

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/062228 A2

(43) Fecha de publicación internacional
18 de mayo de 2012 (18.05.2012)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/435 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2011/000007
- (22) Fecha de presentación internacional:
10 de noviembre de 2011 (10.11.2011)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P/2010/216
12 de noviembre de 2010 (12.11.2010) CU
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR** [CU/CU]; Calle 216 Esq. a 15, Atabey, Playa., La Habana 11600 (CU).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **LEÓN MONZÓN, Kalet** [CU/CU]; Calle 31 e/ 320 y 322 # 32009, Fraga. La Lisa., La Habana 17100 (CU). **CARMENATE PORTILLA, Tania** [CU/CU]; Calle Churruca e/ Daoiz y Santa Teresa # 387, Cerro., La Habana 12000 (CU). **PÉREZ RODRÍGUEZ, Saumel** [CU/CU]; Calle 146A e/ 241 y 243 # 24122 (altos). Bauta., Artemisa. 32400 (CU). **ENAMORADO ESCALONA, Neris, Michel** [CU/CU]; Calle 45 # 19412 Apto 2 e/e 194 y 196 Versalles, La Lisa, La Habana 17100 (CU). **LAGE DAVILA, Agustín, Bienvenido** [CU/CU]; Kohly No. 51 entre 28 y 30, Vedado, Plaza., La Habana 10400 (CU).
- (74) Mandatario: **LOPEZ MATILLA, Lien**; Departamento de Patentes, Calle 216 Esq. a 15, Atabey. Playa, La Habana 11600 (CU).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
 - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: POLYPEPTIDES DERIVED FROM IL-2 HAVING AGONIST ACTIVITY, FOR THE THERAPY OF CANCER AND CHRONIC INFECTIONS

(54) Título : POLIPÉPTIDOS DERIVADOS DE LA IL-2 CON ACTIVIDAD AGONISTA PARA LA TERAPIA DEL CÁNCER E INFECCIONES CRÓNICAS.

(57) Abstract: The invention relates to polypeptides that have the same primary sequence as human IL-2, except that some amino acids have been mutated. The mutations introduced substantially reduce the capacity of these polypeptides for the in vitro and in vivo stimulation of regulatory T cells (T CD4+CD25+FoxP3+) and increase the efficacy of said polypeptides in the therapy of murine transplantable tumours. The invention also relates to the therapeutic uses of these variants, either alone or combined with vaccines, for the therapy of diseases, such as cancer or infections in which the activity of the regulatory T cells (Tregs) is relevant. The invention further relates to pharmaceutical compositions comprising the aforementioned polypeptides as an active principle. In addition, the invention relates to the therapeutic use of said polypeptides and pharmaceutical compositions, making use of their ability to modulate the immune system in relation to pathologies such as cancer and chronic infectious diseases.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a polipéptidos que comparten secuencia primaria con la IL-2 humana, excepto porque varios aminoácidos han sido mutados. Las mutaciones introducidas reducen sustancialmente la capacidad de estos polipéptidos para estimular in vitro e in vivo a las células T reguladoras (T CD4+CD25+FoxP3+) y le confieren una mayor eficacia en la terapia de tumores trasplantables murinos. Además incluye, las aplicaciones terapéuticas de estas variantes, solas o en combinación con vacunas, para la terapia de enfermedades como el cáncer o infecciones donde la actividad de las células T reguladoras (Tregs) es relevante. En otro aspecto la presente invención se relaciona con las composiciones farmacéuticas que comprenden como principio activo los polipéptidos divulgados. Por último, la presente invención se relaciona con el uso terapéutico de los polipéptidos y composiciones farmacéuticas divulgados dado su efecto modulador del sistema inmune sobre patologías como cáncer y enfermedades infecciosas crónicas.



WO 2012/062228 A2

POLIPEPTIDOS DERIVADOS DE LA IL-2 CON ACTIVIDAD AGONISTA PARA LA TERAPIA DEL CÁNCER E INFECCIONES CRÓNICAS.

Campo de la Invención.

- 5 La presente invención se relaciona con la inmunología. Particularmente se relaciona con la aplicación terapéutica de la modulación del sistema inmune mediante análogos de moléculas naturales que tienen acción agonista de la molécula original, y sin embargo de manera sorprendente demostraron una eficacia terapéutica superior.

10 Antecedentes de la Invención:

- La interleucina 2 (IL-2) fue el primer factor de crecimiento descrito para las células T. Desde su descubrimiento se observó su capacidad de promover la proliferación y la supervivencia de las células T *in vitro* (Smith, K.A. (1988) *Science*. 240, 1169-76), así como su capacidad de potenciar la respuesta inmune T en el contexto de infecciones virales (Blattman, J.N., *et al.* (2003) *Nat Med*. 9, 540-7) o vacunas (Fishman, M., *et al.* (2008) *J Immunother*. 31, 72-80; Kudo-Saito, C., *et al.* (2007) *Cancer Immunol Immunother*. 56, 1897-910; Lin, C.T., *et al.* (2007) *Immunol Lett*. 114, 86-93). Sin embargo, este papel clásico de la IL-2 como promotor de la respuesta inmune T ha sido cuestionado recientemente, por múltiples datos experimentales (Almeida, A.R., *et al.* (2002) *J Immunol*. 169, 4850-60; de la Rosa, M., *et al.* (2004) *Eur J Immunol*. 34, 2480-8; Malek, T.R., *et al.* (2004) *Nat Rev Immunol*. 4, 665-74) que muestran a esta citocina como un factor de crecimiento homeostático para las células T reguladoras naturales T CD4+CD25+ FoxP3+ (Tregs).

- La interleucina 2 ha sido además propuesta como un actor relevante en el mecanismo por el cual las células T reguladoras suprimen la actividad y expansión de otras células efectoras como las T CD4 auxiliaadoras, las T CD8 citotóxicas y las células asesinas naturales NK. En particular ha sido propuesto recientemente que las células T reguladoras suprimen a otras células T, induciendo la disminución local de los niveles de IL-2 (Pandiyani, P., *et al.* (2007) *Nat Immunol*. 8, 1353-62). Este efecto supresor se sustenta: a) En su capacidad de inhibir directamente la producción de nueva IL-2 por las células T efectoras que suprime (Almeida, A.R., *et al.* (2002) *J Immunol*. 169, 4850-60; Takahashi, T., *et al.* (1998) *Int Immunol*. 10, 1969-80; Thornton, A.M., *et al.* (1998) *J Exp Med*. 188, 287-96; Wolf, M., *et al.* (2001) *Eur J Immunol*. 31, 1637-45); b) La capacidad de secuestrar, internalizar y degradar de forma rápida la IL-2 presente en su microambiente (Pandiyani, P., *et al.* (2007) *Nat Immunol*. 8, 1353-62); y c) Su capacidad de sobre-expresar la cadena alfa del receptor de IL-2 (Kuniyasu, Y., *et al.*

(2000) *Int Immunol.* 12, 1145-55), lo que le permite usar más eficientemente la IL-2 cuando hay bajas concentraciones de la misma.

Resumiendo, la IL-2 es una citosina con propiedades altamente pleiotrópicas, siendo muy relevante en la actividad biológica de diferentes poblaciones celulares. Esta propiedad hace de la IL-2 un nodo importante en la regulación de la respuesta inmune, convirtiéndola en un blanco atractivo y complejo para terapias de inmuno modulación.

La IL-2 ha sido utilizada por varios años en la terapia del cáncer. En particular su uso en altas dosis es una terapia aprobada en varios países para el tratamiento del melanoma y carcinoma renal metastásico. Sin embargo, el uso directo de la IL-2 en pacientes está severamente limitado por los efectos tóxicos y la baja eficacia de la misma. Tanto es así que apenas el 20% de los pacientes elegibles reciben la terapia y más aún solo el 17% de los tratados muestra respuesta objetiva relevante. Una explicación probable para este dramático fallo en la clínica es que la terapia con IL-2 nativa estimula también poblaciones de células T reguladoras (Ahmadzadeh, M., *et al.* (2006) *Blood.* 107, 2409-14) que actúan en contra de la inmuno-estimulación perseguida con la misma. Numerosas evidencias preclínicas apoyan hoy esta idea. En particular experimentos en modelos murinos muestran que la actividad primaria de la IL-2 inyectada in vivo es la expansión homeostática de las células T reguladoras naturales.

Varias estrategias se han desarrollado con el objetivo de mitigar los efectos tóxicos de la terapia con IL-2. Algunas de estas estrategias se basan en el empleo de variantes mutadas de IL-2, diseñadas para aumentar la capacidad de esta molécula de señalar mayormente por el receptor de alta afinidad (cadenas alfa, beta y gamma) y no por el de afinidad intermedia (cadenas beta y gamma). La idea básica es promover la señalización en células T versus la señalización en células NK que son las células que se consideran responsables por los efectos tóxicos observados. En esta línea de trabajo se encuentran las invenciones siguientes: U.S. Pat. 7,186,804, U.S. Pat. 7,105,653, U.S. Pat. 6,955,807, U.S. Pat. No. 5,229,109, U.S. Patent application 20050142106. Es importante notar en cualquier caso que ninguna de estas invenciones se relaciona con muteínas de la IL-2 que posean mayor eficacia terapéutica que la IL-2 nativa in vivo, en base a su capacidad disminuida para estimular a las células T reguladoras naturales.

Otras variantes mutadas de la IL-2 han sido creadas con el objetivo de incrementar su actividad farmacológica. Por ejemplo mejorando su plegamiento o incrementando su tiempo de vida en sangre. Entre otras las siguientes invenciones van en esta línea de trabajo: U.S. Pat. No. 4,959,314, U.S. Pat. No. 5,116,943, U.S. Pat. No. 4,853,332.

Nuevamente ninguna de estas muteínas posee una capacidad disminuida para activar las células T reguladoras ni muestra una mayor eficacia terapéutica.

Finalmente, se debe referir que existen en la literatura numerosas propuestas de agentes terapéuticos (Kreitman, R.J. (2009) *Curr Pharm Des.* 15, 2652-64; Litzinger, M.T., Fernando, R., Curiel, T.J., Grosenbach, D.W., Schlom, J. and Palena, C. (2007) *Blood.* 110, 3192-201; Morse, M.A., Hobeika, A.C., Osada, T., Serra, D., Niedzwiecki, D., Lyerly, H.K. and Clay, T.M. (2008) *Blood.* 112, 610-8; Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T. and Nakayama, E. (1999) *Cancer Res.* 59, 3128-33; Quezada, S.A., Peggs, K.S., Curran, M.A. and Allison, J.P. (2006) *J Clin Invest.* 116, 1935-45) que proponen modular o reducir la actividad de las células T reguladoras *in vivo*. Estos agentes terapéuticos han sido probados en modelos animales o incluso en pacientes para la terapia directa de cáncer o para potenciar el efecto de vacunas. También hay algunos reportes que proponen modular la actividad de la IL-2, en particular con anticuerpos monoclonales (Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M.P., Surh, C.D. and Sprent, J. (2006) *Science.* 311, 1924-1927; Boyman, O., *et al.* (2006) *Expert Opin Biol Ther.* 6, 1323-31; Kamimura, D., *et al.* (2006) *J Immunol.* 177, 306-14; Murakami, M., Sakamoto, A., Bender, J., Kappler, J. and Marrack, P. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA.* 99, 8832-7; Tomala, J., Chmelova, H., Mrkvan, T., Rihova, B. and Kovar, M. (2009) *J Immunol.* 183, 4904-4912), para promover mejores o más efectivas respuestas inmunes. Sin embargo, para nuestro conocimiento no existe ningún reporte en la literatura, basado en variantes mutadas de la IL-2, que muestre la posibilidad de obtener una mayor eficacia terapéutica en base a su capacidad disminuida para estimular a las células T reguladores naturales.

25 **Breve Descripción de la Invención**

La presente invención se relaciona con la obtención de variantes mutadas de la IL-2, que muestran una mayor eficacia terapéutica que la IL-2 nativa en modelos de tumores murinos transplantables. Estas muteínas se caracterizan por ser agonistas parciales de la actividad de la IL-2 y se seleccionan por su capacidad especialmente baja de estimular a las células T reguladores naturales (T CD4+CD25+FoxP3+) *in vitro* y/o *in vivo*. La eficacia terapéutica de estas muteínas *in vivo*, propone una solución práctica para mejorar las terapias con IL-2 en tumores malignos. En particular, estas muteínas permitirán superar las limitaciones observadas en la terapia con IL-2 nativa que derivan de su probada capacidad para expandir *in vivo* a las células T reguladoras naturales.

La presente invención se refiere a polipéptidos que comparten secuencia primaria con la IL-2 humana, excepto porque varios aminoácidos han sido mutados. Las mutaciones introducidas reducen sustancialmente la capacidad de estos polipéptidos para estimular in vitro e in vivo a las células T reguladoras (T CD4+CD25+FoxP3+) y le confieren una mayor eficacia en la terapia de tumores trasplantables murinos. La presente invención incluye además las aplicaciones terapéuticas de estas variantes mutadas, solas o en combinación con vacunas, para la terapia de enfermedades como el cáncer o infecciones donde la actividad de las células T reguladoras (Tregs) es relevante.

La presente invención permitirá un mejoramiento sustancial de las estrategias actuales de inmunomodulación basadas en la IL-2, tanto en la terapia directa del cáncer, como en su combinación con diferentes vacunas. En particular la sustitución de la IL-2 nativa por las variantes mutadas descritas en esta invención, permitirá evitar la expansión de células T reguladoras que reducen marcadamente los efectos terapéuticos deseados.

15

Descripción Detallada de la Invención.

Obtención de los polipéptidos análogos de la IL-2.

La presente invención se relaciona con polipéptidos de tamaño entre 100 y 500 aminoácidos, preferiblemente de tamaño 140 cuyo peso molecular aparente es de al menos 15 kD. Estos polipéptidos mantienen una alta identidad de secuencia con la IL-2 nativa, más de un 90% de identidad, en una zona de su secuencia, incluyen de 3 a 6 mutaciones respecto a la IL-2 nativa. En dichas posiciones, estos polipéptidos son mutados introduciendo residuos de aminoácidos diferentes a los que existen en la misma posición en la IL-2 nativa. Los residuos que sustituyen a los residuos originales se seleccionan para poseer propiedades fisicoquímicas bien distintas al aminoácido original, cambio de residuo polar por apolar, cargado por no cargado, grande por pequeño, ácido por básico, entre otros.

Los polipéptidos de la presente invención pueden denominarse indistintamente como polipéptidos inmunomoduladores, análogos de la IL-2 o muteínas de la IL-2, entre otros. Estos polipéptidos se diseñan a partir de la estructura 3D del complejo IL-2-receptor (depositada en la base de datos pública PDB), introduciendo mutaciones preferentemente en las posiciones de la IL-2 que corresponden a aminoácidos significativamente expuestos al solvente y que son altamente conservados en las IL-2 de diferentes especies (secuencias obtenidas de la base de datos Swissprot). Los aminoácidos expuestos al solvente del tipo antes mencionados se identifican usando programas bioinformáticos para la visualización de estructuras de proteínas como el

RASMOL, SwissPDBviewer u otros. Las posiciones conservadas en la secuencia de la IL-2 se identifican usando programas bioinformáticos para el alineamiento múltiple de secuencias por ejemplo Fasta, ClusterW u otros.

5 Los polipéptidos de esta invención se pueden obtener por diferentes vías, entre otras, por síntesis de proteínas. También podrían obtenerse por técnicas de ingeniería genética, por ejemplo expresándolos en bacterias tales como, entre otras *E. coli*, en células de mamíferos tales como, entre otras, células NSO. Las mutaciones puntuales en las posiciones específicas podrían obtenerse además por técnicas de mutagénesis dirigida mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

10 Sorprendentemente, los inventores encontraron una ventaja sustancial para estas muteínas con respecto al tradicional uso de la IL-2 nativa. Esta ventaja radica en el aumento de su eficacia en la terapia antitumoral, derivada de su capacidad de evitar la expansión de las células T reguladoras.

15 **Selección de los polipéptidos análogos de la IL-2 por su actividad biológica;**

Los polipéptidos de la presente invención son seleccionados por las siguientes propiedades:

20 1) Acción agonista de la IL-2 nativa. Esta propiedad puede evaluarse directamente en ensayos de proliferación *in-vitro* con líneas celulares dependientes de IL-2 como la CTLL2 o la Kitt225, o con ensayos con mezclas de linfocitos T de ratón y/o humanas. Estas muteínas deben poseer una actividad estimuladora específica que sea de 5 a 50 veces inferior a la de la IL-2 nativa en estos ensayos.

25 2) Pérdida de la capacidad, en relación con la IL-2 nativa, de estimular *in vitro* y/o *in vivo* las poblaciones de células T reguladoras. Esta propiedad puede evaluarse, por ejemplo, estudiando la capacidad de las muteínas de la presente invención en comparación con la IL-2 nativa para inducir directamente la expansión de células T CD4+CD25+, purificadas de ratones vírgenes y estimuladas con un anticuerpo anti-CD3 *in vitro*. También puede evaluarse el efecto de la inyección en ratones por cinco días, intraperitoneal o subcutánea, de estas muteínas o la IL-2 nativa en la expansión o aumento de la tasa de proliferación de poblaciones de células T reguladoras (TCD4+CD25+FoxP3+). La actividad de la IL-2 mutadas sobre las
30 células T reguladoras debe ser al menos 1000 veces menor que la de la IL-2
35 nativa en estos ensayos.

3) Efecto terapéutico incrementado con respecto a la IL2 nativa en modelos animales. Esta propiedad puede evaluarse, por ejemplo, comparando el efecto antitumoral o anti-metastásico de las muteínas y la IL-2 nativa por si solas en modelos de tumores trasplantables (Ej Melanoma B16). También puede evaluarse a través del efecto potenciador de la respuesta celular y/o humoral a una vacuna de interés. Las muteínas deben mostrar una mayor eficacia terapéutica que la IL-2 nativa en dosis que contengan igual masa total de proteínas de la IL-2 y la muteína.

10

La presente invención se relaciona particularmente con las muteínas detalladas en la Tabla 1. Estas muteínas incluyen múltiples sustituciones de aminoácidos que de conjunto les confieren las propiedades antes mencionadas.

15 **Tabla 1:** Muteínas construidas que poseen las tres propiedades básicas descritas en esta patente. Las mutaciones se refieren según la numeración de la IL-2 humana.

Mutaciones
R38K, F42I, Y45N, E62L, E68V
R38K, F42Q, Y45E, E68V
R38A, F42I, Y45N, E62L, E68V
R38K, F42K, Y45R, E62L, E68V
R38K, F42I, Y45E, E68V
R38A, F42A, Y45A, E62A

La presente invención también comprende modificaciones adicionales de la clase de muteínas de IL-2 antes referida y en especial las descritas en la Tabla 1. Ya sea para aumentar la afinidad de las mismas por componentes específicos del receptor de IL-2, pero sin afectar o incluso mejorando su carácter de agonista que no estimula a las células T reguladoras; o para mejorar su farmacodinámica *in vivo*: aumentar el tiempo de vida o reducir su internalización por las células T. Estas mutaciones adicionales pudieran ser obtenidas por diseño racional con herramientas bioinformáticas, o utilizando bibliotecas moleculares combinatorias de diferente naturaleza (bibliotecas de fagos, bibliotecas de expresión génica en levadura o en bacterias).

20

25

En otro aspecto la presente invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende cualquiera de los polipéptido inmunomoduladores antes descritos, acoplado a una proteína transportadora. La proteína transportadora puedes ser la Albúmina o la región Fc de las inmunoglobulinas humanas.

5

Aplicación terapéutica de los polipéptidos análogos de la IL-2;

Esta invención incluye además las composiciones farmacéuticas que comprenden como principio activo las muteínas de IL-2 y sus análogos, divulgadas por la presente invención, así como sus posibles aplicaciones terapéuticas con el objetivo de
10 potenciar la respuesta inmune natural o inducida por vacunas en enfermedades como el cáncer o infecciones crónicas donde las células T reguladoras sean particularmente relevantes.

Para su uso terapéutico, el polipéptido de la presente invención deberá ser administrado a un sujeto portador de la enfermedad de forma independiente o
15 combinado con otros polipéptidos o con otras sustancias que faciliten o potencien su acción terapéutica. La ruta de administración podrá ser cualquiera de las rutas de administración descritas por el arte previo para la administración parenteral de fármacos. Podrá administrarse preferiblemente por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intratumoral.

20 Los polipéptidos descritos en la presente invención también pueden administrarse formando parte de una composición farmacéutica útil en la terapia de cáncer y de enfermedades infecciosas crónicas o para potenciar la respuesta celular y/o humoral a vacunas en sustitución de la IL2 nativa. Los polipéptidos de la presente invención pueden ser usados en combinación con vacunas terapéuticas para cáncer o con
25 vacunas profilácticas en enfermedad infecciosa donde las células T reguladoras son relevantes.

Para obtener el efecto terapéutico deseado, el polipéptido de la presente invención deberá ser administrado a dosis suficientemente altas como para garantizar una concentración del mismo en el nodo linfático o sitio periférico relevante para la
30 enfermedad en estudio, que esté en el rango de concentraciones para el cual la muteína muestra un efecto immune-estimulador. La dosis en cuestión deberá por tanto ser ajustada para el tipo de enfermedad y via de administración en estudio. Por ejemplo en el caso de terapia de tumores, la dosis debe ajustarse para lograr concentraciones de la muteína en el interior del tumor y/o en el nodo linfático loco-
35 regional que garanticen la estimulación de una respuesta inmune antitumoral. Los rangos de dosis a explorar pueden variar desde cientos de microgramos hasta cientos

de miligramos por dosis. Para aquellas aplicaciones en que la muteína sustituya una terapia tradicional con IL-2 nativa, la dosis de muteína a utilizar debe ser menor o equivalente en actividad (determinada usando ensayo con línea CTLL2) a la usada tradicionalmente para la IL-2 nativa.

- 5 El número de administraciones a aplicar deberá también ajustarse a la biodistribución de la muteína en cuestión. En general se deberá lograr sostener las concentraciones efectivas antes referidas por un tiempo que va desde 2 días hasta 30 días consecutivos. Note por ejemplo que si la muteína es acoplada a una proteína transportadora, la frecuencia de administraciones de la misma deberá ser ajustada en
- 10 consecuencia. Para aplicaciones donde se sustituya a la IL-2 nativa, el esquema de administración de la muteína podrá ser similar al aplicado en la terapia tradicional. Debe entenderse por acción terapéutica la remisión total o parcial de los síntomas de la enfermedad. En cáncer, la disminución del volumen tumoral o el incremento del tiempo de recaída será, entre otros, el criterio de remisión de la enfermedad.
- 15 Los polipéptidos de la invención son particularmente útiles en la terapia de tumores tales como entre otros melanomas y tumores renales.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Obtención de la muteína. a) Expresión de la muteína en la cepa de *E. coli* BL21DE3 evaluada por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), carril1: Proteínas totales de la cepa BL21DE3 control negativo de la expresión, carriles 2 y 3: Dos ejemplos de los niveles de expresión alcanzados en esta cepa, la flecha señala la banda correspondiente a la muteína. b) Cromatograma de fase reversa que muestra el paso fundamental de purificación final de la proteína, la flecha señala el

20 pico correspondiente a la proteína de interés. c) Purificación de la muteína evaluada por SDS-PAGE 1: Resultados del proceso de semi-purificación por lavados del precipitado celular, 2: muteína obtenida después de la purificación por fase reversa.

Figura 2. Evaluación del carácter agonista de la muteína de la IL-2. a) Medición por citometría de flujo, de la capacidad de unión de la muteína a la superficie de la línea celular CTLL2. Tanto la IL-2 como la muteína fueron detectadas usando un AcM específico por la secuencia de 6His presente en las proteínas recombinantes. b) El gráfico muestra la capacidad de la muteína de inducir la proliferación de la línea celular CTLL2, dependiente de IL-2, en comparación con la IL-2 nativa. La proliferación fue medida por incorporación de MTT.

35 **Figura 3.** La muteína no induce la proliferación de las células T reguladoras *in vitro*. a) Gráfico de citometría de flujo que muestra la pureza de la población CD3+CD4+CD25+

purificada a partir de los ganglios de un ratón C57BL6. b) Las células Treg fueron estimuladas *in vitro* con un AcM anti CD3 y se les administró IL-2 nativa en concentración de 0,5 ng/mL o muteína en concentración de 32 ng/mL durante 72 horas, el gráfico muestra el No de células vivas recuperadas después de cada

5 tratamiento en comparación con el control donde no se adicionó ninguna citocina. Las concentraciones seleccionadas corresponden, a la concentración a la cual cada molécula induce igual proliferación de la línea CTLL2.

Figura 4. Evaluación del efecto del tratamiento con la muteína sobre la proliferación de las poblaciones de linfocitos. a) Cuantificación de los pesos relativos de los bazo de los ratones tratados con la muteína durante cinco días. Los pesos de los bazo de los

10 ratones tratados fueron estadísticamente superiores a los del grupo control. Se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. b) Medición de la población de linfocitos T CD8+, el gráfico muestra los porcentajes de esta población.

15 **Figura 5.** La muteína es más eficiente que la IL-2 nativa en la disminución de metástasis en el modelo de metástasis experimental de la línea de melanoma MB16F0. a) Fotos representativas de los pulmones correspondientes a cada tratamiento. b) Cuantificación de las metástasis pulmonares en cada grupo.

Figura 6. La administración de la muteína en combinación con la vacuna OVA/VSSP potencia el efecto antitumoral de esta vacuna. Los ratones portadores del tumor EG7 fueron tratados con la vacuna OVA/VSSP sola o en combinación con la muteína. El gráfico muestra el crecimiento tumoral, el grupo tratado con la combinación de la vacuna y la muteína mostró una reducción del tamaño tumoral estadísticamente diferente del grupo control.

25

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Diseño de las muteínas de IL-2

Las muteínas fueron diseñadas computacionalmente, a partir de técnicas bioinformáticas, usando como base la estructura reportada de la IL-2 humana en la

30 base de datos PDB (Protein Data Bank) y las secuencias aminoacídicas de la IL-2 en diversas especies que están disponibles en la base de datos Swissprot. Varias muteínas fueron diseñadas incluyendo de 3 a 6 mutaciones (introduciendo sustituciones no conservativas de aminoácidos) en residuos expuestos al solvente y fuertemente conservados en la evolución. Estas muteínas fueron expresadas en *E.coli*

35 a partir de una construcción genética en el vector pET28a incluyéndoles una secuencia identificadora de 6 histidinas en el amino terminal. Las muteínas fueron

purificadas por fase reversa (Figura 1) obteniéndose con una elevada pureza (>95%). Las muteínas obtenidas fueron seleccionadas a partir de sus propiedades en ensayos experimentales *in vitro* e *in vivo* para mostrar las 3 propiedades básicas descritas en el cuerpo de esta invención. De todas la muteínas construidas en la Tabla 1 se describe un conjunto de mutaciones específicas que tienen la propiedad deseada de ser agonistas de la actividad de la IL-2 sin estimular sensiblemente a las células T reguladoras y mostrando una mayor eficacia terapéutica que la IL-2 nativa en el tratamiento de tumores murinos trasplantables. La Tabla 2 refiere otras de las muteínas construidas pero que no mostraron las propiedades deseadas.

10

Tabla 2: Muteínas construidas que no poseen las propiedades básicas descritas en esta patente. Las mutaciones se refieren según la numeración de la IL-2 humana.

Mutaciones
Q22V, Q126A, I129D, S130G
L18N, Q126Y, S130R
Q13Y, Q126Y, I129D, S130R
L18N, Q22V, T123A, I129D, S130R
R38A, F42A, Q126Y, I129D
Q126Y, I129D, E62L, E68V

15 **Ejemplo 2. Demostración del carácter agonista de las muteínas de IL-2 diseñadas.**

La Figura 2 ejemplifica cómo muteínas de las referidas en las Tabla 1 se unen a componentes del receptor de IL-2 sobre la superficie de la línea celular CTLL2 (Figura.2a). Las muteínas construidas se unen a la células CTLL2, de la cual se conoce posee en su superficie tanto receptores de alta afinidad como de afinidad intermedia para la IL-2. La unión detectada en nuestros ensayos resulta ser similar a lo obtenida con la IL-2 nativa. La Figura 2b ilustra entonces la capacidad de las muteínas dadas en la Tabla 1 de estimular el crecimiento de la línea celular CTLL2 (Figura. 2b). Estas muteínas resultan ser agonistas parciales de la actividad de la IL-2 en este ensayo. La actividad específica de las mismas es entre 5 y 50 veces menor que la de la IL-2 nativa.

25

Ejemplo 3. Efecto de las muteínas de IL-2 sobre las células T reguladoras.

Las muteínas descritas en la Tabla1 muestran una capacidad muy reducida de estimular células T reguladoras *in vitro* (Figura 3). Como se observa en esta Figura si bien la IL-2 nativa es capaz de hacer proliferar significativamente a las células T reguladoras (T CD4+CD25+FoxP3+) al estimularlas con un anticuerpo anti-CD3 pegado al fondo de la placa de cultivo. Las muteínas descritas en la Tabla 1 en concentraciones significativamente superiores en masa a la de la IL-2 nativa no estimulan a las células T reguladoras. Debe acotarse que los resultados antes descritos son validos incluso aumentando la cantidad de muteína a usar de modo que se utilice aquella cantidad capaz de mostrar una actividad equivalente a la IL-2 nativa en el ensayo de proliferación con la línea CTLL2. Las muteínas descritas en la Tabla 1 exhiben típicamente una capacidad de estimular las células T reguladoras al menos 1000 veces menor que la IL-2 nativa.

Ejemplo 4. Caracterización de la actividad inmunoestimuladora *in vivo* de la muteínas diseñadas.

Las muteínas descritas en la Tabla 1 muestran una capacidad inmunoestimuladora aumentada *in vivo*. Las Figuras 4a,b muestran como las muteínas inducen una esplenomegalia mayor a la de la IL2 nativa en ratones naive después del tratamiento por cinco días con dos dosis diarias intraperitoneales de 20 µg de la muteína. Esta estimulación correlaciona con un claro incremento de poblaciones efectoras, como los linfocitos T CD8+. Como observación relevante este tratamiento con muteínas no estimula la expansión de las células T reguladoras (TCD4+CD25+FoxP3+) a diferencia de los observado para la IL2 nativa (Figuras 4c,d).

25

Ejemplo 5. Medición de la eficacia terapéutica de las muteínas en un modelo murino de tumores trasplantables.

Se demostró el incremento en la eficacia terapéutica de las muteínas diseñadas en un modelo murino de tumores trasplantables. Las muteínas descritas en la Tabla1 muestran una eficacia aumentada para el tratamiento de metástasis pulmonares inducidas en un modelo de melanoma murino MB16. La Figura 5 muestra como el tratamiento por 5 días con dos dosis diarias intraperitoneales de 20µg de una de las muteínas de la Tabla 1 muestra un fuerte efecto antimetastásico, que no se observa en los grupos tratados de igual forma y con igual dosis de IL-2 nativa.

35

Ejemplo 6. Medición de la capacidad de las muteínas de potenciar el efecto de una vacuna antitumoral.

Se demostró la capacidad de la muteína diseñada de potenciar el efecto antitumoral de una vacuna. Se utilizó el modelo de tumor primario de la línea EG7, que es una línea tumoral modificada para expresar el antígeno OVA. A los ratones portadores del tumor se les inmunizó con el antígeno OVA adyuvado en VSSP solamente o en combinación con la muteína. La figura 6 muestra que la disminución del crecimiento tumoral fue mayor en el grupo de ratones tratados con la combinación de la vacuna y la muteína que en el grupo tratado con la vacuna solamente.

10

REIVINDICACIONES

1. Un poli-péptido agonista de la IL-2, caracterizado porque tiene hasta un 95 %
5 de homología con la secuencia de la IL-2 nativa y donde dicho polipéptido es al menos 1000 veces menos efectivo para estimular *in vitro* y/o *in vivo* a las células T reguladoras y muestra una mayor eficacia terapéutica *in vivo*.
2. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las mutaciones R38K, F42I, Y45N, E62L, E68V.
- 10 3. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las mutaciones R38K, F42Q, Y45E, E68V.
4. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las mutaciones R38A, F42I, Y45N, E62L, E68V.
5. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las
15 mutaciones R38K, F42k, Y45R, E62L, E68V.
6. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las mutaciones R38K, F42Q, Y45E, E68V.
7. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las mutaciones R38A, F42A, Y45A, E62A.
- 20 8. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido inmunomodulador de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, acoplado a una proteína transportadora.
9. La proteína de fusión de la reivindicación 8 caracterizada porque la proteína transportadora es la Albúmina.
- 25 10. La proteína de fusión reivindicación 8 caracterizada porque la proteína transportadora es la región Fc de las inmunoglobulinas humanas.
11. Una composición farmacéutica útil en la terapia de cáncer y enfermedades infecciosas crónicas, caracterizada porque comprende como principio activo el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7.
- 30 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, caracterizada porque comprende como principio activo uno o varios polipéptidos descritos en las reivindicaciones de la 1 a la 7.
13. Una composición farmacéutica útil en la terapia de cáncer y enfermedades infecciosas crónicas, caracterizada porque comprende como principio activo la
35 proteína de fusión descritas en cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 10.

14. Uso de cualquiera de los polipéptidos de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para el tratamiento directo de tumores malignos en sustitución de la IL-2 nativa.
15. Uso de cualquiera de los polipéptidos de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para potenciar la respuesta celular y/o humoral a vacunas en sustitución de la IL2 nativa.
- 5
16. Uso según reivindicación 15 cuando la vacuna a potenciar es una vacuna terapéutica para cáncer.
17. Uso según reivindicación 15 cuando la vacuna a potenciar es una vacuna para enfermedades infecciosas donde las células T reguladoras son relevantes.
- 10
18. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la manufactura de un medicamento útil en la terapia de enfermedades crónicas.
19. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la manufactura de un medicamento útil en la terapia del cáncer.
20. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la manufactura de un medicamento útil en la terapia de enfermedades infecciosas crónicas.
- 15
21. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 11 para la terapia de enfermedades crónicas.
22. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 11 para la terapia de cáncer.
- 20
23. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 11 para la terapia de enfermedades infecciosas crónicas.
24. Uso de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 10 para la terapia de enfermedades crónicas.
- 25
25. Uso de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 10 para la terapia de cáncer.
26. Uso de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 10 para la terapia de enfermedades crónicas.
27. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la manufactura de un medicamento que modula el sistema inmune.
- 30
28. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 y sus aplicaciones cuando se introducen nuevas mutaciones que incrementan su afinidad de unión a los diferentes componentes del receptor de IL-2.

Figura 1

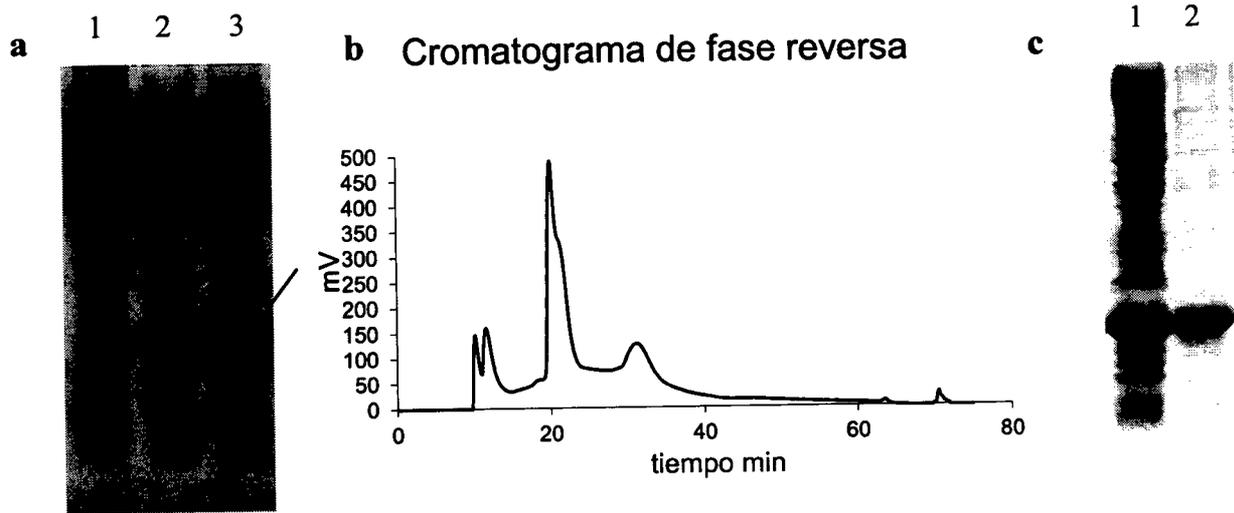
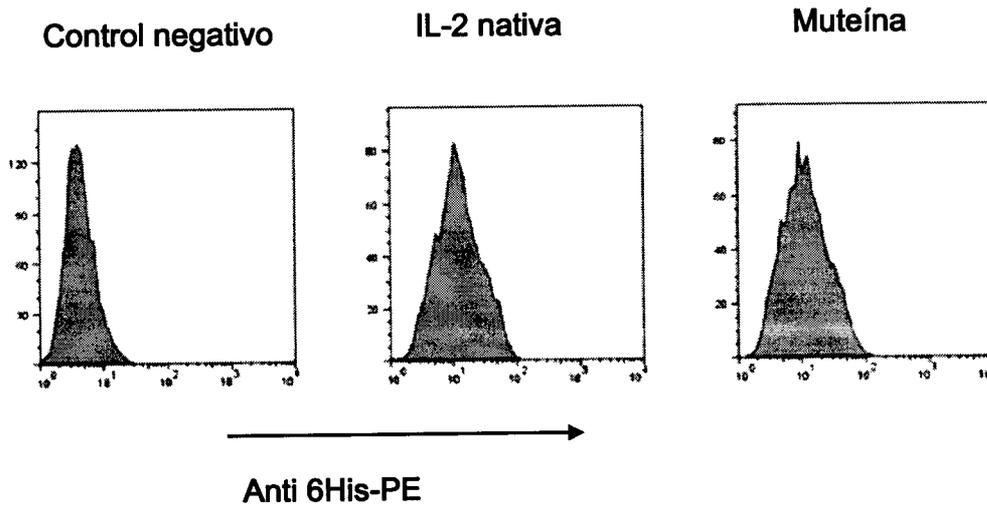


Figura 2

a



b

Proliferación de la línea CTLL2

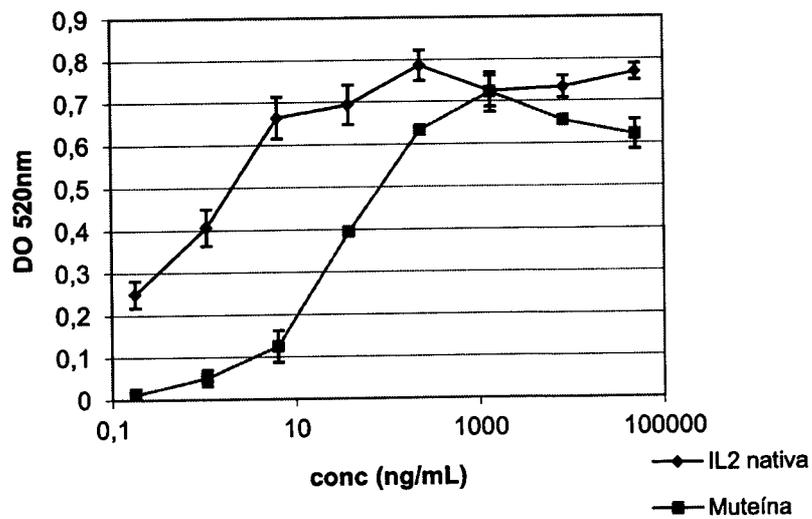
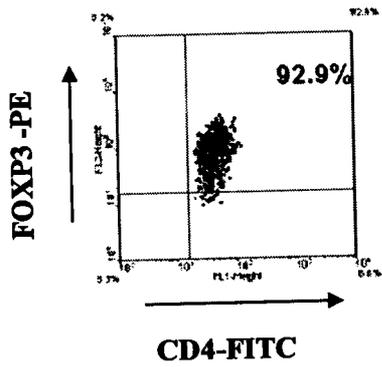


Figura 3

A



B

Proliferación de las células T reguladoras

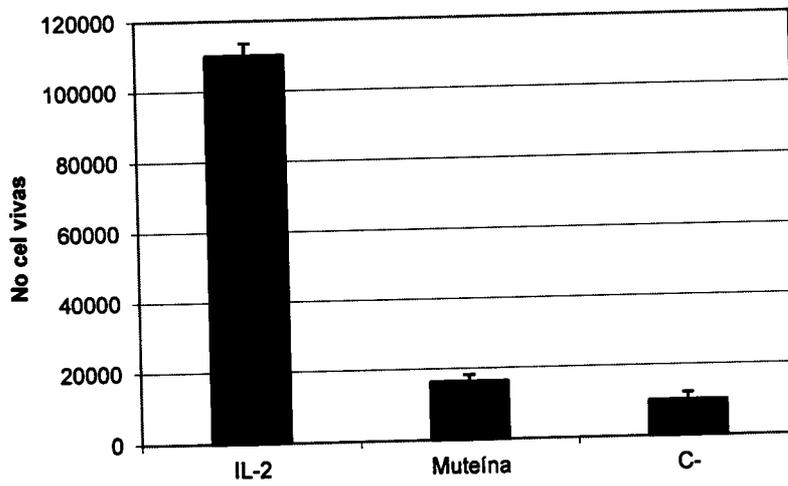


Figura 4

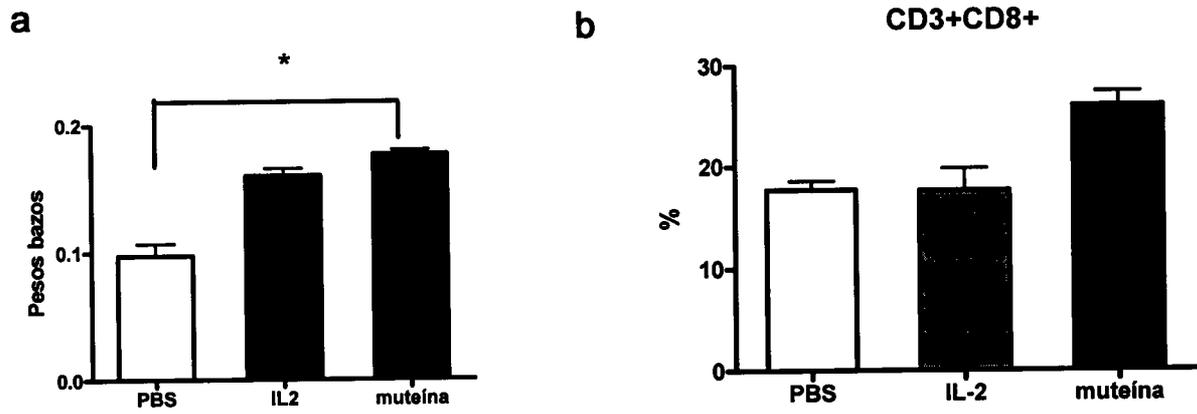


Figura 5

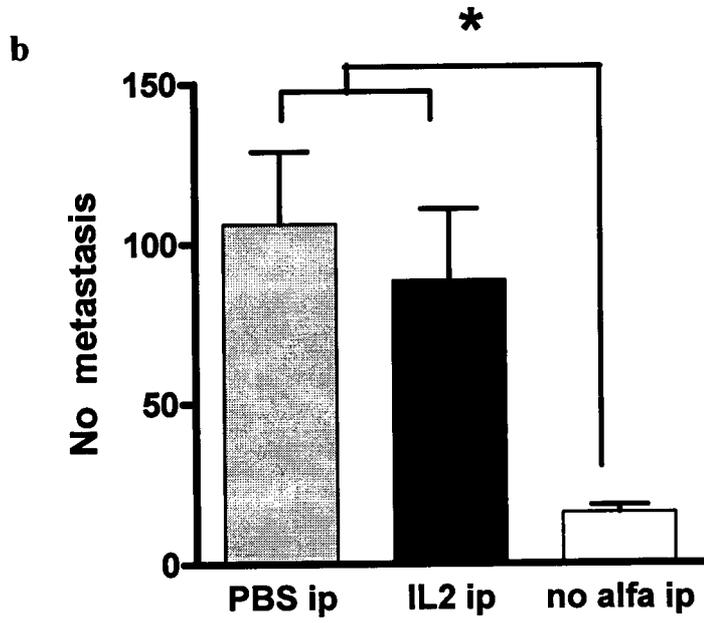
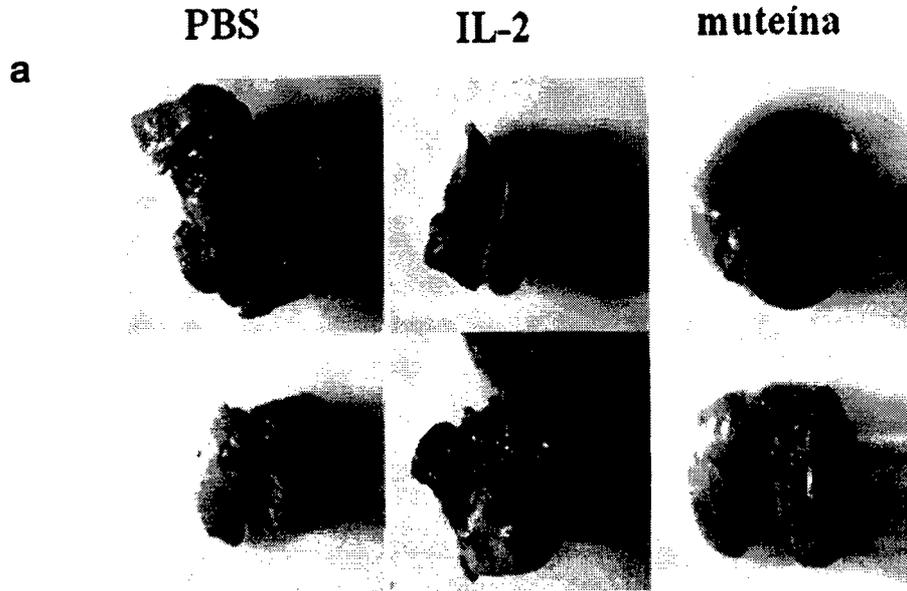


Figura 6

