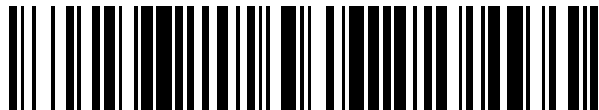


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 645**

51 Int. Cl.:

A61P 3/10 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012 PCT/EP2012/054174**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12123381**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12708029 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2683395**

54 Título: **Uso de IL-2 a baja dosis para tratar la diabetes tipo 1**

30 Prioridad:

11.03.2011 EP 11305269
11.03.2011 US 201161451663 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2018

73 Titular/es:

ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS (33.3%)
3 Avenue Victoria
75004 Paris, FR;
SORBONNE UNIVERSITÉ (33.3%) y
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)

72 Inventor/es:

KLATZMANN, DAVID;
SAADOUN, DAVID;
CACOUB, PATRICE;
ROSENZWAJG, MICHÈLE;
PIAGGIO, ELIANE;
BENSIMON, GILBERT y
BERNARD, CLAUDE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 693 645 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

Uso de IL-2 a baja dosis para tratar la diabetes tipo 1

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevas terapias de enfermedades humanas basadas en IL-2. Más específicamente, la presente invención se refiere a terapias a baja dosis de IL-2 de la diabetes tipo 1 en sujetos humanos.

Antecedentes de la invención

10 La interleucina-2 (IL-2) fue identificada hace casi 30 años [1] y originalmente se llamó factor de crecimiento de células T debido a su capacidad para estimular los linfocitos T in vitro. Es una proteína con un peso molecular reportado de entre aprox. 13 kda y 17 kda [2] y un punto isoelectrónico de aprox. 6 a 8,7.

La IL-2 se ha utilizado en la clínica para estimular las respuestas inmunes efectivas en cánceres y enfermedades infecciosas [3, 4]. Ahora está autorizado para su uso en humanos para el tratamiento del cáncer.

15 En una de sus indicaciones registradas, el tratamiento complementario del carcinoma de células renales (CCR), menos del 10% de los pacientes responden al tratamiento. Esta eficacia limitada de la IL-2 se explica ahora en parte por el reciente descubrimiento de que la IL-2 también desempeña un papel importante en la supervivencia periférica y la función supresora de las células T reguladoras (Treg) [5, 6], que se sabe que suprimen las respuestas efectoras antitumorales.

20 De hecho, la señalización del receptor IL-2/IL-2 (IL-2R) es importante durante las respuestas inmunes de las células T efectoras (Teff) y Treg. Por un lado, es necesaria una extensa señalización de IL-2R para el desarrollo de células Teff de corta duración, diferencial y terminal, que muestren una actividad funcional mejorada, y para obtener la memoria adecuada de las células T [7]. Por otro lado, la señalización de IL-2/IL-2R es esencial para el desarrollo de Treg y la homeostasis, como lo demuestra el hecho de que los ratones knock-out de IL-2 carecen de Treg. Cabe destacar que los ratones con deficiencia en IL-2 o IL-2R son capaces de desarrollar respuestas inmunitarias efectoras, como lo demuestra su desarrollo de enfermedades autoinmunes mediadas por células T (AID) graves.

25 Estas diferentes consecuencias de las anomalías de señalización de IL-2 se explican ahora por el hecho de que tanto las diferencias cuantitativas como las cualitativas en la señalización de IL-2/IL-2R regulan a Treg y Teff. Las Treg parecen requerir un bajo umbral de señalización IL-2/IL-2R para apoyar su desarrollo y homeostasis periférica [6]. Se ha demostrado que la administración de IL-2 conduce a una marcada expansión y activación de Treg en ratones y humanos [3, 4, 8].

30 Hoy en día, la IL-2 continúa siendo utilizada exclusivamente para la inmunoterapia del cáncer y no se ha investigado en enfermedades autoinmunes humanas o, más en general, en enfermedades humanas causadas por una respuesta inmune indeseable. Esto se debe a los riesgos percibidos y esperados asociados con dicho tratamiento. De hecho, la capacidad de IL-2 para estimular Teffs conlleva el riesgo de activar las células T muy efectoras que median la enfermedad y, por lo tanto, agravan la enfermedad.

35 Sumario de la invención

La presente invención proporciona interleucina-2 (IL-2) para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I en un sujeto humano, en el que la IL-2 debe administrarse a una dosis de menos de 3,5 MUI/día.

40 En el presente documento se describe un método para reducir o prevenir una respuesta inmune indeseable en un sujeto humano, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad de interleucina-2 (IL-2) eficaz para estimular los linfocitos T reguladores (Tregs) sin inducir sustancialmente linfocitos T efectoras (Teffs).

Se describe adicionalmente un método para reducir o prevenir una respuesta inmune no deseable en un sujeto humano, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad de interleucina-2 (IL-2) eficaz para estimular los linfocitos T reguladores (Tregs) sin inducir sustancialmente los efectos secundarios asociados a IL-2.

45 También se describe un método para reducir o prevenir una respuesta inmune indeseable en un sujeto humano, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad de interleucina-2 (IL-2) eficaz para estimular los linfocitos T reguladores (Tregs) sin inducir sustancialmente los efectos secundarios asociados con los linfocitos T efectoras (Teffs) e IL-2.

50 Se describe un método para reducir o prevenir una respuesta inmune indeseable en un sujeto humano, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad de interleucina-2 (IL-2) eficiente para cambiar el equilibrio (o la proporción) entre los linfocitos T reguladores (Tregs) y los linfocitos T efectoras (Teffs) (equilibrio Treg/Teff) hacia Tregs en dicho sujeto.

Se describe aún más un método para reducir o prevenir una respuesta inmune indeseable en un sujeto humano, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad de interleucina-2 (IL-2) eficiente para aumentar el equilibrio (o la proporción) entre los linfocitos T reguladores (Tregs) y los linfocitos T efectores (Teffs) en dicho sujeto.

- 5 La presente invención propone nuevas terapias basadas en IL-2. Se describe en este documento que la IL-2 puede usarse como una nueva clase de fármacos inmunorreguladores y antiinflamatorios que actúan por expansión/activación de Treg específica.

Se describe, por tanto, un método para tratar un trastorno autoinmune, relacionado con el sistema inmunológico o inflamatorio en un sujeto humano, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad de interleucina-2 (IL-2) eficiente para cambiar el equilibrio entre los linfocitos T reguladores (Tregs) y los linfocitos T efectores (Teffs) (equilibrio Treg/Teff) hacia Tregs en dicho sujeto.

10

Se describe en este documento un método para tratar un trastorno autoinmune, relacionado con el sistema inmunitario o inflamatorio en un sujeto humano, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad de interleucina-2 (IL-2) eficaz para estimular los linfocitos T reguladores (Tregs) sin inducir sustancialmente linfocitos T efectores (Teffs), y/o para disminuir la inflamación.

15

Se describe el tratamiento curativo o preventivo de tales trastornos. Más particularmente, los métodos descritos en este documento previenen la aparición o el desarrollo de un trastorno autoinmune, relacionado con el sistema inmune o inflamatorio en un sujeto.

La IL-2 suele administrarse repetidamente.

- 20 La interleucina-2 para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, inmune o inflamatorio debe administrarse a una dosis de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2 millones de unidades internacionales (MUI)/m²/día, preferiblemente de aproximadamente 0,1 ó 0,2 a aproximadamente 1 MUI/m²/día o en una dosis inferior a aproximadamente 3,5 MUI/día.

En una realización preferida, se administra en una dosis de aproximadamente 3 MUI/día o en una dosis de menos de aproximadamente 2 MUI/día, preferiblemente en una dosis de entre aproximadamente 0,1 MUI y aproximadamente 2 MUI/día, preferiblemente de aproximadamente 0,3 MUI y aproximadamente 1 MUI/día.

25

El tratamiento puede comprender preferiblemente al menos un primer tratamiento en el que la interleucina-2 se administre una vez al día durante al menos 3 días consecutivos, preferiblemente durante 3 a 7, aun preferiblemente de 4 a 5 días consecutivos. Preferiblemente es seguido por una dosis de mantenimiento después de dos a cuatro semanas. La dosis de mantenimiento se puede administrar una vez a la semana, o una o dos veces al mes.

30

En una realización preferida, el tratamiento comprende al menos un primer tratamiento en el que se administra una dosis de aproximadamente 0,2 MUI/m² de interleucina-2 una vez al día durante al menos 3 días consecutivos, preferiblemente durante 3 a 7, aun preferiblemente de 4 a 5 días consecutivos, seguido de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 0,2 MUI/m² después de una a tres semanas, cuya dosis de mantenimiento se puede repetir cada una a tres semanas. En un aspecto preferido, el sujeto es un adulto al que se le administran aproximadamente 0,3 MUI como dosis diaria de 0,2 MUI/m².

35

En otra realización preferida, el tratamiento comprende al menos un primer tratamiento en el que se administra una dosis de aproximadamente 0,6 MUI/m² de interleucina-2 una vez al día durante al menos 3 días consecutivos, preferiblemente durante 3 a 7, aun preferiblemente de 4 a 5 días consecutivos, seguido de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 0,6 MUI/m² después de dos a 4 semanas, cuya dosis de mantenimiento se puede repetir cada dos a cuatro semanas. En un aspecto preferido, el sujeto es un adulto al que se le administra aproximadamente 1 MUI como dosis diaria de 0,6 MUI/m².

40

En otra realización preferida más, el tratamiento comprende al menos un primer tratamiento en el que se administra una dosis de aproximadamente 1,8 MUI/m² de interleucina-2 una vez al día durante al menos 3 días consecutivos, preferiblemente durante 3 a 7, aun preferiblemente de 4 a 5 días consecutivos, seguidos de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1,8 MUI/m² después de aproximadamente uno o dos meses, cuya dosis de mantenimiento se puede repetir cada uno a dos meses. En un aspecto preferido, el sujeto es un adulto que se administra con aproximadamente 3 MUI como la dosis diaria de 1,8 MUI/m².

45

En términos generales, se prefiere que la IL-2 se administre en una dosis de D/10 a 20xD, preferiblemente D/5 a 10xD, en donde D es la dosis mínima que desencadena la regulación positiva de la expresión de CD25 en Treg, sin inducir la expansión de Treg. Preferiblemente, la regulación al alza de la expresión de CD25 es al menos 33%, preferiblemente al menos 50%.

50

La invención estimula los linfocitos T reguladores (Tregs) sin inducir sustancialmente linfocitos T efectores (Teffs) en un sujeto humano. Los métodos descritos en este documento hacen posible aumentar el equilibrio Treg/Teff o aumentar la potente población supresora de células Treg en dicho sujeto.

55

La IL-2 se administra además para reducir o prevenir la inflamación en un sujeto humano.

Se describe además un método para determinar si un régimen o dosis de IL-2 debe modificarse en un paciente con un trastorno autoinmune, relacionado con el sistema inmunitario o inflamatorio, tratado con IL-2, cuyo método comprende monitorear la cantidad del nivel de expresión de Tregs y/o CD25 en Tregs, en donde una cantidad del nivel de expresión de Tregs y/o CD25 en Tregs inferior a un valor de control, significa que la dosis de IL-2 debe aumentarse.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Efectos de la dosis baja de IL-2 en marcadores biológicos de vasculitis autoinmune relacionada con el VHC

Se muestran los cambios en el tratamiento del tiempo en la carga viral del VHC (panel A), la crioglobulina (panel B) y los niveles séricos del complemento C4 (panel C). Los datos se expresan como media \pm errores estándar (n = 10, *: P <0,05, ** P <0,01, ***: P<0,001).

Figura 2: Efectos de dosis bajas de IL-2 en subpoblaciones de linfocitos

Se muestran cambios en el tratamiento del tiempo de los porcentajes de CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻Foxp3⁺ en células CD4⁺ T y de CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ en células T CD8⁺ (panel A), relación Treg/Teff global (panel B), números absolutos de células B totales CD19⁺ y células de la zona Marginal B (panel C) y de células NK y células CD56^{bright}NK (panel D). Los datos se expresan como media \pm errores estándar (n = 10, *: P <0,05, ** P <0,01, ***: P<0,001).

Figura 3. Caracterización fenotípica de CD4⁺ Treg por citometría de flujo. Se muestra la puerta representativa de los linfocitos para la identificación del subconjunto CD3⁺CD4⁺ T. Dentro de las células T CD3⁺CD4⁺, las Treg se identificaron como células CD25^{high}CD127⁻FoxP3⁺.

Figura 4. Actividad supresora de células Treg en pacientes con vasculitis autoinmune relacionada con el VHC bajo tratamiento con IL-2

Los Treg purificados con FACS se evaluaron para determinar su capacidad para suprimir la proliferación de células T efectoras autólogas en diferentes proporciones (de 1/1 a 1/8) bajo estimulación alogénica. Los resultados se expresan en cpm. El experimento mostrado es representativo de 4.

Figura 5. Caracterización fenotípica de CD8⁺ Treg por citometría de flujo. Se muestran puertas de linfocitos representativas para la identificación de CD3⁺CD8⁺ Treg. Dentro de las células T CD3⁺CD8⁺, las Treg se identificaron como células CD25⁺FoxP3⁺.

Figura 6. Caracterización de los subconjuntos de células B CD19⁺ por citometría de flujo

Las poblaciones de subconjuntos de células B se definieron como naife (IgD⁺CD27⁻), memoria (IgD⁺CD27⁺), zona marginal (IgD⁺CD27⁺).

Figura 7: La dosis baja de IL-2 induce una disminución global de la inflamación revelada por los análisis de transcriptoma de PBMC

El agrupamiento jerárquico antes y después del tratamiento con IL-2 (panel A) destaca las regulaciones de disminución de genes que afectan principalmente a los genes relacionados con las células B y los genes proinflamatorios. La minería de datos identificó la vía NFκB como central en la disminución de la respuesta proinflamatoria (panel B). Los genes regulados por disminución en pacientes tratados con IL-2 se simbolizan en cuadros rojos. Los genes presentes en la firma transcripcional (panel A) se representan esquemáticamente en cuadros redondos rellenos. La activación postranscripcional entre 2 productos genéticos (por ejemplo, por fosforilación, clivaje, etc.) se representa mediante una flecha puntiaguda, y la flecha rellena representa una activación transcripcional directa. Las flechas punteadas representan la señalización indirecta.

La tabla (panel C) muestra los resultados de un ICA de estos datos. Se muestra el número de firmas reguladas por aumento o por disminución en el grupo tratado con IL-2 que tienen un enriquecimiento significativo para los términos GO y las vías de KEGG relacionadas con la inflamación, la respuesta inmune y la enfermedad autoinmune (diabetes mellitus tipo I, lupus eritematoso sistémico, enfermedad tiroidea autoinmune), trasplante (enfermedad de injerto contra huésped y rechazo de aloinjerto) o patologías inflamatorias relacionadas con la infección (enfermedad de Chagas, leishmaniasis, infección por Helicobacter pylori, malaria, amebiasis, shigelosis, todas caracterizadas por un alto grado de inflamación). Como controles, se probó el mismo número de términos GO seleccionados aleatoriamente, junto con los términos GO relacionados con el ciclo celular y las patologías de control. Para cada término GO o ruta KEGG, el valor p de prueba de Khi2 indica un posible sesgo de enriquecimiento para las firmas reguladas por aumento o por disminución en comparación con las firmas reguladas por aumento (2527) o por disminución (3429) en general.

Figura 8: La dosis baja de IL-2 induce Treg en pacientes con diabetes de tipo I.

La Figura 8 muestra la relación Treg/Tc_{D4} en pacientes administrados con 0,33, 1 ó 3 MUI/día de IL-2 (Proleukin®) durante 5 días. El aumento máximo de Treg es relativamente similar a las diferentes dosis, pero la duración del efecto depende de la dosis, y proporciona información para definir el programa del tratamiento de mantenimiento (es decir, cuanto menor sea la dosis, menor será el retraso entre las inyecciones de mantenimiento).

5 Figura 9: La dosis baja de IL-2 no disminuyó la producción de péptido C.

La Figura 9A muestra la relación Treg/Tc_{D4} en un paciente administrado con IL-2 (Proleukin®) durante 5 días. La Figura 9B muestra la concentración de péptido C sérico antes y después de la administración de IL-2, en el mismo paciente. Hay un aumento en Treg durante el tratamiento, que se correlaciona con un aumento en la producción de péptido C a los 2 meses.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención muestra inesperadamente, por primera vez, la expansión in vivo de Treg supresoras muy potentes sin la expansión de Teff, ni la aparición de eventos adversos, a través de una inmunoterapia con dosis bajas de IL-2 en pacientes autoinmunes humanos.

15 IL-2 se utiliza exclusivamente para la inmunoterapia del cáncer y no se ha investigado solo en enfermedades autoinmunes en humanos. De hecho, la capacidad de IL-2 para estimular Teffs conlleva el riesgo de activar las células T muy efectoras que median la autoinmunidad. En este documento, se muestra evidencia biológica de que la IL-2 se puede usar bajo condiciones que inducen Treg sin inducir Teff, concordante con la evidencia clínica que muestra que no se observaron eventos adversos relacionados con la activación inmunitaria. De acuerdo con esta
20 invención, la IL-2 inclina claramente el balance de Treg/Teff a favor de las Treg, como también lo apoya el contexto inflamatorio reducido globalmente durante la terapia con IL-2.

En los primeros ensayos en pacientes relacionados con el VHC, los inventores demostraron que la dosis baja de IL-2 es bien tolerada, induce un aumento espectacular y selectivo en las células Treg y conduce a una mejoría clínica en el 80% de los pacientes.

25 Con un tratamiento de 5 días de 1,5 M de UI/día, se observó un aumento significativo de Treg en todos los pacientes (un aumento de 2 veces), sin efectos secundarios. Después de tratamientos adicionales de 5 días de 3MUI/día, se observó un aumento adicional de Tregs.

30 Los resultados de los inventores muestran que el tratamiento fue bien tolerado, sin cambios significativos en granulocitos, glóbulos rojos o enzimas hepáticas. Además, a la dosis de 1,5 MUI/día, no se observaron efectos secundarios como la astenia, reacciones locales transitorias en los sitios de inyección, síndrome del tipo gripe, mialgia o hipertensión.

Es importante destacar que, durante todo el tratamiento y el seguimiento, no hubo signos biológicos o clínicos que indicaran la activación de células T patógenas.

Un tratamiento de 1,5 MUI/día durante 5 días representa hasta ahora la dosis más baja de IL-2 con eficacia y seguridad comprobadas para fines de inducción de Treg en seres humanos.

35 Además, la presente invención reveló, por primera vez, una marcada actividad antiinflamatoria de IL-2. Los análisis de transcriptomas no supervisados de los inventores mostraron una clara regulación a la baja de las firmas/vías asociadas con muchas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, así como enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, como la enfermedad de injerto contra huésped y el rechazo de aloinjerto. Con este estudio, que muestra que es posible usar IL-2 para estimular Treg sin estimular Teff en seres humanos, los inventores proponen
40 que los tratamientos con dosis bajas de IL-2 cambiarán profundamente los paradigmas preventivos y terapéuticos para todas estas enfermedades.

Los inventores han continuado con la prueba de dosis bajas de IL-2 en otra enfermedad autoinmune, a saber, la diabetes tipo I, lo que confirma el interés de las dosis bajas de IL-2 en el tratamiento de dicho trastorno.

45 Por lo tanto, la presente invención proporciona nuevos enfoques terapéuticos para tratar la diabetes tipo I utilizando IL-2. La invención describe que la IL-2, a dosis bajas, puede activar o expandir efectivamente la población de células Treg supresoras en sujetos que tienen diabetes tipo I, sin activar sustancialmente las células T efectoras.

El sujeto es cualquier paciente humano, independientemente de su edad o género. En una realización particular, el paciente puede ser un niño o un adolescente.

Interleucina-2 (IL-2)

50 En el contexto de esta invención, el término "IL-2" designa cualquier fuente de IL-2, incluidas las fuentes de mamíferos tales como, por ejemplo, ser humano, ratón, rata, primate y cerdo, y puede ser nativo u obtenido mediante técnicas recombinantes o sintéticas, incluyendo polipéptidos de IL-2 recombinantes producidos por huéspedes microbianos. IL-2 puede ser o comprender la secuencia polipeptídica nativa, o puede ser una variante

activa del polipéptido IL-2 nativo. Preferiblemente, el polipéptido de IL-2 o variante activa se deriva de una fuente humana, e incluye IL-2 humana recombinante, particularmente IL-2 humana recombinante producida por huéspedes microbianos.

5 Las variantes activas de IL-2 se han descrito en la bibliografía. Las variantes de la IL-2 nativa pueden ser fragmentos, análogos y derivados de los mismos. Por "fragmento" se entiende un polipéptido que comprende solo una parte de la secuencia de polipéptidos intacta. Un "análogo" designa un polipéptido que comprende la secuencia del polipéptido nativo con una o más sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. Las muteínas y los pseudopéptidos son ejemplos específicos de análogos. Los "derivados" incluyen cualquier polipéptido IL-2 nativo modificado o fragmento o análogo de éste, como glicosilado, fosforilado, fusionado con otro polipéptido o molécula, polimerizado, etc., o mediante modificación o adición química o enzimática para mejorar las propiedades de IL-2 (por ejemplo, la estabilidad, la especificidad, etc.). Las variantes activas de un polipéptido de IL-2 de referencia generalmente tienen al menos un 75%, preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia IL-2.

10 Los métodos para determinar si un polipéptido variante de IL-2 está activo están disponibles en la técnica y se describen específicamente en la presente invención. Una variante activa es, lo más preferiblemente, una variante que activa Tregs.

Ejemplos de variantes de IL-2 se describen, por ejemplo, en los documentos EP109748, EP136489, US 4.752.585; EP200280, o EP118,617.

20 Preferiblemente se utiliza una IL-2 recombinante, es decir, una IL-2 que se ha preparado mediante técnicas de ADN recombinante [9]. El organismo huésped utilizado para expresar un ADN recombinante que codifica IL-2 puede ser procariontico (una bacteria como *E. coli*) o eucariótico (por ejemplo, una célula de levadura, hongo, planta o mamífero). Los procesos para producir IL-2 se han descrito, por ejemplo, en los documentos US 4.656.132; US 4.748.234; US 4.530.787; o US 4.748.234.

25 En una realización preferida, la invención usa una IL-2 de origen humano, o una variante activa de la misma, más preferiblemente producida de forma recombinante. Se describen una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la IL-2 humana, por ejemplo, en Genbank ref 3558 o P60568, respectivamente. La invención más preferiblemente utiliza una IL-2 humana.

La IL-2 para uso en la presente invención estará en forma esencialmente pura, por ejemplo, a una pureza del 95% o más, más preferiblemente 96, 97, 98 o 99% pura.

30 Para su uso en la presente invención, la IL-2 típicamente no se combina o coadministra con ningún agente supresor de Teff. Sin embargo, aunque no se prefiere ni se requiere, pueden contemplarse combinaciones de fármacos.

IL-2 se puede usar en forma monomérica o multimérica.

La IL-2 está disponible comercialmente, incluso para usos farmacéuticos, y está autorizada para su uso en pacientes humanos. Las formas comerciales adecuadas incluyen, por ejemplo,

35 - Proleukin®, (aldesleukin®), una interleucina-2 humana de serina-125 des-alanil-1 desglicosilada, producida en *E. coli*.

- Roncoleukin®, IL-2 humana recombinante producida en levadura.

40 La interleucina-2 puede usarse sola o en combinación con cualquier otro agente terapéuticamente activo. En una realización preferida, la IL-2 no se administra en combinación con rapamicina cuando se usa para prevenir o tratar la diabetes tipo I.

Células T Reguladoras

45 Las células T reguladoras son linfocitos T que tienen actividad inmunosupresora. Las Treg naturales se caracterizan como células CD4+CD25+Foxp3+. Los seres humanos y los ratones que presentan un déficit genético en Tregs desarrollan múltiples enfermedades autoinmunes específicas de órganos mediadas por las células T. Se ha descrito un defecto cuantitativo o cualitativo de Treg en muchas enfermedades autoinmunes humanas, que incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes tipo I, esclerosis múltiple, uveítis y miositis. Por el contrario, la adición/restauración de Treg induce mejoras clínicas en la mayoría de los modelos animales de estas enfermedades.

50 Las Treg también desempeñan un papel importante en el control de las enfermedades inflamatorias, aunque su modo de acción en dicha enfermedad no se conoce bien. De hecho, en la mayoría de las enfermedades inflamatorias, el agotamiento de Treg exacerba la enfermedad, mientras que la adición de Treg la disminuye. Esto se muestra, por ejemplo, en el contexto de la aterosclerosis. Aunque esta enfermedad no es principalmente una enfermedad inflamatoria, su desarrollo implica un componente/bucle inflamatorio. En ratones deficientes en apolipoproteína E (ApoE) que desarrollan espontáneamente aterosclerosis, el agotamiento de Treg agravó

significativamente la formación de placa, mientras que la inyección de Treg policlonal mejoró significativamente la enfermedad.

La mayoría de las Treg son células CD4+, aunque también existe una población rara de linfocitos T CD8+ Foxp3 + T con actividad supresora.

5 Células T efectoras

En el contexto de esta solicitud, las "células T efectoras" (o "Teff") designan linfocitos T convencionales distintos de las Treg (a veces también denominadas Tconv en la bibliografía), que expresan uno o más receptores de células T (TCR) y realizan funciones efectoras (p. ej., actividad citotóxica, secreción de citoquinas, anti-auto reconocimiento, etc.). Las principales poblaciones de Teff humanos de acuerdo con esta invención incluyen linfocitos T auxiliares CD4+ (por ejemplo, Th0, Th1, Th17) y linfocitos T citotóxicos CD4+ o CD8+, y pueden ser específicos para antígenos propios o no propios.

En la situación particular de una enfermedad autoinmune, las células Teff incluyen la población de células T responsable o involucrada en la enfermedad. Por ejemplo, dicha población de células T incluye linfocitos T que reconocen un antígeno propio, como un antígeno tiroideo, un antígeno articular, un antígeno de islote β-Langherans, etc. En una enfermedad de GVHD, las células de Teff incluyen linfocitos T del injerto.

Amplificación selectiva de Tregs

En el contexto de esta invención, una estimulación (o inducción o activación o amplificación) de Treg designa cualquier aumento en la proporción de células Treg en relación con Teffs, en número o en actividad, según lo probado por ensayos supresores o por la expresión de moléculas que reflejen la actividad de las Treg, como CD25, la cadena alfa del receptor de IL-2, en un paciente. El aumento en la proporción es, preferiblemente, de, al menos, un 20% en comparación con el nivel antes del tratamiento, más preferiblemente de, al menos, un 40%, incluso más preferiblemente de, al menos, un 60%. En una realización particular y preferida, la estimulación designa un cambio en el equilibrio Treg/Teff hacia Tregs, o un aumento en la relación Treg/Teff.

Un aspecto esencial de la invención reside, de hecho, en la capacidad, in vivo, en pacientes humanos que tienen un trastorno autoinmune, relacionado con el sistema inmunitario o inflamatorio, para estimular las Treg sin inducir sustancialmente a Teff.

La inducción (o activación o expansión) de Tregs se puede medir como se describe en los ejemplos, por ejemplo, midiendo el número de Tregs (por ejemplo, en base a la expresión de CD25, FoxP3, etc.) y/o la actividad de Tregs en muestras del sujeto tratado. La ausencia de inducción sustancial (o activación o expansión) de Teff también se puede medir como se describe en los ejemplos, por ejemplo, midiendo el número de Teff y/o la actividad de Teff en muestras del sujeto tratado. Previamente, la ausencia de una inducción sustancial indica que la población de células Teff diana no adquiere marcadores de activación como CD25, CD69 y/o HLA-DR, o según lo evaluado por el análisis del transcriptoma completo. Los métodos detallados para detectar, medir y cuantificar células Treg y Teff son ampliamente conocidos per se en la técnica y algunos se describen en los ejemplos.

La estimulación en Tregs puede medirse por un aumento en los recuentos de Treg en el paciente, típicamente, por lo menos, en un 10%, o por un aumento en los marcadores de activación, como la intensidad de la expresión de CD25. La ausencia de inducción de Teff típicamente indica que la población de células Teff no ha aumentado en más del 10% en dicho sujeto como resultado del tratamiento.

La estimulación de Treg y la ausencia de una inducción sustancial de Teff se evalúa preferiblemente mediante una medida de la relación o la proporción Treg/Teff en el sujeto tratado. Esta proporción se calcula, por ejemplo, en función del número de Tregs y el número de Teff en una muestra del sujeto. Como se ilustra en los ejemplos, tal proporción típicamente aumenta en, al menos, un 20% en los pacientes tratados, más preferiblemente en, al menos, un 30%, 40% o 60%.

El porcentaje de referencia de Treg en sujetos humanos, es decir, la proporción de Tregs/Teffs CD4+, es de aprox. 4,6+ 0,6% (el % de referencia en pacientes con enfermedad autoinmune puede ser mucho más bajo, como se muestra en el Ejemplo 1, donde los pacientes con vasculitis autoinmune inducida por el VHC tuvieron un nivel de porcentaje de referencia de 3,6% + 0,23 solamente, aunque estos números pueden variar de un laboratorio a otro, según los aspectos técnicos de la medida).

Los resultados presentados en esta solicitud muestran que, después de 1 ciclo de tratamiento con 1,5 MUI/día, se obtiene un aumento de 2 veces (100%) en el % de referencia de Treg, que puede amplificarse aún más con un tratamiento adicional. Dependiendo del protocolo, se han obtenido incrementos superiores al 300%. Se ha observado un aumento similar de 2 veces después de 1 tratamiento de 5 días en pacientes con T1D, independientemente de la dosis utilizada (0,33; 1 y 3 MUI/día).

En una realización preferida, el método permite un aumento del 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100% o más de la relación Treg/Teff en un sujeto.

Además, la invención muestra un aumento no solo en Treg CD4+, sino también en una población rara de Treg que son CD8+.

En una realización particular, la invención incrementa las Tregs circulantes CD4+CD25^{hi}CD127⁺TFoxp3⁺.

En otra realización particular, la invención incrementa las Tregs CD8+CD25^{hi}Foxp3⁺.

5 Otro aspecto importante es que la población de células Treg amplificadas es altamente supresiva. De hecho, los resultados presentados muestran que, tras el tratamiento de acuerdo con la invención, las Treg se activan con una potente actividad supresora hacia las células Teff. En nuestro estudio, se pudo detectar una actividad supresora sustancial (> 75%) a una relación Treg/Teff de 1/8 en un ensayo supresor clásico en el que las Treg de un individuo normal no tratado dan tal supresión en una relación de 1/2 a 1/4.

10 Por lo tanto, la invención permite un aumento sustancial de Treg en sujetos humanos que tienen enfermedades autoinmunes, sin una alteración sustancial o activación de linfocitos T efectores. En una realización preferida, el método de la invención es un método que incrementa en, al menos, un 30% las Treg CD25⁺Foxp3⁺ en un sujeto y que causa menos del 5% de aumento en las Teff diana en dicho sujeto.

15 Además, la invención muestra inesperadamente que, a dosis de administración preferidas, las terapias basadas en IL-2 de la invención no inducen esencialmente hipertensión arterial; dolores de cabeza, náuseas, artralgias, mialgias o síndromes tipo gripe, ni muchos otros efectos secundarios conocidos de IL-2, como se describe en el Resumen de Características de Productos de IL-2 de la FDA). Por lo tanto, es posible utilizar la terapia con IL-2 en sujetos humanos que tienen trastornos relacionados con el sistema inmune, sin activar sustancialmente las células Teff y sin inducir sustancialmente los efectos secundarios asociados a la IL-2, mientras que inducen muy sustancialmente las Treg y el efecto antiinflamatorio.

Dosis de IL-2

Para su uso en la presente invención, la IL-2 se administra en una dosis que activa eficazmente las Treg sin activar sustancialmente Teffs. La consecuencia es un aumento dramático en la proporción Treg/Teff en el sujeto.

25 La dosis efectiva puede ser ajustada por el médico, basándose en la información contenida en la presente solicitud. En particular, con el conocimiento de la presente invención que, en pacientes con enfermedad autoinmune, la IL-2 puede administrarse en condiciones que activen Tregs y que, esencialmente, no activen Teff; la persona experta puede ser capaz de ajustar las dosis a cada paciente y condición.

Normalmente, la IL-2 se administra a una dosis de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2 MUI/m²/día, preferiblemente de 0,2 a aproximadamente 1 MUI/m²/día.

30 La cantidad de IL-2 para administrar depende así, de preferencia, del área de superficie corporal del sujeto. El área de superficie corporal (BSA) es la superficie medida o calculada de un cuerpo humano.

Se han publicado varios cálculos para llegar al BSA sin medición directa:

La fórmula de Dubois & Dubois [18] se usa comúnmente en adultos:

$$BSA(m^2) = 0.007184 \times \text{peso (kg)}^{0.425} \times \text{altura (cm)}^{0.725} = \frac{\text{peso (kg)}^{0.425} \times \text{altura (cm)}^{0.725}}{139.2}$$

35 Otra fórmula comúnmente utilizada es la fórmula de Mosteller [19] adoptada para ser utilizada por el Comité de Farmacia y Terapéutica del Cross Cancer Institute, Edmonton, Alberta, Canadá:

$$BSA(m^2) = \sqrt{\frac{\text{peso (kg)} \times \text{altura (cm)}}{3600}} = \frac{\text{peso (kg)}^{0.5} \times \text{altura (cm)}^{0.5}}{60}$$

Se utiliza más particularmente en niños.

La BSA promedio generalmente se toma en 1,73 m² para un adulto.

40 Valores BSA promedio

Neonato (recién nacido) 0,25 m²

Niño 2 años 0,5 m²

	Niño de 9 años	1,07 m ²
	Niño 10 años	1,14 m ²
	Niño 12-13 años	1,33 m ²
	Para hombres	1,9 m ²
5	Para mujeres	1,6 m ²

Típicamente, la dosis según la invención es inferior a 3,5 millones de UI/día/paciente, más preferiblemente inferior a 3,0 millones de UI/día/paciente, incluso más preferiblemente inferior a 2,5 millones de UI/día/paciente, aún más preferiblemente inferior a 2,0 millones de UI/día/paciente.

10 El tratamiento se repite típicamente, es decir, las dosis bajas de IL-2 anteriores se administran varias veces a un sujeto, para lograr progresivamente el beneficio más sustancial. La dosis y el programa de administración varían según el objetivo preventivo o terapéutico del tratamiento, así como también según la enfermedad que se va a tratar/prevenir. El efecto del tratamiento se puede controlar mediante medidas Treg y la dosis y el calendario de administración se ajustan en consecuencia.

15 Las dosis ejemplares están entre 0,1 y 3 MUI, preferiblemente de 0,1 a 1,5 MUI, aun preferiblemente de 0,25 a 1 MUI. Las dosis preferidas son:

- 3,0 M UI/día/paciente,
- 2,5 M UI/día/paciente,
- 2,0 M UI/día/paciente,
- 1,5 M UI/día/paciente,
- 20 - 1,0 M UI/día/paciente,
- 0,5 M UI/día/paciente,
- 0,3 MUI/día/paciente
- 0,1 M UI/día paciente,
- 0,05 M UI/día paciente,
- 25 - 0,02 M UI/día paciente, o
- 0,01 M UI/día paciente.

Estas dosis se pueden combinar, dependiendo del sujeto y la evolución de la enfermedad.

30 El tratamiento se puede proporcionar como tratamientos de varios días, por ejemplo, 1-7 días de administración diaria, preferiblemente entre 3 y 5 días. Dichos tratamientos de tratamiento pueden reproducirse en diferentes períodos de tiempo, interrumpidos por períodos sin tratamiento. En un contexto preventivo, la IL-2 puede administrarse en la dosis anterior en inyecciones individuales, a diferentes intervalos de tiempo, por ejemplo, una vez a la semana durante largos períodos de tiempo. Se pueden ajustar diferentes protocolos según el paciente y la enfermedad.

35 La dosis de mantenimiento se puede administrar de dos a ocho semanas después de que se completara el ciclo de inicio. Preferiblemente, la dosis de mantenimiento es la misma que la dosis inicial.

Determinación de la dosificación:

En términos generales, la IL-2 se puede administrar a una dosis de D/10 a 20xD, preferiblemente de D/5 a 10xD, en donde D es la dosis mínima que activa la inducción de la expresión de CD25 en Treg, sin inducir la expansión de Treg.

40 Este método para determinar la dosis baja apropiada de IL-2 es particularmente útil cuando se contempla una vía de administración diferente de la subcutánea.

Especialmente tal dosis puede ser útil en la administración oral, nasal o rectal.

La determinación de los niveles de CD25 se puede lograr utilizando anticuerpos anti-CD25 en la citometría de flujo.

A este respecto, las muestras que contienen linfocitos pueden fijarse con un agente de fijación adecuado (por ejemplo, paraformaldehído, que se puede usar al 1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS)) para permitir la posterior cuantificación o determinación cualitativa del marcador de superficie celular (por ejemplo, mediante el uso de citometría de flujo) según sea conveniente (por ejemplo, después del transporte desde el sitio de recolección y cultivo de la muestra que contiene linfocitos hasta un laboratorio de citometría de flujo). Los anticuerpos monoclonales anti-CD25 (mAbs) disponibles en el mercado y etiquetados a diferentes fluorocromos como Alexa488 (Molecular Probes, Oregon, EE. UU.) y FITC (Sigma) están disponibles.

A continuación, se proporcionan ejemplos de dosis y programas de administración.

Tratamiento de la diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 (T1D) se debe a la destrucción autoinmune de las células productoras de insulina en el páncreas. En muchos pacientes se puede encontrar un defecto en la vía de activación del receptor de IL-2/IL-2. Además, la IL-2 puede prevenir la aparición de diabetes tipo 1 en modelos de ratones con T1D (ratones NOD) y la IL-2 administrada muy pronto, después de la aparición de la diabetes, puede revertir la diabetes.

Sin embargo, la aparición de un nuevo inicio de T1D se ha descrito en pacientes con cáncer tratados con dosis bajas de IL-2. Por lo tanto, el tratamiento de pacientes humanos con T1D con IL-2 no es sencillo y no ha iniciado anteriormente ningún tratamiento de este tipo solo con IL-2. El ejemplo 2 muestra los primeros resultados en un ensayo doble ciego en pacientes con T1D administrados con dosis bajas de IL-2 (0,33, 1 ó 3 MUI/día) durante 5 días.

Por lo tanto, los inventores ahora describen un método para 1) prevenir y 2) tratar el T1D usando una dosis baja de IL-2, especialmente el T1D de inicio reciente.

La interleucina-2 se recomienda especialmente en los sujetos con riesgo de desarrollar diabetes tipo I. En ese caso, el tratamiento con IL-2 es preventivo en la aparición de la diabetes en dicho sujeto. En el contexto de la prevención, los pacientes con riesgo de T1D (es decir, pacientes provenientes de familias con antecedentes de T1D o pacientes con polimorfismo genético de la vía de activación del receptor de IL-2/IL-2 asociados con una mayor frecuencia de T1D, y/o pacientes en los que se han detectado autoanticuerpos contra antígenos, como insulina, GAD, proteína asociada a insulinoma 2 (IA2) y tirosina fosfatasa o transportador de zinc 8 (ZnT8) (o anticuerpos que se han asociado con T1D) se tratan con dosis bajas de IL 2, impidiendo así la activación de las células T efectoras que generarán T1D.

En este contexto, el tratamiento utiliza dosis de IL-2 iguales o inferiores a 3 M UI/día o, incluso en una realización preferida, por debajo de 1 ó 0,5 M UI por día, y el tratamiento se administra una vez cada dos semanas, o preferiblemente una vez cada 3 semanas o preferentemente una vez al mes. El tratamiento se puede ajustar (dosis o programa) en función de la proporción y función de Treg.

En otra realización particular, un tratamiento candidato preferido muestra una subproducción de IL-2 y una producción residual de insulina.

De hecho, en el entorno terapéutico, el uso preferido de los inventores es para pacientes recién diagnosticados con T1D que se sabe que todavía tienen una masa restante de células productoras de insulina en el páncreas. En una realización particular, la interleucina 2 en este contexto puede administrarse a una dosis de 3 millones de unidades por día durante 3 a 7 días y, luego, se pueden administrar otros tratamientos de IL-2 al menos una vez al mes como se describe anteriormente. El tratamiento se puede ajustar (dosis o programa) en función de la proporción y función de Treg.

En una realización preferida, el tratamiento comprende al menos un primer tratamiento en el que se administra una dosis de aproximadamente 0,2 MUI/m² de interleucina-2 una vez al día durante al menos 3 días consecutivos, preferiblemente durante 3 a 7, aun preferiblemente de 4 a 5 días consecutivos, seguido de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 0,2 MUI/m² después de una a tres semanas, cuya dosis de mantenimiento se puede repetir cada una a tres semanas. En un aspecto preferido, el sujeto es un adulto al que se le administran aproximadamente 0,3 MUI como dosis diaria de 0,2 MUI/m².

En otra realización preferida, el tratamiento comprende al menos un primer tratamiento en el que se administra una dosis de aproximadamente 0,6 MUI/m² de interleucina-2 una vez al día durante al menos 3 días consecutivos, preferiblemente durante 3 a 7, aun preferiblemente de 4 a 5 días consecutivos, seguido de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 0,6 MUI/m² después de dos a 4 semanas, cuya dosis de mantenimiento se puede repetir cada dos a cuatro semanas. En un aspecto preferido, el sujeto es un adulto que se administra con aproximadamente 1 MUI como dosis diaria de 0,6 MUI/m².

En otra realización preferida, el tratamiento comprende al menos un primer tratamiento en el que se administra una dosis de aproximadamente 1,8 MUI/m² de interleucina-2 una vez al día durante al menos 3 días consecutivos, preferiblemente durante 3 a 7, aun preferiblemente de 4 a 5 días consecutivos, seguidos de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1,8 MUI/m² después de aproximadamente uno o dos meses, cuya dosis de

mantenimiento se puede repetir cada uno a dos meses. En un aspecto preferido, el sujeto es un adulto que se administra con aproximadamente 3 MUI como la dosis diaria de 1,8 MUI/m².

Se prefiere la vía subcutánea.

Ejemplos adicionales del régimen para controlar los brotes:

- 5 - Infusión continua de 24 h durante 5 a 7 días de 0,1 a 3,5 ó 3 M UI/día
- Dosis repetidas una vez al día durante 5 a 30 días en dosis diarias de 0,1 a 3,5 ó 3 M UI/día
- Dosis repetidas una vez cada dos días durante 15 a 30 días a una dosis diaria de 0,1 a 3,5 ó 3 M UI/día
- Dosis repetidas una vez al día durante 3 días consecutivos en una semana durante 2 a 4 semanas consecutivas a dosis diarias de 0,1 a 3,5 M o 3 UI/día

10 Ejemplos de régimen de mantenimiento y/o prevención:

- Dosis repetidas diariamente de uno a siete días en una semana cada dos a seis semanas con dosis diarias de 0,1 a 3,5 ó 3 M UI/día

- Dosis repetidas una vez al día durante 5 a 30 días cada 3 a 6 meses a dosis diarias de 0,1 a 3,5 ó 3 M UI/día

- Dosis repetidas una vez al día durante 5 a 30 días una vez al año con dosis diarias de 0,1 a 3,5 ó 3 M UI/día

15 - Dosis repetidas una vez al día durante 1 a 3 días, cada 1 a 3 meses, en dosis diarias de 0,1 a 3,5 o 3 M UI/día

- Dosificación de mantenimiento de 0,01 a 1 M UI/día, 1 día cada semana

La necesidad de administrar múltiples ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 constante o múltiples ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de múltiples niveles es a discreción del médico responsable y puede evaluarse mediante el seguimiento de las células Treg en sujetos en tratamiento con el método de la invención.

20 En una realización preferida, en un paciente con enfermedad autoinmune, es mejor alcanzar y/o mantener el nivel de porcentaje de Tregs entre 5-10% de células T totales.

En un contexto preventivo, es deseable alcanzar y/o mantener el nivel de porcentaje de Tregs entre un 4,5-7% de células T totales.

25 Las dosis de IL-2 pueden adaptarse según la respuesta de los pacientes, es decir, los efectos sobre el porcentaje de Treg y su estado de activación (CD25).

Por lo tanto, se describe un método para determinar si un régimen o dosis de IL-2 debe modificarse en un paciente con un trastorno autoinmune, inmunológico o inflamatorio, tratado con IL-2, cuyo método comprende monitorear la cantidad de Tregs y/o el nivel de expresión de CD25 en Tregs.

30 Una cantidad de Tregs, y/o un nivel de expresión de CD25 en Tregs inferior al valor de control, significa que la dosis de IL-2 debe aumentarse. El valor de control es generalmente la cantidad de referencia del nivel de expresión de Tregs y/o CD25 en el paciente, antes de cualquier tratamiento.

35 En una realización particular, dicha cuantificación se puede llevar a cabo cuando se inicia el tratamiento (por ejemplo, entre 3 y 5 días después de la primera administración). Si los porcentajes de Tregs o los niveles de expresión de CD25 están por debajo de un aumento del 20% en comparación con el valor inicial, la dosis de IL-2 se puede aumentar (p. ej., x2) y se encuentra que el proceso se puede repetir hasta que una dosis (inferior a 3,5 MUI/día) induzca una respuesta Treg adecuada.

40 Preferiblemente, este método también se realiza durante el período de mantenimiento, lo que implica cuantificar el número de Treg y/o el nivel de expresión de CD25 en Treg cada 2 a 6 meses, preferiblemente entre 1 y 5 días después de la administración de IL-2. Si los porcentajes de Tregs o los niveles de expresión de CD25 están por debajo de un aumento del 20% en comparación con el valor inicial, la dosis de IL-2 podría aumentar (por ejemplo, x2).

Formas y vías de administración

45 Se puede administrar IL-2 usando cualquier método aceptable conocido per se en la técnica. Así, por ejemplo, la IL-2, o la composición farmacéutica que comprende IL-2, puede administrarse mediante cualquier forma de inyección, incluida la inyección intravenosa (IV), intramuscular (IM), transdérmica o subcutánea (SC), o por vía oral o vía nasal, así como por administración tópica (crema, gotitas, etc.). En una realización particular de la invención, la IL-2 se usa como una formulación de liberación sostenida, o una formulación que se administra usando un dispositivo de liberación sostenida. Dichos dispositivos son ampliamente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, parches

transdérmicos y bombas implantables en miniatura que pueden proporcionar el suministro de medicamentos a lo largo del tiempo en una forma continua y estable en una variedad de dosis para lograr un efecto de liberación sostenido. También se pueden contemplar formulaciones sublinguales o gotas para los ojos.

5 La IL-2 se administra típicamente en asociación (por ejemplo, en solución, suspensión o mezcla) con un vehículo, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes adecuados incluyen cualquier solución isotónica, solución salina, solución tamponada, formulación de liberación lenta, etc. Las composiciones líquidas, liofilizadas o secadas por pulverización que comprenden IL-2 o variantes de éstas son conocidas en la técnica y pueden prepararse como soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas.

10 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas comprenden agentes estabilizantes, agentes tamponantes, agentes de carga, o combinaciones de éstas apropiadas para minimizar los problemas asociados con la pérdida de la estabilidad de la proteína y la actividad biológica durante la preparación y el almacenamiento.

Puede usarse un agente de tamponamiento para mantener el pH de la composición líquida dentro de un intervalo aceptable para la estabilidad de IL-2. El agente de tamponamiento puede ser un ácido tal como, por ejemplo, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fosfórico y ácido glutámico.

15 Los ejemplos de agentes de carga adecuados incluyen, por ejemplo, glicina, manitol o valina, o cualquier combinación de estos.

Los ejemplos de vehículos inertes que pueden usarse como agentes estabilizantes incluyen azúcares (por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrosa) y alcoholes de azúcar, así como aminoácidos.

20 La composición farmacéutica puede incorporar adicionalmente otros agentes estabilizantes, como la metionina, un surfactante no iónico, como el polisorbato 80, etc.

Se describen ejemplos específicos de formulaciones de IL-2 [10] y en el documento US 4.604.377.

25 Cuando la IL-2 está en forma monomérica, se prefiere agregar a las composiciones una base de aminoácidos suficiente para disminuir la agregación de IL-2 durante el almacenamiento. La base de aminoácidos puede ser un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Los ejemplos de dichos aminoácidos incluyen arginina, lisina y ácido aspártico.

En una realización particular, la composición comprende una IL-2 multimérica, por ejemplo, liofilizada.

30 Un ejemplo específico de tal composición es la IL-2 Proleukin®. Esta formulación liofilizada comprende IL-2 recombinante oxidada selectivamente mezclada con un vehículo soluble en agua, como el manitol, que proporciona volumen y SDS para asegurar la solubilidad de IL-2 en agua. Esta composición es adecuada para la reconstitución en soluciones acuosas para inyección parenteral.

Envasado

El envasado actual de IL-2 son viales que contienen 18 M UI de IL-2. Dada la baja dosis que se utilizará, se preparan preferiblemente envases para dosis de 0,01M UI, 0,02M UI, 0,5M UI, 0,1M UI, 0,2M IU, 0,5M IU, 1M IU y 3, o 3,5M UI.

35 Por lo tanto, un objeto específico de esta invención también se basa en una composición farmacéutica que comprende una dosis unitaria de 3 M UI de IL-2, o menos. La composición puede estar en un vial, cápsula, jeringa, etc.

Tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias

40 Los métodos descritos en este documento se pueden usar para el tratamiento de cualquier afección asociada o causada por una respuesta inmune indeseable y/o en la que se ha descrito un defecto cuantitativo o cualitativo de Treg.

45 El tratamiento puede ser curativo o preventivo. En una realización particular, el tratamiento es curativo, es decir, se refiere a un sujeto en el que se declara la enfermedad, incluso en etapas muy tempranas. En tales pacientes, el tratamiento tiene como objetivo reducir o detener la progresión de la enfermedad y/o suprimir los síntomas o las causas de la enfermedad. El tratamiento puede llevar a la desaparición completa de la enfermedad en el paciente, como se ilustra en los ejemplos.

50 El tratamiento puede ser preventivo, es decir, en pacientes que no tienen declarada una enfermedad o en pacientes en remisión de una enfermedad para prevenir recaídas, como en el caso de la esclerosis múltiple. En tales pacientes, el tratamiento apunta a mantener un nivel elevado de Tregs y/o reducir la inflamación para evitar el desarrollo de una enfermedad causada por una reacción inmune indeseable.

El tratamiento designa cualquier mejora en la condición del paciente, como menor dolor, menor lesión tisular, etc.

La infección crónica por el VHC está asociada de manera única con una serie de complicaciones extrahepáticas, cuyos mecanismos patógenos parecen ser en gran medida impulsados por el sistema inmunológico. Entre ellas, la crioglobulinemia y sus secuelas clínicas tienen la asociación más fuerte. Las crioglobulinas son fácilmente detectables en el 40-60% de los pacientes infectados por el VHC [11, 20, 21, 22], mientras que en el 5-10% de los casos se desarrolla una vasculitis manifiesta por crioglobulinemia (crioglobulinemia mixta: MC) [11]. Los órganos diana más frecuentes son la piel, las articulaciones, los nervios y el riñón. La expresión de la enfermedad es variable, desde síntomas clínicos leves (púrpura, artralgia) hasta complicaciones fulminantes que amenazan la vida (glomerulonefritis, vasculitis generalizada). La observación de las células T en infiltrados vasculares, la presencia de autoanticuerpos y la observación de que algunos grupos HLA confieren susceptibilidad frente a MC en pacientes infectados por HCV respaldan la naturaleza autoinmune de esta patología ligada a virus [12, 13]. La fisiopatología de la MC parece ser el resultado de la interacción entre el VHC y los linfocitos, que modula directamente la función de las células B y T y da como resultado la activación policlonal y la expansión de células B que producen IgM con actividad del factor reumatoide (RF) [23]. Anteriormente se informó que las Treg se reducían significativamente en los pacientes con HCV-MC [12, 14, 15]. Además, en pacientes con MC, que podrían tratarse con éxito para el VHC, la eliminación del virus se asoció con la cura de la vasculitis y la recuperación de Treg.

La sección experimental muestra los resultados de un estudio de fase I/IIa diseñado para evaluar la seguridad, los efectos inmunológicos y la eficacia clínica de la administración repetida de la terapia con baja dosis de IL-2 en pacientes infectados por el VHC con autoinmunidad asociada. Se muestra que la dosis baja de IL-2 es bien tolerada, induce un aumento drástico y selectivo en las células Treg y conduce a una mejoría clínica en todos los pacientes tratados. Esta es la primera demostración de la inducción y recuperación de Treg in vivo después de la inmunoterapia con IL-2 en una enfermedad autoinmune humana.

Como se mostró en los ejemplos, el tratamiento fue bien tolerado y no indujo la activación de células T efectoras, brote de vasculitis o aumento de la viremia por VHC. Las dosis bajas de IL-2 aumentaron drásticamente las proporciones de Tregs CD4+CD25hiCD127-Foxp3+ con una potente actividad supresiva en todos los pacientes, y disminuyeron las proporciones de las células B de la zona marginal de forma concomitante. Los estudios de transcriptoma de las células mononucleares de sangre periférica mostraron que la IL-2 inducía una atenuación global de los mediadores del estrés inflamatorio/oxidativo. Se observó una reducción de la crioglobulinemia y/o una mejoría clínica de la vasculitis en el 90% (9/10) y el 80% (8/10) de los pacientes, respectivamente.

Esta es la primera demostración de recuperación de células Treg y de mejoría clínica después de una inmunoterapia con IL-2 en dosis baja y bien tolerada en una enfermedad autoinmune humana. Allana el camino para un uso más amplio de IL-2 para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos y no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1: IL-2 de dosis baja en la vasculitis relacionada con el VHC

En este documento se proporciona la primera evidencia biológica en sujetos humanos de que la IL-2 puede usarse en condiciones que inducen Tregs sin inducir Teffs en pacientes con autoinmunidad. Los inventores presentan en este documento la primera demostración de la expansión in vivo de una Treg supresora muy potente a través de la inmunoterapia con IL-2 en una enfermedad autoinmune humana, que conduce a una mejoría clínica. El punto final primario del estudio de los inventores, el aumento de Treg al final de la terapia con IL-2, y todos los puntos finales secundarios, incluida la respuesta clínica, se cumplieron. Los inventores muestran que la baja dosis de IL-2 es bien tolerada, induce un aumento drástico y selectivo en las células Treg y conduce a una mejoría clínica en el 80% de los pacientes. Esta es la primera demostración de la inducción y recuperación de Treg in vivo después de la inmunoterapia con IL-2 en una enfermedad autoinmune humana. Además, se muestra por primera vez un marcado efecto antiinflamatorio de las dosis bajas de IL-2 en seres humanos.

Métodos

Pacientes

Los criterios de inclusión para el estudio fueron los siguientes: 1) infección crónica por VHC activa definida por un ARN de VHC positivo; 2) antecedentes de vasculitis MC definida por la (i) presencia de crioglobulina sérica $\geq 0,05$ g/l en al menos dos determinaciones y (ii) la presencia de la tríada púrpura-artralgia-astenia o (iii) vasculitis comprobada por biopsia (riñón, nervios o piel) en ausencia de púrpura [16, 17]; 3) presencia en la inclusión de una vasculitis clínicamente activa con resistencia o intolerancia a terapias convencionales, es decir, terapia antiviral (Peg-Interferón- α y ribavirina) y/o Rituximab; 5) un mínimo de 6 ó 2 meses después de suspender el tratamiento con rituximab o antiviral, respectivamente.

Los criterios de exclusión incluyeron la coinfección con el virus de la hepatitis B o VIH, cirrosis hepática, cáncer o linfoma, cualquier uso de inmunosupresores en los últimos 6 meses, adicción a las drogas, abuso del alcohol o embarazo.

Diseño del estudio

Se realizó un ensayo monocéntrico en fase I/II prospectivo abierto. Se administraron cuatro ciclos de terapia subcutánea de IL-2 durante 5 días. La primera cura se realizó a una dosis de 1,5 millones de UI/día durante una hospitalización de una semana para evaluar la tolerancia. Sobre la base de una tolerancia satisfactoria, las 3 curaciones posteriores se realizaron de forma ambulatoria a la dosis de 3 millones de UI/día. La segunda cura se inició después de un lavado de 10 días, mientras que las siguientes 2 curaciones después de un periodo de 17 días sin agua. El estudio fue aprobado por el comité de ética institucional y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

Los pacientes fueron evaluados el día 1 y el día 5 de cada cura, antes de la primera y última administración de IL-2 de esa cura. También se evaluaron de 48 a 90 días después de la última administración de IL-2.

La respuesta al tratamiento se analizó comparando los parámetros clínicos, inmunológicos y virológicos en la evaluación inicial, al final de cada tratamiento de IL-2 (en las semanas 1, 3, 6 y 9) y al final del seguimiento. La respuesta clínica se definió analizando la progresión de los siguientes signos clínicos principales: afectación de la piel (ausencia de púrpura y/o úlcera de la pierna), neuropatía periférica (mejoría clínica y electrofisiológica en dos exámenes sucesivos), afectación renal (normalización del nivel de creatinina sérica y desaparición de proteinuria y/o hematuria), y ausencia de artralgia.

El punto final primario fue un aumento absoluto del 4% de la proporción de células T reguladoras (Treg) CD4+CD25+Foxp3+ al final de la terapia con IL-2 (es decir, en W9). Los puntos finales secundarios incluyeron la seguridad, la evaluación de la inmunidad celular y humoral en W9, el aumento persistente de los niveles de Treg a distancia del tratamiento (W19) y la evaluación de la respuesta clínica de la vasculitis.

Análisis de citometría de flujo.

El control inmunológico se realizó de acuerdo con los métodos de rutina previamente publicados y utilizados en el departamento de Bioterapia de Pitié-Salpêtrière.

Brevemente, se establecieron recuentos (células/ μ l) de subconjuntos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, linfocitos B CD19+ y células NK CD3⁺CD56⁺) a partir de muestras de sangre recién extraída utilizando los kits CYTO-STAT tetraCHROME con gotas fluorescentes Flowcount como estándar interno y el software tetra CXP con un citómetro FC500 según las instrucciones del fabricante (Beckman Coulter, Villepinte, Francia). Los subconjuntos de estas células se analizaron mediante citometría de flujo multicolor y mAbs directamente conjugados a varios marcadores fluorescentes. La adquisición y el análisis de las células mediante citometría de flujo se realizaron con un citómetro FC500 (Beckman Coulter). Los parámetros de ajuste del instrumento (ganancias, compensaciones y umbral) se establecieron con el software de la máquina (software CXP; Beckman Coulter) junto con las perlas de calibración (perlas de fraguado de flujo, kit Cytocomp y células de control CYTO-TROL). La reproducibilidad de la máquina se verificó con cuentas estandarizadas (Flow-check). Los datos se analizaron con el software de análisis CXP (Beckman Coulter).

Los subconjuntos de estas células se analizaron utilizando citometría de flujo multicolor y mAbs directamente conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina-Rojo de Texas (ECD), Alofocianina (APC) o ficoeritrina-Cianina 7 (PE-Cya7) fueron utilizados para: CD3-ECD o -PC7, CD4-ECD o -PC7, CD8-PC7, CD8-APC, CD14-PE, CD16-FITC, CD19-ECD, CD28-FITC, CD45RA-APC, CD45RO-FITC, CD56-PE CD69-PE, CD152-PE y HLA-DR-PC7, todos de Beckman Coulter (Villepinte, Francia). CD25-PE, CD25APC, CD27-PE, CD62L-FITC e IgD-FITC, fueron de BD Biosciences (Le Pont De Claix, Francia). CD127 era de e-Biosciences (San Diego, CA, EE. UU.) y proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral inducida por glucocorticoides (GITR)-PE de Miltenyi Biotech (París, Francia). Los anticuerpos péptido asociado a la latencia (LAP)-PE y CCR7-PE fueron de R&D Systems (Abingdon, Reino Unido). El marcaje intracelular de CD152 se realizó utilizando el reactivo Fix y Perm de Invitrogen (Cergy Pontoise, Francia) después de la tinción de las membranas CD3, CD4, CD127 y CD25. Se utilizaron anticuerpos de control de isotipo de ratón emparejado. El marcaje intranuclear con FOXP3 se realizó después de la tinción de las membranas CD3, CD4, CD 127 y CD25 utilizando el kit de Foxp3 anti-humano APC (clon PCH101, eBiosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó IgG2a APC de rata como control isotípico (eBiosciences).

La adquisición y el análisis de las células mediante citometría de flujo se realizaron con un citómetro FC500 (Beckman Coulter). Los parámetros de ajuste del instrumento (ganancias, compensaciones y umbral) se establecieron con el software de la máquina (software CXP; Beckman Coulter) junto con las perlas de calibración (perlas de fraguado de flujo, kit Cytocomp y células de control CYTO-TROL). La reproducibilidad de la máquina se verificó con cuentas estandarizadas (Flow-check). Los datos se analizaron con el software de análisis CXP y el software Kaluza (Beckman Coulter).

Para la detección de la producción de citocinas intracelulares, las PBMC se estimularon con PMA 50 ng/ml e ionomicina 1 mM en presencia de Golgi-Stop (BD Biosciences) durante 4 horas y luego se tiñeron con anti-IFN- γ -FITC (eBioscience), o anti-IL-17-Alexa Fluor 647 (e-Bioscience) después de la fijación y permeabilización, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayos de supresión de células T

- El ensayo de supresión de células se realizó como se describió anteriormente. Brevemente, las PBMC se tiñeron con combinaciones apropiadas de mAbs para purificar mediante citómetro de flujo (FACS Aria, BD Biosciences) células CD3+CD4+CD25+CD127low/-; a saber, Treg clasificado por FACS. Para probar su actividad supresora, las
- 5 Treg se analizaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo redondo mezcladas en varias relaciones celulares (1/1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16) con 5×10^4 células CD4+CD25- clasificadas por FACS autólogas como células respondedoras en presencia de 10^4 PBMC alogénicas irradiadas (15 grises) como células estimuladoras en 200 μ l de medio de cultivo completo. Se realizaron triplicados para cada condición de cultivo. Después de 4 días, se
- 10 determinó la proliferación celular mediante la incorporación de 1 μ Ci (0,037 MBq) de 3 H-timidina (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 16 h adicionales y se midió usando un contador β (contra-WALLAC). Los resultados se expresaron en recuentos por minuto (cpm) y el porcentaje de supresión de la proliferación se determinó mediante la proliferación de células efectoras sin treg/proliferación de células efectoras con la relación treg.

Estudios de transcriptoma

- 15 Se generaron ARN utilizando el Mini Kit RNeasy (QIAGEN, requis, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se evaluó mediante un analizador de Agilent que mostraba una calidad del número de integridad del ARN de 7-9,5 (Agilent Technologies). El rendimiento de ARN se evaluó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Products, Thermo Fisher Scientific).

- 20 El ARN total se amplificó y se convirtió en ARNc biotinilado de acuerdo con el protocolo del fabricante (Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit; Ambion).

Los ARNc marcados se hibridaron durante la noche en matrices Illumina Human HT-12 V3 BeadChip (Illumina), que contenían más de 48.000 sondas. Luego, las matrices se lavaron, bloquearon, tiñeron y escanearon en una Illumina BeadStation siguiendo los protocolos del fabricante. El software Illumina BeadStudio (Illumina) se usó para generar valores de intensidad de señal a partir de las exploraciones.

- 25 Los datos se normalizaron de acuerdo con el método de los cuantiles y la agrupación jerárquica supervisada se realizó en 435 transcripciones seleccionadas que se modularon significativamente después del tratamiento en al menos 3 de cada 6 pacientes. Las relaciones del umbral de modulación se establecieron en 0,6 y 1,5 para las transcripciones reguladas por aumento o por disminución respectivamente. Un paciente que presentaba perfiles de modulación demasiado divergentes de los otros se excluyó del análisis de agrupamiento. Las firmas de genes se
- 30 analizaron para generar redes funcionales utilizando el software PredictSearch™ (Prediguard), una solución bioinformática de análisis de datos dedicada a identificar correlaciones relevantes entre genes y conceptos, se utilizó para generar redes funcionales. Esta herramienta se actualiza diariamente con toda la base de datos de NCBI Pubmed y busca correlaciones relevantes entre gen-gen o concepto-gen dentro de las cocitaciones de los resúmenes.

- 35 Las correlaciones también se recuperan de la comparación cruzada con el conjunto completo (> 18000) de firmas transcripcionales depositadas en la base de datos GEO del NCBI y se extraen con el algoritmo DBF-MCL usando la herramienta TranscriptomeBrowser. Además, PredictSearch™ permite la anotación de genes modulados según las vías de KEGG y Biocarta, así como a la ontología GO.

- 40 Para los análisis no supervisados, las firmas moleculares potenciales se extrajeron utilizando un Análisis de componentes independientes no supervisados (ICA). Esas firmas se agregaron a la base de datos de análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA, por sus siglas en inglés) y se verificaron por su importancia en los datos de micromatrices que utilizan el software GSEA. Los bordes iniciales de GSEA de firmas moleculares estadísticamente significativas (valor de q FDR <0,05) se anotaron para los términos GO y el enriquecimiento de las vías KEGG. Se seleccionaron firmas con enriquecimiento para términos GO relacionados con la inflamación,
- 45 respuesta inmune y patologías autoinmunes. Se usó una prueba de Khi2 para determinar si estas firmas seleccionadas estaban reguladas por aumento o por disminución de manera preferencial en muestras tratadas con IL-2 en comparación con la distribución general de las firmas reguladas por aumento o por disminución.

Análisis estadístico

- 50 Un tamaño de muestra de 10 pacientes alcanza el 94% de potencia para detectar una media de diferencias apareadas de 4% con una desviación estándar estimada de 3% y un nivel de significación (alfa) de 0,05 mediante una prueba de suma clasificada de Wilcoxon de dos lados, asumiendo que la distribución real del porcentaje de células T reguladoras CD4+ CD25+Foxp3 + es normal.

- 55 Las comparaciones de la línea de referencia con las medidas W9 o Post-IL-2 se realizaron con la prueba de suma clasificada de Wilcoxon. La aproximación F de la prueba de Friedman se utilizó para comparar todas las mediciones repetidas [24]. Las aproximaciones de la región crítica de la estadística de Friedman y las comparaciones múltiples se realizaron cuando fue apropiado [25].

Los valores de tiempo hasta el pico (Tmax) se determinaron directamente a partir de los datos experimentales como el tiempo del porcentaje máximo de Treg (Emax).

Resultados

Pacientes

- 5 Se incluyeron diez pacientes (Tabla-1). En el momento de la inclusión, la mediana de la edad (Q1-Q3) fue de 58,5 (49,5- 66,2) años con una proporción de hombres/mujeres de 50/50%. Las manifestaciones clínicas de vasculitis MC incluyeron neuropatía periférica (n = 8), púrpura (n = 8), astenia (n = 6), artralgia (n = 3) y compromiso renal (n = 1) [proteinuria diaria 1,5 g, hematuria microscópica y creatinemia 74µmol/L]. El nivel medio de crioglobulina (Q1-Q3) fue de 0,53 (0,26-2,77) g/L, de IgM Kappa de tipo II en todos los casos. La mediana (Q1-Q3) del factor del complemento C4 fue de 0,065 (0,02-0,16) mg/L, la actividad del factor reumatoide estuvo presente en el 90% de los casos y los anticuerpos antinucleares fueron positivos en un paciente (a un título de 1/640). La carga viral media del VHC fue de 6,25 (5,5-6,8) Log copias/ml; ningún paciente tuvo cirrosis hepática.

Seguridad de baja dosis de IL-2.

- 15 El cumplimiento del tratamiento fue bueno y todos los pacientes completaron los 4 tratamientos de IL-2. La IL-2 fue, clínicamente y biológicamente, bien tolerada (Tabla-1). No se observaron cambios significativos en los granulocitos, glóbulos rojos o enzimas hepáticas a lo largo del estudio. Solo se observaron efectos secundarios menores de grado clínico 1 y se resolvieron espontáneamente, como astenia (n = 4), reacciones locales transitorias en los sitios de inyección (n = 4), síndrome del tipo gripe (n = 4), mialgia (n = 1) e hipertensión (n = 1). Notablemente, ninguno de estos ocurrió con la dosis más baja de 1,5 millones de UI/día de IL-2 (Tabla-1). Durante todo el tratamiento y el seguimiento, no hubo signos biológicos o clínicos que indicaran una activación de las células T patógenas: no se observó brote de vasculitis; el examen de órganos linfáticos no mostró anomalías sugestivas de inducción de trastorno linfoproliferativo; no se observó ningún aumento en la carga viral del VHC (Tabla 1 y Fig. 1 A).

Eficacia biológica y clínica de dosis bajas de IL-2 en HCV-MC

- 25 La carga viral del VHC disminuyó continuamente durante el período de tratamiento con IL-2 y fue significativamente más baja en W9 ($p = 0,02$), en ausencia de cualquier tratamiento antiviral. Los niveles séricos de crioglobulina, que también disminuyeron continuamente ($P = 0,014$, en W9), ya estaban disminuidos ($P = 0,003$), mientras que C4 aumentó inversamente ($P = 0,027$) después del primer tratamiento de IL-2 de 1,5m IU (Fig-1). Ningún paciente desarrolló anticuerpos antinucleares sobre la terapia con IL-2 y los anticuerpos antinucleares desaparecieron en el paciente N°. 1.
- 30 De acuerdo con los parámetros biológicos mejorados de la vasculitis por HCV-MC (Fig. 1), 8 de cada 10 pacientes mostraron una mejoría clínica notable después del tratamiento con IL-2, con desaparición de púrpura y artralgia (8/8 y 3/3 pacientes, respectivamente). Parámetros renales normalizados (proteinuria diaria $<0,3$ g y ausencia de hematuria) en el paciente N°. 10. Los únicos pacientes que no tuvieron una respuesta clínica marcada fueron aquellos que presentaron solo una neuropatía en el momento de la inclusión (n = 2).
- 35 La dosis baja de IL-2 induce un aumento drástico de las células T reguladoras de CD4+ y CD8+.

- La IL-2 indujo un aumento drástico en las Treg CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻Foxp3⁺ circulantes (Fig.-2A y Fig-3). El porcentaje de referencia de Treg en este grupo de pacientes fue de $3,6\% \pm 0,23$ (media +/- sem), significativamente más bajo que los valores normales ($4,6 \pm 0,6$) de acuerdo con los estudios informados anteriormente por los inventores. En W9, las proporciones de Treg fueron de $11,8\% \pm 1,96$ ($P = 0,004$), alcanzando el criterio de valoración principal de eficacia de los inventores. Cabe destacar que las proporciones de Treg ya aumentaron aproximadamente 2 veces después del primer tratamiento de 5 días de 1,5 millones de UI de IL-2 (Fig. 2A). Las proporciones de Treg continuaron aumentando durante el período de lavado entre los tratamientos, y fueron impulsadas por los tratamientos subsiguientes (Fig-2A). En comparación con los valores de referencia, estas proporciones aumentadas de Treg fueron estadísticamente significativas durante todo el tratamiento ($P = 0,016$ en W1 y $P <0,001$ en W3, 6 y 9). La mediana del valor pico de la proporción de Tregs (Emax = 14%) se alcanzó al final del tercer tratamiento de IL-2 (Tmax mediana = 2,9), lo que corresponde a un aumento del 10,3% en comparación con la línea de referencia (Emax menos la línea de referencia) o corresponde a un aumento del 350% de Tregs (Emax/línea de referencia). A una distancia (de 129 a 150 días) del tratamiento, la proporción de Treg se mantuvo significativamente elevada, al doble del valor de referencia ($6,1\% \pm 0,51$, $P = 0,008$), en el rango de valores para donantes de sangre normales. Finalmente, se evaluaron la funcionalidad de las Treg expandidas IL-2 y se encontró que eran altamente supresivas (Fig-4).

- Se puede detectar una población de células T CD8⁺CD25^{hi}Foxp3 raras con función supresora en individuos normales [26] (Fig. 5). Se supervisaron estas células durante el tratamiento con IL-2 y se observó su marcado aumento, concomitante con el aumento de Treg CD4⁺. Después del primer tratamiento, su proporción aumentó en aproximadamente un 500% y se mantuvo elevada durante todo el tratamiento (Fig. 2A, Tabla 2). En conjunto, el aumento de Tregs CD4⁺ y CD8⁺ conduce a un aumento notable en la relación Treg/Teff global, sin modificación de la relación CD4/CD8 (Fig-2B, Tabla-2).

El número total de células B disminuyó durante el tratamiento con IL-2, inmediatamente después del primer tratamiento, y luego se recuperó a distancia de la terapia. Esta disminución afectó particularmente a las células de la zona marginal IgD⁺CD27⁺ que están implicadas en la fisiopatología de la vasculitis [27] (Fig-2C, Fig-6). En contraste, hubo un aumento significativo en el número de células NK, que ya se detectó después del primer tratamiento de IL-2, y mostró una clara tendencia a un aumento continuo a lo largo del tiempo; esto cesó rápidamente después de la interrupción de IL-2. En particular, hubo un aumento específico de las células NK CD56^{bright} que producen altos niveles de citoquinas inmunorreguladoras y son poco citotóxicas (Fig. 2D, Tabla-2).

La dosis baja de IL-2 induce una disminución global de la inflamación revelada por los análisis de transcriptoma de PBMC

Se analizó el transcriptoma de PBMC antes y después del tratamiento de IL-2 (Fig-3. Primero se realizó un análisis supervisado, comparando directamente los dos conjuntos de datos y buscando genes que estaban regulados por aumento o por disminución entre las dos condiciones. Este estudio primero confirmó las observaciones fenotípicas, mostrando una mayor expresión de genes relacionados con la función de las células Treg y NK, junto con una menor expresión de genes relacionados con la función de las células B (no se muestra). Los enfoques de agrupamiento jerárquico y de minería de datos revelaron una disminución notable en la expresión de genes asociados con mediadores del estrés inflamatorio/oxidativo (Fig. 7A). La vía NFκB aparece crucialmente involucrada en esta regulación (Fig. 7B). Se confirmaron estos resultados mediante un análisis no supervisado (es decir, no basado en hipótesis). En este enfoque, todos los datos de transcriptoma pre y post-IL-2 se mezclan, y las firmas que maximizan la segregación de los datos en grupos independientes se buscan en base al Análisis de Componentes Independientes (ICA) [28]. Los términos y vías de la ontología de genes (GO) (GOTP) se buscan entre las firmas que diferenciaron los grupos pre y post-tratados. La proporción de GOTP regulada por aumento o por disminución fue de 0/251 para la inflamación ($p = 1,3E-40$), 16/684 para las respuestas inmunes ($p = 3,4E-94$) y 77/555 para la activación de linfocitos ($p = 7,0E-49$) (Fig-3C). A la inversa, se obtuvieron 1701 firmas reguladas por aumento y 208 por disminución con el GOTP relacionado con el ciclo celular ($p = 1,5E-138$). Análisis similares con términos de control elegidos al azar no mostraron enriquecimiento.

Luego se realizó un análisis similar en los términos de las rutas de Kyoto Encyclopedia de genes y genomas (KEGG) relacionadas con patologías autoinmunes, inflamatorias y relacionadas con trasplantes y enfermedades infecciosas. Estas firmas fueron preferentemente reguladas por disminución después del tratamiento con IL-2 ($p = 7,6E-09$ y $p = 7,6E-36$, respectivamente), mientras que las patologías de control no lo fueron.

Tabla 1: Características y resultados de pacientes con úlceras vasculares autoinmunes relacionadas con HCV con terapia 1L-2

Características	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9	Paciente 10
Edad en el momento del diagnóstico (años)	48	74	63	50	59	67	51	66	58	43
Sexo	mujer	mujer	hombre	hombre	hombre	hombre	mujer	hombre	mujer	mujer
Síntomas										
Línea de referencia	P, A, F	P, N, F	P, N, F	N, F	P, N, F	P, N	P, N	N	A, P	A, P, N, K, F
Terapia post IL-2	-	-	N	N	-	-	-	N	-	N
Terapia previa										
	Peg IFN/RBV	Peg IFN/RBV	Peg IFN/RBV	Peg IFN/RBV	Peg IFN/RBV	Peg IFN/RBV	Peg IFN/RBV	Peg IFN/RBV	Peg IFN/RBV	Peg IFN/RBV
	Rituxan	Rituxan								Rituxan
Nivel sérico de crioglobulina (g/l)										
Línea de referencia	0,56	1,61	0,17	0,16	0,30	0,3	6,99	2,77	2,78	0,51
Terapia post IL-2	0	1,00	0,91	0	0,34	0	3,87	1,99	2,94	0,19
Nivel de complemento C4 (g/L)										
Línea de referencia	0,20	0,06	0,08	0,20	0,06	0,15	0,07	0,02	0,03	0,02
Terapia post IL-2	0,21	0,05	0,12	0,27	0,09	0,19	0,10	0,06	0,04	0,03
Carga viral HCV (Log UI/mL)										
Línea de referencia	5,3	6,2	7,2	6,3	5,6	6,9	5,8	6,3	6,8	5,4
Tratamiento posterior a IL-2	5,2	5,8	5,6	6,2	5,6	5,8	6,0	5,1	4,6	5,5
Alanina aminotransferasa (UI/L)										
Línea de referencia	26	38	29	25	77	40	58	60	104	40
Terapia post IL-2	19	17	45	24	81	23	22	62	80	35
Terapia IL-2										
Efectos secundarios										
Tratamiento 1 (1.5 MUI/día por 5 días)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tratamiento 2 (3 MUI/día durante 5 días)	-	F, M	F	F	F	Flu, LR	Flu, LR	Flu, LR	AH	Flu, LR
Tratamiento 3 (3 MUI/día durante 5 días) -	-	F	F	F	F	LR	Flu	Flu, LR	AH	-
Tratamiento 4 (3 MUI/día durante 5 días)	-	-	-	-	-	LR	-	LR	-	-

A: artralgia, F: fatiga, P: púrpura, N: neuropatía, K: compromiso renal, M: mialgia, Flu: Síndrome tipo gripe, LR: reacción local, AH: hipertensos arteriales

Tabla 2: Características inmunológicas bajo la terapia con IL-2

	Línea de referencia	Fin del tratamiento 1	Fin del tratamiento 2	Fin del tratamiento 3	Fin del tratamiento 4	Post IL-2
Linfocitos (células/μl)	685 (242-2008)	838 (267-1817)	746 (238-1529)	781 (398-2320)	855 (558-1859)	871 (426-2302)
Células T (células/μl)	633 (242-1214)	655 (401-1214)	456* (284-1334)	506 (250-1237)	647 (292-1660)	690 (299-936)
Células T CD4 totales (células/μl)	298 (149-1193)	456 (118-1009)	335 (91-658)	403 (94-1192)	340 (173-1041)	531 (151-984)
Células T CD8 totales (células/μl)	234 (73-681)	191 (36-531)	130* (64-414)	147* (77-680)	223 (104-448)	292 (84-518)
Relación CD4/CD8	1,9 (1,4-4,3)	1,8 (1-5,3)	1,6 (1,1-5,2)	1,7 (0,9-5,1)	1,96 (0,8-4,9)	1,8 (1,3-4,9)
Células NK (células/μl)	63 (49-184)	97* (44-245)	155** (13-290)	164** (50-269)	209*** (79-389)	77 (41-229)
Células NK ^{bright} CD56 (células/μl)	8 (5-17)	18** (8-30)	27*** (2-100)	20** (6-58)	27** (8-93)	7*** (2-12)
Células B (células/μl)	118 (18-570)	90 (20-334)	84* (27-236)	86* (24-342)	98 (29-175)	111 (30-522)
Células MZ B (células/μl)	12 (1-77)	4* (1-35)	3* (1-14)	3** (1-15)	4** (1-14)	3 (1-42)
Treg						
CD4+CD25hiCD127-Foxp3 + (células/μl)	15 (5-29)	25 (8-71)	29*** (9-92)	31** (14-221)	36** (20-271)	31** (12-62)
% CD25hiCD127-FoxP3+/CD4+	3,8 (1,8-4,4)	6,8* (3,7-15)	10,4*** (5-24)	10*** (3,2-29)	11*** (6-26)	6** (3-8)
CD8+Foxp3+ (células/μl)	0,08 (0,03-1,36)	0,46* (0,03-3,71)	0,46* (0,11 - 3,31)	0,62** (0,12-6,8)	0,47** (0,17-2,68)	0,19 (0,07-0,64)
% CD25+FoxP3+/CD8+	0,04 (0,01 -0,2)	0,35*** (0,02-0,7)	0,24*** (0,08-0,99)	0,2 *** (0,11-1)	0,28*** (0,08-0,6)	0,08 (0,03-0,24)
% Treg/Teff (CD4+CD8)	4 (2-6)	9,5** (4-17)	13*** (9-53)	14,5*** (6-42)	14*** (7-32)	6** (4-13)
Células T CD4+	44	29	16***	23***	28**	46
% CD25+ (sin Treg)	(20-59)	(10-63)	(5-32)	(10-40)	(7-48)	(17-66)

Los resultados mostrados son la mediana con el rango entre paréntesis para cada población celular analizada para los 10 pacientes incluidos en el protocolo.

- 5 El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de suma clasificada de Wilcoxon; * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 versus la línea de referencia

Ejemplo 2: IL-2 de dosis baja en la diabetes tipo 1

Los inventores iniciaron un ensayo clínico de detección de dosis de IL-2 en T1D, cuyo objetivo era definir la dosis activa más baja que podía inducir de forma segura Treg en pacientes adultos con T1D.

- 10 El ensayo DF-IL2 es doble ciego, comparando placebo, dosis de Proleukin® de 0,3, 1 y 3 MUI/día (dosis acumulada de 1,5, 5 y 15 MUI, respectivamente).

El objetivo del ensayo será preservar la secreción de insulina endógena restante en pacientes con T1D recientemente diagnosticada.

- 15 Principales características del paciente: adultos, ambos sexos, diagnóstico T1D como WHO-ADA, duración de la enfermedad desde el diagnóstico de menos de 12 semanas en la primera dosis de IL-2 y péptido C detectable en la entrada.

La recomendación actual para un efecto clínicamente significativo es abordar con el tratamiento activo al menos una preservación de la masa de células β pancreáticas, es decir, el mantenimiento del péptido C AUCO-120 en comparación con la línea de referencia.

- 20 Todos los 24 pacientes han sido incluidos. Aunque los investigadores aún desconocen la dosis de IL-2 administrada, los resultados obtenidos hasta ahora muestran que la IL-2 es segura (no hay SAE en ninguno de los pacientes). Se

han observado eventos adversos menores (fiebre leve, dolor moderado en el lugar de la inyección, etc.) en algunos pacientes y, según los datos de seguridad del ensayo clínico de los inventores previo 40, probablemente estén relacionados con la dosis de 3 MUI/día. Un análisis provisional de la dinámica de Treg para los primeros 16 pacientes que completaron su tratamiento se ha realizado y sin ciego del estudio a los investigadores (luego de la autorización de las autoridades reguladoras). Este análisis provisional muestra que (i) la IL-2 puede inducir Treg en pacientes con T1D y (ii) la dosis de 1 MUI por día induce una buena respuesta de Treg que dura más de 2 semanas (ver Figura 8).

Es importante destacar que no se detectó en pacientes una disminución significativa de la producción de péptido C. La medición del péptido C después de un MMTT (prueba de tolerancia a las comidas mixtas) muestra al menos una producción de péptido C conservada o, a veces, 2 meses después del tratamiento de 5 días con IL-2 en pacientes, como se muestra para el paciente 1 en la Figura 9B (téngase en cuenta que no se conoce la dosis recibida por este paciente, pero el aumento en Treg observado durante el tratamiento indica que recibió IL-2, no el placebo).

Después de este primer estudio con pacientes adultos con T1D, los inventores concibieron un segundo ensayo de búsqueda de dosis, para T1D infantil, con inclusión de pacientes de 7 años o más (DF-IL2-niño). Se refinó el estudio de búsqueda de dosis de los inventores en base a los resultados de estos en el ensayo descrito anteriormente. Se está investigando un intervalo de dosis de 0,125 a 1 MUI/m²/d (definido en este documento como dosis ultra baja) durante un período de tratamiento de un año (16 inyecciones), con el objetivo de confirmar la tolerancia y la eficacia para la inducción de Treg. Esto corresponde a una dosis acumulada de 2 a 16 MUI/m², más de 100 veces menos que en el estudio descrito anteriormente.

En conjunto, los resultados clínicos de los inventores alivian la preocupación de que la IL-2 podría no ser tan efectiva en la inducción de Treg en pacientes con T1D que tienen alteraciones de la vía de activación de IL-2/IL-2R. También confirman la excelente tolerancia de IL-2 a las dosis utilizadas y confirman que 0,5 MUI/m²/día es una dosis adecuada para evaluar la eficacia de IL-2 en pacientes con T1D, niños y adultos, recientemente diagnosticados.

Referencias

1. Gillis S et KA Smith. Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* 1977; 268: 154-6.
2. Gillis S et J Watson. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 1980; 152: 1709-19.
3. Ahmadzadeh M et SA Rosenberg. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 2006; 107: 2409-14.
4. Zhang H, KS Chua, M Guimond, V Kapoor, MV Brown, TA Fleisher, et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Med* 2005; 11: 1238-43.
5. Papiernik M, ML de Moraes, C Pontoux, F Vasseur et C Penit. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 1998; 10: 371-8.
6. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 453-79.
7. Williams MA, AJ Tzwnik et MJ Bevan. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 2006; 441: 890-3.
8. Grinberg-Bleyer Y, A Baeyens, S You, R Elhage, G Fourcade, S Gregoire, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med*; 207: 1871-8.
9. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 1983; 302:305-10.
10. Whittington and Faulds Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer *Drugs* (1993) 46 (3): 446-514.
11. Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, et al. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. *Arthritis Rheum* 1999;42:2204-12
12. Boyer O, Saadoun D, Abriol J, et al. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 2004;103:3428-30.
13. Lenzi M, Frisoni M, Mantovani V, et al. Haplotype HLA-B8-DR3 confers susceptibility to hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1998;91: 2062-6.
14. Saadoun D, Rosenzweig M, Landau D, Piette JC, Klatzmann D, Cacoub P. Restoration of peripheral immune homeostasis after rituximab in mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 2008; 111:5334-41.

15. Landau DA, Rosenzweig M, Saadoun D, Trébeden-Negre H, Klatzmann D, Cacoub P. Correlation of clinical and virologic responses to antiviral treatment and regulatory T cell evolution in patients with hepatitis C virus-induced mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Arthritis Rheum* 2008; 58:2897-907.
- 5 16. Gorevic PD, Kassab HJ, Levo Y, et al. Mixed cryoglobulinemia: clinical aspects and long-term follow-up of 40 patients. *Am J Med* 1980; 69:287-308.
17. Saadoun D, Resche Rigon M, Sene D, et al. Rituximab plus Peg-interferon-alpha/ ribavirin compared with Peg-interferon-alpha/ribavirin in hepatitis C-related mixed cryoglobulinemia. *Blood* 2010; 116:326-34.
18. Dubois & Dubois *Arch Intern Med* 1916, 17:863
19. Mosteller RD. "Simplified calculation of body-surface area". *N Engl J Med* 1987; 317:1098.
- 10 20. Nagasaka et al, Cryoglobulinemia in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection: host genetic and virological study. *J Med Virol* 2001; 65:52-7
21. Lunel et al, Cryoglobulinemia in chronic liver disease: role of hepatitis C virus and liver damage. *Gastroenterology* 1994;106:1291-300.
- 15 22. Donada et al, Systemic manifestation and liver disease in patients with chronic hepatitis C and type II or III mixed cryoglobulinaemia. *Blood* 1998; 91:2062-6.
23. Agnello et al, A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1992; 327:1490-5.
24. Iman et al. Approximations of the Critical Region of the Friedman Statistic. *Communications in Statistics Part a-Theory and Methods* 1980; 9:571-95.
25. Conover et al. *Practical non parametric statistics*. John Wiley & Sons ed. New york;1980.
- 20 26. Chaput et al, Identification of CD8+CD20+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009; 58: 520-9.
27. Charles et al, Clonal expansion of immunoglobulin M+CD27+B cells inHCV-associated mixed cryoglobulinemia. *Blood* 2008; 111:1344-56.
28. Concannon et al, Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 2009;360:1646-54.

REIVINDICACIONES

1. Interleucina-2 (IL-2) para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I en un sujeto humano, en donde IL-2 debe administrarse en una dosis de menos de 3,5 MUI/día, en donde dicha IL-2 es IL-2 humana o un análogo activo de ésta, cuyo análogo activo tiene al menos un 85% de identidad de aminoácidos con la IL-2 humana.
- 5 2. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha IL-2 es un análogo activo de la IL-2 humana que tiene al menos un 90% de identidad de aminoácidos con la IL-2 humana.
3. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha IL-2 es aldesleucina.
- 10 4. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que debe administrarse a una dosis de aproximadamente 3 MUI/día.
5. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la interleucina-2 (IL-2) debe administrarse en una dosis de menos de 2 MUI/día.
- 15 6. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la IL-2 debe administrarse repetidamente.
7. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el tratamiento comprende al menos un primer tratamiento en el que la interleucina-2 debe administrarse una vez al día durante al menos 3 días consecutivos.
- 20 8. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el tratamiento comprende al menos un primer tratamiento en el que la interleucina-2 debe administrarse una vez al día durante 3 a 7 días.
9. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I según la reivindicación 7 u 8, en la que dicho primer ciclo de tratamiento es seguido por una dosis de mantenimiento después de 1 a 4 semanas.
- 25 10. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el tratamiento es terapéutico.
11. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el tratamiento es preventivo.
12. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el tratamiento previene la aparición o el desarrollo de la diabetes tipo I.
- 30 13. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes tipo I de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el sujeto tiene riesgo de desarrollar diabetes tipo I y el tratamiento con IL-2 es preventivo de la aparición de la diabetes en dicho sujeto.
14. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes tipo I de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el sujeto a tratar muestra una subproducción de IL-2 y una producción residual de insulina.
- 35 15. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la interleucina-2 se administra por inyección o por administración oral, nasal o tópica.
16. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la interleucina-2 (IL-2) se administra por vía subcutánea.
- 40 17. Interleucina-2 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la interleucina-2 debe administrarse en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

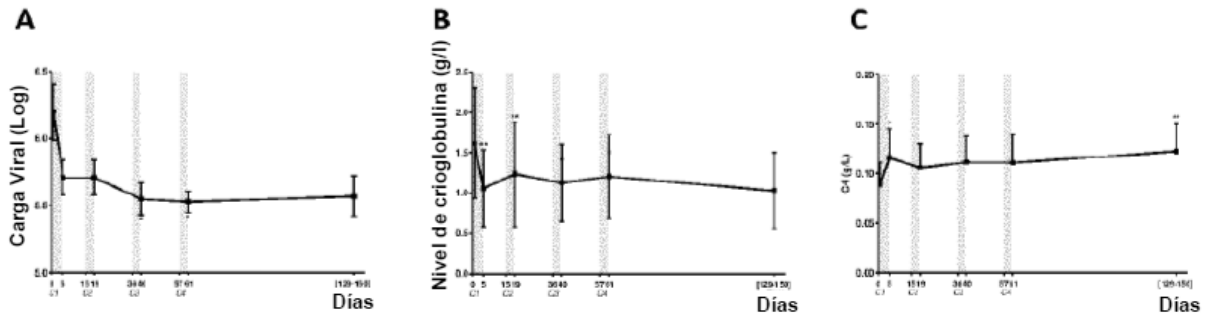


Figura 1

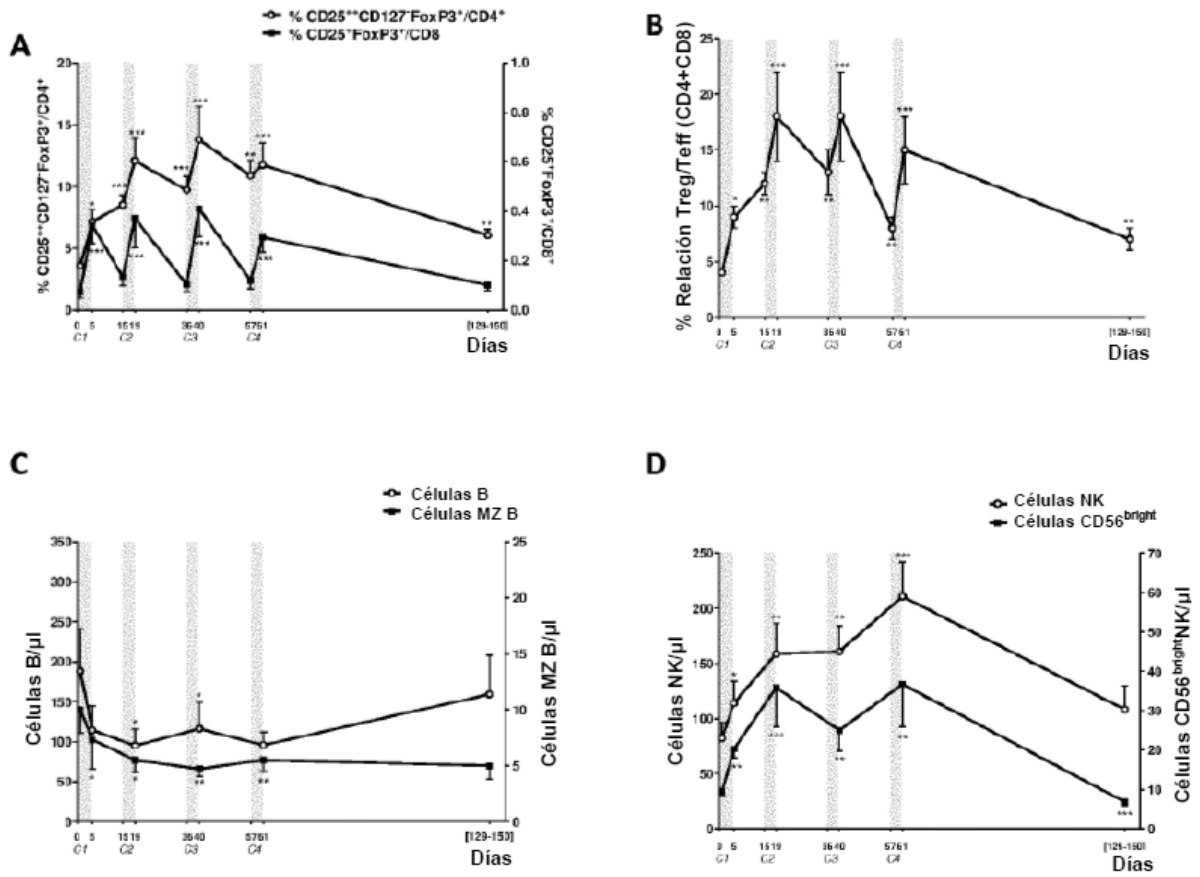


Figura 2

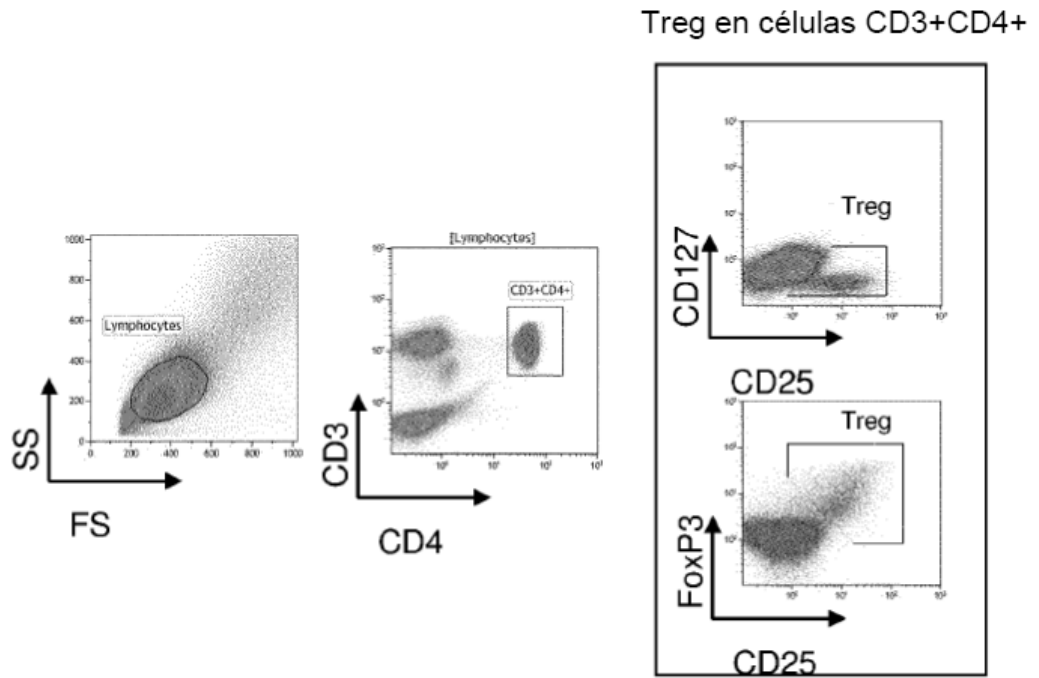


Figura 3

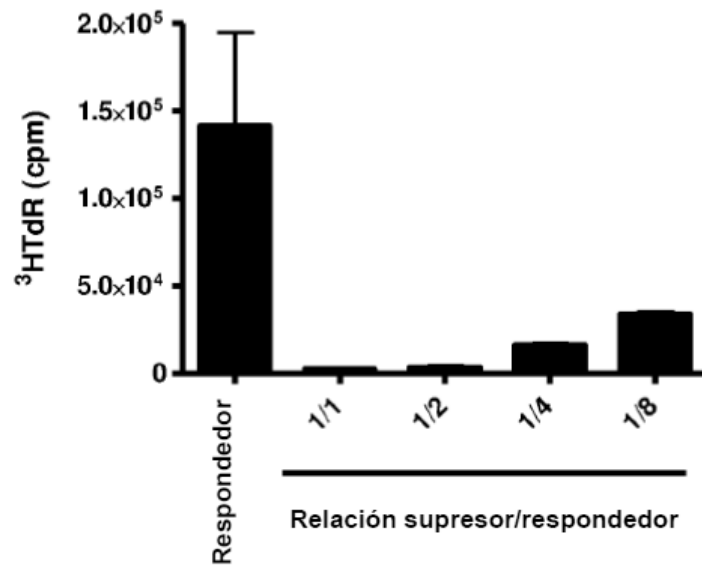


Figura 4

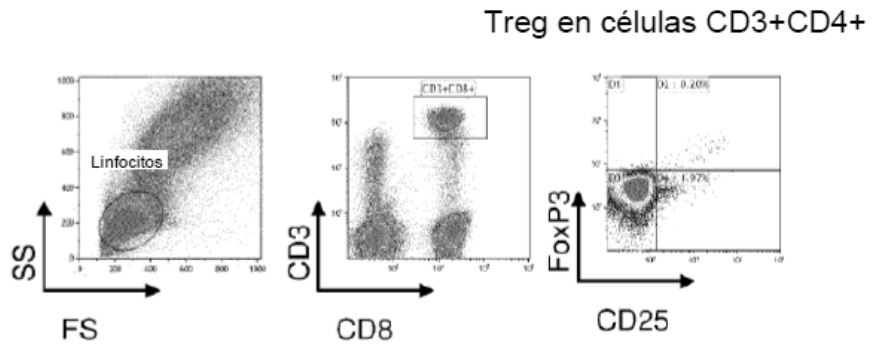


Figura 5

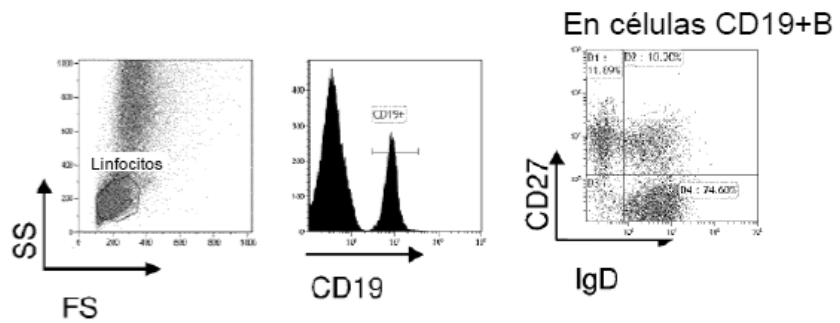


Figura 6

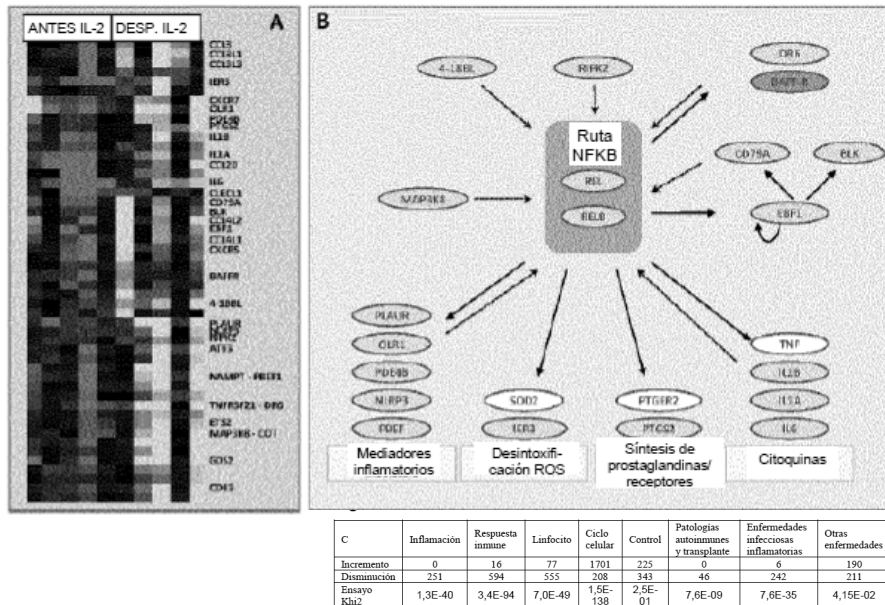


Figura 7

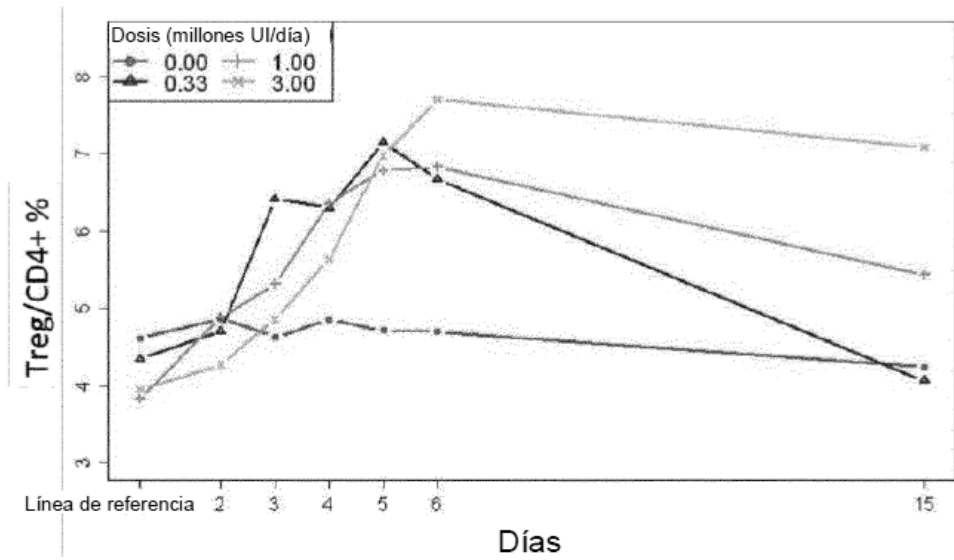


Figura 8

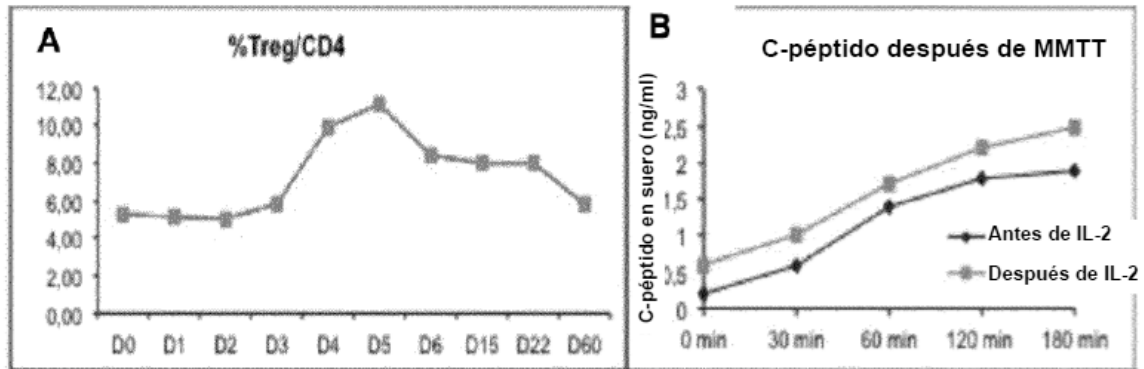


Figura 9