

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 050**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2015 PCT/EP2015/066084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16012312**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2015 E 15735977 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3194431**

54 Título: **Interleuquina 38 troncada en el extremo terminal N**

30 Prioridad:

25.07.2014 EP 14178478

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

07.11.2019

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. (100.0%)
Hansastraße 27C
80686 München , DE**

72 Inventor/es:

**WEIGERT, ANDREAS;
MORA, JAVIER;
BRÜNE, BERNHARD;
DILLMANN, CHRISTINA;
PARNHAM, MICHAEL JOHN y
GEISSLINGER, GERD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 730 050 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

Interleuquina 38 truncada en el extremo terminal N

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una proteína interleuquina (IL) 38 truncada en el extremo terminal N de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones adjuntas, así como a ácidos nucleicos y vectores que codifican el péptido IL-38 truncado y células recombinantes que comprenden estos ácidos nucleicos o vectores. La invención muestra que la IL-38 se procesa en el extremo terminal N y que la versión truncada de la citoquina actúa como un antagonista de la activación inmune en macrófagos. Esto indica un uso de la citoquina truncada en el tratamiento y la prevención de trastornos autoinmunes. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína IL-38 truncada, y un procedimiento para seleccionar moduladores de la función de la IL-38 truncada.

Descripción

La familia de citoquinas y receptores IL-1 es un grupo heterogéneo de proteínas que regulan particularmente la inmunidad. Inicialmente, cuatro citoquinas de la familia IL-1 se caracterizaron intensamente (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra e IL-18), revelando principios basales de regulación inmune, algunos de los cuales ya se habían trasladado a la clínica. Las siete citoquinas restantes de la familia IL-1 se identificaron mediante análisis *in silico* de bases de datos de genes (IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra, IL-37 e IL-38). En los últimos años, se realizaron estudios importantes para investigar su relevancia para la inducción o regulación de la respuesta inmunitaria. En conclusión, las citoquinas de la familia IL-1 exhiben un amplio espectro de funciones en inmunidad, incluida la inducción de la inflamación Th1 y Th2, así como la mediación de efectos antiinflamatorios o pro-resolventes. A nivel mecanicista, la activación de la inflamación está mediada por la función de las citoquinas de la familia IL-1 con agonista del receptor (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36), que es contrarrestada por antagonistas de receptores de la familia IL-1 (IL-1Ra, IL-36Ra). Es de destacar que la función agonista o antagonista del receptor completo a menudo requiere el procesamiento del extremo terminal N de las citoquinas de la familia IL-1, generalmente creando la citoquina madura a partir de un precursor. El más prominente de estos eventos es probablemente la maduración de IL-1 β por el inflamasoma.

Los receptores de la familia IL-1 se caracterizan por la presencia de dominios de inmunoglobulina extracelular y un dominio TIR intracelular que es necesario para la transducción de señales. La familia de receptores IL-1 incluye cuatro miembros con ligando y función conocidos: IL-1R1 (IL-1RI), IL-1R4 (ST2), IL-1R5 (IL-18R), IL-1R6 (IL-1Rp2); dos correceptores: IL-1R3 (IL-1RAcP), IL-1R7 (IL-18AcP); un receptor señuelo: IL-1R2 (IL-1RII); y tres receptores huérfanos TIR8 (SIGIRR), TIGIRR-1 (IL-1RAPL2), TIGIRR-2 (IL-1RAPL1). La nomenclatura de los receptores huérfanos sigue siendo ambigua. IL-1RAPL1, también conocido como TIGIRR-2, se denominó originalmente IL-1R8. Sin embargo, recientemente fue denominado como IL-1R9 o IL-1R10. Para evitar confusiones, los inventores utilizarán el término IL-1RAPL1 en el presente manuscrito. IL-1RAPL1 está altamente expresado en el cerebro y está involucrado en el desarrollo cerebeloso, el retraso mental y los defectos cognitivos. La principal diferencia estructural con respecto a otros miembros de la familia de receptores de IL-1 es una extensión de 150 aminoácidos del extremo terminal C en el dominio intracelular de IL-1RAPL1, que también está presente en su homólogo cercano IL-1RAPL2 y el receptor regulador TIR8. No se ha descrito un papel de esta estructura en la señalización celular. Los estudios funcionales sugieren que el mecanismo de activación y la señalización secuencia abajo de IL-1RAPL1 difiere de la de otros miembros de la familia de receptores de IL-1. Existe evidencia de que IL-1RAPL1 activa de forma selectiva JNK, que está involucrada, entre otras cosas, en la activación inmune. De hecho, un cribado funcional de ARNi reveló que IL-1RAPL1 regula el fenotipo del macrófago tras la interacción con las células apoptóticas.

La IL-38, también conocida como IL1F10, es la adición más reciente a la familia de IL-1. Comparte un 41% de homología con IL-1Ra y un 43% con IL-36Ra y, por lo tanto, se propuso como un antagonista del receptor de IL-1. De hecho, recientemente se ha demostrado que la IL-38 se puede unir a la IL-1R6, en la que reduce la producción de citoquinas después de la estimulación de *C. albicans* o la adición de IL-36 cuando se administra a bajas concentraciones. Sin embargo, se observó un aumento en la citoquina producida después de la estimulación de LPS junto con IL-38. En general, los polimorfismos de la IL-38 se asocian con una mayor susceptibilidad a desarrollar patologías autoinflamatorias como la espondiloartritis, la artritis reumatoide o la artritis psoriásica o con niveles de CRP, lo que sugiere un papel de la IL-38 en la regulación de los mecanismos subyacentes a tales condiciones.

Las citoquinas incluyen un gran número de hormonas inmunorreguladoras de mamífero que son secretadas por células del sistema inmune. Ejercen sus efectos biológicos a través de la interacción con receptores específicos en las superficies celulares. Por lo tanto, la respuesta biológica a una citoquina está regulada tanto por la presencia de la citoquina como por la expresión de su molécula receptora. Muchas enfermedades de los mamíferos, incluidas las enfermedades autoinmunes, inflamatorias y de cáncer, se correlacionan con niveles aumentados o alterados de citoquinas o receptores de citoquinas que pueden contribuir a la regulación errónea del sistema inmunitario y la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, los compuestos que son capaces de bloquear los efectos inmunorreguladores o inflamatorios de las citoquinas deben tener una actividad terapéutica significativa con respecto a dichos estados de enfermedad.

Las estrategias convencionales para generar inmunosupresión asociada con una respuesta inmune no deseada se basan en fármacos inmunosupresores de amplio espectro. Además, para mantener la inmunosupresión, la terapia con medicamentos inmunosupresores es generalmente una propuesta de por vida. Desafortunadamente, el uso de inmunosupresores de amplio espectro se asocia con un riesgo de efectos secundarios graves, como tumores, infecciones, nefrotoxicidad y trastornos metabólicos. En consecuencia, nuevas terapias inmunosupresoras serían beneficiosas.

Por lo tanto, hasta hoy no hay un enfoque terapéutico satisfactorio para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes y existe una necesidad constante de agentes inmunosupresores adicionales para avanzar en la atención médica de pacientes que padecen enfermedades asociadas con un sistema inmunitario patológico o incluso activado crónicamente.

El problema anterior se resuelve en un primer aspecto mediante una proteína IL-38 truncada aislada de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína IL-38 truncada" se refiere a un polipéptido IL-38 en el que se han eliminado residuos de aminoácidos del área del extremo terminal amino (o extremo terminal N) del polipéptido IL-38 de longitud completa. Una "proteína IL-38 truncada" en el contexto de la presente invención nunca comprende la secuencia de longitud completa como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

El término "variante funcional" de una proteína significa en este documento una variante de proteína, en la que la función, en relación con la invención definida como afinidad y estabilidad, se conserva esencialmente. Por lo tanto, uno o más aminoácidos que no son relevantes para dicha función pueden haber sido intercambiados. El término 'variante funcional' también debe entenderse como homólogos de otros mamíferos. Preferiblemente, las variantes funcionales de la presente invención conservan las capacidades inmunosupresoras de la proteína IL-38 truncada descrita en este documento como se muestra en la SEQ ID NO: 2.

El término "identidad de secuencia" (u "homología de secuencia") indica una medida cuantitativa del grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos de igual longitud o entre dos secuencias de nucleótidos de igual longitud. Si las dos secuencias que se comparan no tienen la misma longitud, se deben alinear de la mejor manera posible con la inserción de espacios o, alternativamente, el truncamiento en los extremos de las secuencias de proteína.

Un porcentaje mínimo más preferido de identidad de secuencia es al menos del 90%, al menos del 91%, al menos del 92%, al menos del 93%, al menos del 94%, al menos del 95%, al menos del 96%, al menos del 97 %, al menos del 98%, al menos del 99% y al menos del 99,5%, lo más preferiblemente del 100% en comparación con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, con la condición de que dicha secuencia de IL-38 truncada no comprenda la secuencia de longitud completa de IL- 38 como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

Dicha proteína IL-38 truncada de la invención tiene en una realización preferida 9, 10 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos truncados en su extremo terminal N en comparación con la proteína mostrada en la SEQ ID NO: 1. Las más preferidas son 19.

El truncamiento del extremo terminal N de acuerdo con la invención descrita en este documento implica preferiblemente al menos 2, preferiblemente 5, lo más preferiblemente 10, lo más preferiblemente 20 aminoácidos adyacentes entre las posiciones 1 a 30 de la SEQ ID NO: 1.

En otras realizaciones, la proteína IL-38 truncada de la invención tiene un extremo terminal N, en el que los primeros 20 aminoácidos del extremo terminal N no son idénticos a los primeros 20 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Alternativamente, una proteína IL-38 truncada de la invención no comprende una secuencia que sea al menos un 80% idéntica a la secuencia entre las posiciones 1 a 20 de la SEQ ID NO: 1.

Incluso más preferida es una proteína IL-38 truncada, que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 95% o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 (20-152_IL-38). Si se produce mediante la expresión recombinante de una proteína IL-38 truncada de la invención, la secuencia de la proteína IL-38 truncada se caracteriza por la presencia de una metionina adicional en el extremo terminal N. Dichas proteínas pueden someterse después de la expresión a un proceso de purificación para obtener la proteína IL-38 truncada aislada de la invención.

"Aislado" y "purificado" se refieren a cualquier molécula o compuesto que está separado de su entorno natural y está libre de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 99%, preferiblemente del 80% al 99% de otros componentes con los que está naturalmente asociado.

Por lo tanto, a este respecto, las proteínas IL-38 truncadas particularmente preferidas de la invención comprenden una metionina en el extremo terminal N en la posición 1; tales proteínas son puramente artificiales y no están presentes en la naturaleza.

- 5 El término "recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína o constructo de ácido nucleico, generado de forma recombinante o sintética, por ejemplo, en el caso de una proteína, a través de la traducción del transcrito de ARN de una serie asociada a un vector o plásmido particular de elementos específicos de ácido nucleico o de un casete de expresión en una célula huésped. El término "recombinante", como se usa en este documento, no abarca la alteración de la célula o el vector por eventos naturales (por ejemplo, mutación espontánea, transformación / transducción / transposición natural), como los que ocurren sin la intervención humana deliberada.
- 10 Por "célula huésped" se entiende una célula, que contiene un vector o casete de expresión y soporta la replicación y/o la expresión de la misma. Las células huésped pueden ser células procariontas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, insecto, anfibio, células vegetales o células de mamífero. Preferiblemente, las células huésped son células bacterianas o procariontas.
- 15 Como se usa en el presente documento, "vector" incluye una referencia a un ácido nucleico usado en la transfección de una célula huésped y en el que se puede insertar un polinucleótido. Los vectores son a menudo replicones.
- El término "proteína" o "proteínas", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido o cualquier porción del mismo.
- 20 El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto; por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos y proteínas se incluyen dentro de la definición de polipéptido. Este término tampoco hace referencia o excluye modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Dentro de la definición se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como las modificaciones conocidas en la técnica, tanto naturales como no naturales.
- 25 El término "proteína recombinante" como se usa en el presente documento se refiere a (1) un polipéptido de origen semisintético o sintético resultante de la expresión de una combinación de moléculas de ADN de diferente origen que se unen utilizando tecnologías de ADN recombinante; (2) un polipéptido de origen semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado con la totalidad o una parte de una proteína con la que está asociado en la naturaleza; (3) un polipéptido de origen semisintético o sintético que está vinculado a un polipéptido distinto de aquel al que está vinculado en la naturaleza; o (4) un polipéptido de origen semisintético o sintético que no está presente en la naturaleza.
- 30 La presente invención también contempla proteínas IL-38 truncadas modificadas químicamente o de otra manera. Las versiones modificadas de los polipéptidos descritos en este documento son, por ejemplo, proteínas IL-38 que se modificaron después de la traducción. Una modificación postraduccional puede ser la glicosilación de la proteína expresada.
- 35 El problema descrito anteriormente de la técnica anterior se resuelve en un aspecto adicional del mismo proporcionando un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante (o que codifica) una proteína IL-38 truncada como se describe en el presente documento. El término "codificante" o "que codifica" se refiere a la capacidad de una secuencia de nucleótidos para codificar uno o más aminoácidos. El término no requiere un codón de inicio o de parada. Una secuencia de aminoácidos puede codificarse en uno de los seis marcos de lectura diferentes proporcionados por una secuencia de polinucleótidos y su complemento.
- 40 El ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia que cuando se expresa produce un polipéptido que consiste en la proteína IL-38 truncada de la invención, pero que no es la proteína IL-38 de longitud completa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.
- Otro aspecto más de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico como se describe en el presente documento anteriormente. Lo más preferido es que el vector de la invención sea un vector de expresión.
- 45 Un "vector de expresión" es un constructo o secuencia de ácido nucleico, generado de forma recombinante o sintética, con elementos específicos de ácido nucleico que permiten la transcripción y/o expresión de otro ácido nucleico en una célula huésped. Un vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. En un ejemplo, un vector de expresión es un vector de ADN, tal como un plásmido, que comprende al menos una secuencia promotora y al menos una secuencia de terminación (por ejemplo, una secuencia de poliadenilación), y opcionalmente un origen de secuencia de replicación (ori), y opcionalmente una secuencia marcadora de selección o seleccionable. Opcionalmente, el vector de expresión puede comprender además al menos una secuencia de interés de codificación de nucleótidos que codifica para al menos un polipéptido, en el que al menos una secuencia promotora está unida operativamente con al menos una secuencia de codificación. El término "expresión" incluye cualquier etapa involucrada en la producción del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postraduccional, traducción, modificación postraduccional y/o secreción.
- 50
- 55 También se proporciona una célula recombinante, que comprende un ácido nucleico o un vector o un vector de expresión como se describe en el presente documento. Una célula recombinante de la invención preferiblemente no

es una célula madre embrionaria humana. Las células recombinantes preferidas de la invención son, por ejemplo, células bacterianas tales como *E. coli* u otros sistemas de expresión, o también células animales tales como células de insectos, células de mamíferos y células humanas.

5 Los compuestos y composiciones como se describen en el presente documento pueden aplicarse en diversos campos médicos, en particular como agentes terapéuticos activos en el tratamiento o la prevención de una enfermedad caracterizada por la activación patológica de la respuesta inmune en un sujeto que necesita un tratamiento de este tipo. La enfermedad preferida a tratar por los compuestos de la invención se describirá a continuación en el presente documento.

10 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína IL-38 truncada, o un ácido nucleico, un vector o una célula recombinante de acuerdo con las realizaciones de la invención descritas anteriormente, para uso en medicina, preferiblemente para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inmune o inflamatoria.

15 En el contexto de la presente invención, una enfermedad inmune o inflamatoria se selecciona preferiblemente de enfermedades autoinmunes, tales como shock séptico, shock hemorrágico, artritis, por ejemplo espondiloartritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica o artrosis, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple y enfermedades metabólicas como la arteriosclerosis y la diabetes tipo I. Otras indicaciones incluyen aquellas que responden al tratamiento con inhibidores de IL-1 β , como el síndrome de Muckle-Wells, los síndromes de fiebre periódica asociados con criopirina (CAPS), la fiebre mediterránea familiar, la enfermedad de Still, la enfermedad de Behçet y la diabetes mellitus.

20 La artritis, que incluye osteoartritis, artritis reumatoide, articulaciones artríticas como resultado de lesiones o depósitos de cristales, y similares, son afecciones inflamatorias comunes que se beneficiarían del uso terapéutico de las proteínas antiinflamatorias, tales como las proteínas IL-38 truncadas de la presente invención. Por ejemplo, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica que afecta a todo el cuerpo y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que recubre la articulación, lo que provoca dolor, rigidez, calor, enrojecimiento e hinchazón. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir huesos y cartílagos. Como resultado de la artritis reumatoide, el revestimiento inflamado de las articulaciones, el sinovio, puede invadir y dañar los huesos y el cartílago, lo que conduce al deterioro de las articulaciones y al dolor severo, entre otros efectos fisiológicos. La articulación afectada puede perder su forma y alineación, lo que resulta en dolor y pérdida de movimiento.

30 La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad mediada por el sistema inmunitario caracterizada particularmente por la inflamación y el daño tisular posterior que conduce a una discapacidad severa y un aumento de la mortalidad. Una variedad de citoquinas se producen localmente en las articulaciones reumatoides. Numerosos estudios han demostrado que la IL-1 y el TNF-alfa, dos citoquinas proinflamatorias prototípicas, desempeñan un papel importante en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la destrucción progresiva de las articulaciones. De hecho, la administración de TNF-alfa e inhibidores de IL-1 en pacientes con AR ha llevado a una mejora dramática de los signos clínicos y biológicos de la inflamación y una reducción de los signos radiológicos de la erosión ósea y la destrucción del cartílago. Sin embargo, a pesar de estos resultados alentadores, un porcentaje significativo de pacientes no responde a estos agentes, lo que sugiere que otros mediadores también participan en la fisiopatología de la artritis (Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2 (2): 135-149 2002; Astry, *J. Interferon Cytokine Res.* 31 (12): 927-40. 2011).

45 Para uso farmacéutico, las proteínas IL-38 truncadas de la invención se formulan para administración parenteral, particularmente intravenosa o subcutánea, de acuerdo con procedimientos convencionales. La administración intravenosa se realizará mediante inyección en bolo, liberación controlada, por ejemplo, mediante minibombas u otra tecnología apropiada, o mediante infusión durante un período típico de una a varias horas. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán una proteína hematopoyética en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5% en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tamponantes, albúmina para prevenir la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc. Cuando se utiliza una terapia de combinación de este tipo, las citoquinas pueden combinarse en una sola formulación o pueden administrarse en formulaciones separadas. Los procedimientos de formulación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's *Pharmaceutical Sciences*. Gennaro, editor, Mack Publishing Co., Easton PA, 1990.

55 Las dosis terapéuticas generalmente estarán en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg de peso del paciente por día, preferiblemente de 0,5-20 mg/kg por día, con la dosis exacta determinada por el médico de acuerdo con los estándares aceptados, teniendo en cuenta la naturaleza y la gravedad de la afección a tratar, las características del paciente, etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel de habilidad ordinaria en la técnica. Las proteínas se administrarán comúnmente durante un período de hasta 28 días. Más comúnmente, las proteínas se administrarán durante una semana o menos, a menudo durante un período de uno a tres días. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína IL-38 truncada de la presente invención es una cantidad suficiente para producir una disminución clínicamente significativa de la respuesta inflamatoria patológica.

En general, la dosificación de la proteína IL-38 truncada administrada variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, la condición médica general y la historia médica previa del paciente. Típicamente, es deseable proporcionar al receptor una dosis de proteína IL-38 truncada que esté en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque también se puede administrar una dosis más alta o menor según lo exijan las circunstancias. Las realizaciones específicas de las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan a continuación en el presente documento.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para modular la respuesta inmune de una célula, comprendiendo el procedimiento poner en contacto dicha célula con una proteína IL-38 truncada de la invención, o expresando en dicha célula un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Una "modulación de la respuesta inmunitaria" puede ser una inhibición de la señalización de JNK, en particular la inhibición de la liberación de IL-6 y la generación de TH17. La inhibición de la señalización de JNK puede observarse mediante el uso de un constructo indicador de JNK en dicha célula. Un informador ampliamente utilizado es un informador accionado por el promotor de AP-1.

Una célula a usar en el procedimiento descrito *in vitro* de la invención es preferiblemente una célula de mamífero, más preferiblemente una célula humana. También se prefiere que la célula sea una célula inmune, más preferiblemente un leucocito, incluso más preferiblemente un macrófago.

Otro aspecto más de la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para seleccionar moduladores de la actividad de IL-38 truncada, que comprende las etapas de

a. Proporcionar una célula,

b. Poner en contacto dicha célula con un patrón molecular asociado a microbios (MAMP), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o sobrenadantes de células apoptóticas (ACM),

c. Poner en contacto adicionalmente dicha célula con una proteína IL-38 truncada de la invención y un modulador candidato,

d. Determinar la activación de JNK en dicha célula,

en el que un aumento de la activación de JNK en dicha célula en comparación con una célula de control o valor de referencia indica que el modulador candidato es un antagonista de IL-38 truncada, y una disminución de la activación de JNK en comparación con una célula de control o referencia indica que el modulador candidato es un agonista de IL-38 truncada.

Los PAMP o MAMP de acuerdo con la invención pueden seleccionarse de lipopolisacáridos bacteriano (LPS), flagelina bacteriana, ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas, peptidoglicano y variantes de ácido nucleico normalmente asociadas con virus, tales como ARN de cadena doble (ARNcd), o motivos CpG no metilados.

Dicha célula que se usa en el procedimiento de cribado de la invención preferiblemente expresa en la superficie celular un receptor de IL-38 truncada, por ejemplo, expresando ectópicamente IL-1RAPL1 en dicha célula.

Un modulador candidato es preferiblemente una molécula pequeña, un ácido nucleico pequeño, tal como un ARN pequeño, o una proteína, tal como un anticuerpo.

Dicha activación de JNK se determina preferiblemente por medio de un constructo informador AP-1. Dichos constructos informadores pueden estar basados en luciferasa, en enzimas o en proteínas fluorescentes. También se puede determinar la expresión directa del gen objetivo de JNK, por ejemplo mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Enfermedades y afecciones

La presente invención proporciona una proteína IL-38 truncada que se puede usar como un agente terapéutico en el tratamiento o prevención de diversas enfermedades. De acuerdo con la presente invención, los compuestos y composiciones son particularmente útiles para el tratamiento y/o prevención de una afección caracterizada por una respuesta inmune o inflamatoria patológica activada. En particular, la invención trata de proporcionar un tratamiento para afecciones caracterizadas por una actividad patológica de citoquinas como la interleuquina 6 y la interleuquina 17, que se demostró que están involucradas en una amplia serie de trastornos inflamatorios y autoinmunes crónicos.

En el contexto de la presente invención, una enfermedad autoinmune es como un trastorno que resulta de una respuesta autoinmune. Una enfermedad autoinmune es el resultado de una respuesta inadecuada y excesiva a un autoantígeno, o una activación patológica de la señalización de la respuesta inmune, por ejemplo, a través de citoquinas. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitarse a, la enfermedad de Addison, la alopecia areata, la espondilitis anquilosante, la hepatitis autoinmune, la parotiditis autoinmune, la enfermedad de Crohn, la diabetes (tipo I), la epidermólisis bullosa distrófica, la epididimitis, la glomerulonefritis, la enfermedad de Graves, el síndrome de Guillain-Barre, la enfermedad de Hashimoto, la anemia hemolítica, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple, la miastenia grave, el pénfigo vulgar, la psoriasis, la fiebre reumática, artritis

reumatoide, la sarcoidosis, la escleroderma, el síndrome de Sjögren, las espondiloartropatías, la tiroiditis, la vasculitis, el vitíligo, el mixedema, la anemia perniciosa, la colitis ulcerativa, entre otras.

Composiciones y kits para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes

5 Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a composiciones y kits para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes o inflamatorias. En una realización, la composición comprende un compuesto tal como una proteína, ácido nucleico o célula recombinante como se describe en el presente documento, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Como se usa en este documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, solubilizantes, rellenos, estabilizantes, aglutinantes, absorbentes, bases, agentes de tamponamiento, lubricantes, vehículos de liberación controlada, diluyentes, agentes emulsionantes, humectantes lubricantes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos o antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar agentes suplementarios en las composiciones. En ciertas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende albúmina de suero.

La composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intratecal, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, transdérmica (tópica) y transmucosa.

20 Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina; propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como el cloruro de sodio o la dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en inyección incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL^{MR} (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición inyectable debe ser estéril y debe ser fluida para que pueda ser inyectada fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

45 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (por ejemplo, una neuregulina) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución del mismo filtrada previamente en forma estéril.

55 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden incluirse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un portador fluido para usar como un enjuague bucal, en el que el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se agita y expectora o traga. Agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un

excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Stertes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o sabor a naranja.

- 5 Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosal o transdérmico. Para la administración transmucosal o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, las composiciones farmacéuticas se formulan en ungüentos, bálsamos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para la liberación sostenida o controlada del ingrediente activo. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como acetato de vinilileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente a través de, por ejemplo, Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones de liposomas (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en este documento incluye unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y las limitaciones inherentes a la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos. Si bien se pueden usar compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosis para uso en humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en circulación en plasma que incluya la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición de los síntomas a la mitad del máximo) determinada en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración.

La presente invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias que se acompañan, sin embargo, sin limitarse a ellas. En las figuras:

Figura 1: la IL-38 se secreta a partir de células apoptóticas. (A) Las células de cáncer de pulmón humano A549, las células de cáncer de mama MDA-231, las PBMC primarias humanas y los neutrófilos primarios humanos se mantuvieron viables, se trataron con TNF-alfa (20 ng/mL)/CHX (10 μ M) para inducir la apoptosis o se incubaron a 60 °C durante 30 minutos para inducir la necrosis. Los respectivos sobrenadantes de células viables (VCM), apoptóticas (ACM) o necróticas (NCM) se recogieron y los niveles de IL-38 se analizaron mediante ELISA. Los datos son las medias \pm SEM, n = 5. (B) La secreción de IL-38 a partir de células A549 apoptóticas se analizó mediante ELISA en los tiempos indicados. Los datos son las medias \pm SEM, n = 5. * p <0,05, ANOVA con corrección de Bonferroni.

- 5 **Figura 2:** La IL-38 liberada por células tumorales apoptóticas regula la producción de citoquinas en macrófagos. Los macrófagos humanos se estimularon durante 24 h con (A) LPS (1 ng/mL) solo o en combinación con 10 ng/mL de IL-38 humana recombinante (rhIL-38) o con (B) sobrenadantes de células A549 apoptóticas (ACM) solas o en combinación con 10 ng/mL de IL-38 humana recombinante (rhIL-38). La producción de citoquinas se midió utilizando una matriz de perlas citométricas; se muestran los resultados normalizados. Los datos son las medias \pm SEM, n = 5 (C) Los macrófagos humanos se estimularon con sobrenadantes de células A549 viables (VCM) o apoptóticas (ACM), que se transfectaron previamente con ARNpi no dirigidos (Ctrlpi), ARNpi dirigido contra IL-38 (IL-38pi) o un vector de sobreexpresión de IL-38 (IL-38se). La producción de citoquinas se midió utilizando una matriz de perlas citométricas; se muestran los resultados normalizados. Los datos son las medias \pm SEM, n = 5 (D) Los macrófagos humanos se transfectaron con un constructo indicador AP1 y la actividad de luciferasa se midió después de 24 h de estimulación con ACM de Ctrlpi y células A549 IL-38pi. Las mediciones de fondo obtenidas de células transfectadas de manera simulada se restaron de cada valor experimental. Se muestran los resultados normalizados. Los datos son las medias \pm SEM, n = 5. * p < 0,05, ANOVA con corrección de Bonferroni.
- 10
- 15 **Figura 3:** IL-38 se une a IL-1R6 e IL-1RAPL1. (A, B) Los macrófagos humanos se estimularon con LPS o ACM durante 6 y 24 h. La expresión de ARNm (A) y la expresión de la proteína de la superficie celular (B) de IL-1R6 e IL-1RAPL1 se midieron mediante RT-qPCR y FACS, respectivamente. Los datos son las medias \pm SEM, n = 5. (C, D) Los macrófagos fueron controles (Ctrl) o se incubaron con 50 ng/mL de IL-38 durante 15 minutos en hielo antes de teñir con anti-IL-1R6 o anti-IL-1RAPL1 y sus respectivos anticuerpos secundarios conjugados con PE. Se muestran los histogramas representativos de citometría de flujo (C) y la cuantificación estadística de la mediana de la intensidad de PE (D). Los datos son las medias \pm SEM, n = 5. (E) Cinética de unión de IL-38 a IL-1R6 e IL-1RAPL1 inmovilizadas. Las placas de 96 pocillos se recubrieron con 0,5 μ g de quimeras de Fc del dominio extracelular de IL-1R6 e IL-1R6 humanas y se incubaron con cantidades crecientes de IL-38 recombinante humana según se indica. La unión de IL-38 al dominio extracelular de los receptores se detectó utilizando el anticuerpo monoclonal biotinilado IL-38. Los datos son las medias \pm SEM, n = 5. * p < 0,05, ANOVA con corrección de Bonferroni.
- 20
- 25
- 30 **Figura 4:** Papel de IL-1R6 e IL-1RAPL1 en la producción de citoquinas. Los macrófagos humanos se transfectaron con ARNpi no dirigido (Ctrlpi) o ARNpi dirigido contra (A) IL-1RAPL1 (IL1RAPL1pi) o (B) IL-1R6 (IL1R6pi) y se estimularon con VCM y ACM durante 24 h. La producción de citoquinas se midió utilizando una matriz de perlas citométricas; se muestran los resultados normalizados. Los datos son las medias \pm SEM, n = 5. * p < 0,05, ANOVA con corrección de Bonferroni.
- 35 **Figura 5:** IL-38 regula la respuesta de Th17. Las células T humanas se activaron con perlas anti-CD3/anti-CD28, se teñieron con eFluor 670 y se estimularon con el sobrenadante de macrófagos estimulados previamente con ACM de las células A549 de control (ACMCtrlph/M Φ) o células A549 con inactivación de IL-38 (ACMIL-38ph/M Φ). Después de 7 días (A) se midió la producción de citoquinas y (B, C) la proliferación celular. (A) Se cuantificaron las citoquinas utilizando una matriz de perlas citométricas; se muestran los resultados normalizados. Los datos son las medias \pm SEM, n = 10. La proliferación de células T se determinó después de la dilución de eFluor 670. (B) Se muestran la cuantificación estadística de todas las células T en proliferación y (C) histogramas de citometría de flujo representativos. Los datos son las medias \pm SEM, n = 10. * p < 0,05, ANOVA con corrección de Bonferroni.
- 40
- 45 **Figura 6:** La IL-38 está truncada en el extremo terminal N. (A) Se muestra el motivo de consenso característico de la familia IL-36 en IL-38, que define el sitio de escisión putativo de esta citoquina en el extremo terminal N. (B) IL-38 etiquetada con myc en el extremo terminal C se sobreexpresó en células A549, que luego se utilizaron para la producción de ACM. Después de la inmunoprecipitación de la IL-38 sobreexpresada utilizando perlas recubiertas con anti-myc, se realizó una electroforesis bidimensional en gel (enfoque isoelectrónico a pH 4-7, seguido de una separación en gel de poliacrilamida), y se usó un anticuerpo monoclonal anti-myc para detectar la IL-38 inmunoprecipitada tras la transferencia de proteínas a nitrocelulosa. (C) Se usaron geles bidimensionales teñidos con Coomassie para recoger manchas de IL-38 putativas, que se analizaron mediante espectrometría de masas. Se muestran los péptidos del extremo terminal N de IL-38 identificados para las diferentes manchas de IL-38.
- 50
- 55 **Figura 7:** La IL-38 truncada y de longitud completa tienen papeles opuestos en la producción de citoquinas y se unen a IL-1RAPL1. (A, C) Los macrófagos humanos fueron (A) no tratados o (C) previamente transfectados con ARNpi no dirigido (Ctrlpi) o siRNA dirigidos contra IL-1RAPL1 (IL1RAPL1pi) y estimulados durante 6 h con IL-1 β recombinante humana 50 ng/mL solo o en combinación con diferentes concentraciones de recombinante humano de longitud completa (IL-38aa1-152) o escindido (IL-38aa20-152) IL-38. Después de 24 h, la concentración de IL-6 en los sobrenadantes se midió utilizando una matriz de perlas citométricas, se muestran los resultados normalizados. Los datos son las medias \pm SEM, n = 7. (B) Cinética de unión de IL-38 de longitud completa y escindida a IL-1RAPL1 inmovilizada. Las placas de 96 pocillos se recubrieron con 0,5 μ g de quimeras de Fc de dominio extracelular de IL-1RAPL1 humano y se incubaron con cantidades crecientes de IL-38aa1-152 o IL-38aa20-152 recombinante humana como se indica. La unión de IL-38 al dominio extracelular de los receptores se detectó utilizando el anticuerpo monoclonal biotinilado IL-38. Los datos son las medias \pm SEM, n = 5. * p < 0,05, ANOVA con corrección
- 60

de Bonferroni.

Figura 8: Vías de señalización inducidas por IL-1RAPL1 reguladas por IL-38 en células HEK. Las células HEK se cotransfectaron con un plásmido de sobreexpresión de IL-1RAPL1 en combinación con (A, D) AP1, (B, E) NFκB o constructos informadores de IL-6 (C). Las células HEK transfectadas con los constructos informadores junto con un plásmido vacío en lugar del plásmido de sobreexpresión de IL-1RAPL1 se utilizaron como controles (simulaciones). (A, B) Las células HEK se estimularon con IL-1β (50 ng/mL) durante 24 h y se midió la actividad de AP1 o NFκB. Se muestran los resultados normalizados. Los datos son las medias ± SEM, n = 15. (C) Se utilizaron constructos informadores de IL-6 con mutaciones puntuales en los sitios de unión de la transcripción indicados. Después de la transfección, las células se incubaron durante 24 h adicionales y se midió la actividad de luciferasa dependiente del promotor de IL-6. Los resultados se expresan como las veces que se produce inducción en relación con las células transfectadas de manera simulada. Los datos son las medias ± SEM, n = 10. (D, E) Después de la transfección, se agregó medio fresco (Ctrl) o diferentes concentraciones de IL-38aa1-152 o IL-38aa20-152 y las células se incubaron durante 24 h adicionales. Los resultados se expresan como las veces que se produce inducción en relación con las células transfectadas de manera simulada. Los datos son las medias ± SEM, n = 15. (F) IL1RAPL1 se sobreexpresó en células HEK y, después de la transfección, se agregaron a las células medio fresco (Ctrl) o IL-38aa1-152 o IL-38aa20-152 (25 ng/mL) seguido de incubación durante 24 h adicionales. La tinción intracelular de JNK fosforilada y p38 se realizó y midió mediante FACS. Los resultados se expresan como las veces que se produce inducción en relación con las células transfectadas de manera simulada. Los datos son las medias ± SEM, n = 5. * p < 0,05, ANOVA con corrección de Bonferroni.

Figura 9: IL-38 regula la actividad de AP1 en macrófagos. Los macrófagos humanos se transfectaron con un vector vacío, AP1, NFκB o constructos indicadores de IL-6. Después de la transfección, los macrófagos se estimularon durante 24 h con IL-1β (50 ng/mL) solo o en combinación con IL-38aa1-152 o IL-38aa20-152 (20 ng/mL). Se midió la actividad de la luciferasa. Las mediciones de fondo obtenidas de células transfectadas de manera simulada se restaron de cada valor experimental. Se muestran resultados normalizados. Los datos son las medias ± SEM, n = 7. * p < 0,05, ANOVA con corrección de Bonferroni.

SEQ ID NO: 1

MCSLPMARYYIIKYADQKALYTRDQQLLVGDPVADNCCAEEKICILPNRGLARTKVPI
 FLGIQGGSRCLACVETEEGPSLQLEDVNIEELYKGGEEATRFTFFQSSSGSAFRLEAAA
 WPGWFLCGPAEPQQPVQLTKESEPSARTKIFYFEQSW

SEQ ID NO: 2

LYTRDQQLLVGDPVADNCCAEEKICILPNRGLARTKVPIFLGIQGGSRCLACVETEEGP
 SLQLEDVNIEELYKGGEEATRFTFFQSSSGSAFRLEAAAWPGWFLCGPAEPQQPVQLT
 KESEPSARTKIFYFEQSW

Ejemplos

Ejemplo 1: IL-38 se libera de células apoptóticas

Cuando se realiza un ELISA interno para determinar los niveles de IL-38 producidos por las líneas celulares tumorales, los inventores notaron que la inducción de la muerte celular apoptótica aumentaba notablemente la secreción de IL-38 en el sobrenadante. En comparación con el sobrenadante de las células de cáncer de pulmón A549 viables o las células de cáncer de mama MDA.231 (VCM), los sobrenadantes de células apoptóticas (ACM), pero no los sobrenadantes de células necróticas (NCM) contenían niveles aproximadamente 10 veces más altos de IL-38 (Figura 1A). Este fue también el caso de los neutrófilos humanos primarios o PBMC, aunque el aumento de la liberación de IL-38 durante la apoptosis no fue tan fuerte (Figura 1A). Con el fin de analizar la cinética de la secreción de IL-38, se midió la concentración de IL-38 en los sobrenadantes de A549 en diferentes momentos tras la inducción de la apoptosis. Se observó una mayor secreción de IL-38 después de 12 h luego de la inducción de apoptosis (Figura 1B), coincidiendo con la aparición de marcadores de apoptosis en células A549 (datos no mostrados).

Ejemplo 2: IL-38 regula la producción de citoquinas después de la estimulación con ACM

Los mediadores derivados de células apoptóticas tienen el potencial de modular las respuestas de los fagocitos, incluida la producción de citoquinas (26). Los inventores analizaron el papel de la IL-38 en la producción de un panel de citoquinas que se producen tras la activación de macrófagos por LPS o tras la interacción con células apoptóticas (27). De estos, la producción de IL-6 e IL-8 estaba regulada por IL-38. La adición de IL-38 recombinante a los macrófagos estimulados con LPS aumentó la producción de IL-6 e IL-8 en comparación con el LPS solo (Figura 2A).

De manera sorprendente, cuando los macrófagos humanos se estimularon con ACM de células A549 solas o en combinación con IL-38 humana recombinante, se observó el efecto opuesto (Figura 2B). IL-38 suprimió la secreción de IL-6 e IL-8 inducida por ACM de los macrófagos. Dado que la ACM ya contenía IL-38, los inventores se preguntaron si la IL-38 endógena afectaba la producción de citoquinas de macrófagos de citoquinas. Para responder a esta pregunta, la IL-38 se sobreexpresó o se eliminó en las células A549 antes de generar ACM. De hecho, la estimulación de macrófagos humanos con ACM producida a partir de células A549 que sobreexpresan IL-38 resultó en una secreción reducida de IL-6 e IL-8, mientras que la estimulación con ACM de células A549 con inactivación de IL-38 produjo mayores concentraciones de IL-6 e IL-8 (Figura 2C). Entre los factores de transcripción prominentes que regulan la producción de citoquinas y están regulados por la familia de IL-1 están NFκB y AP1. Como NFκB se bloquea después de la interacción de los macrófagos con las células apoptóticas (28), los inventores se preguntaron si la IL-38 endógena regulaba la activación de AP1 en respuesta a la ACM. Al aplicar ACM de las células A549 con inactivación de IL-38 en comparación con ACM de control a los macrófagos transfectados con un constructo informador de luciferasa AP1, los inventores notaron que el ACM que contenía menores niveles de IL-38 indujo una activación de AP1 más pronunciada (Figura 2D). En conclusión, la IL-38 endógena restringió la activación de macrófagos inflamatorios en respuesta a sobrenadantes de células apoptóticas.

Ejemplo 3: IL-38 antagoniza la producción de citoquinas dependientes de IL1RAPL1 en respuesta en ACM

Los inventores plantearon la hipótesis de que la IL-38 inhibe la producción de citoquinas inducida por ACM al actuar como un antagonista del receptor. Por lo tanto, los inventores analizaron los candidatos de la familia del receptor de IL-1 por su asociación con IL-38. Se mostró que la IL-38 se une a la IL-1R6 (19) y los inventores observaron que el receptor huérfano IL-1RAPL1 regula la producción de citoquinas en macrófagos después de la estimulación con ACM (16). Los inventores primero determinaron que la expresión de IL1R6 y IL-1RAPL1 en macrófagos se determinó a nivel de ARNm usando qPCR (Figura 3A) y al nivel de disponibilidad de superficie celular por FACS (Figura 3B) después de la estimulación con ACM o LPS. La expresión de IL1R6 fue generalmente baja (Figura 3C) y se subregulaba a nivel de ARNm después de la estimulación con ACM o LPS, que, sin embargo, no era evidente a nivel de expresión de la superficie celular. Contrariamente, la expresión de IL-1RAPL1 fue abundante (Figura 3C) y se indujo aún más a nivel de ARNm así como en la superficie celular a las 6 h después de LPS y a las 6 h y 24 h después del tratamiento con ACM (Figura 3A, B). Además, la expresión de IL-1RAPL1 en la superficie celular se redujo después de 24 h de estimulación con LPS. Estos experimentos sugirieron a IL-1RAPL1 al menos como un candidato adicional para la acción de IL-38. A continuación, los inventores analizaron si IL-38 se uniría a IL-1RAPL1 realizando tanto ensayos de competición como ensayos de unión de receptores. Para ensayos de competición, los macrófagos humanos se incubaron con IL-38 humana recombinante antes de analizar la expresión superficial de IL-1R6 o IL-1RAPL1. Con base en el bajo nivel de expresión de superficie de IL-1R6, fue difícil observar las diferencias en la expresión de la superficie celular debido a la preincubación de IL-38 (Figura 3C, D). Sin embargo, para IL-1RAPL1, los inventores observaron que IL-38 compitió con el anticuerpo usado para la tinción con FACS (Figura 3C, D), lo que indica que IL-38 puede unirse a IL-1RAPL1. Para validar estos resultados, se realizaron ensayos de unión directa al receptor. Las placas se recubrieron con quimeras de IL-1R6-Fc e IL-1RAPL1-Fc, se agregaron diferentes concentraciones de IL-38 a los pocillos y se visualizó la IL-38 unida. Como se mostró recientemente (19), la IL-38 se unió realmente a IL-1R6 (Figura 3E). Además, IL-38 también se unió a IL-1RAPL1 (Figura 3E). Como estos resultados sugirieron que la IL-38 podría regular la producción de citoquinas mediante la unión a IL-1RAPL1, los inventores se preguntaron por el papel de IL-1RAPL1 en la producción de citoquinas inducida por ACM. La inactivación transitoria de IL-1R6 o IL-1RAPL1 se realizó en macrófagos humanos y los niveles de IL-6 e IL-8 en sobrenadantes de cultivo de macrófagos se midieron después de la estimulación con ACM. La producción de IL-6 e IL-8 después de la estimulación con ACM era dependiente de IL-1RAPL1 (Figura 4A), mientras que IL-1R6 no estaba involucrada en la producción de citoquinas en el modelo del inventor (Figura 4B).

Ejemplo 4: IL-38 regula las respuestas de Th17

A continuación, los inventores se preguntaron por las consecuencias posteriores de la supresión dependiente de IL-38 de la producción de citoquinas a partir de macrófagos mediante el análisis del efecto de los sobrenadantes de macrófagos sobre la activación de células T. Los inventores aislaron células T humanas primarias, las estimularon con perlas antiCD3/antiCD28 y las incubaron repetidamente con sobrenadantes de macrófagos previamente estimulados con ACM y con ACM de células A549 con inactivación de IL-38. Los niveles de IL-10, IL-17 e IFN-γ se midieron en los sobrenadantes de las células T después de siete días de cultivo. Cuando los macrófagos se estimularon con ACM, sus sobrenadantes redujeron la producción de IFN-γ e IL-10 por las células T y elevaron ligeramente los niveles de IL-17 (Figura 5A). Sin embargo, cuando los macrófagos se estimularon con ACM sin IL-38, sus sobrenadantes elevaron fuertemente la producción de IL-17 por parte de las células T y disminuyeron aún más las concentraciones de IL-10 (Figura 5A). Estos efectos fueron independientes de las diferencias en la proliferación de células T. El tratamiento con ACM no afectó el número de células T en proliferación (Figura 5B), aunque afectó el número de divisiones antes de la división de las células T, lo que podría explicar la reducción de los niveles de IFN-γ e IL-10 (Figura 5C). Sin embargo, no hubo diferencia en la proliferación de células T si ACM contenía IL-38 o no (Figura 5B, C). Estos datos muestran que la IL-38 de las células apoptóticas restringe la generación de células Th17 dependientes de macrófagos y mantiene la expresión de IL-10.

Ejemplo 5: IL-38 se procesa en el extremo terminal N en células apoptóticas

Excepto por IL-1Ra, todos los miembros de la familia de IL-1 se producen como precursores, que necesitan ser escindidos en el extremo terminal N para alcanzar la actividad completa. Recientemente, de acuerdo con el tamaño del prodominio del extremo terminal N, IL-38 fue clasificada en la subfamilia de IL-36 (4, 19). IL-38, como los otros miembros de esta subfamilia, posee un motivo de consenso, que determina putativamente el sitio de escisión del extremo terminal N (Figura 6A). Con el fin de determinar si la apoptosis indujo o no el procesamiento de IL-38, la IL-38 marcada con myc en el extremo terminal C se sobreexpresó en células tumorales y se produjo ACM a partir de estas células. Después de la inmunoprecipitación, se realizó una electroforesis en gel bidimensional de IL-38 para visualizar las isoformas de IL-38. Se identificaron con éxito dos isoformas de IL-38 en el gel, lo que indica que la IL-38 se procesa realmente durante la apoptosis (Figura 6B). Las dos manchas que representan las isoformas de IL-38 putativas fueron seleccionadas y analizadas por espectrometría de masas (MS). En la mancha con mayor peso molecular, pronosticada como IL-38 de longitud completa, se encontraron dos péptidos del extremo terminal N en el análisis por MS, uno del aminoácido 9 a 18, y el segundo del aminoácido 24 a 41, mientras que en el análisis por MS muestra con peso molecular más bajo, solo se encontró el péptido del aminoácido 24 a 41 (Figura 6C). Por lo tanto, la IL-38 se procesa en el extremo terminal N en células apoptóticas.

15 **Ejemplo 6: IL-38 truncada de longitud completa ejerce funciones opuestas en la regulación de la producción de citoquinas a través de IL-1RAPL1**

Para determinar si la IL-38 truncada y de longitud completa tiene una actividad biológica diferente, se determinó la concentración de IL-6 en los sobrenadantes de macrófagos humanos estimulados con IL-1 β , sola o en combinación con diferentes concentraciones de IL-38 de longitud completa (IL-38aa1-152) o truncada (IL-38aa20-152). Después de la estimulación con IL-1 β , las concentraciones más altas de IL-38aa1-152 (20 ng/mL, 10 ng/mL) aumentaron significativamente la producción de IL-6, mientras que la IL-38aa20-152 disminuyó la producción de IL-6 incluso cuando se aplicó a baja concentración (Figura 7A). Dado que la IL-38 en ACM regulaba la producción de IL-6 interactuando con IL-1RAPL1, los inventores se preguntaron si ambas isoformas de IL-38, que tienen roles opuestos en la producción de citoquinas, se unen a IL-1RAPL1. Los inventores realizaron un ensayo de unión al receptor como se explicó anteriormente. Ambas isoformas de IL-38 se unieron a IL-1RAPL1 en este ensayo (Figura 7B). Sin embargo, las cinéticas de unión parecían diferir ligeramente. Al considerar que aunque IL-38aa1-152 e IL-38aa20-152 ejercen papeles opuestos en la producción de citoquinas, ambos son capaces de unirse a IL-1RAPL1, otro punto clave a analizar fue si los efectos en la producción de IL-6 ambos eran dependientes de IL-1RAPL1. Para lograr esto, se realizó una inactivación transitoria de IL-1RAPL1 en macrófagos y se midió la concentración de IL-6 en los sobrenadantes después de la estimulación con IL-1 β solo o en combinación con IL-38aa1-152 o IL-38aa20-152. La inactivación de IL-1RAPL1 en macrófagos anuló tanto la inducción de IL-6 por IL-38 de longitud completa como la supresión de IL-6 por IL-38 truncada (Figura 7C).

25 **Ejemplo 7: IL-38 regula la ruta JNK/AP1 activada por IL-1RAPL1**

Los inventores obtuvieron evidencia de que IL-38 regula AP-1 en macrófagos al interactuar con células apoptóticas (Figura 2D). Para analizar las vías de señalización que se ven afectadas por la IL-38 en relación con su interacción con IL-1RAPL1, los inventores utilizaron por primera vez un modelo de sobreexpresión del receptor con células HEK 293T. Las células se cotransfectaron con un constructo de sobreexpresión para constructos informadores de IL-1RAPL1 y AP1 o NF κ B. Las células HEK transfectadas con los constructos informadores pero sin sobreexpresión de IL-1RAPL1 se utilizaron como control. Primero, para caracterizar el modelo, se estimularon las células que sobreexpresan IL-1RAPL1 y las células de control con IL-1 β , y se midió la actividad de AP1 (Figura 8A) o NF κ B (Figura 8B). IL-1 β se usó como un ligando de baja afinidad para el receptor huérfano IL-1RAPL1 (14). Después de la estimulación con IL-1 β , se observó una inducción significativa de NF κ B pero no de actividad AP1 en las células de control. Sin embargo, cuando IL-1RAPL1 se sobreexpresó, se observó una activación de AP1, así como una mayor actividad de NF κ B. Por lo tanto, la IL-1 β sola induce la activación de NF κ B de una manera independiente de IL-1RAPL1, pero no la activación de AP1, que requirió de IL-1RAPL1. De manera sorprendente, incluso sin ningún estímulo, la presencia de IL-1RAPL1 fue suficiente para aumentar las actividades de AP1 y NF κ B en comparación con las células de control (Figura 8A, B). Por lo tanto, IL-1RAPL1 activa AP1, pero no para NF κ B, después de la estimulación con IL-1 β en células HEK, pero induce la activación de AP1 y NF κ B tras la sobreexpresión sin la adición de un ligando exógeno. Para confirmar esto, se utilizaron constructos del promotor de IL-6 con o sin mutaciones puntuales en diferentes sitios de unión al factor de transcripción (AP1, NF κ B, CREB y CEBP β). Las células HEK se cotransfectaron con un plásmido de sobreexpresión de IL1RAPL1 y los constructos indicadores de IL-6 (29). También en esta configuración, la sobreexpresión de IL-1RAPL1 activó el promotor de IL-6 en comparación con las células de control HEK. Esta inducción del promotor de IL-6 se anuló cuando los sitios de unión de AP1 y NF κ B se mutaron (Figura 8C). Esto sugiere la presencia de un ligando endógeno para IL-1RAPL1 producido por las células HEK. Luego, los inventores se preguntaron si IL-38aa1-152 e IL-38aa20-152 podían afectar la actividad de AP1 y NF κ B secuencia abajo de IL-1RAPL1. La actividad del promotor NF κ B en esta configuración no estaba regulada por la IL-38 (Figura 8D), pero la inducción de AP1 estaba regulada negativamente por ambas isoformas de IL-38 (Figura 3E). Es importante destacar que IL-38aa20-152 fue capaz de regular la inducción de AP1 en concentraciones más bajas en comparación con la proteína de longitud completa. Para analizar las vías de señalización que conducen a la supresión dependiente de IL-38 de la actividad de AP1 inducida por IL-1RAPL1, se realizó una tinción intracelular de JNK fosforilada y p38 en células con sobreexpresión de IL-1RAPL1 en comparación con células HEK de control. Después de la sobreexpresión de IL-1RAPL1, se observó una inducción en JNK fosforilada pero no en p38. Esta inducción se redujo significativamente mediante IL-38aa20-152, pero no

mediante IL-38aa1-152, lo que confirma el papel regulador más fuerte de la IL-38 truncada.

Ejemplo 8: IL-38 regula la actividad de AP1 en macrófagos

A continuación, los inventores transfirieron los datos del inventor del modelo HEK a la configuración de macrófagos. Los macrófagos humanos se transfectaron con constructos informadores de AP1 o NFκB y se estimularon con IL-1β solo o en combinación con IL-38aa20-152 o IL-38aa1-152. Al igual que en las células HEK, la IL-38aa20-152 disminuyó la AP1, pero no la actividad de NFκB en los macrófagos, mientras que la IL-38aa1-152 fue ineficaz (Figura 9). Por lo tanto, solo la IL-38 truncada suprimió la actividad de AP-1 en macrófagos, lo que concuerda con el hallazgo del inventor de que los macrófagos estimulados con sobrenadantes de células apoptóticas que carecen de IL-38 mostraron niveles más altos de actividad de API (Figura 2D). Finalmente, los inventores abordaron la cuestión de por qué IL-38aa1-152 aumentó la producción de IL-6 después de la estimulación de macrófagos con IL-1β (Figura 7A), mientras que en el modelo de células HEK, IL-38aa1-152 no aumentó la activación de AP1 ni de NFκB. Para investigar esta discrepancia, los macrófagos se transfectaron con un constructo informador de IL-6 y se estimularon con IL-1β solo o en combinación con ambas isoformas de IL-38. Como se esperaba, la IL-38aa20-152 redujo la actividad del promotor de la IL-6, pero la IL-38aa1-152 no afectó en absoluto la inducción del promotor de la IL-6 (Figura 9), lo que sugiere que el aumento de la producción de IL-6 mediada por la IL-38aa1-152 no fue regulada transcripcionalmente.

En conclusión, la presente invención muestra una IL-38 procesada en el extremo terminal N que se puede usar en la clínica para limitar la autoinflamación en general o como resultado, por ejemplo, de una interacción defectuosa de macrófagos con células apoptóticas.

Referencias:

1. Sims, J. E. & Smith, D. E. (2010) *Nat Rev Immunol* 10, 89-102.
2. Dinarello, C. A. (2009) *Annu Rev Immunol* 27, 519-50.
3. Dinarello, C. A. (2013) *Seminars in immunology*.
4. Garlanda, C., Dinarello, C. A. & Mantovani, A. (2013) *Immunity* 39, 1003-18.
5. Towne, J. E., Renshaw, B. R., Douangpanya, J., Lipsky, B. P., Shen, M., Gabel, C. A. & Sims, J. E. (2011) *J Biol Chem* 286, 42594-602.
6. Latz, E., Xiao, T. S. & Stutz, A. (2013) *Nat Rev Immunol* 13, 397-411.
7. Boraschi, D. & Tagliabue, A. (2013) *Seminars in immunology*.
8. Pavlowsky, A., Gianfelice, A., Pallotto, M., Zanchi, A., Vara, H., Khelifaoui, M., Valnegri, P., Rezai, X., Bassani, S., Brambilla, D., Kumpost, J., Blahos, J., Roux, M. J., Humeau, Y., Chelly, J., Passafaro, M., Giustetto, M., Billuart, P. & Sala, C. (2010) *Current biology : CB* 20, 103-15.
9. Gambino, F., Kneib, M., Pavlowsky, A., Skala, H., Heitz, S., Vitale, N., Poulain, B., Khelifaoui, M., Chelly, J., Billuart, P. & Humeau, Y. (2009) *The European journal of neuroscience* 30, 1476-86.
10. Jin, H., Gardner, R. J., Viswesvariah, R., Muntoni, F. & Roberts, R. G. (2000) *European journal of human genetics: EJHG* 8, 87-94.
11. Born, T. L., Smith, D. E., Garka, K. E., Renshaw, B. R., Bertles, J. S. & Sims, J. E. (2000) *The Journal of biological chemistry* 275, 29946-54.
12. Carrie, A., Jun, L., Bienvenu, T., Vinet, M. C., McDonell, N., Couvert, P., Zemni, R., Cardona, A., Van Buggenhout, G., Frints, S., Hamel, B., Moraine, C., Ropers, H. H., Strom, T., Howell, G. R., Whittaker, A., Ross, M. T., Kahn, A., Fryns, J. P., Beldjord, C., Marynen, P. & Chelly, J. (1999) *Nature genetics* 23, 25-31.
13. Khan, J. A., Brint, E. K., O'Neill, L. A. & Tong, L. (2004) *The Journal of biological chemistry* 279, 31664-70.
14. Pavlowsky, A., Zanchi, A., Pallotto, M., Giustetto, M., Chelly, J., Sala, C. & Billuart, P. (2010) *Commun Integr Biol* 3, 245-7.
15. Arthur, J. S. & Ley, S. C. (2013) *Nat Rev Immunol* 13, 679-92.
16. Ley, S., Weigert, A., Heriche, J. K., Mille-Baker, B., Janssen, R. A. & Brune, B. (2013) *Immunobiology* 218, 40-51.
17. Lin, H., Ho, A. S., Haley-Vicente, D., Zhang, J., Bernal-Fussell, J., Pace, A. M., Hansen, D., Schweighofer, K., Mize, N. K. & Ford, J. E. (2001) *The Journal of biological chemistry* 276, 20597-602.

18. Bensen, J. T., Dawson, P. A., Mychaleckyj, J. C. & Bowden, D. W. (2001) *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 21, 899-904.
19. van de Veerdonk, F. L., Stoeckman, A. K., Wu, G., Boeckermann, A. N., Azam, T., Netea, M. G., Joosten, L.A., van der Meer, J. W., Hao, R., Kalabokis, V. & Dinarello, C. A. (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3001-5.
20. Jung, M. Y., Kang, S. W., Kim, S. K., Kim, H. J., Yun, D. H., Yim, S. V., Hong, S. J. & Chung, J. H. (2010) *Scandinavian journal of rheumatology* 39, 190-6.
21. Guo, Z. S., Li, C., Lin, Z. M., Huang, J. X., Wei, Q. J., Wang, X. W., Xie, Y. Y., Liao, Z. T., Chao, S. Y. & Gu, J.R. (2010) *International journal of immunogenetics* 37, 33-7.
22. Chou, C. T., Timms, A. E., Wei, J. C., Tsai, W. C., Wordsworth, B. P. & Brown, M. A. (2006) *Annals of the rheumatic diseases* 65, 1106-9.
23. Monnet, D., Kadi, A., Izac, B., Lebrun, N., Letourneur, F., Zinovieva, E., Said-Nahal, R., Chiocchia, G. & Breban, M. (2012) *Annals of the rheumatic diseases* 71, 885-90.
24. Rahman, P., Sun, S., Peddle, L., Snelgrove, T., Melay, W., Greenwood, C. & Gladman, D. (2006) *Arthritis and rheumatism* 54, 2321-5.
25. Dehghan, A., et al. (2011) *Circulation* 123, 731-8.
26. Zitvogel, L., Kepp, O. & Kroemer, G. (2010) *Cell* 140, 798-804.
27. Ley, S., Weigert, A., Weichand, B., Henke, N., Mille-Baker, B., Janssen, R. A. & Brune, B. (2013) *Oncogene* 32, 631-40.
28. Weigert, A., Tzieply, N., von Knethen, A., Johann, A. M., Schmidt, H., Geisslinger, G. & Brune, B. (2007) *Mol Biol Cell* 18, 3810-9.
29. Xiao, W., Hodge, D. R., Wang, L., Yang, X., Zhang, X. & Farrar, W. L. (2004) *Prostate* 61, 354-70.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína IL-38 truncada aislada, o una variante funcional de la misma, en la que dicha proteína IL-38 truncada o dicha variante funcional se trunca en el extremo terminal N en comparación con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y consiste en una secuencia de aminoácido que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, y en la que dicho truncamiento comprende al menos 10 aminoácidos adyacentes entre las posiciones 1 a 30 de la SEQ ID NO: 1.
- 10 2. La proteína IL38 truncada aislada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha proteína IL-38 truncada tiene 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos truncados en su extremo terminal N en comparación con la proteína mostrada en la SEQ ID NO: 1.
3. Un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína IL-38 truncada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. Un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. El vector de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la secuencia expresable está operativamente unida a un promotor.
6. Una célula recombinante, que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, o un vector de acuerdo con la reivindicación 4 o 5.
- 20 7. Una composición farmacéutica que comprende una proteína IL-38 truncada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, o un vector de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, o una célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, para uso en medicina, preferiblemente para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inmune o inflamatoria.
8. Un procedimiento in vitro para modular la respuesta inmunitaria de una célula, comprendiendo el procedimiento poner en contacto dicha célula con una proteína IL-38 truncada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, o expresar en dicha célula un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3.
- 25 9. El procedimiento in vitro de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la modulación de la respuesta inmunitaria es una inhibición de la señalización de JNK, en particular la inhibición de la liberación de IL-6 y la generación de TH17.
10. Un procedimiento in vitro para seleccionar moduladores de la actividad de la IL-38 truncada, que comprende las etapas de
- 30 a. Proporcionar una célula,
- b. Poner en contacto dicha célula con un patrón molecular asociado a microbios (MAMP), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o sobrenadantes de células apoptóticas (ACM),
- c. Poner en contacto adicionalmente dicha célula con una proteína IL-38 truncada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 y un modulador candidato,
- d. Determinar la activación de JNK en dicha célula,
- 35 en el que un aumento de la activación de JNK en dicha célula en comparación con una célula de control o valor de referencia indica que el modulador candidato es un antagonista de IL-38 truncada, y una disminución de la activación de JNK en comparación con una célula de control o referencia indica que el modulador candidato es un agonista de IL-38 truncada.
- 40 11. El procedimiento in vitro de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha célula expresa en la superficie celular un receptor de IL-38 truncada, por ejemplo, expresando ectópicamente IL-1RAPL1 en dicha célula.
12. El procedimiento in vitro de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que dicha activación de JNK se determina por medio de un constructo informador de AP-1.

Figura 1:

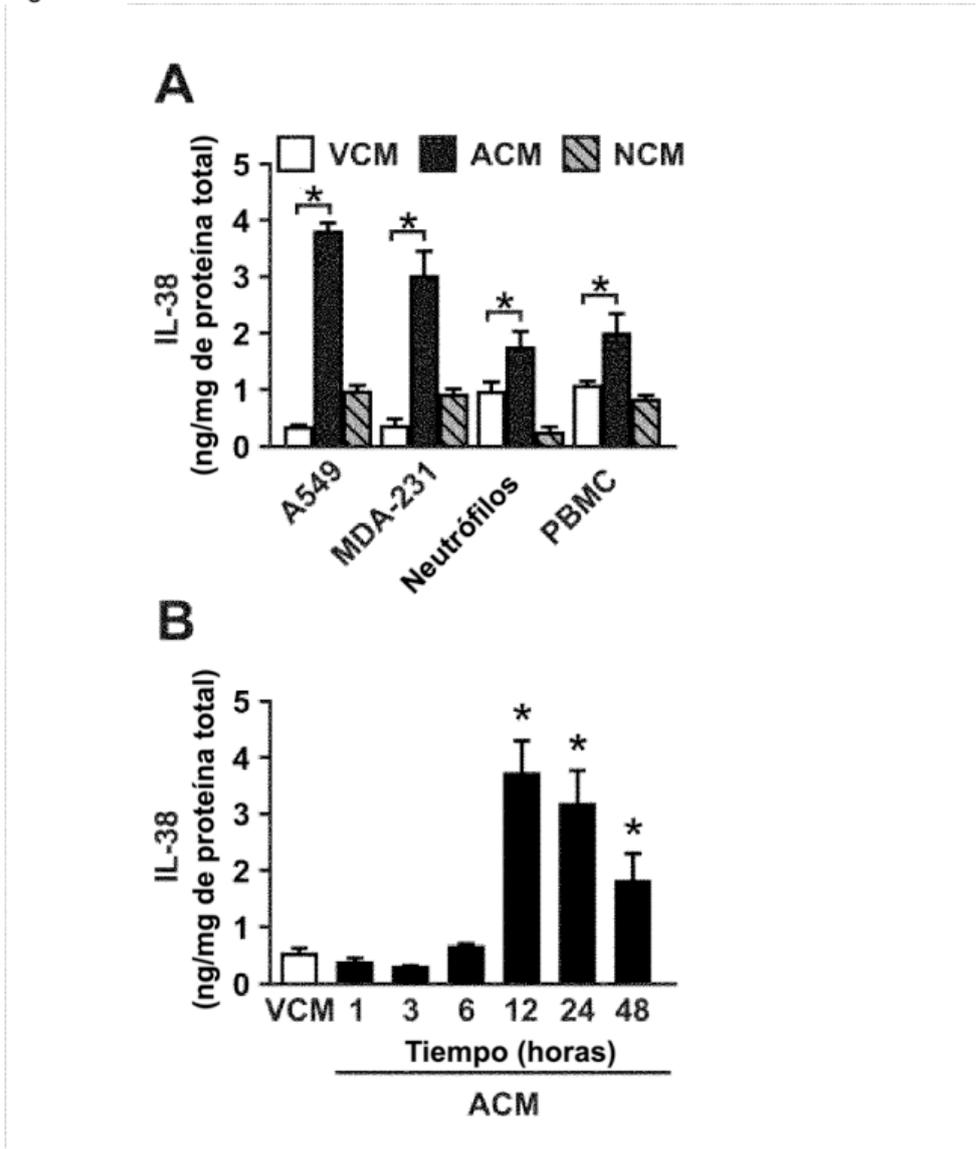


Figura 2:

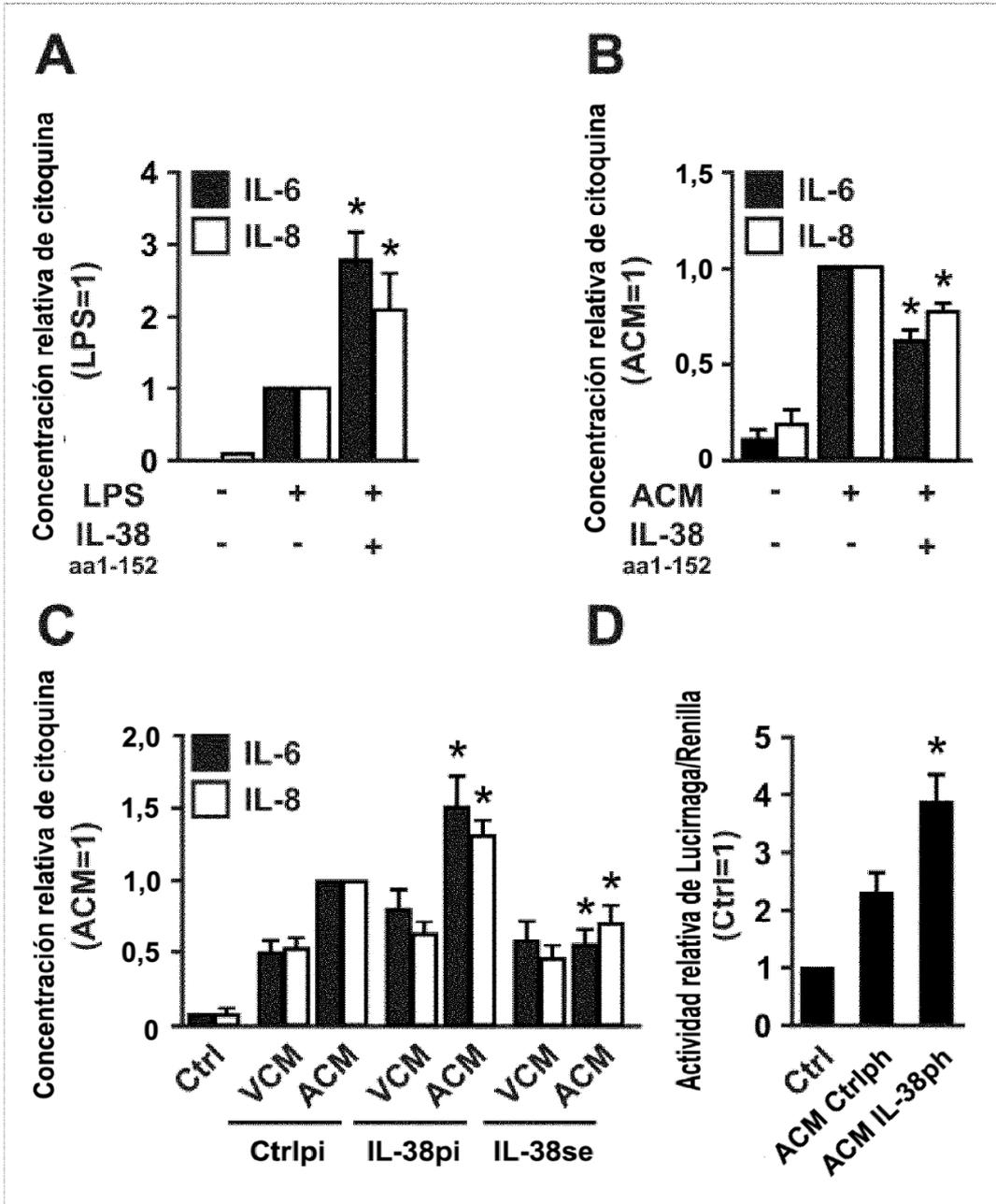


Figura 3:

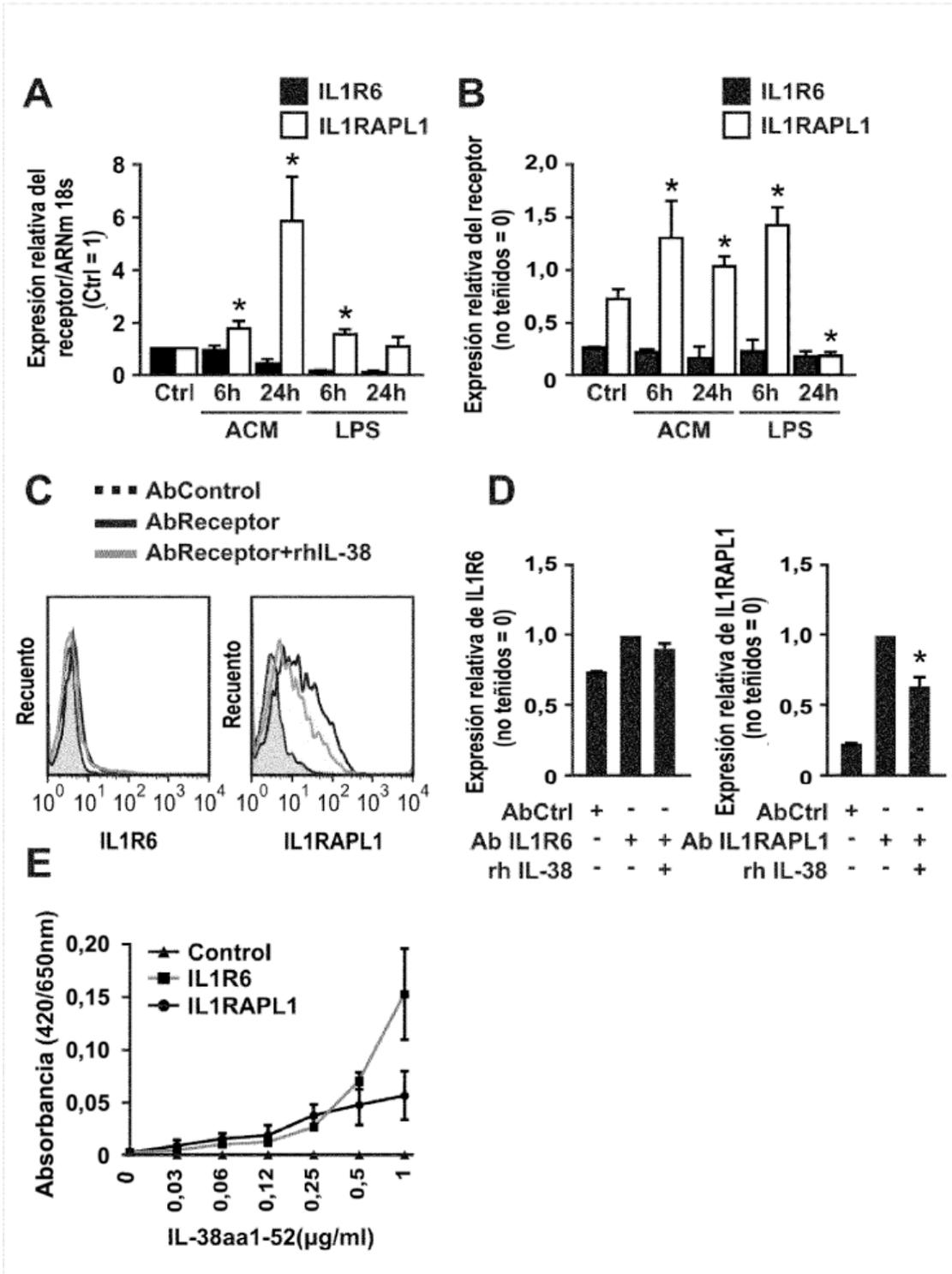


Figura 4:

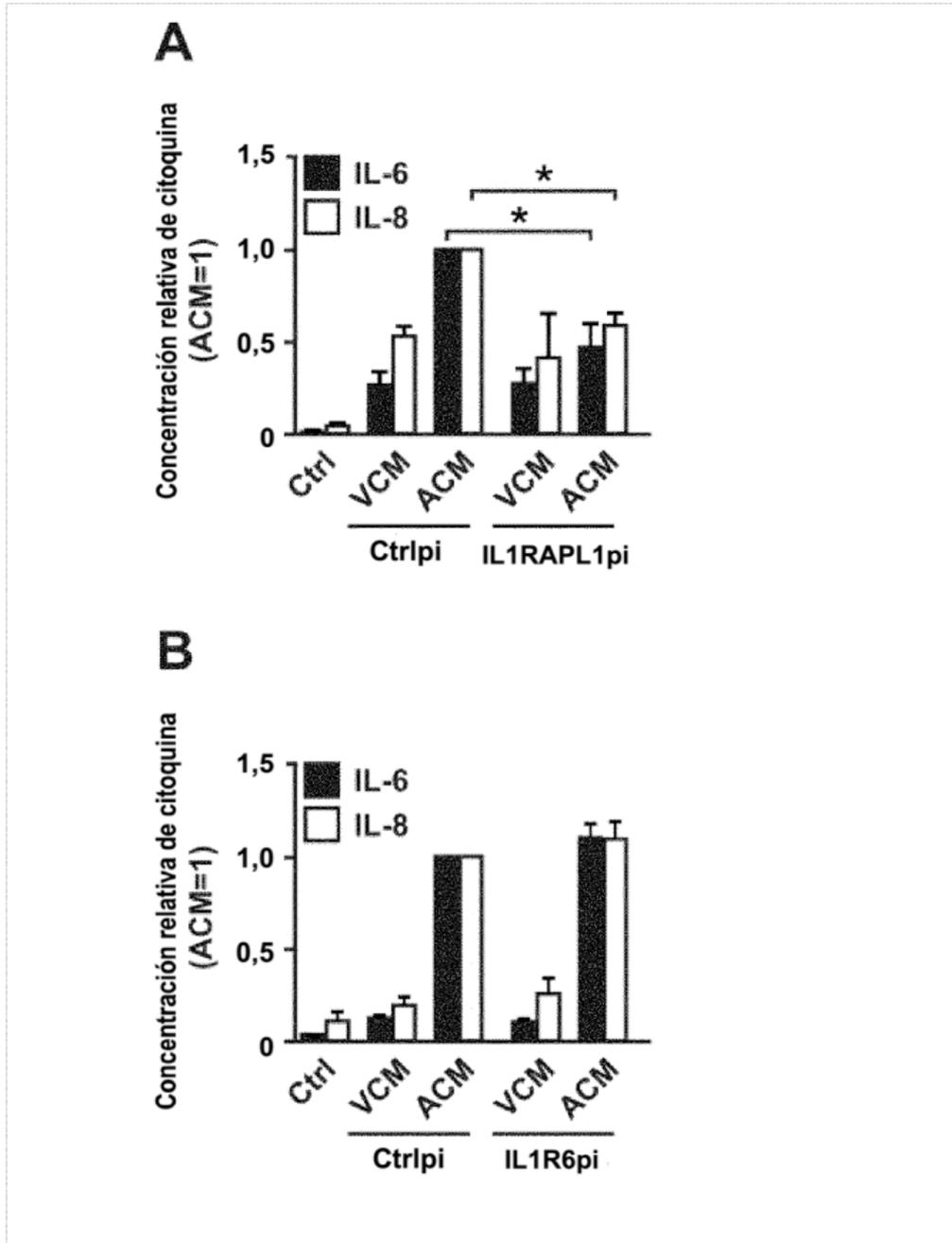


Figura 5:

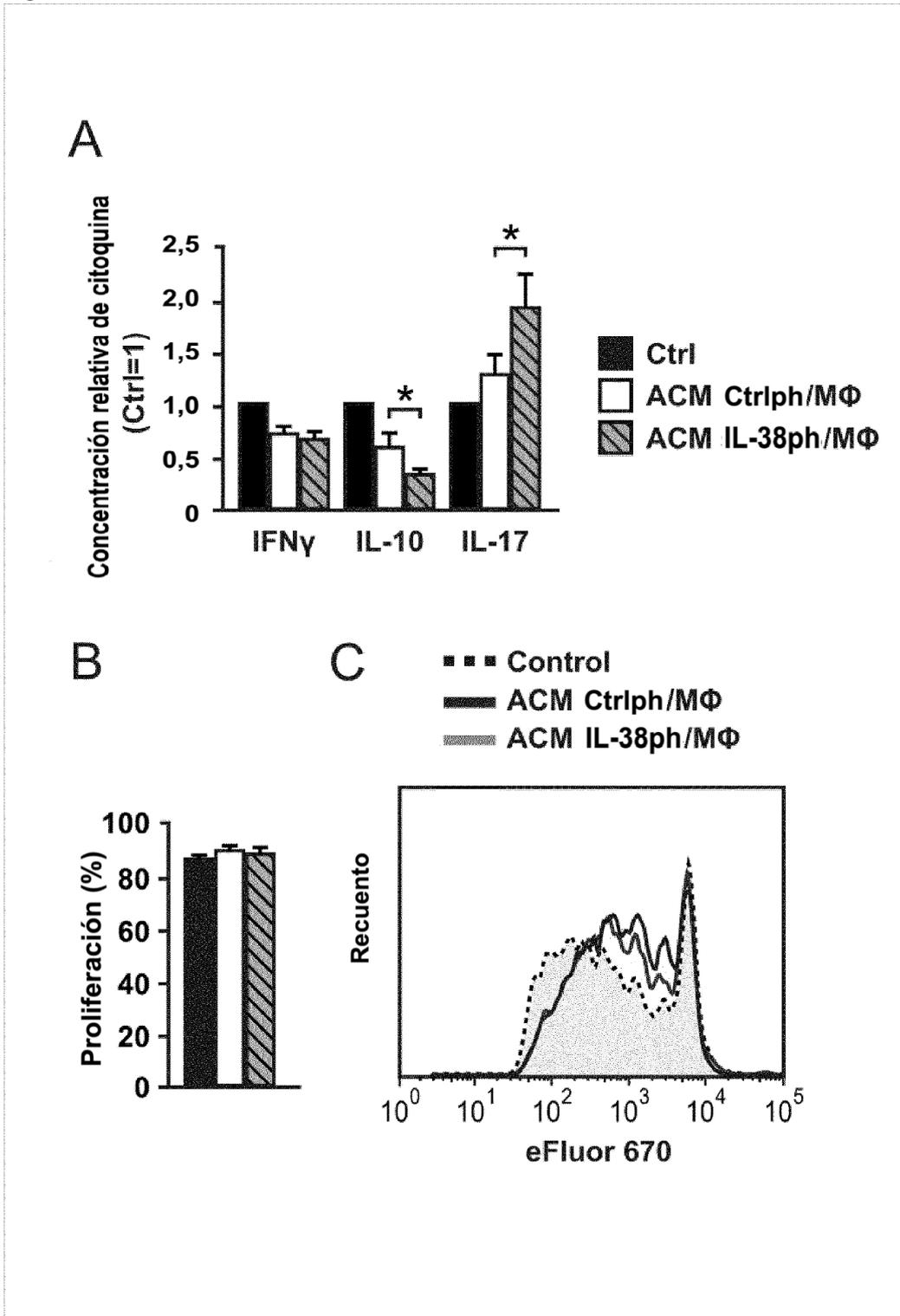


Figura 6:

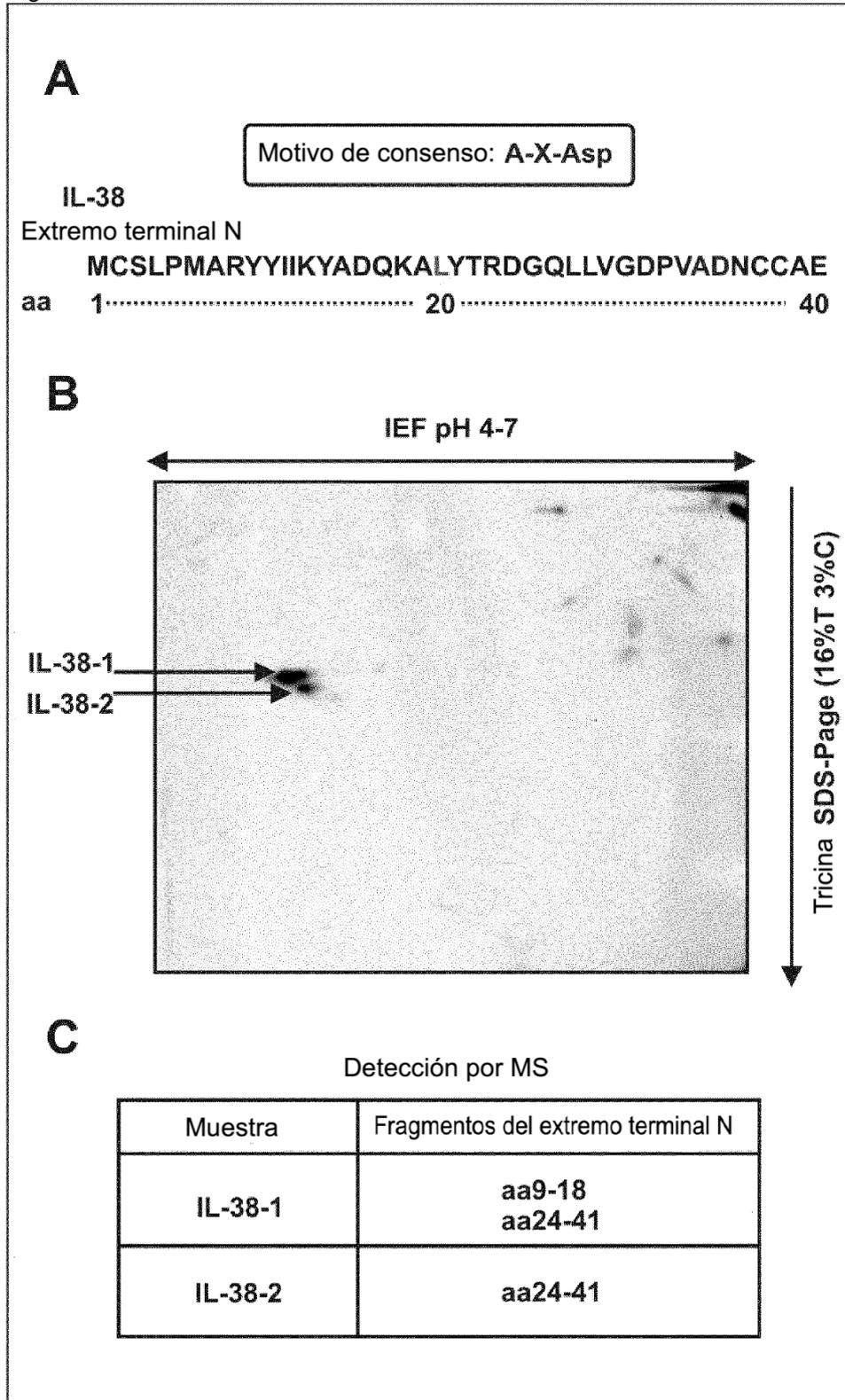


Figura 7:

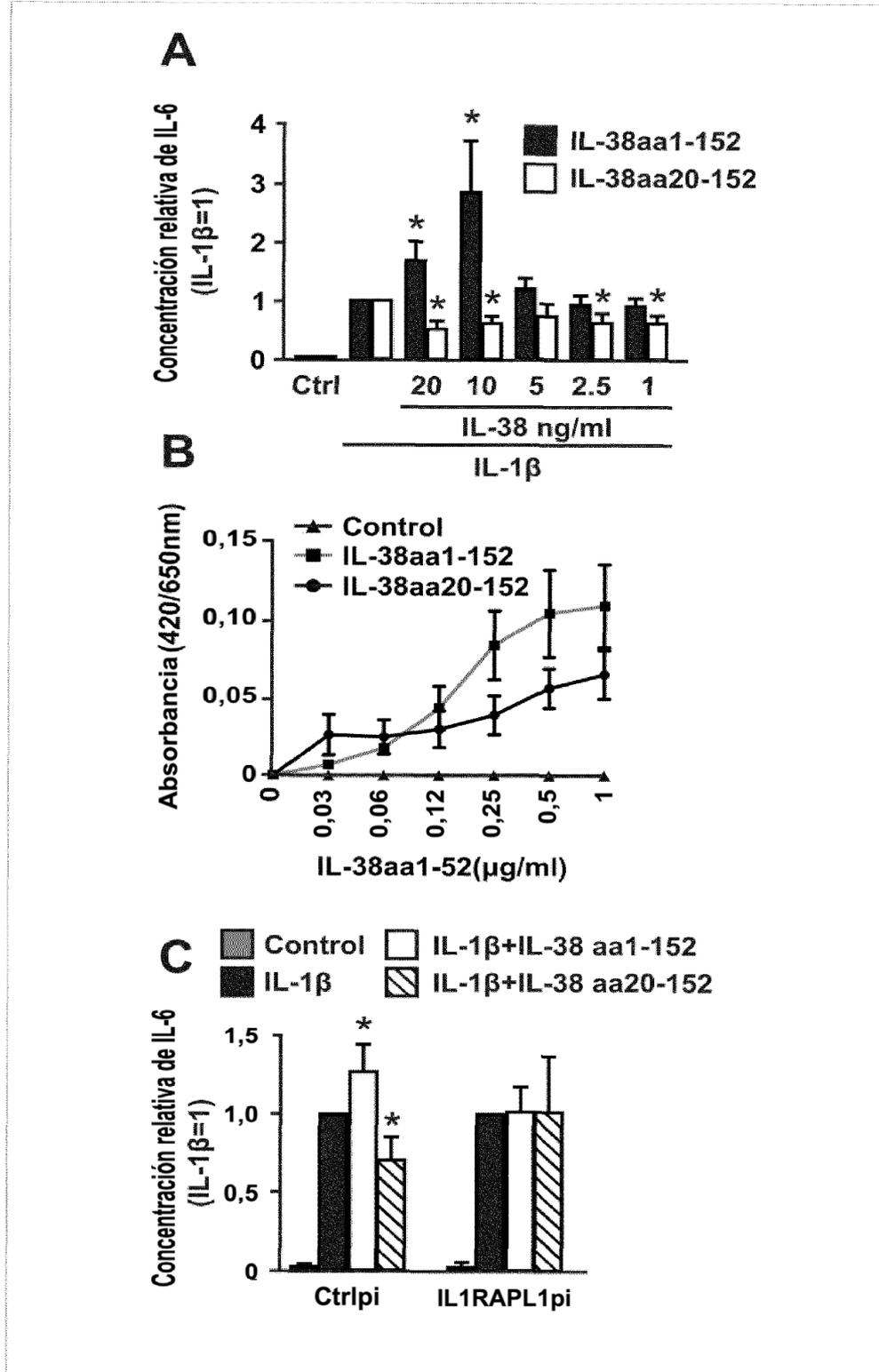


Figura 8:

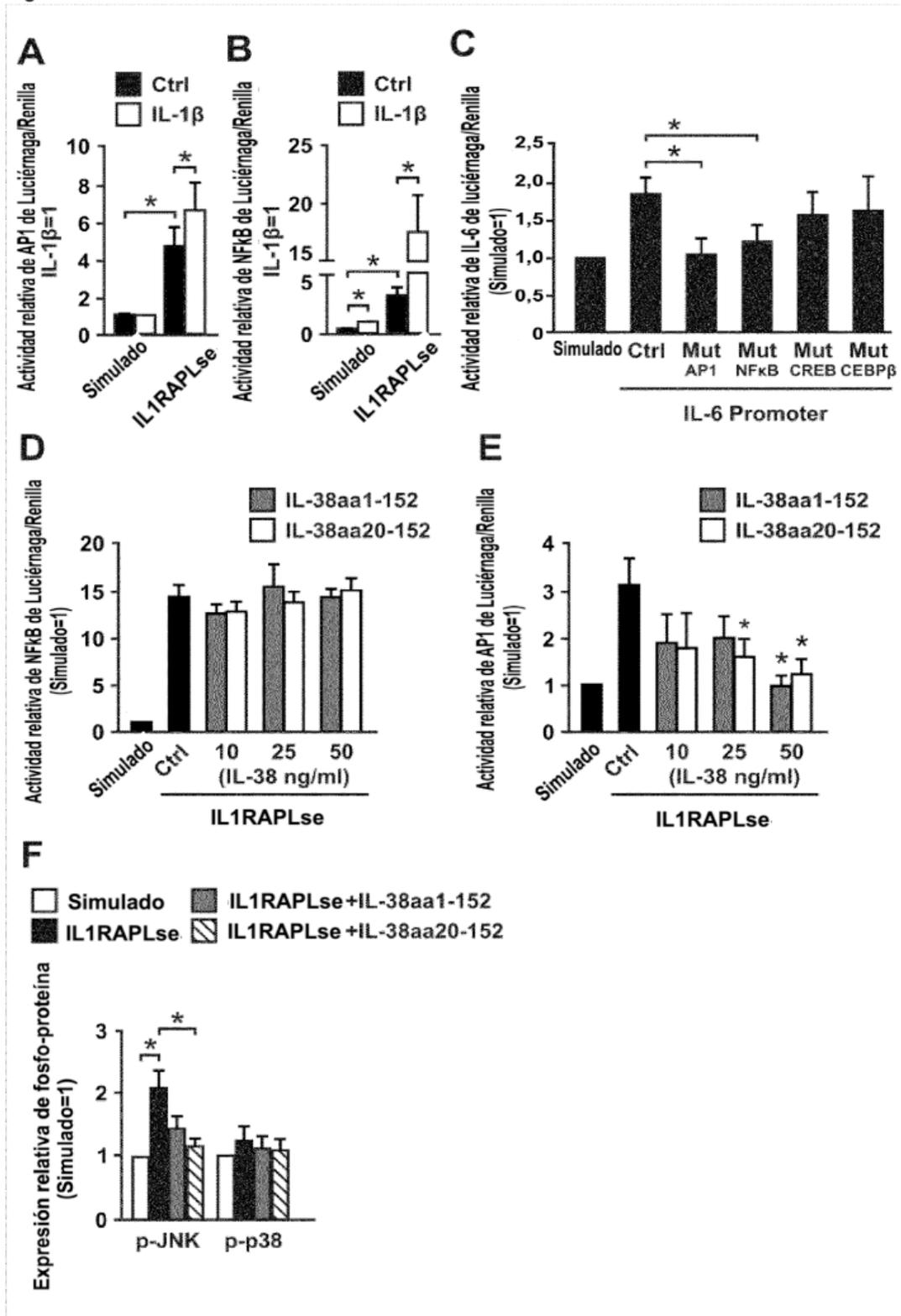


Figura 9:

