTGFβ1	STEKNCCVRQLYIDFRKDLGKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSIDTOYS	↓	338
huTGFβ2	NVQDNCCLRPLYIDFKRDLGKWIHEPKGYANANFCAGACPYLWSSDTHS		389
huTGFβ3	NLEENCCVRPLYIDERODLGKWWHEPKGYANANFCAGACPYLWSSDTHS		359
huTGFβ1	KVLDALYNQHNFGASAAPCCVPOALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSC		388
huTGFβ2	RVLSLYNTINFEASAPCCVSDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSC		439
huTGFβ3	TVLGLYNTLNFEASAPCCVPOALEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVKSC		409
	#		
huTGFβ1	KCS	391	
huTGFβ2	KCS	442	
huTGFβ3	KCS	412	

FIG. 1

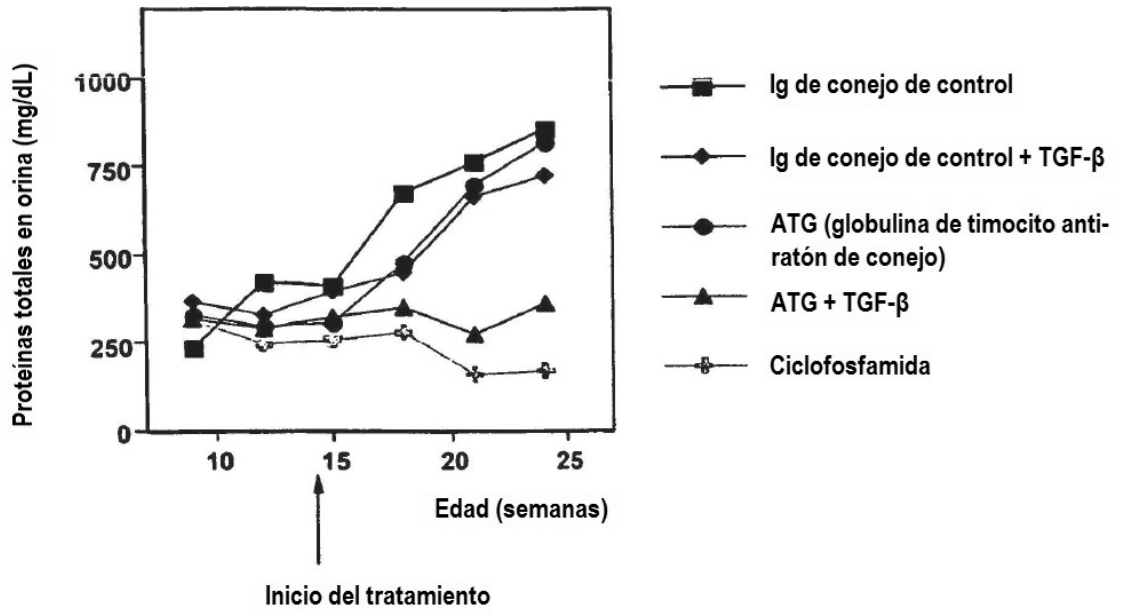


FIG. 2

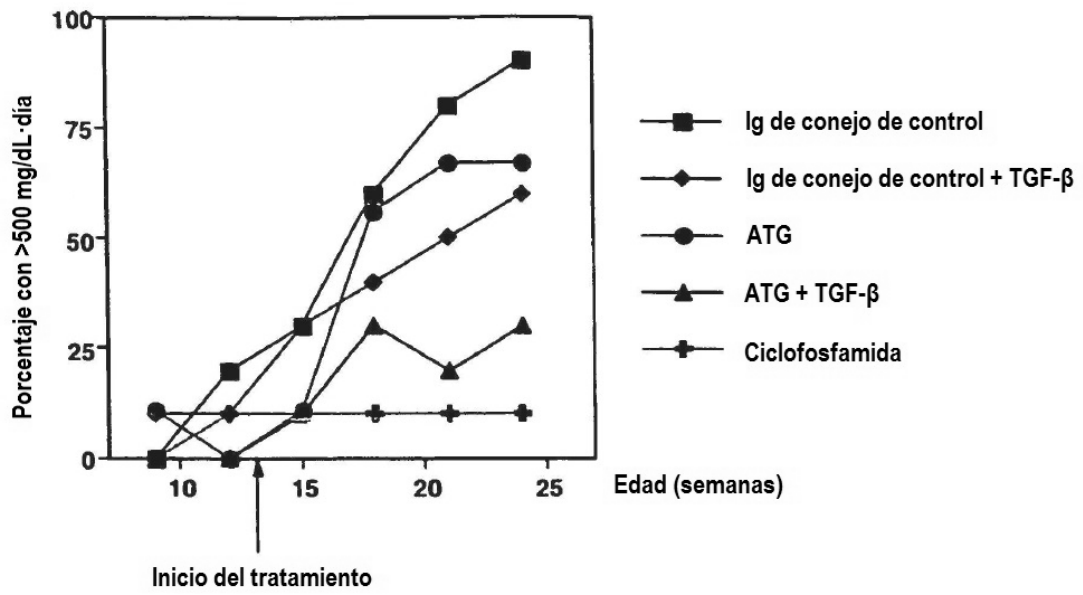


FIG. 3

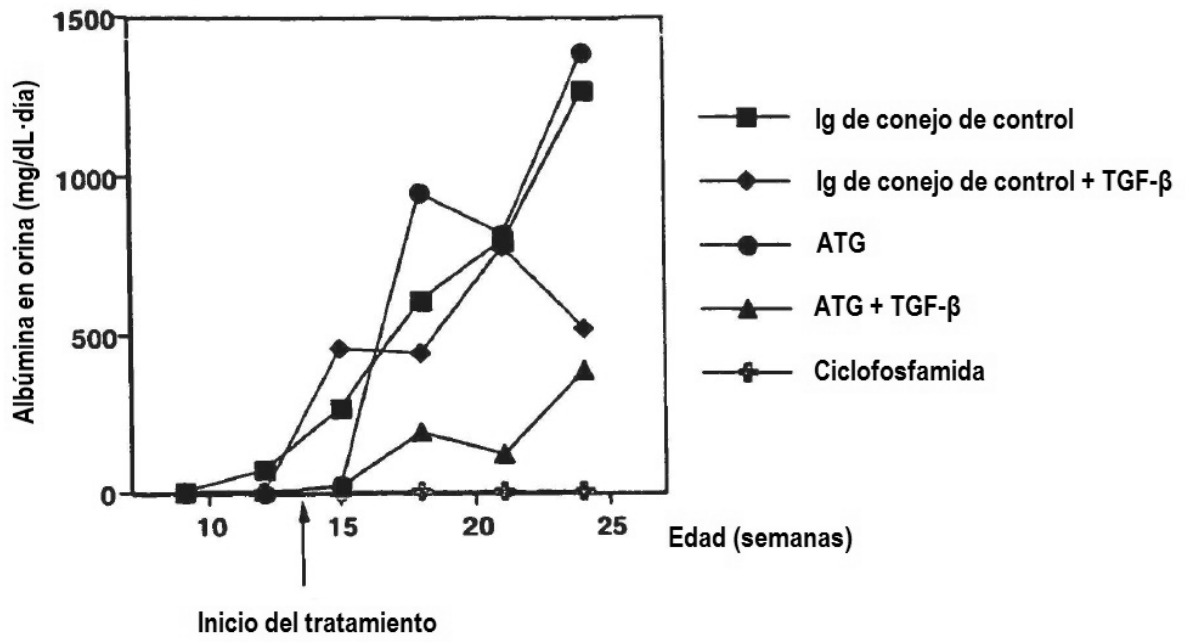


FIG. 4

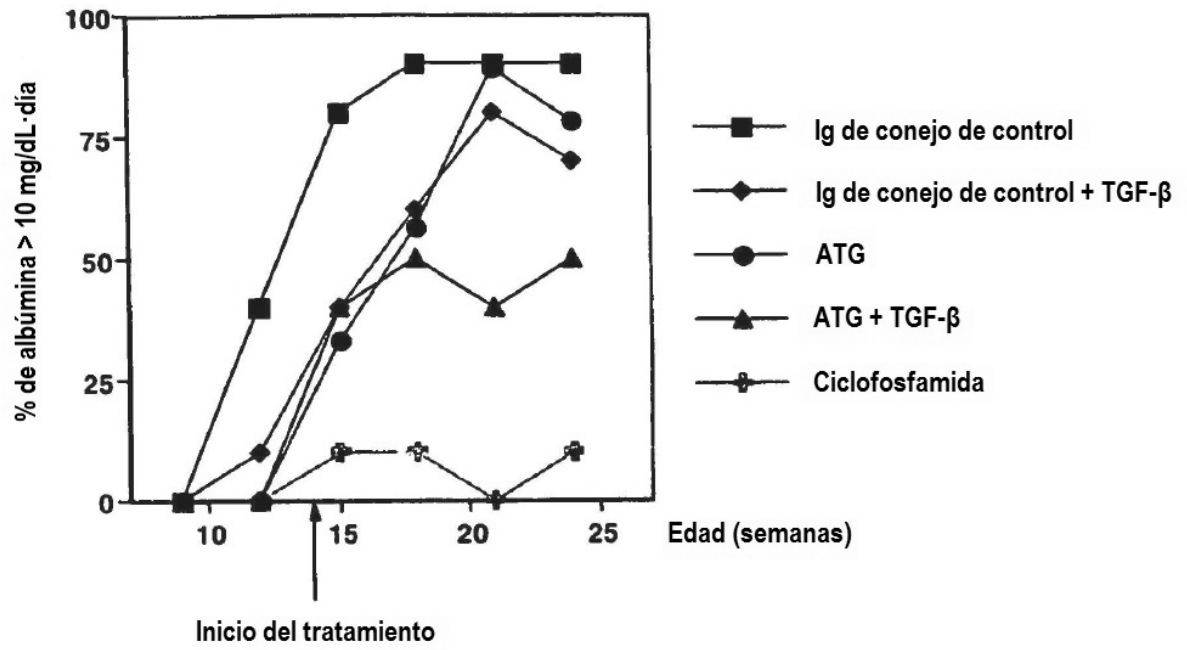


FIG. 5

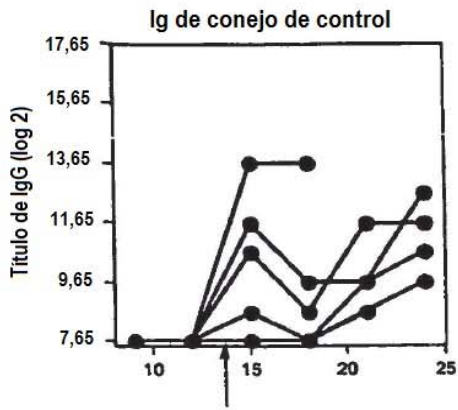


FIG. 6A

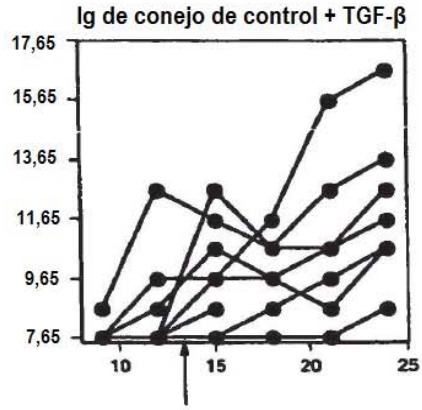


FIG. 6B

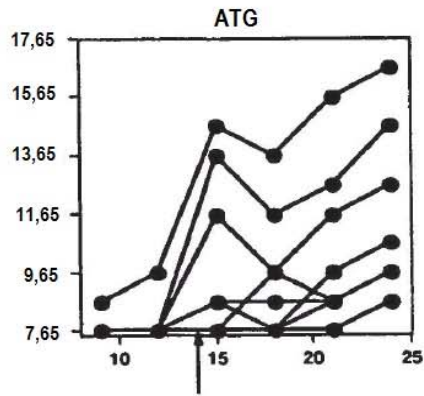


FIG. 6C

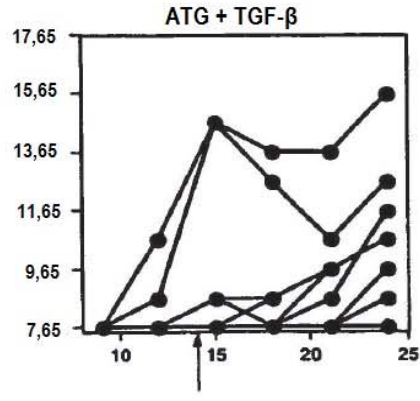


FIG. 6D

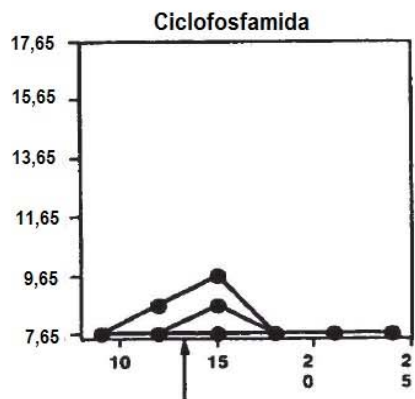


FIG. 6E

Edad
(semanas)

FIGS. 6A-6E

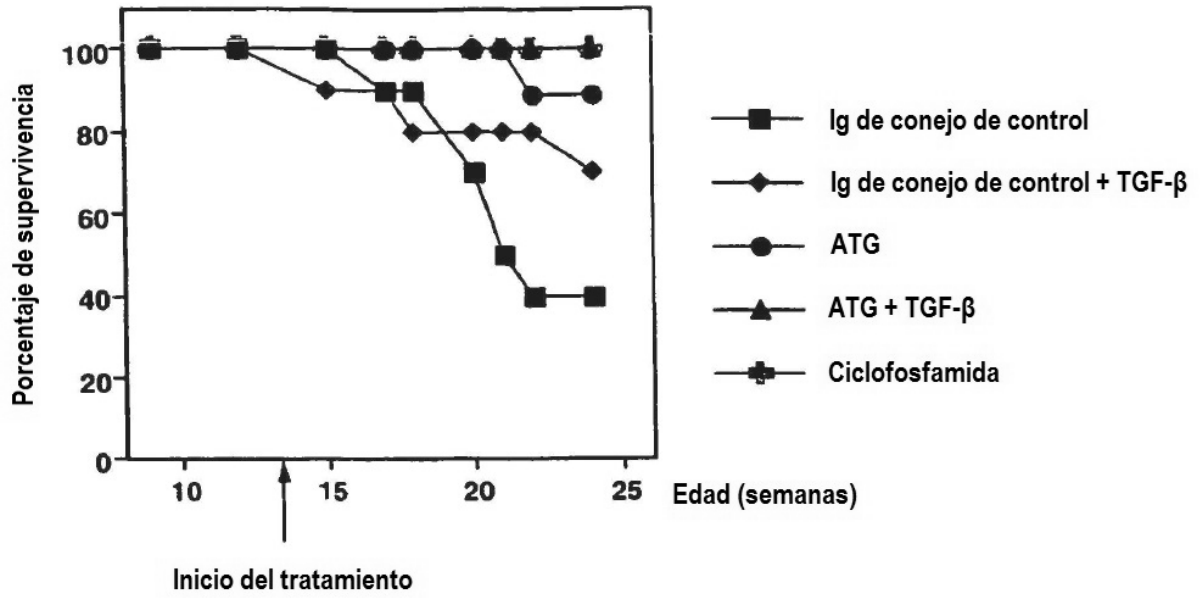


FIG. 7

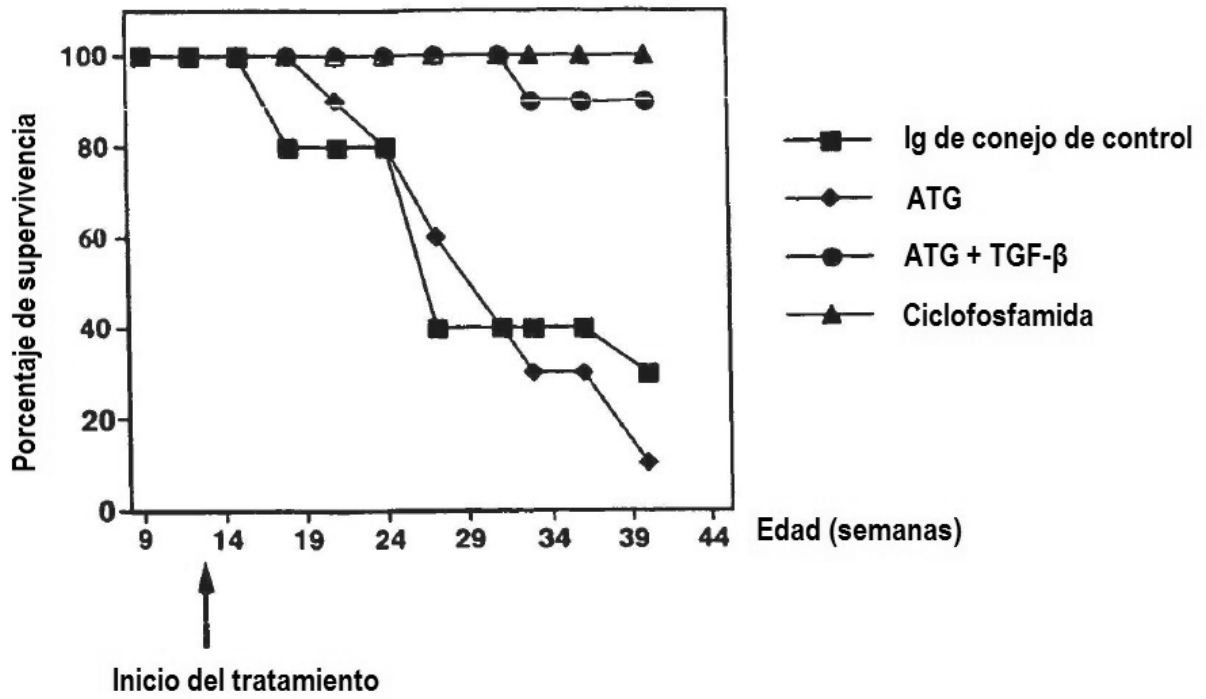


FIG. 8

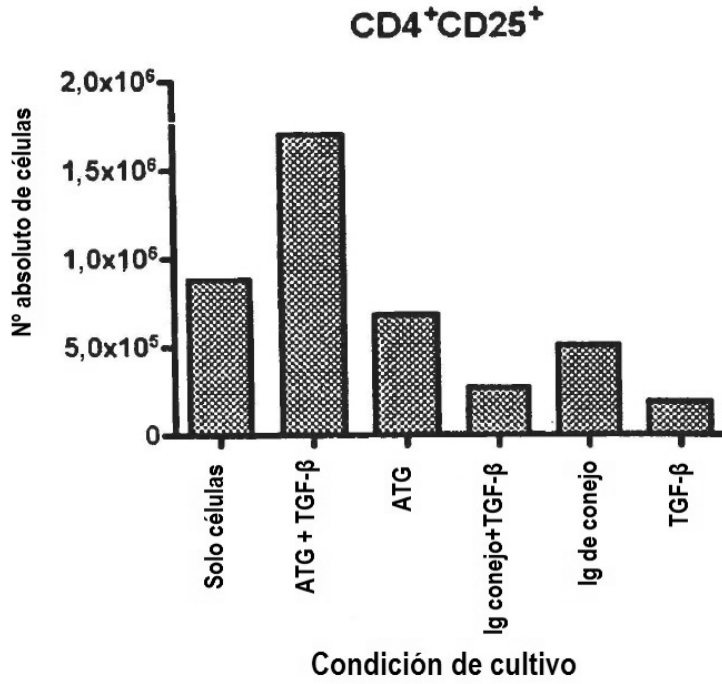


FIG. 9A

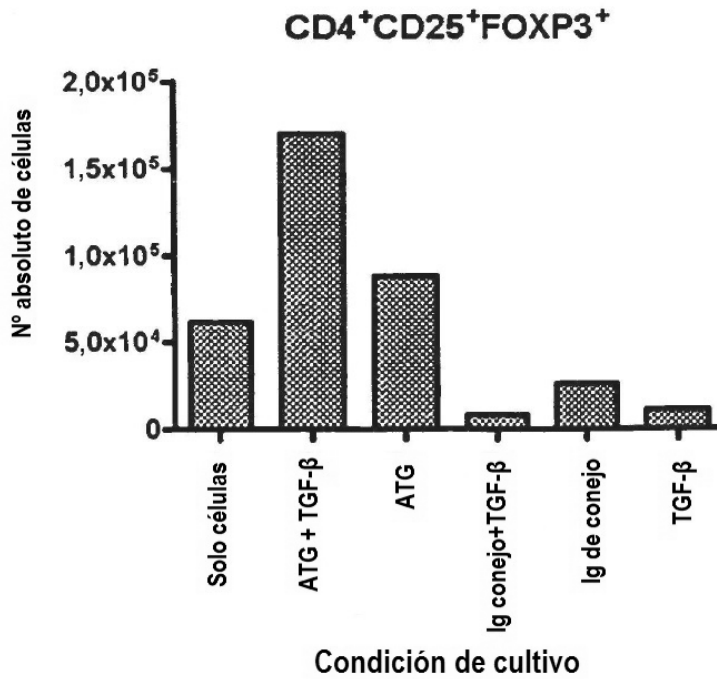


FIG. 9B