

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 436**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/12</b>	(2006.01)	<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/21</b>	(2006.01)		
<b>C07K 5/00</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/57</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/12</b>	(2006.01)		
<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 1/16</b>	(2006.01)		
<b>A61P 9/10</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2010 PCT/NL2010/050897**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2011 WO11081523**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2010 E 10807562 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2519250**

54 Título: **Análogos de interferón**

30 Prioridad:

**10.02.2010 US 302973 P**  
**31.12.2009 EP 09181049**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.11.2016**

73 Titular/es:

**BIORION TECHNOLOGIES B.V. (100.0%)**  
**L.J. Zielstraweg 2**  
**9713 GX Groningen, NL**

72 Inventor/es:

**POELSTRA, KLAAS;**  
**PRAKASH, JAI;**  
**BELJAARS, ELEONORA y**  
**BANSAL, RUCHI**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 588 436 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

## Análogos de interferón

5 [0001] La invención se refiere al campo de la medicina. Entre otros, se refiere a análogos biológicamente activos de interferones (IFNs) que muestran efectos secundarios menos deseados y a los usos terapéuticos de los mismos.

10 [0002] Alrededor de 10 IFNs diferentes se han identificado en mamíferos; siete de ellos se han descrito para seres humanos. Se dividen típicamente en tres clases: IFN tipo I, IFN tipo II e IFN tipo III. Todos los IFNs tipo I enlazan con un complejo receptor de superficie celular específico conocido como el receptor de IFN- $\alpha$  (IFNAR) que consiste en las cadenas IFNAR1 e IFNAR2. Los interferones tipo I presentes en los seres humanos son IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\omega$ . El interferón tipo II se enlaza a IFNGR. En los seres humanos éste es IFN- $\gamma$ . Por la interacción con sus receptores de superficie celular específicos, los IFNs activan el transductor y el activador de señal de complejos de transcripción (STAT); los STATs son una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de determinados genes del sistema inmunológico. Algunos STATs se activan tanto mediante los IFNs de tipo I como de tipo II. Sin embargo, cada tipo de IFN puede también activar STATs únicos (Platanias, L. C. 2005 Nature reviews. Immunology 5 (5): 375-386).

20 [0003] IFNs de todas las clases de IFN son muy importantes para combatir las infecciones víricas. Aunque reciben su nombre por su capacidad para "interferir" con la replicación vírica dentro de las células huésped, los IFNs tienen otras funciones: activan las células inmunes, tales como las células asesinas naturales y los macrófagos; aumentan el reconocimiento de infecciones o células tumorales mediante la sobreexpresión de antígenos para los linfocitos T; y aumentan la capacidad de las células huésped no infectadas para resistir a nuevas infecciones por virus. Ciertos síntomas del huésped, tales como dolores musculares y fiebre, están relacionados con la producción de IFNs durante la infección.

25 [0004] IFN $\gamma$  es una citocina pleiotrópica producida por las células inmunes activadas. Actúa a través del IFN $\gamma$  receptor que es expresado casi en todos los tipos de células, sin embargo muestra una especificidad de especies estricta. IFN $\gamma$  se ha aplicado al tratamiento de enfermedades inmunológicas, víricas y cancerosas (Younes and Amsden, J Pharm Sci 2002) con efectos significativos. Además, diferentes estudios han demostrado el papel potencial de IFN $\gamma$  en la fibrosis renal y de hígado (Kidney Int. 1999;56:2116-27, Hepatology 1996 23:1189-99). Desafortunadamente, la corta vida media de circulación y los efectos secundarios sistémicos indeseables de los interferones actualmente disponibles han limitado su aplicación clínica e incluso ensayos clínicos se han detenido. Muchos intentos se han hecho para circunvenir estos problemas, por ejemplo mediante la incorporación de IFN $\gamma$  en liposomas, microesferas y elastómeros (Pharm Res. 2000 17:42-8, Pharm Res. 1996 13:1464-75, J Control Release. 2005 102:607-17). Métodos de entrega específicos de célula no se han usado hasta el momento. Esto no es sorprendente debido al hecho de que tal método se ha considerado generalmente imposible para las citocinas que necesitan ser entregadas a sus propios receptores para suscitar un efecto biológico, de modo que siempre acaban en células diana que expresan estos receptores. La entrega a otros receptores diana será por lo tanto en la mayoría de los casos inútil y a lo mejor llevará a la asimilación en otros tipos de células causando la pérdida de actividad o mayor diversificación de los efectos adversos. Sin embargo, los presentes inventores reconocieron que la estructura del IFN ofrece oportunidades únicas de focalización ya que la molécula contiene una fracción de unión al receptor que es específica de especies y una fracción de señalización que es no es específica de especies y que actúa intracelularmente. Se descubrió sorprendentemente que la estructura única de IFN $\gamma$  permite entregar la fracción de señalización de IFN $\gamma$  a otro receptor objetivo, siempre que este nuevo receptor objetivo permita la liberación intracelular de esta fracción de señalización y la activación posterior de la vía de señalización del IFN $\gamma$  intracelular/nuclear. Por ejemplo, un IFN $\gamma$  truncado mimético dirigido al receptor del Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF) mostró significativamente menos efectos secundarios sistémicos en un modelo de ratón con daño hepático agudo cuando se comparó con IFN $\gamma$  de longitud total o IFN $\gamma$  no dirigido mimético.

50 [0005] Por consiguiente, la invención se refiere a un análogo de interferón (IFN), donde la fracción que media la unión a su receptor natural es al menos funcionalmente interrumpida y donde el análogo comprende una fracción de señalización capaz de mediar la actividad IFN intracelular, dicha fracción de señalización es proporcionada en su N-término, opcionalmente vía un enlazador, con al menos un dominio objetivo capaz de enlazar a un receptor de superficie celular diferente del receptor de IFN. Preferiblemente, el análogo es un análogo de IFN gamma (IFN $\gamma$ ).

55 [0006] Análogos de interferones provistos de una fracción de selección heteróloga se conocen en la técnica. La WO2008/068621 divulga un producto de conjugación de IFN $\gamma$  y una fracción de selección, tal como una fracción de selección de tumor o una fracción de selección de vasculatura tumoral. El estado de la técnica solo divulga la conjugación para IFN $\gamma$  de longitud total, que todavía enlazará con su receptor nativo causando efectos adversos.

60 [0007] La EP0844252 pretende proporcionar péptidos cíclicos y su proceso de preparación, que permiten injerto químico posterior en el acoplamiento en dichos péptidos cíclicos, es decir, su fijación a un soporte sólido, a un compuesto de peso molecular alto, a un marcador y/o a otros péptidos cíclicos, para proporcionar aplicaciones biotecnológicas nuevas o mejoradas, particularmente en el campo de la cromatografía de afinidad, inmunización, desarrollo de pruebas de diagnóstico, vacunas y composiciones farmacéuticas. Enseña el acoplamiento de ligandos de péptido cíclico a moléculas biológicas, entre otros a interferones. No se hace ninguna mención en la EP0844252 acerca del uso de una molécula de IFN truncada que carezca de un dominio de unión funcional para su receptor natural.

[0008] Un interferón análogo de la presente invención tiene ventajas claras e inesperadas sobre el uso de un interferón de longitud total (modificado), no solo con respecto a su uso terapéutico (menos efectos secundarios, eficacia aumentada, antigenicidad reducida debido a peso molecular inferior) sino también a su proceso de producción (síntesis recombinante).

[0009] La interrupción funcional de la fracción que media la unión a su receptor natural se puede conseguir eliminando, insertando, substituyendo uno o varios residuos de aminoácidos pertinentes en el dominio de unión al receptor. Dominios de unión al receptor de interferón se han identificado y se conocen en la técnica. Por ejemplo, unión de IFN $\gamma$  murino al receptor de IFN $\gamma$  se puede abolir borrando al menos parcialmente los primeros 40, 30 o 20 residuos N-terminales.

[0010] En una forma de realización, el análogo es un polipéptido de IFN $\gamma$  truncado que solo contiene los residuos implicados en la señalización intracelular. Como se utiliza en este caso, la señalización intracelular puede comprender translocación nuclear y/o actividad antivírica.

[0011] Preferiblemente, la fracción de señalización que media la actividad intracelular comprende un motivo de señal de localización nuclear polibásica (NLS) como se encuentra en el C-término de IFN humano y murino (Subramaniam *et al.* 2000, J. Cell Science 113, 2771-2781). Este motivo de NLS se cree que forma un complejo con un transductor de señal y activador de transcripción (STAT); STATs son una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de determinados genes del sistema inmunológico. Algunos STATs se activan mediante los IFNs tanto de tipo I como de tipo II. Sin embargo cada tipo de IFN puede también activar STATs únicos (Platanias, L. C. 2005 Nature reviews. Immunology 5 (5): 375-386). La activación de STAT inicia la ruta de señalización celular mejor definida para todos los IFN, la ruta de señalización Janus quinasa-STAT tradicional (JAK-STAT). En esta ruta, las JAKs se asocian con receptores de IFN y, después del acoplamiento del receptor con IFN, fosforilan tanto STAT1 como STAT2. Como resultado, un complejo de factor génico 3 estimulado por IFN (ISGF3) se forma - este contiene STAT1, STAT2 y un tercer factor de transcripción llamado IRF9 - y se mueve en el núcleo celular. Dentro del núcleo, el complejo de ISGF3 se enlaza a secuencias de nucleótidos específicas llamadas elementos de respuesta estimulada por IFN (ISREs) en los promotores de ciertos genes; esto induce la transcripción de esos genes.

[0012] Un análogo proporcionado aquí puede comprender el motivo de NLS polibásico que comprende la secuencia de aminoácidos (R)KRXRS(R), donde X es cualquier residuo de aminoácido, preferiblemente donde X es R, K, S o T. Preferiblemente, el motivo de NLS está presente en el extremo C-terminal del análogo. En una forma de realización, comprende la secuencia, preferiblemente la secuencia C-terminal RKRKRSR, KSKRSR, KRTRS o KRTRSQ. En un aspecto específico, la fracción de señalización comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) la secuencia de aminoácidos KFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSLRKRKRSR;
- (b) la secuencia de aminoácidos YSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPAAGTKRTRSQ o YSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPAAGTKRKRQSQ;
- (c) la secuencia de aminoácidos AKFEVNNPQIQHKAVNELIRVIHQLSPESSLRKRKRRC
- (d) una extensión de al menos 10, preferiblemente al menos 15, aminoácidos contiguos de la secuencia de (a), (b) o (c);
- (e) una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% de identidad con a) o b) o c) siempre que la actividad de la señalización intracelular se mantenga; y
- (f) la secuencia de aminoácidos de (a) o (b) o (c) donde como mucho 10, preferiblemente como mucho 8, más preferiblemente como mucho 5 residuos de aminoácidos son eliminados, adicionados o substituidos, siempre que la actividad de señalización, por ejemplo la translocación nuclear, se mantenga.
- (g) la secuencia de consenso VxxxVQRxAxxELIxVxxxLxPxxxxxKRxRS donde x es cualquier residuo de aminoácido;
- (h) la secuencia de consenso VxxxxxQxxAxxELIxVxxxLxPxxxxxKRKRS donde x es cualquier residuo de aminoácido;
- (i) la secuencia de consenso Vxxx[V/I]Q[R/H] [Q/K]A[F/V/I] [N/H] ELI[R/Q]Vx[H/A] [Q/E]L[L/S]P[E/A] [S/A] [S/A] [L/K]xxKRKRS donde x es cualquier residuo de aminoácido;

La secuencia de aminoácidos de (a) representa una secuencia de IFN $\gamma$  murino truncado, la secuencia de (b) es una homóloga humana y la secuencia de (c) es la homóloga de rata. Preferiblemente, un análogo de la invención comprende una extensión de al menos 10, preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos contiguos de la secuencia de (a) o (b) o (c). En una forma de realización, dicha extensión comprende la secuencia N-terminal de la secuencia de (a) o (b) o (c). En otra forma de realización, comprende la secuencia C-terminal de la secuencia de (a) o (b) o (c), preferiblemente al menos los últimos 15 aminoácidos. En otra forma de realización, la extensión comprende una secuencia interna de la secuencia de (a) o (b) o (c). Secuencias ejemplares son LLPESLLRKRKRSR, KFEVNNPQVQRQ, QAFNELIRVVHQLL, MAELSPAAGTKRTRSQ, YSVTDLNVQRKAI, KAIHELIVMAELS.

[0013] La persona experta entenderá que variantes con una o varias modificaciones de aminoácido en las secuencias de (a) o (b) o (c) están también dentro del campo de la invención. La secuencia de aminoácidos de (a) o (b) o (c) donde como mucho 10, preferiblemente como mucho 8, más preferiblemente como mucho 5 residuos de aminoácidos son

eliminados, adicionados o sustituidos, siempre que la actividad de señalización, por ejemplo la translocación nuclear, se mantenga.

5 [0014] La alineación de secuencias de IFN $\gamma$  humano y murino muestra que 15 de cada 36 residuos (41%) son idénticos y 24 de cada 36 residuos (66%) están positivamente cargados. La correspondencia de identidad se hace según el programa de alineación Clustal W.

huInterferón gamma	4 YSVTDLN VQR K AIHE L I Q V MAELS PAAKTG KRTRSQ 39 + V + VQR + A + E L I + V + + L P + KR RS+
MuInterferón gamma	3 FEVNNPQ VQRQ AFNE L IRV VH QLL PESS LRKRK RS R 38

10 La línea entre las secuencias indica los residuos conservados, dando una producción de una secuencia de consenso anteriormente citada de (g). La alineación del interferón gamma de humano, de rata y de ratón puede proporcionar las secuencias de consenso de (h) y (i). En una forma de realización, un análogo comprende una fracción de señalización según la secuencia de consenso (g), (h) o (i) mencionada anteriormente. Otras secuencias útiles incluyen secuencias de aminoácidos que muestran al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95% de identidad con (a) o (b) o (c) siempre que la actividad de señalización intracelular se mantenga.

15 [0015] En un aspecto específico, el análogo comprende una fracción de señalización según la secuencia de consenso:  
 Xaa<sup>1</sup>Xaa<sup>2</sup>Xaa<sup>3</sup>Xaa<sup>4</sup> Val Xaa<sup>5</sup> Xaa<sup>6</sup> Xaa<sup>7</sup> Xaa<sup>8</sup> Xaa<sup>9</sup> Gln Xaa<sup>10</sup> Xaa<sup>11</sup> Ala Xaa<sup>12</sup> Xaa<sup>13</sup> Glu Leu Ile Xaa<sup>14</sup> Val Xaa<sup>15</sup>  
 Xaa<sup>16</sup> Xaa<sup>17</sup> Leu Xaa<sup>18</sup> Pro Xaa<sup>19</sup> Xaa<sup>20</sup> Xaa<sup>21</sup> Xaa<sup>22</sup> Xaa<sup>23</sup> Lys Arg Lys Arg Ser Xaa<sup>24</sup> Xaa<sup>25</sup>, donde Xaa<sup>1</sup>, Xaa<sup>2</sup>,  
 20 Xaa<sup>3</sup> Xaa<sup>4</sup> Xaa<sup>6</sup> Xaa<sup>11</sup>, Xaa<sup>13</sup>, Xaa<sup>14</sup>, Xaa<sup>16</sup> Xaa<sup>17</sup>, Xaa<sup>18</sup> Xaa<sup>19</sup> Xaa<sup>20</sup> Xaa<sup>21</sup> Xaa<sup>22</sup> Xaa<sup>23</sup> Xaa<sup>24</sup> y Xaa<sup>25</sup> es cualquier  
 residuo de aminoácido Xaa<sup>5</sup> es un residuo polar sin carga tal como Asn o Thr Xaa<sup>7</sup> es un residuo no polar  
 hidrofóbico tal como Pro o Leu Xaa<sup>8</sup> es un residuo polar sin carga tal como Gln o Asn Xaa<sup>9</sup> es un residuo  
 hidrofóbico no polar tal como Val, Ile o Leu Xaa es un residuo polar básico tal como Arg, His o Lys Xaa<sup>12</sup> es un  
 residuo hidrofóbico no polar tal como Phe, Val o Ile Xaa<sup>15</sup> es un residuo hidrofóbico no polar tal como Val, Ile, Met.  
 25 Preferiblemente, un análogo comprende como fracción de señalización una secuencia que corresponde a los residuos  
 95-133 en IFN $\gamma$  murino o residuos 95-134 en IFN $\gamma$  humano. Esta secuencia tiene actividad antivírica (Mujtaba *et al.*  
 2006, Clinical and Vaccine Immunology, Vol. 13, No.8, p.944-952).

30 [0016] La actividad de señalización de un análogo puede ser fácilmente determinada por métodos conocidos en la  
 técnica. Por ejemplo, la capacidad del análogo para inducir translocación nuclear de STAT1 $\alpha$  cuando se absorbe  
 intracelularmente por una línea celular macrófaga murina se puede determinar como se describe por Subramaniam *et al.*  
 La actividad de señalización puede también ser evaluada por formación del complejo con el factor de transcripción  
 Stat1 $\alpha$  y el importador nuclear de Stat1 $\alpha$ , el análogo importina- $\alpha$  NPI-1. Véase en particular Subramaniam *et al.*  
 35 (2001, J. Interferon Cytokine Res. 21(11):951-959). Otros ensayos *in vitro* adecuados incluyen la No-producción en  
 macrófagos murinos tal como la línea celular RAW. En una forma de realización, el análogo muestra al menos 30%,  
 preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75% de la actividad (en el vitro) de su homólogo  
 interferón de longitud total. La señalización específica de célula puede mejorar significativamente la eficacia *in vivo* de  
 un análogo que muestra actividad relativamente baja *in vitro*.

40 [0017] Tal y como se menciona aquí por encima, un análogo de la presente invención se caracteriza por la ausencia de  
 un dominio de unión al receptor de IFN funcional y la presencia de un dominio de selección capaz de unión a un  
 receptor alternativo que puede mediar la asimilación intracelular del análogo, por ejemplo un receptor que entra en la vía  
 endocítica tras la unión de ligandos y/o como parte de la rotación de receptor constante. Como se entenderá, el receptor  
 alternativo o "secundario" al que se va a dirigir tiene algún grado de expresión específica del tipo de célula. Los  
 45 receptores expresados de forma ubicua son candidatos menos adecuados. Además, el receptor debe ser expresado en  
 una célula que sea sensible a la fracción de señalización intracelular, por ejemplo en caso de un análogo de IFN $\gamma$ , éste  
 debe contener un elemento sensible al IFN $\gamma$ .

50 [0018] Preferiblemente, el dominio de selección puede enlazar con un receptor que sea específico para células de  
 fibroblasto y de tipo fibroblasto, tales como por ejemplo miofibroblastos, fibroblastos portales, células mesangiales,  
 fibroblastos intersticiales, fibroblastos alveolares o células estromales. También se prevén receptores expresados en las  
 células tumorales. Un análogo de IFN $\gamma$  puede inducir la apoptosis en células tumorales, que puede ser específicamente  
 dirigidas vía un receptor secundario expresado en células tumorales. En una forma de realización, el receptor se  
 55 selecciona del grupo que consiste en los receptores PDGF, receptor de tipo VI de colágeno, receptores de citocina  
 incluyendo receptor de TGF $\beta$ , receptor de TNF $\alpha$  y el receptor de IL1 $\beta$ , receptores de factor de crecimiento de insulina,  
 receptores de VEGF y receptores de quimiocina (por ejemplo CXCR4). Resultados óptimos fueron obtenidos cuando el  
 análogo fue dirigido al receptor de PDGF, preferiblemente el receptor de PDGF- $\beta$ . Otros dominios diana adecuados  
 incluyen péptidos de adhesión celular, tal como el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) que fue originalmente identificado como  
 la secuencia dentro de la fibronectina que media la fijación celular. El motivo RGD se ha encontrado ahora en otras  
 60 numerosas proteínas y soporta la adhesión celular en muchas, pero no en todas, ellas. Las integrinas, una familia de las  
 proteínas de superficie celular, actúan como receptores para las moléculas de adhesión celular. Un subconjunto de las  
 integrinas reconoce el motivo RGD dentro de sus ligandos, cuya unión media tanto en el substrato celular como en las

interacciones célula-célula. Análogos que contienen RGD se pueden utilizar como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades tales como la trombosis y el cáncer.

5 [0019] En un aspecto específico, los objetivos del dominio de selección pueden enlazar con un receptor para un oligosacárido o una glicoproteína, preferiblemente el receptor de asialoglicoproteína (ASGP) o el receptor de manosa (CD 206). Por ejemplo, el dominio de selección es un oligosacárido, preferiblemente manosa o lactosa, conjugado con una molécula portadora. En otra forma de realización, manosa-6-fosfato (M6P) o un derivado del mismo se puede usar como dominio de selección para el receptor de M6P/IGF II. Véase por ejemplo EP1117443.

10 [0020] El dominio de selección es un preferiblemente una sustancia proteínico (péptido) de manera que el análogo en su conjunto es un polipéptido de fusión que puede ser fácilmente producido por ejemplo recombinantemente. Sin embargo, otros tipos de dominios de selección no proteínicos son también previsto tales como sacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, moléculas sintéticas y similares.

15 [0021] En un aspecto, el dominio de selección comprende al menos una porción de péptido cíclico. Los péptidos se pueden ciclar por varios medios, incluyendo formación de puente de santonina o disulfuro de cisteína. Péptidos cíclicos útiles para seleccionar un análogo de la invención para un tipo de célula deseada son descritos en la técnica. Por ejemplo, la EP1117443 divulga un péptido cíclico que comprende al menos una secuencia que codifica un péptido de reconocimiento de receptor celular (RPR). En una forma de realización, un análogo de la invención comprende en su dominio de selección (ciclado o lineal) al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en RGD, KPT, SRN, NLI y LID.

25 [0022] Una forma de realización preferida se refiere a análogos que tienen un dominio de selección que comprende múltiples secuencias de unión al receptor, preferiblemente en forma de al menos una repetición en tándem de una porción de péptido (cíclico). La repetición en tándem puede comprender dos partes de péptido cíclico, preferiblemente partes de péptido cíclico idénticas, conectadas vía un enlazador de 1 a 5 aminoácidos. Esto es particularmente ventajoso para seleccionar un receptor que sea activo como un dímero, tal como el receptor de PDGF, TGF $\beta$  o IL-10. En una forma de realización, el dominio de selección comprende uno, preferiblemente dos, copia(s) de la secuencia de aminoácidos X<sub>1</sub>SRNLIDX<sub>2</sub>, donde X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> indican fracciones que juntas pueden formar un enlace (peptídico) de manera que se forme una estructura cíclica donde la secuencia SRNLID es parte del anillo. Las dos copias están preferiblemente separadas por una secuencia enlazadora de 1 a 7 aminoácidos. Preferiblemente, X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son residuos Cys. Los inventores descubrieron que un dominio de selección que comprende la secuencia de aminoácidos CSRNLIDC-enlazador-CSRNLIDCS, donde el enlazador es una secuencia de aminoácidos de 1 a 7, como 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 residuos de aminoácidos, es muy eficaz en la unión al receptor de PDGF $\beta$  dimerico. Por ejemplo, se realizó un experimento comparativo donde dos péptidos cíclicos capaces de unión al receptor de PDGF fueron enlazados uno al otro vía un separador que consistía en 6 aminoácidos mientras que en otro constructo estos dos péptidos cíclicos fueron acoplados vía un separador de 11 aminoácidos. En ambos constructos, el separador contenía un residuo de lisina para permitir el acoplamiento de un fármaco o trazador. Ambos constructos bicíclicos fueron marcados FITC y añadidos a cultivos de células 3T3, expresando el receptor de PDGF y se incubaron durante 2 horas para examinar la unión. Tras la incubación y la coloración con un anticuerpo contra FITC, los datos inmunohistoquímicos mostraron unión significativa del constructo que comprende el separador de 6 aminoácidos, mientras que sólo unión baja se observó con el constructo que contenía el separador más largo de 11 aminoácidos.

45 [0023] En una forma de realización, el enlazador puede consistir en 4 o 5 residuos de aminoácidos, preferiblemente seleccionados del grupo de residuos Gly, Ala, Ser y Thr, más preferiblemente al menos 3 de éstos siendo un residuo de glicina. Los enlaces preferidos consisten en la secuencia K(GS)<sub>m</sub>GG donde m es 1 o 2. Como un ejemplo específico, el dominio de selección comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos CSRNLIDCKGSGGCSRNLIDCS o CSRNLIDCKGSGGCSRNLIDCS. En otra forma de realización, el enlazador consiste en 5 o 6 residuos de aminoácidos, preferiblemente seleccionados del grupo de los residuos Asp, Lys, Gly, Ala, Ser y Thr. Buenos resultados fueron obtenidos con un enlazador de 4 a 7 residuos, al menos 4, preferiblemente al menos 5, siendo un residuo de glicina. Otros enlaces adecuados incluyen una secuencia de 4 a 7 residuos, los residuos se seleccionan de los residuos de Gly y de Asp, por ejemplo [G<sub>n</sub>D<sub>m</sub>] donde n+m es de 4 a 7, donde n  $\geq$  4 y M un número entero entre 0 y 3. En una forma de realización específica, el dominio de selección comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos CSRNLIDC[G<sub>n</sub>D<sub>m</sub>] CSRNLIDC, donde n+m es de 4 a 7, donde n  $\geq$  4 y M un número entero entre 0 y 3. Por ejemplo, el dominio de selección consiste en o comprende la secuencia CSRNLIDCGGGDGGCSRNLIDC, CSRNLIDCGDGGCSRNLIDC, CSRNLIDCGDDGGCSRNLIDC o CSRNLIDCGGGGGCSRNLIDC.

60 [0024] El dominio de selección se puede estar unido al dominio de señalización por cualquier medio, por ejemplo por una secuencia enlazadora o separadora. Secuencias enlazadoras adecuadas son típicamente de hasta 15, preferiblemente hasta 10 residuos de aminoácidos de longitud. Enlaces de polialanina pueden ser utilizados. Por ejemplo, se proporciona aquí un análogo de interferón gamma, que consiste en la secuencia CSRNLIDCKGSGGCSRNLIDCSAAA KFEVNNPQVQRQAFNELIR VVHQLLPESLKRKRKR, CSRNLIDCKGSGGCSRNLIDCSAAA AKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLKRKRKR o CSRNLIDCGGGDGGCSRNLIDCSAAA KFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLKRKRKR.

65

[0025] El dominio de selección también puede estar unido al dominio de señalización vía una molécula portadora, por ejemplo albúmina. Esto es especialmente ventajoso si el dominio de selección es una sustancia no proteínica, por ejemplo un oligosacárido tal como manosa o lactosa. En una forma de realización, la molécula portadora comprende grupos reactivos libres como hidroxilo, amina y/o sulfato. El tamaño del portador es preferiblemente una proteína plasmática endógena, como albúmina, lactoferrina o fibronectina.

[0026] La invención también se refiere a un conjugado que comprende un compuesto de interés, por ejemplo una molécula biológicamente activa, conjugada con un dominio de selección de PDGF bicíclico, dicho dominio de selección comprende dos copias de la secuencia de aminoácidos  $X_1SRNLIDX_2$ , donde  $X_1$  y  $X_2$  indica fracciones que juntas pueden formar un enlace, como un enlace peptídico o de disulfuro, de manera que se forme una estructura bicíclica donde la secuencia SRNLID es parte de cada anillo. Preferiblemente,  $X_1$  y  $X_2$  son residuos Cys que permiten la ciclización vía formación de enlaces de disulfuro. Un conjugado según la invención se caracteriza por el hecho de que las dos copias están separadas por una secuencia enlazadora de 2 a 7 aminoácidos. Se descubrió sorprendentemente que esta longitud de espaciador específico permite una selección altamente eficaz del receptor de PDGF, que es activo como un dímero. Así, también se proporciona un conjugado que comprende un compuesto de interés conjugado con un dominio de selección, dicho dominio de selección comprende la secuencia de aminoácidos  $X_1SRNLIDX_2$ -enlazador- $X_3SRNLIDX_4$ , donde el par de  $X_1$  y  $X_2$  y el par de  $X_3$  y  $X_4$  puede formar un enlace (peptídico) de manera que se forme una estructura bicíclica donde las secuencias SRNLID son parte de un anillo, y donde el enlazador es una secuencia de aminoácidos que consiste en 2 a 7 residuos de aminoácidos. Como se ha mencionado anteriormente, el enlazador puede consistir en 4 o 5 residuos de aminoácidos. Se pueden seleccionar del grupo de residuos Gly, Ala, Ser, Asp, Lys y Thr, preferiblemente al menos 3 de éstos son un residuo de glicina. Enlaces preferidos consisten en la secuencia  $K(GS)_mGG$  donde  $m$  es 1 o 2. Como un ejemplo específico, el dominio de selección comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos CSRNLIDCKGSGGCSRNLIDCS o CSRNLIDCKGSGGCSRNLIDCS. En otra forma de realización, el enlazador consiste en 5 o 6 residuos de aminoácidos, preferiblemente seleccionados del grupo de residuos Asp, Gly, Ala, Ser y Thr. Se obtuvieron buenos resultados con un enlazador de 4 a 7 residuos, al menos 4, preferiblemente al menos 5, siendo un residuo de glicina. Otros enlaces adecuados incluyen una secuencia de 4 a 7 residuos, los residuos son seleccionados de residuos de Gly y Asp, por ejemplo  $[G_nD_m]$  donde  $n+m$  es de 4 a 7, donde  $n \geq 4$  y  $M$  un número entero entre 0 y 3. En una forma de realización específica, el dominio de selección comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos CSRNLIDC $[G_nD_m]$  CSRNLIDC, donde  $n+m$  es de 4 a 7, donde  $n \geq 4$  y  $M$  un número entero entre 0 y 3. Por ejemplo, el dominio de selección consiste en o comprende la secuencia CSRNLIDCGGGDGGCSRNLIDC, CSRNLIDCGGDGGCSRNLIDC, CSRNLIDCGDDGGCSRNLIDC o CSRNLIDCGGGGGCSRNLIDC.

[0027] El uso de la secuencia SRNLID como dominio de selección celular se conoce en la técnica. La WO00/23113 divulga la conjugación de un péptido cíclico que comprende un péptido de reconocimiento de receptor (RRP) para una molécula portadora que es mayor de 5000 Dalton, por ejemplo albúmina de suero. Un RRP ejemplar es la secuencia de unión al receptor de PDGF XSRNLIDCX, donde X denota la ubicación de ciclización. Se enseña que, en la estructura de péptido cíclico, múltiples secuencias de RRP pueden estar presentes. También se describe unir más de uno (por ejemplo 5-15 péptidos cíclicos) a una molécula portadora. Hagens *et al.* (2007) Pharmaceutical Res. Vol. 24, pp. 566-574, muestran la entrega del péptido cíclico CSRNLIDC conjugado con albúmina a células estrelladas hepáticas. Así, los conjugados del estado de la técnica dependen todos de la unión de RRP a una molécula portadora. La construcción del conjugado de la invención, donde las fracciones cíclicas no se fijan a una molécula portadora sino en lugar de la misma colocada en un motivo en tándem con una longitud de espaciador específica de 2 a 7 aminoácidos no se enseña o sugiere en la técnica. Se ha observado que esta estructura bicíclica bien definida mejora la unión de conjugado al receptor de PDGF dimérico en comparación con un conjugado según la WO00/23113, donde el número y la orientación espacial de las secuencias de unión al receptor múltiple fijadas al portador son aleatorizadas y mucho menos controladas. La configuración en tándem que fija la distancia entre las dos fracciones cíclicas en un conjugado de la invención se diseña para interactuar óptimamente con el receptor de PDGF dimérico. Además, la presencia de la molécula portadora relativamente grande puede reducir las interacciones receptoras por impedimento estérico.

[0028] El péptido bicíclico se puede preparar químicamente o a través de técnicas recombinantes que proporcionan métodos de producción que son muy favorables para la industria farmacéutica. Además, la estructura bicíclica puede ser directamente fijada a una entidad química (fármaco o trazador), polimérica (por ejemplo polietilenglicol, PEG), péptido pequeño o proteína que produzca un compuesto de peso molecular bajo específico de célula que puede fácilmente penetrar en los tejidos extravasculares. En particular para fines de selección tumoral, esta penetración de tejido puede ser muy pertinente.

[0029] Resultados óptimos fueron conseguidos con un enlazador que consistía en 3 a 5 residuos de aminoácidos. En una forma de realización, el conjugado comprende la secuencia de aminoácidos CSRNLIDC-enlazador-CSRNLIDCS (BiPPB) donde el enlazador es una secuencia de aminoácidos de 2 a 7, preferiblemente 3 a 5, residuos de aminoácidos. Este péptido bicíclico se usa adecuadamente como ligando de selección de peso molecular bajo con alta afinidad al receptor de PDGF (PDGF-R). El péptido se puede preparar bien por síntesis química o recombinante. El enlazador puede comprender uno o varios residuos de aminoácidos con una cadena lateral reactiva que se puede usar para la fijación covalente de un compuesto de interés, como un marcador detectable, un fármaco y/o diagnóstico. Aminoácidos reactivos adecuados incluyen lisina, serina y treonina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, asparagina, glutamina, tirosina, metionina y triptófano.

5 [0030] La fracción biológicamente activa puede tener cualquier tipo de actividad biológica útil, incluyendo citocina, quimiocina, o actividad de prostaglandina. Puede ser de naturaleza proteínica o no proteínica. Por ejemplo, la fracción es seleccionada del grupo seleccionado de fármacos, citocinas, quimiocinas, hormonas, prostaglandinas y similares. Ejemplos específicos incluyen PGE2, 15d-PGJ2, IL-10, IFN $\gamma$ , IFN $\gamma$  truncado. Fracciones proteínicas pueden convenientemente ser fijadas al dominio de selección específico de PDGF-R por fusión genética, bien en el N- o C-término. En una forma de realización, se conjuga al N-término.

10 [0031] Un análogo o conjugado según la invención se puede acoplar a un núcleo y/o portador o molécula de entrega por métodos conocidos en la técnica. Núcleos adecuados o portadores incluyen dendrímeros, liposomas y polímeros naturales, sintéticos o semi-sintéticos (ramificados o lineales). Los dendrímeros se ha comprobado con éxito que son útiles como aditivos en diferentes vías de administración farmacológica porque pueden hacer que los fármacos aumenten su hidrosolubilidad, biodisponibilidad y biocompatibilidad. Véase, Chen *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 97 Issue 1, pg. 123 - 143. Como un ejemplo, la invención proporciona un análogo de IFN $\gamma$  conjugado a un dendrímero o a un liposoma. El liposoma puede contener fármaco (anti-cáncer).

20 [0032] En una forma de realización, un análogo de interferón o conjugado dirigido a PDGFR según la invención se modifica por medios convencionales para mejorar sus propiedades farmacológicas, como el aumento de la eficacia y/o la estabilidad. En una forma de realización, se modifica para mejorar la vida media por fijación de al menos un polímero no antigénico, por ejemplo por un polímero seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicoles (PEGs) y derivados de los mismos. La PEGilación es rutinariamente conseguida por incubación de un derivado reactivo de PEG con la macromolécula diana. La fijación covalente de PEG a un fármaco o proteína terapéutica puede "ocultar" el agente del sistema inmunológico del huésped (inmunogenicidad reducida y antigenicidad), aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en la solución) del agente que prolonga su tiempo circulatorio al reducir la depuración renal.

25 [0033] Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un análogo de interferón proteínico según la invención o que codifica un conjugado dirigido a PDGFR proteínico como se describe en este caso por encima. La persona experta será capaz de diseñar y de construir una secuencia de ácidos nucleicos adecuada por ejemplo un constructo de fusión que codifique la fracción de selección y la fracción biológicamente activa usando tecnología del ADN recombinante estándar. La secuencia de ácidos nucleicos aislada puede ser parte de un vector de expresión, por ejemplo un vector diseñado para la producción de proteína recombinante en una célula huésped bacteriana o mamífera. También se proporciona una célula huésped que comprende una secuencia de ácidos nucleicos o un vector según la invención, preferiblemente donde dicha célula huésped es una célula huésped bacteriana o mamífera. Un análogo o conjugado dirigido a PDGF descrito aquí ha mejorado las propiedades con respecto a la su distribución en el cuerpo. Más específicamente, permite dirigir un compuesto biológicamente activo de interés a una célula de interés mientras se mantiene la actividad biológica de este compuesto particular. Para lograr la especificidad de célula, estos mediadores están equipados con un marcador de dirección que aumentará su concentración alrededor de receptores diana pertinentes en el tejido enfermo. Otra forma de realización por lo tanto se refiere a una composición farmacéutica que incluye un análogo de IFN o un conjugado dirigido a PDGF y un portador farmacéuticamente aceptable. Un aspecto específico se refiere a una composición farmacéutica que comprende un análogo dirigido a IFN $\gamma$ , preferiblemente un análogo de IFN $\gamma$  dirigido a PDGF que muestra efectos secundarios reducidos en comparación con IFN $\gamma$  no dirigido. Una composición farmacéutica ejemplar contiene un péptido que comprende o consiste en la secuencia CSRNLIDCK(GS)<sub>m</sub>GGCSRNLIDCSAAAAKFEVNNPQ VQRQAFNELIRVVHQLLPESLRKRKRSR donde m es 1 o 2, por ejemplo CSRNLIDCKGSGSGCSRNLIDCSAAAAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPES 30 SLRKRKRSR. Otra composición farmacéutica ejemplar comprende un conjugado que comprende una molécula biológicamente activa conjugada a un dominio de selección, dicho dominio de selección comprende la secuencia de aminoácidos CSRNLIDC-enlazador-CSRNLIDCS, donde el enlazador es una secuencia de aminoácidos de 2 a 7, preferiblemente 3 a 5, residuos de aminoácidos.

40 [0034] También se proporciona el uso de un análogo de IFN ( $\gamma$ ) según la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad seleccionada de cáncer, enfermedades víricas, enfermedad fibrótica, enfermedad esclerótica y enfermedades inflamatorias crónicas o agudas. Enfermedades ejemplares incluyen glomerulosclerosis, fibrosis intersticial, fibrosis de pulmón (fibrosis pulmonar idiopática), aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedad de Crohns, colitis ulcerosa, glomerulonefritis y sepsis.

55 [0035] Se sabe que IFN $\gamma$  también tiene actividad antivírica. Ya que la forma truncada de IFN $\gamma$  se demuestra que es bioactiva y se descubrió que muestra todas las actividades de IFN $\gamma$  nativo siempre que un dispositivo de rastreo se fije a la molécula, un análogo de la invención está dotado de actividad antivírica también. Las enfermedades ejemplares incluían infecciones provocadas por el virus de la gripe o el virus sincitial respiratorio humano (RSV). El RSV es un virus que causa infecciones del tracto respiratorio. Es la causa principal de infección del tracto respiratorio inferior y de las visitas hospitalarias durante la infancia e la juventud. A veces un bebé se puede infectar sintómicamente más de una vez, incluso dentro de una sola temporada de RSV. En los Estados Unidos, el 60% de los bebés se infectan durante su primera temporada de RSV, y casi todos los niños se habrán infectado con el virus a los 2-3 años de edad. De los infectados con el RSV, 2-3% desarrollarán bronquiolitis, requiriendo hospitalización. Infecciones de RSV severas se han encontrado en aumento entre pacientes mayores. No hay vacuna. El tratamiento se limita a cuidado de apoyo,

incluyendo oxígeno. En climas templados hay una epidemia anual durante los meses de invierno. En climas tropicales, la infección es más común durante el invierno.

[0036] La presente divulgación por lo tanto también se refiere a un método para el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad seleccionada de cáncer, enfermedad vírica, enfermedad fibrótica, enfermedad esclerótica y enfermedades inflamatorias crónicas o agudas tales como glomerulonefritis, fibrosis intersticial, fibrosis de pulmón, aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedad de Crohns, colitis ulcerosa, glomerulonefritis y sepsis, que comprende proporcionar a un sujeto con la necesidad del mismo una dosis terapéuticamente efectiva de un análogo de IFN según la invención. La enfermedad puede ser una enfermedad hepática, preferiblemente una enfermedad hepática crónica tal como cirrosis hepática. El experto en la técnica ajustará la dosis que se debe aplicar a la manera de aplicación, tamaño, peso, estado de salud, etc., del sujeto al que se le va a realizar la administración. La administración se puede realizar de cualquier manera conocida de por sí para la administración de un medicamento. Un análogo de IFN $\gamma$  según la invención se usa ventajosamente en una composición medicinal (terapéutica o profiláctica) en una forma para la administración intrapulmonar, por ejemplo por administración intranasal o inhalación. También se proporciona un dispositivo de inhalación que incluye un análogo de IFN $\gamma$  como ingrediente activo.

Leyenda de las figuras

[0037]

Figura 1: clonación de IFN $\gamma$  mimético de ratón. Se estimularon esplenocitos con PHA y ARN fue aislado. RT y PCR utilizando cebadores específicos dieron un producto de PCR del tamaño previsto. Expresión del constructo en células BL21 y producción confirmada de transferencia de Western del mimético.

Figura 2: IFN $\gamma$  mimético recombinante muestra efectos anti-fibróticos en los fibroblastos 3T3 de ratón. Las células se tiñen para  $\alpha$ -actina de músculo liso que es un marcador de fibrosis.

Figura 3: construcción de pET39b-BiPPB que codifica un dominio de selección de receptor de PDGF bicíclico.

Figura 4: construcción de pET39b-BiPPB-IFN $\gamma$  que codifica un conjugado de IFN $\gamma$  dirigido a PDGFR.

Figura 5: construcción de pET39b-BiPPB- IFN $\gamma$  mimético.

Figura 6: análisis de transferencia en mancha de IFN $\gamma$ -BiPPB y IFN $\gamma$  mimético-BiPPB mostrando el acoplamiento de pPB-péptido a IFN $\gamma$ .

Figura 7: estudio de unión en células LX2 de línea celular estrellada hepática humana. Las células fueron manchadas para péptido de unión a PDGFR. La coloración indica la unión de constructos que contienen pPB a las células diana.

Figura 8: análisis de hemograma para estudiar los efectos secundarios del tratamiento en el modelo de ratón con daño hepático agudo.

WBC= recuento de glóbulos blancos.  
LYM= linfocitos.  
PLT= recuento de plaquetas.  
RBC= recuento de glóbulos rojos. Para detalles véase el ejemplo 4.

Figura 9: análisis de PCR en tiempo real de los marcadores de fibrosis hepática MMP13 y TIMP1. Para detalles véase el ejemplo 4.

Figura 10: efecto de IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB en el modelo de ratón con daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub> agudo. Cuantificación de  $\alpha$ -SMA (A), colágeno-I (B) y desmina (C) - coloración de secciones de hígado obtenidas de ratones normales tratados con aceite de oliva y ratones tratados con CCl<sub>4</sub> recibiendo bien IFN $\gamma$ , IFN $\gamma$  mimético, IFN $\gamma$  mimético-PEG, IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB (5  $\mu$ g/ratón) o PBS solo. La cuantificación fue hecha utilizando el programa informático de formación de imágenes Cell-D. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5 ratones por grupo. #P<0,05 frente al grupo de aceite de oliva tratado de PBS; \*P<0,05; \*\*P<0,01 frente al grupo de CCl<sub>4</sub> tratado con PBS. Para detalles véase el ejemplo 6

Figura 11: análisis de PCR en tiempo real de marcadores para fibrosis hepática en ratones, 3 días después de la administración de CCl<sub>4</sub> o aceite de oliva. Los ratones fueron tratados con diferentes compuestos como se indica y los niveles de colágeno 1a1 (A),  $\alpha$ -SMA (B), desmina (C) y TIMP1 (D) ARNm fueron medidos. Para detalles véase el ejemplo 6.

Figura 12: análisis de recuento de sangre en toda la sangre de ratones, 3 días después de la administración de CCl<sub>4</sub> o aceite de oliva. Los ratones fueron tratados con diferentes compuestos como se indica y el recuento de plaquetas (PLT: fig. A), recuento de glóbulos blancos (WBC, fig. B) y recuento de linfocitos (C) fueron medidos utilizando un contador Coulter. Para detalles véase el ejemplo 6.

Sección experimental

[0038] La fibrosis hepática se caracteriza por la acumulación excesiva de los componentes de matriz extracelular que lleva a cicatrices hepáticas. Hasta la fecha, no hay terapia que haya tenido éxito disponible para el tratamiento de la fibrosis hepática. Las células estrelladas hepáticas (HSCs) y los fibroblastos son las células efectoras clave implicadas en la progresión de la enfermedad, que se activan por factores de crecimiento cruciales tales como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ). Interferón gamma (IFN $\gamma$ ) ha demostrado tener varios efectos beneficiosos *in vitro* e *in vivo* durante la fibrosis hepática. Sin embargo, IFN $\gamma$  muestra una especificidad de especies estricta y tiene una vida media circulante corta que limita su uso clínico potencial.

Además, IFN $\gamma$  tiene efectos adversos serios en el sistema inmunológico, en células endoteliales y en el sistema nervioso central (por ejemplo, causando depresiones) que llevan todos a la retirada frecuente de los pacientes de los ensayos clínicos y en consecuencia al fallo de estos ensayos. Para circunvenir estos inconvenientes, los presentes inventores han producido un péptido estable mimético de IFN $\gamma$  que carece del sitio de reconocimiento de receptor extracelular y contiene una fracción de señalización que interactúa directamente en la cascada de señalización del IFN $\gamma$  aguas abajo, manteniendo así las funciones potenciales del IFN $\gamma$ .

[0039] Para aumentar la especificidad de IFN $\gamma$  y el péptido mimético de IFN $\gamma$ , IFN $\gamma$  y el péptido mimético fusionados a BiPPB (péptido bicíclico contra el receptor beta de PDGF) fueron generados, ya que la expresión del receptor de PDGF es altamente sobreexpresada durante el daño hepático particularmente en HSCs.

[0040] **Ejemplo 1: Clonación de IFN $\gamma$ .** Esplenocitos de ratón fueron aislados de bazo fresco y fueron cultivados en presencia de PHA (fitohemaglutinina) para estimular la producción de citocina. Después de 24 horas de estimulación, ARN fue aislado y ADNc fue sintetizado usando cebador antisentido específico del gen seguido de amplificación por PCR mediante fusión de polimerasa de DNA usando cebadores específicos sentido y antisentido de IFN $\gamma$  mimético. El fragmento obtenido fue clonado en pET42a (vector de expresión procariótico) en el sitio PshAI/EcoRI y los clones positivos fueron controlados por restricción de análisis de digestión. Véase la figura 1.

[0041] La secuencia de nucleótidos 5'->3' del interferón gamma de ratón truncado (secuencia de referencia NCBI: NM\_008337.2) (nt 457 - nt 572) es como sigue:

457 gccagtttgaggt caacaacca caggtccagc gccagcatt caatgagctc atccgagtg tccaccagct gttgccggaa tccagcctca ggaagcggaa aaggagtcg tg 572 a. El último nucleótido ha sido añadido para insertar el codón de terminación antes de la cisteína, que es el aminoácido último en la secuencia. La cisteína se retira de la secuencia para proporcionar el plegado apropiado del péptido y también para evitar plegado inapropiado debido a enlaces de disulfuro en la proteína de fusión (con BiPPB).

[0042] La secuencia de aminoácidos codificada es AKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLRKRKRSR\* \* denota codón de terminación.

Clonación de IFN $\gamma$ -BiPPB y IFN $\gamma$  mimético-BiPPB. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de selección de PDGF bicíclico BiPPB fue generada por amplificación de dos fragmentos utilizando 4 cebadores (2 para cada fragmento) y luego ligadas utilizando sitio de restricción Bam HI incorporado y luego clonadas en vector pET39b en el sitio Scal/NotI. IFN $\gamma$  e IFN $\gamma$  mimético fue amplificado por PCR utilizando cebador de fusión de péptido (sentido) y cebador antisentido de IFN $\gamma$  o IFN $\gamma$  mimético. El fragmento amplificado fue digerido y ligado en el vector pET39b-BiPPB en el sitio NotI/XhoI y los clones positivos fueron controlados análisis de digestión de restricción. Véase las figuras 4 y 5. Las secuencias de todos los constructos fueron además confirmadas por secuenciación de ADN automatizada.

BiPPB

[0043] Secuencia de nucleótidos para BiPPB:

tgt tct aga aac ctc atc gat tgt aag gga tcc gga ggt tgt tca cgt aat cta ata gat tgt tca Secuencia de aminoácidos para BiPPB: CSRNLIDCKGSGGCSRNLIDCS (véase también la figura 3)

Interferón gamma (longitud total)

[0044] Secuencia de nucleótidos: interferón gamma de ratón (secuencia de referencia NCBI: NM\_008337.3) gccggccgca 457 gccagtttgaggt caacaacca 481 caggtccagc gccagcatt caatgagctc atccgagtg tccaccagct gttgccggaa 541 tccagcctca ggaagcggaa aaggagtcg 569 ataa Secuencia de aminoácidos para IFN $\gamma$  de ratón

MNATHCILALQLFLMAVSGCYCHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRN

WQKDGDMKILQSQIISFYLRLEVLKDNQAISNNISVIESHLITTFFSNSKAKKDAF

MSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLRKRKRSRC

[0045] Secuencia de nucleótidos de la proteína fusionada (BiPPB-IFN gamma) tgt tct aga aac ctc atc gat tgt aag gga tcc gga ggt tgt tca cgt aat cta ata gat tgt tca gccggccgca Secuencia de interferón gamma (NM\_008337.3).

[0046] Secuencia de aminoácidos para BiPPB-IFN $\gamma$

*CSRNLIDCKGSGSGGCSRNLIDCSAAAMNATHCILALQLFLMAVSGCYCHGTVIES*  
*LESLNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGDMLKILQSQIISFYLRRLFVLDKNQ*  
*AISNNISVIESHLITTFNSNSKAKKDAFMSIAKFEVNPNPQVQRQAFNELIRVVHQLL*  
*PESLRKRKRSR*

[0047] La cursiva denota BiPPB; el texto normal denota IFN $\gamma$  mimético; la negrita denota enlazador o espaciador. Véase también figura 4.

5

Interferón gamma mimético fusionado a BiPPB

[0048] Secuencia de nucleótidos de la proteína fusionada (BiPPB-IFN $\gamma$  gamma mimético) tgt tct aga aac ctc atc gat tgt aag gga tcc gga ggt tgt tca cgt aat cta ata gat tgt tca gcggccgca 457 gccca agtttgaggt caacaaccca cagggtccagc gcccaagcatt caatgagctc atccgagtggt tccaccagct gttgccggaa tccagcctca ggaagcggaa aaggagctg 569 ataa  
 Secuencia de aminoácidos para BiPPB-IFN $\gamma$  mimético

10

*CSRNLIDCKGSGSGGCSRNLIDCSAAA*

*AKFEVNPNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLRKRKRSR\**

15

[0049] Cursiva denota BiPPB; texto normal denota IFN $\gamma$  mimético; negrita denota: enlazador o espaciador. Véase también figura 5.

20

[0050] Los ácidos nucleicos fueron luego transformados en células BL21 (*E. Coli*) para la expresión usando inducción de IPTG. La proteína expresada fue analizada por SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western o análisis de transferencia de mancha utilizando anticuerpo anti-IFN $\gamma$  y/o anticuerpo anti-PPB (véase figura 6). La proteína expresada (con marcador His) fue luego purificada bajo condiciones nativas a través de cromatografía en columna Ni-NTA. Los marcadores fueron proteólicamente divididos y además purificados usando cromatografía en columna de sefrosa.

25

[0051] **Ejemplo 2: Efectos anti-fibróticos de IFN $\gamma$  mimético dividido y activo:** se evaluaron los efectos anti-fibróticos del péptido IFN $\gamma$  dividido mimético en fibroblastos NIH3T3 de ratón según se evaluó por inmunocitoquímica (coloración  $\alpha$ -SMA). En resumen, fibroblastos 3T3 fueron sembrados en placas de 24 pocillos en la densidad de  $6 \times 10^4$  células/pocillo, después de 24 horas, las células se mantuvieron en ayunas en 0,5% de FBS con medio durante toda la noche. Luego, las células fueron incubadas medio de inanición con compuestos diferentes (PDGF 50 ng/ml, TGF $\beta$  10 ng/ml, IFN $\gamma$  mimético 1 $\mu$ g/ml, 50ng/ml PDGF + 1 $\mu$ g/ml IFN $\gamma$  mimético y 10 ng/ml TGF $\beta$  + 1 $\mu$ g/ml IFN $\gamma$  mimético). Después de 48 horas de incubación, las células fueron lavadas, fijadas con etanol:acetona (1:1) y manchadas para  $\alpha$ -SMA (marcador de fibroblastos activados).

30

[0052] **Ejemplo 3: Estudio de fijación de BiPPB e IFN $\gamma$  mimético-BiPPB en células LX2 humanas:** se determinó la unión de BiPPB y mimético-BiPPB en células LX2 (HSCs humano). En resumen, las células LX2 fueron colocadas en placas de 48 pocillos en una densidad celular de  $3 \times 10^4$  células/pocillo. Después de 24 horas, las células fueron privadas de alimento en medio (FBS) durante toda la noche. Luego, las células fueron incubadas con diferentes compuestos (BiPPB, PPB-HSA y BiPPB-IFN $\gamma$  mimético) durante 2 horas a temperatura ambiente para la unión. Después de la unión, las células fueron extensivamente lavadas con PBS, fijadas con etanol:acetona (1:1) y manchadas para PPB. Los resultados se presentan en la figura 7.

40

[0053] **Ejemplo 4: Estudio del efecto *in vivo* en daño hepático inducido por CCl $_4$  agudo en ratones:** IFN $\gamma$  recombinante, IFN $\gamma$  mimético, IFN $\gamma$ -BiPPB de proteína de fusión recombinante y IFN $\gamma$  mimético-BiPPB de proteína de fusión recombinante se evaluaron por efectos anti-fibróticos en modelo de ratón con daño hepático inducido por CCl $_4$  agudo. El día 1, a los animales se les dio una dosis intraperitoneal única (1ml/kg) de tetracloruro de carbono (CCl $_4$ ) en aceite de oliva o aceite de oliva (controles n=6). Después de 24 horas de inyección de CCl $_4$ , en el día 2 y 3, los animales fueron tratados con PBS (n=6), 50.000 U/ratones de IFN $\gamma$  (n=6), 50.000 U/ratones de IFN $\gamma$  mimético (n=5), 50.000 U/ratones de IFN $\gamma$ -BiPPB (n=6), 50.000 U/ratones de IFN $\gamma$  mimético-BiPPB (n=6). Luego, el día 4, los animales fueron sacrificados y se realizaron recuentos de sangre y los efectos anti-fibróticos (véase Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb. J Hepatol. 2007 May;46(5):955-75) fueron evaluados utilizando PCR cuantitativo. Los resultados se presentan en las Figuras 8 y 9.

50

[0054] Los datos presentados en la Fig. 8 demuestran que mimético-BiPPB es más eficaz que el IFN $\gamma$  no modificado en la atenuación de la sobreexpresión del recuento de glóbulos blancos (WBC) y recuento de linfocitos (lym) en la sangre completa asociada a fibrosis hepática inducida por CCl $_4$  (p<0,01). En cambio, la reducción en el recuento de plaquetas (PLT) asociada al tratamiento con IFN $\gamma$  (que es un efecto adverso bien conocido por IFN $\gamma$ ) es menos severa cuando los animales reciben IFN $\gamma$  mimético-BiPPB en vez de IFN $\gamma$  no modificado (p< 0,0025).

55

[0055] Los datos presentados en la figura 9 muestran que IFN $\gamma$  mimético-BiPPB está dotado de actividad antifibrótica: atenúa la sobrerregulación inducida por CCl $_4$  de las metaloproteinasas matriciales (MMP13). La proporción MMP-13 frente a inhibidor de tejido de metaloproteinasas (TIMP1) es similar a la obtenida con IFN $\gamma$  nativo, pero mejor que IFN $\gamma$  mimético ( $p < 0,03$ ), indicando que el acoplamiento de Bi-PPB a IFN $\gamma$  mimético es beneficioso. Colectivamente los datos de la Fig. 8 y 9 muestran que IFN $\gamma$  mimético-BiPPB es más potente en comparación con el IFN $\gamma$  nativo y tiene menos efectos secundarios.

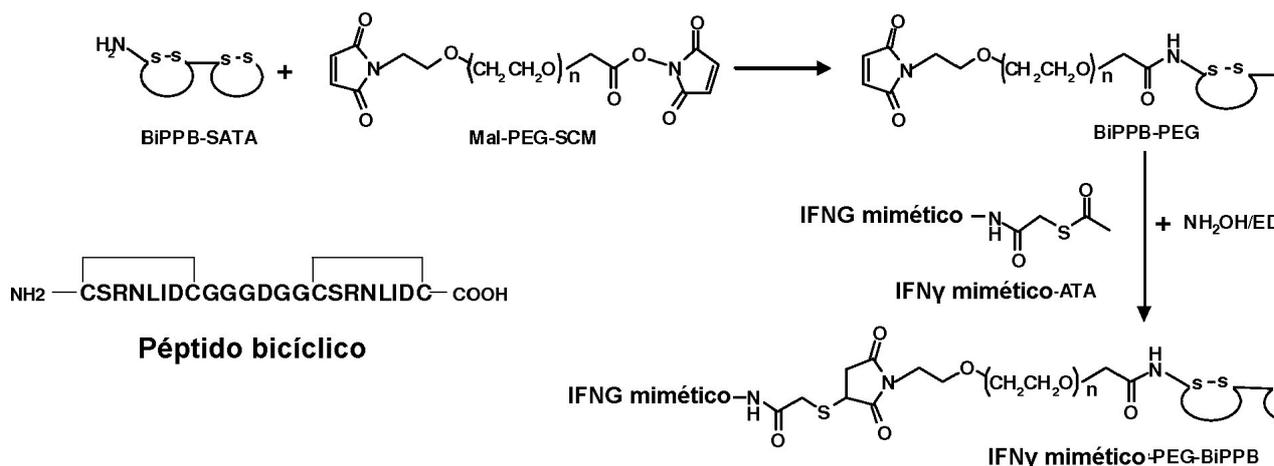
**Ejemplo 5:**

[0056] **Síntesis química de conjugados de interferón gamma mimético:** conjugado de IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB: 0,111  $\mu$ mol péptido de reconocimiento de PDGFR bicíclico (BiPPB, 2223,2 Da, Genosphere Biotechnologies) fue acoplado con 0,337  $\mu$ mol maleimida-PEG-succinimidil carboxi metil éster (Mal-PEG-SCM, 2 KDa, Creative PEGworks) durante 3 horas. Luego, lisina (0,337  $\mu$ mol) se añadió para bloquear grupos libres de Mal-PEG-SCM. Después de 1 hora de reacción, el producto sintetizado BiPPB-PEG-MAL (0,112  $\mu$ mol) fue reaccionado con 0,56  $\mu$ mol de IFN $\gamma$  mimético-ATA (4689 Da, Genosphere Biotechnologies) en presencia de reactivo de desacetilación durante toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, el conjugado de IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB sintetizado (8828,2 Da) fue extensivamente dializado contra PBS utilizando 7 KDa dia- $\alpha$ -lizador G2 cassetes de diálisis (Thermo scientific).

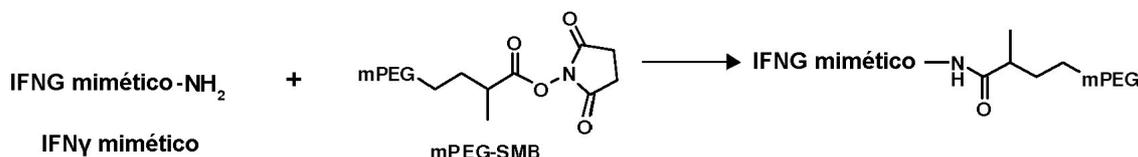
[0057] Conjugado de IFN $\gamma$  mimético-PEG: 0,107  $\mu$ mol IFN $\gamma$  mimético-ATA (4689 Da) fue reaccionado con 0,321  $\mu$ mol de poli (etilenglicol)-succinimidil  $\alpha$ -metilbutanoato (mPEG-SMB, 2 KDa, Nektar therapeutics) durante 2 horas y posteriormente el producto fue dializado extensivamente.

a) IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB

[0058]



b) IFN $\gamma$  mimético-PEG



**Ejemplo 6:**

**Efecto en parámetros fibróticos después de la administración intravenosa de IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB en el modelo de ratón con daño hepático agudo**

[0059] Análisis de parámetros fibróticos en el nivel de la proteína:  
 Los ratones fueron intraperitonealmente inyectados con CCl $_4$  en el día 1 para inducir daño hepático. El día 2 y 3, los ratones fueron tratados con IFN $\gamma$  (5  $\mu$ g/dosis), IFN $\gamma$  mimético-PEG, IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB (5 $\mu$ g/dosis) o PBS solo. El día 4, los animales fueron sacrificados; los hígados y diferentes órganos fueron recogidos para posterior análisis. Secciones de hígado fueron fijadas con acetona, secadas y rehidratadas con PBS. Luego, las secciones fueron incubadas anticuerpo primario (colágeno, SMA y desmina) durante 1 hora. Luego, las secciones fueron bloqueadas 0,03% de H $_2$ O $_2$  para actividad de peroxidasa endógena durante 30 min. Posteriormente, secciones fueron incubadas con anticuerpo anti-cabra de conejo conjugado con anticuerpo secundario HRP (1:100; DAKO) seguido de anticuerpo de

5 anticonejo de cabra conjugado con HRP (1:100, DAKO) durante 30 min. La actividad de peroxidasa fue desarrollada utilizando AEC (Sigma) durante 20 min y núcleos fueron contrateñidos hematoxilina (Fluka). Las secciones fueron montadas con gelatina Kaiser y visualizadas bajo el microscopio óptico (Olympus). Para análisis cuantitativo, 27 imágenes de microscopio fueron capturadas y áreas manchadas positivamente fueron cuantificadas utilizando el programa de formación de imágenes Cell D de Olympus. Los resultados se muestran en la figura 10

Análisis de parámetros fibróticos en el nivel de expresión génica:

10 [0060] ARN total de tejidos de hígado fue aislado utilizando un equipo RNeasy mini (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN fue cuantificada por un espectrofotómetro UV (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). El ARN total (1,6 µg) fue usado para transcripción inversa en volumen total de 50 µl con el equipo de síntesis de ADNc (Promega). Todos los cebadores fueron comprados de Sigma-Genosys (Haverhill, UK). 10 Ng de ADNc fue usado para análisis de PCR en tiempo real cuantitativo. Las reacciones fueron realizadas utilizando mezcla de RCP SYBR Green (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron analizadas por el sistema de detección de secuencia ABI 7900HT (Applied Biosystems). Finalmente, los números de ciclo de umbral (Ct) fueron calculados para cada gen y la expresión génica relativa fue calculada después de la normalización para la expresión del gen de referencia GAPDH. Los resultados se muestran en la figura 11. El análisis de los efectos adversos se representa en la figura 12.

## 20 Ejemplo 7:

**Efecto en los parámetros fibróticos después de la administración intravenosa de IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB en el modelo de ratón de fibrosis hepática avanzada establecido.**

25 Análisis de parámetros fibróticos en el nivel de la proteína:

30 [0061] Ratones balb/C machos (20-22g) fueron tratados con aceite de oliva o dosis en aumento de CCl<sub>4</sub> (semana 1: 0,5 ml/kg; semana 2: 0,8 ml/kg y semana 3-8: 1 ml/kg preparado en aceite de oliva) dos veces por semana por inyecciones intraperitoneales durante 8 semanas. En la semana 7 y 8, los ratones fueron tratados con PBS, IFN $\gamma$  mimético-PEG o IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB (5µg/ratón, tres veces por semana). Todos ratones fueron sacrificados en la semana 8; y muestras de sangre e hígado fueron recogidas para mediciones posteriores. Las secciones de hígado fueron manchadas para colágeno I y desmina, CD68, 33D1 y MHC de clase II. Se ha observado que la forma truncada dirigida de IFN $\gamma$  (IFN $\gamma$  mim-biPPB) indujo reducción sustancial en los parámetros fibróticos en este modelo de fibrosis hepática crónica en ratones; tanto el colágeno I como la coloración de desmina fue profundamente reducida en ratones de CCl<sub>4</sub> tratados con IFN $\gamma$  mim-biPPB en comparación con ratones CCl<sub>4</sub> no tratados. En cambio, el tratamiento con IFN $\gamma$  mim no dirigido, carente del sitio de unión al receptor, no indujo ningún efecto en estos parámetros mientras que el ratón de longitud total inducido por IFN $\gamma$  solo una reducción pequeña en el colágeno I y la coloración de desmina. El IFN $\gamma$  nativo (ratón) indujo la infiltración de células inflamatorias (CD68<sup>+</sup> macrófagos, neutrófilos, 33D1<sup>+</sup> células dendríticas) al igual que expresión de MHCII aumentada. En cambio, IFN $\gamma$  mim-biPPB no indujo esta respuesta inflamatoria aumentada en los hígados.

## 40 Ejemplo 8:

**El análogo de IFN $\gamma$  truncado dirigido al receptor de PDGF es activo pero provoca menos efectos secundarios.**

45 [0062] Un conjugado previsto de IFN $\gamma$  mimético químicamente acoplado a BiPPB fue sintetizado y caracterizado utilizando transferencia de Western y para sus efectos anti-fibróticos *in vitro* en los fibroblastos de ratón 3T3. *In vivo*, el conjugado dirigido fue examinado en modelos de fibrosis hepática de 4 días (agudo) y 8 semanas (crónico) inducidos con CCl<sub>4</sub> en ratones. Diferentes parámetros fibróticos e infiltración de células inflamatorias fueron evaluados en los hígados utilizando inmunohistoquímica y análisis de expresión génica.

50 [0063] Resultados: el conjugado exitosamente sintetizado provocó la inhibición de la expresión de colágeno en fibroblastos de ratón inducidos por TGFbeta. *In vivo*, el péptido mimético dirigido de IFN $\gamma$  (IFN $\gamma$  mim-biPPB) indujo la reducción sustancial en los parámetros fibróticos en ambos modelos de fibrosis hepática aguda y crónica en ratones. El tratamiento con IFN $\gamma$  mim no dirigido, que carece de un dominio de unión al receptor, no mostró ningún efecto y el IFN $\gamma$  de longitud total de ratón no modificado mostró solo una reducción moderada. Este IFN $\gamma$  de longitud total de ratón indujo infiltración de células inflamatorias (CD68<sup>+</sup> macrófagos, neutrófilos, 33D1<sup>+</sup> células dendríticas) al igual que aumentó la expresión de MHCII. En cambio, IFN $\gamma$  mim-biPPB no indujo una respuesta inflamatoria (datos no mostrados).

## 60 Ejemplo 9:

**Estudio con IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB en el modelo de tumor subcutáneo en ratones**

65 Materiales y métodos

[0064] Macho normal C57BL/6 y ratones Balb/C pesando de 20 a 25 g fueron obtenidos de Harlan (Zeist, Países Bajos). Se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 y recibieron una dieta *ad libitum* normal. Todos los protocolos experimentales para estudios animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la universidad de Groningen. Para inducir tumores subcutáneos, células C26 fueron cultivadas en 3 matraces de 125-mm un día antes de la inyección en animales para tenerlas en la fase de crecimiento. Las células fueron separadas por tripsinización, y la tripsina fue retirada por centrifugación. El granulado celular fue resuspendido en PBS. Un total de  $1 \times 10^6$  células (células B16 y C26) suspendidas en 100  $\mu$ l de PBS fueron inyectadas en el costado de los ratones Balb/C subcutáneamente. El crecimiento tumoral fue seguido de medición del tamaño del tumor utilizando un calibrador Vernier digital. El volumen tumoral fue establecido utilizando la fórmula:  $a \times b^2 / 2$ , donde a denota la longitud tumoral y b denota el ancho tumoral. Los tumores C26 fueron inducidos en ratones como se describe. El tratamiento se comenzó en el día 5 cuando el volumen tumoral alcanzó el rango de 50 a 100  $\text{mm}^3$  porque este tamaño tumoral ha demostrado ser un tamaño de tumor óptimo para el inicio del tratamiento. Animales (n=4 por grupo) fueron inyectados intravenosamente con seis dosis de vehículo (PBS), IFN $\gamma$  mimético-PEG (5  $\mu$ g/dosis), IFN $\gamma$  mimético-PEG-BiPPB (5  $\mu$ g/dosis) en días alternativos bajo anestesia ( $\text{O}_2$ /isoflurano). El tamaño tumoral fue medido bajo anestesia. Los animales con tumores C26 fueron sacrificados el día 20 porque no se observó ningún efecto del tratamiento. Los animales fueron sacrificados con anestesia de gas ( $\text{O}_2$ /isoflurano), y los tumores fueron aislados y fijados en isopentano frío para criosecciones.

[0065] Secciones de 4- $\mu$ m de espesor de criostato fueron preparadas a partir de tejido congelado rápidamente y manchadas para CD31 según los métodos de inmunoperoxidasa estándar. Se analizó la coloración de CD31 (marcador de células endoteliales) para la determinación del área de lumen de los vasos sanguíneos y la densidad de los vasos sanguíneos en secciones tumorales de tumores C26. Los resultados mostraron angiogénesis significativa en tumores no tratados y en tumores de ratones tratados con IFN $\gamma$  mimético, mientras que los ratones tratados con IFN $\gamma$  mimético-BiPPB mostraron una reducción fuerte en la angiogénesis en sus tumores (datos no mostrados).

#### **Ejemplo 10:**

##### **Efecto del IFN $\gamma$ truncado dirigido al receptor de PDGF en la fibrosis pulmonar.**

Antecedentes y fundamentos para las terapias basadas en pacientes con IPF:

[0066] La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es una enfermedad del pulmón parenquimal progresiva con una supervivencia media de solo 3-5 años tras el diagnóstico<sup>1,2</sup>. Además de la IPF, también otros tipos de fibrosis pulmonar tienen un mal pronóstico, en particular la neumonía intersticial no específica (NSIP) fibrosante y la fibrosis en fase final de por ejemplo diferentes enfermedades autoinmunes y alveolitis alérgica extrínseca. Actualmente no existen terapias eficaces para la fibrosis pulmonar debido a una falta de comprensión de los mecanismos de la enfermedad.

[0067] El (mio)fibroblasto tiene un papel central en todos los tipos de fibrosis de pulmón<sup>3</sup>. El daño continuo a los pulmones lleva al inicio de mecanismos de reparación desregulados con reclutamiento de fibroblastos y su transformación en miofibroblastos. Los miofibroblastos son las células efectoras clave en la fibrosis que producen cantidades excesivas de componentes de matriz extracelular tales como colágenos. Los miofibroblastos se cree actualmente que son el objetivo terapéutico más importante para el tratamiento de la fibrosis pulmonar<sup>3</sup>. Los factores de crecimiento clave en la proliferación y la transformación de los miofibroblastos son el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), y la endotelina-1 y muchas nuevas terapias se han centrado en la inhibición de estos factores o sus receptores. Sin embargo, la mayor parte de los ensayos clínicos basados en la modulación del comportamiento de los miofibroblasto han mostrado resultados decepcionantes<sup>1</sup>. El interferón gamma (IFN $\gamma$ ) es probablemente el mediador anti-fibrótico más estudiado en ensayos clínicos de IPF. Media la detención del crecimiento de los miofibroblasto y la apoptosis a través de una vía dependiente de STAT-1 (transductores de señal y activadores de transcripción-1), que es importante para la resolución de respuestas fibrogénicas<sup>4</sup>. A pesar de un inicio prometedor inicial, el gran ensayo INSPIRE llegó a la conclusión de que IFN $\gamma$  no prolongó la supervivencia<sup>5</sup>. IFN $\gamma$ , sin embargo, fue administrado subcutáneamente y dado que los receptores de IFN $\gamma$  se encuentran en casi todas las células del cuerpo, tiene efectos secundarios limitantes de la dosis graves. Estos incluyen enfermedad tipo gripe y fatiga<sup>5</sup>. La administración inhalada puede parcialmente circunvenir este problema y actualmente se ha registrado una prueba para el estudio de los efectos de IFN $\gamma$  en aerosol en la IPF (véase <http://clinicaltrials.gov>). Otra vía para aumentar la concentración de IFN $\gamma$  dentro de los miofibroblastos, y así la eficacia, es usar el concepto de focalización de fármaco: los fármacos se acoplan para portadores farmacológicos selectivos de células que son absorbidos específicamente por células diana, los fármacos se liberan dentro de esas células reduciendo así los efectos secundarios sistémicos mientras que logran altas concentraciones locales en las células diana. Los miofibroblastos, por ejemplo, sobreexpresan específicamente los receptores de PDGF que se pueden usar para fines de focalización de fármaco<sup>6</sup>.

[0068] Aunque  $\text{CCl}_4$  induce la fibrosis hepática, los pulmones también tienen baja expresión de actividad de citocromo P450 y  $\text{CCL}_4$  (que se vuelve compuesto tóxico por esta enzima) es por lo tanto también ligeramente activado en el tejido pulmonar. Esto lleva a la activación de células profibróticas que a su vez expresan el receptor de PDGF, que inicia la actividad profibrótica. Este modelo se ha usado como un modelo de fibrosis pulmonar idiopática (IPF, véase la ref. 8 y 9). Mientras se exploran los efectos antifibróticos de IFN $\gamma$  en el tejido de hígado, un cambio significativo en el tejido de pulmón fue apreciado por los examinadores. El peso de los pulmones de los ratones tratados con  $\text{CCl}_4$  fue

significativamente superior a los pulmones de los ratones normales ( $0,75 \pm 0,05$  % de peso corporal en los normales frente a  $2,03 \pm 0,15$  % de peso corporal en los ratones no tratados con  $\text{CCl}_4$ ;  $P < 0,01$ ) aún este aumento fue significativamente reducido por el tratamiento con PPB-PEG-IFN $\gamma$  ( $1,53 \pm 0,11$  % de p. c.;  $P < 0,05$  vs ratones no tratados con  $\text{CCl}_4$ ). El examen microscópico reveló que los pulmones de los ratones tratados con  $\text{CCl}_4$  estaban afectados por alveolitis difusa, una condición que puede preceder a la fibrosis, y los pulmones mostraron una tinción de colágeno mejorada. Cuando estos ratones fueron tratados con IFN $\gamma$  acoplado a péptidos de reconocimiento del receptor de PDGF, se encontró una alveolitis significativamente reducida en los pulmones y una deposición de colágeno reducida. Cabe destacar que estos efectos beneficiosos de IFN $\gamma$  dirigido se lograron después de establecer la enfermedad pulmonar.

[0069] Por lo tanto se concluye el IFN $\gamma$  dirigido al receptor de PDGF es capaz de acumular en cualquier tejido con significativa expresión de receptor de PDGF $\beta$ , y es capaz de ejercer un efecto antifibrótico en otros tejidos al igual que el ilustrado por su efecto en los pulmones. Los análogos de IFN $\gamma$  de la invención pueden así utilizarse para el tratamiento de la fibrosis idiopática y otras formas de fibrosis o esclerosis en otros tejidos caracterizados por expresión mejorada del receptor de PDGF.

**Ejemplo 11:**

**Objetivo de IFN $\gamma$  truncado para varios receptores**

[0070] En este experimento se muestra que un análogo de la invención que comprende la fracción de señalización de IFN $\gamma$  murino (IFN $\gamma$  mim) y un dominio de selección de superficie celular puede ser eficazmente dirigido no solo al receptor de PDGF sino también a otros receptores de superficie celular. Los dominios de selección ejemplares evaluados incluyen lactosa (ligando para la asialoglicoproteína (ASGP)), manosa (ligando para el receptor de manosa (CD 206) y el tripéptido RGD (ligando para el receptor  $\alpha\beta 3$  receptor de integrina). La secuencia de IFN $\gamma$  mim consistió en FEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLRKRKRSR. Varios tipos de células y parámetros diferentes para el análisis de la actividad de IFN $\gamma$  usados en el estudio. Las muestras de control fueron expuestas a INN $\gamma$  intacto murino. Para detalles véase la tabla por debajo.

Análogo de IFN $\gamma$	Receptor diana	Células usadas	Parámetro medido (detalles ver texto)	Resultados
Lactosa-HSA-PEG-IFN $\gamma$ mim	Receptor de asialoglicoproteína(ASGP)	Hepatocitos humanos (HepG2)	Expresión de ICAM 1	Expresión mejorada vs INF $\gamma$ control
Mannosa-HSA-PEG-mimIFN $\gamma$	Receptor de manosa (CD 206)	Macrófagos RAW de ratón	Expresión de MHC II	Expresión igual vs INF $\gamma$ control
RGD-PEG-IFN $\gamma$ mim	Receptor de $\alpha\beta 3$	Células endoteliales	Ensayo de angiogénesis <i>in vitro</i>	Efectividad mejorada vs INF $\gamma$ control

Experimentos con Lactosa-HSA-PEG-IFN $\gamma$ .

Síntesis

[0071] Lactosa-HSA (25 moléculas de lactosa acopladas a albúmina de suero humano) fue conjugada a la molécula bifuncional de PEG (2KDa). Tras la diálisis, lactosa-HSA-PEG fue acoplado a IFN $\gamma$  truncado modificado por SATA derivado de ratón. El producto sintetizado (Lac-HSA-PEG-IFN $\gamma$ mim) fue extensivamente dializado contra PBS.

Experimento en hepatocitos humanos:

[0072] Hepatocitos humanos (HepG2) fueron colocados en placas de 12 pocillos ( $1 \times 10^5$  células/pocillo). Las células se dejaron crecer en incubadora de 5%/37°C/CO $_2$ . Posteriormente, las células fueron incubadas con medio, IFN $\gamma$  de ratón (1ug/ml), IFN $\gamma$  humano (1ug/ml), Lac-HSA-PEG-IFN $\gamma$  derivado de IFN $\gamma$  de ratón (1ug/ml), Lac-HSA o Lac-HSA-PEG-IFN $\gamma$  (1ug/ml) después de 2 horas de bloqueo con Lac-HSA. Después de 24 horas de incubación, las células fueron lisadas, el ARN fue aislado y transcrito inversamente. El ADNc fue usado para el análisis de expresión de molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1), que se conoce por ser inducido en respuesta a IFN $\gamma$ . 18srRNA se usó un control de limpieza.

Resultados:

[0073] Como era de esperar, ni IFN $\gamma$  truncado de ratón ni Lac-HSA indujo la expresión de ICAM1 en hepatocitos humanos, mientras que tanto IFN $\gamma$  como Lac-HSA-PEG-IFN $\gamma$  derivado de ratón sobrerreguló la expresión de ICAM1 en hepatocitos humanos. Además, la expresión de ICAM1 inducida por Lac-HSA-PEG-IFN $\gamma$  fue casi completamente bloqueada por exceso de Lac-HSA.

## Conclusiones:

5 [0074] La especificidad de especies de IFN $\gamma$  fue confirmada al mostrar que IFN $\gamma$  (truncado) de ratón era inefectivo en hepatocitos humanos. Sin embargo, esta citocina se convirtió en un compuesto bioactivo en células humanas después del acoplamiento a la lactosa de fracción diana, que se conoce por introducir hepatocitos vía el receptor de asialoglicoproteína (ASGP). La especificidad para el receptor de ASGP fue mostrada por bloqueo de este receptor por Lac-HSA. Esto demuestra que la parte de señalización de IFN $\gamma$  (que no es específica de especies) se puede entregar en el citoplasma de otras células diana que no sean fibroblastos vía otro receptor diana que no sea el receptor de PDGF utilizando una fracción de azúcar en lugar de un péptido. La selección de hepatocitos es particularmente pertinente para el tratamiento de la hepatitis B y C y la sobreexpresión de ICAM-1 es una respuesta fisiológica para mejorar la actividad antiviral. Este experimento sostiene el uso de IFN $\gamma$  truncado específico de célula según la invención como un compuesto antiviral.

15 [0075] De forma similar, la manosa fue acoplada a IFN $\gamma$  de ratón truncado según técnicas estándar (L. Beljaars *et al* J. of Hepatology 29: 579-588, 1998) y la bioactividad de este IFN $\gamma$  manosilado fue demostrada en los macrófagos de ratón con expresión de MHC de clase II como parámetros de lectura (métodos de rtPCR).

20 [0076] El péptido de unión endotelial RGD- o su péptido de control RAG, que no enlaza a estas células, fueron también acoplados a IFN $\gamma$  de ratón truncado según métodos estándar. Los análogos resultantes fueron evaluados para su actividad biológica en cultivos de células endoteliales (H5V) midiendo la formación de tubo que es un parámetro que refleja la angiogénesis. La formación de tubo por células H5V fue inhibida más potentemente por RGD-IFN $\gamma$ mim en este ensayo (datos no mostrados).

25 [0077] Conclusiones: la modificación de IFN $\gamma$  truncado de ratón por conjugación a una fracción de selección (por ejemplo un oligosacárido o péptido) se puede realizar sin perturbar la bioactividad de la parte de señalización de esta citocina. La entrega de un análogo de IFN $\gamma$  que es defectuosa en la unión a su receptor natural pero que en cambio puede enlazar a un receptor de superficie celular diferente mediando la asimilación celular del análogo permite usos terapéuticos más eficaces con menos efectos secundarios.

## 30 Referencias

[0078]

- 35 1. du Bois RM. Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Drug Discov*;9(2):129-40.
2. Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol* 2009;2(2):103-21.
- 40 3. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* 2007;132(4):1311-21.
4. Bonner JC. Mesenchymal cell survival in airway and interstitial pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*;3:15.
- 45 5. King TE, Jr., Albera C, Bradford WZ, *et al*. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009;374(9685):222-8.
- 50 6. Beljaars L, Weert B, Geerts A, Meijer DK, Poelstra K. The preferential homing of a platelet derived growth factor receptor-recognizing macromolecule to fibroblast-like cells in fibrotic tissue. *Biochemical pharmacology* 2003;66(7):1307-17.
7. Homma S, Nagaoka I, Abe H, *et al*. Localization of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor I in the fibrotic lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(6 Pt 1):2084-9.
- 55 8. Paakko P, Anttila S, Sormunen R, *et al*. Biochemical and morphological characterization of carbon tetrachloride-induced lung fibrosis in rats. *Arch Toxicol* 1996;70(9):540-52.
9. Mizuguchi S, Takemura S, Minamiyama Y, *et al*. S-allyl cysteine attenuated CCl<sub>4</sub>-induced oxidative stress and pulmonary fibrosis in rats. *Biofactors* 2006;26(1):81-92.

60 **Ejemplo 11:****Estudio de unión de BiPPB a células cultivadas o primarias recientemente aisladas**

65 [0079] Este ejemplo muestra que Bi-PPB bien producidas químicamente o a través de técnicas recombinantes específicamente se enlazan al receptor de PDGFB. La especificidad receptora es demostrada por el bloqueo de la unión

con anticuerpos de receptor de antiPDGF-β específicos. BiPPB es no específico de especies ya que enlaza a células de rata, ratón y humano tipo mio-fibroblasto. La interacción con el receptor requiere al menos dos péptidos cíclicos, ya que la forma monocíclica no enlaza con el receptor diana.

5 Secuencia de BiPPB:

[0080] C(1)SRNLIDC(1)GGGDGGC(2)SRNLIDC(2): ciclizaciones de puente disulfuro Cys(1)-Cys(1) y Cys(2)-Cys(2)

Métodos:

10

[0081] La unión de BiPPB fue realizada en las células estrelladas hepáticas de rata aisladas recientemente primarias. Las células fueron sembradas en placas de 8 pocillos de cristal (Lab-Tek, Nunc, Naperville, IL) en 30.000 células/pocillo en el medio de cultivo. Después de la incubación durante toda la noche a 37°C/5%CO<sub>2</sub>, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente incubadas con PPB (monocíclico) etiquetado con FITC o BiPPB (bicíclico: 10 µg/ml) a temperatura ambiente. Para bloquear la unión, anti-PDGF-βR IgG se añadió a las células 1h antes del PPB acoplado aFITC o BiPPB. Después de 2 h, las células fueron lavadas de 3 a 4 veces con PBS frío y fijadas con 4% de paraformaldehído. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI y montado en citifluor (reactivo antidecoloración) y visualizados bajo microscopio fluorescente.

15

20

[0082] Experimentos de unión similares fueron realizados en miofibroblastos de humano recientemente aislados primarios, fibroblastos de ratón 3T3 y células estrelladas hepáticas humanas (LX2). Para células estrelladas hepáticas humanas, la secuencia de BiPPB fue de la siguiente manera:

C(1)S R N L I D C(1) K G S G S G G C(2)S R N L I D C(2):

25

ciclizaciones de puente disulfuro Cys(1)-Cys(1) y Cys(2)-Cys(2)

[0083] Resultados: el PPB monocíclico acoplado a FITC no mostró ninguna unión ya que el receptor de PDGF requiere interacción dimérica. BiPPB acoplado a FITC mostró unión significativa al tipo de célula evaluada, que fue casi completamente bloqueado por el anticuerpo del receptor de PDGF, mostrando la especificidad del receptor de la unión a estas células (datos no mostrados).

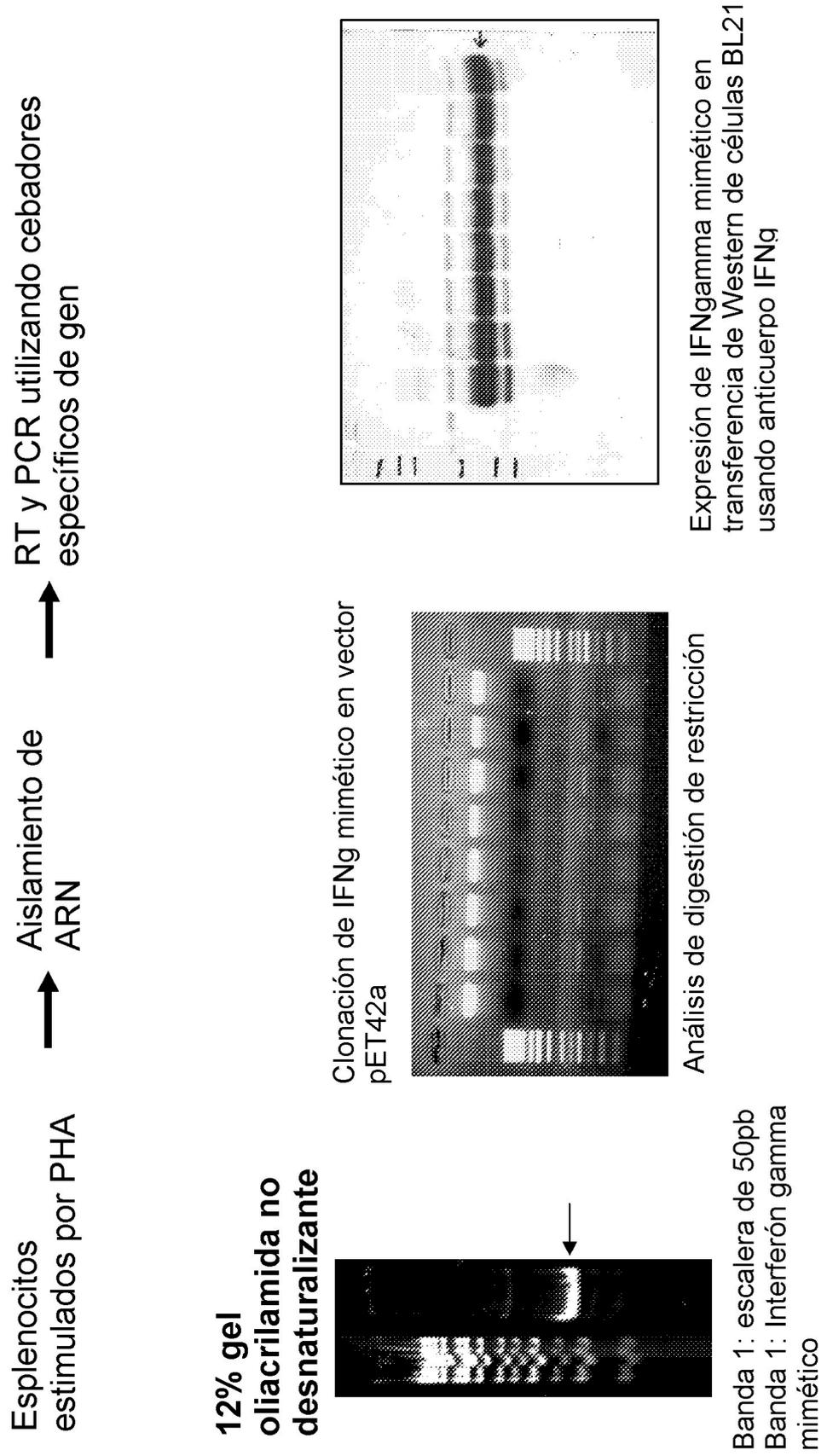
30

## REIVINDICACIONES

1. Análogo de interferón gamma (IFN $\gamma$ ), donde la fracción que media la unión a su receptor natural está al menos funcionalmente interrumpida y donde el análogo comprende una fracción de señalización capaz de mediar la actividad de IFN $\gamma$  intracelular, donde la fracción de señalización comprende en el extremo C-terminal del análogo una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 (a) la secuencia de aminoácidos KFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLKRKRKRSR;  
 (b) la secuencia de aminoácidos YSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPAAKTGKRKRSQ;  
 (c) una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 90% de identidad con (a) o (b) siempre que la actividad de señalización intracelular se mantenga;  
 10 (d) la secuencia de aminoácidos (a) o (b) donde como mucho 5 residuos de aminoácidos son eliminados, adicionados o sustituidos, siempre que la actividad de señalización, por ejemplo translocación nuclear, se mantenga;  
 (e) la secuencia de consenso  
 15 Vxxxx[V/I]Q[R/H][Q/K]A[F/V/I][N/H]ELI[R/Q] Vx[H/A][Q/E]L[L/S]P[E/A][S/A][S/A][L/K]xxKRKRS donde x es cualquier residuo de aminoácido; y  
 (f) la secuencia Xaa<sup>1</sup>Xaa<sup>2</sup>Xaa<sup>3</sup>Xaa<sup>4</sup> Val Xaa<sup>5</sup> Xaa<sup>6</sup> Xaa<sup>7</sup> Xaa<sup>8</sup> Xaa<sup>9</sup> Gln Xaa<sup>10</sup> Xaa<sup>11</sup> Ala Xaa<sup>12</sup> Xaa<sup>13</sup> Glu Leu Ile Xaa<sup>14</sup> Val Xaa<sup>15</sup> Xaa<sup>16</sup> Xaa<sup>17</sup> Leu Xaa<sup>18</sup> Pro Xaa<sup>19</sup> Xaa<sup>20</sup> Xaa<sup>21</sup> Xaa<sup>22</sup> Xaa<sup>23</sup> Lys Arg Lys Arg Ser Xaa<sup>24</sup> Xaa<sup>25</sup>, donde Xaa<sup>1</sup>, Xaa<sup>2</sup>, Xaa<sup>3</sup> Xaa<sup>4</sup> Xaa<sup>6</sup> Xaa<sup>11</sup>, Xaa<sup>13</sup>, Xaa<sup>14</sup>, Xaa<sup>16</sup> Xaa<sup>17</sup>, Xaa<sup>18</sup> Xaa<sup>19</sup> Xaa<sup>20</sup> Xaa<sup>21</sup> Xaa<sup>22</sup> Xaa<sup>23</sup> Xaa<sup>24</sup> y Xaa<sup>25</sup> es cualquier residuo de aminoácido Xaa<sup>5</sup> es Asn o Thr  
 20 Xaa<sup>7</sup> es Pro o Leu  
 Xaa<sup>8</sup> es Gln o Asn  
 Xaa<sup>9</sup> Val, Ile o Leu  
 Xaa<sup>10</sup> es Arg, His o Lys  
 25 Xaa<sup>12</sup> es Phe, Val o Ile  
 Xaa<sup>15</sup> es Val, Ile o Met  
 dicha fracción de señalización está provista en su N-término, opcionalmente vía un enlazador, con al menos un dominio de selección capaz de unión a un receptor de superficie celular diferente del receptor de IFN $\gamma$ , donde dicho dominio de selección puede enlazar con el receptor de PDGF $\beta$ , el receptor de manosa6-fosfato/factor-II de crecimiento tipo insulina (M6P/ IGF2R), el receptor de asialoglicoproteína (ASGP) o el receptor de manosa (CD 206).
2. Análogo según la reivindicación 1, donde la fracción de señalización comprende la secuencia de aminoácidos KFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLKRKRKRSR o YSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPAAKTGKRKRSQ.
- 35 3. Análogo según la reivindicación 1 o 2, donde el dominio de selección es el péptido de adhesión celular RGD.
4. Análogo según la reivindicación 1 o 2, donde el dominio de selección es un oligosacárido, preferiblemente manosa(-6-fosfato) o lactosa, conjugado a una molécula portadora.
- 40 5. Análogo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el dominio de selección comprende dos copias de la secuencia de aminoácidos X<sub>1</sub>SRNLIDX<sub>2</sub>, donde X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> indican fracciones que juntas pueden formar un enlace (peptídico) de manera que se forme una estructura cíclica donde la secuencia SRNLID es parte del anillo y donde las dos copias están separadas por una secuencia enlazadora de 2 a 7 aminoácidos.
- 45 6. Análogo según la reivindicación 5 donde el dominio de selección comprende la secuencia de aminoácidos CSRNLIDC-enlazador-CSRNLIDCS, donde el enlazador es una secuencia de aminoácidos de 3 a 7, preferiblemente 4 o 5, residuos de aminoácidos.
- 50 7. Análogo según la reivindicación 5 o 6, donde el enlazador se selecciona del grupo que consiste en (i) las secuencias K(GS)<sub>m</sub>GG donde m es 1 o 2 y (ii) las secuencias de la fórmula general [G<sub>n</sub>D<sub>m</sub>] donde n+m es de 4 a 7, donde n  $\geq$  4 y M un número entero entre 0 y 3.
- 55 8. Análogo según la reivindicación 7, donde el dominio de selección consiste en o comprende la secuencia CSRNLIDCGGGDGGCSRNLIDC, CSRNLIDCGGGDGGCSRNLIDC, CSRNLIDCGDDGGCSRNLIDC o CSRNLIDCGGGGGGCSRNLIDC.
9. Conjugado que comprende un compuesto de interés conjugado a un dominio de selección, dicho dominio de selección comprende la secuencia de aminoácidos X<sub>1</sub>SRNLIDX<sub>2</sub>-enlazador-X<sub>3</sub>SRNLIDX<sub>4</sub>, donde el par de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> y el par de X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> pueden formar un enlace, preferiblemente un enlace peptídico, de manera que se forme una estructura bicíclica donde las secuencias SRNLID forman cada una parte de un anillo, y donde el enlazador es una secuencia de aminoácidos de 2 a 7, preferiblemente de 3 a 5, residuos de aminoácidos.
- 60 10. Análogo o conjugado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, provisto de al menos un polímero no-antigénico, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicoles y derivados de los mismos.
- 65

11. Secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un análogo proteináceo o conjugado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 5 12. Vector de expresión que incluye una secuencia de ácidos nucleicos aislada según la reivindicación 11.
13. Célula huésped que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 11 o un vector según la reivindicación 12, preferiblemente donde dicha célula huésped es una célula bacteriana o mamífera huésped.
- 10 14. Composición farmacéutica que incluye un análogo o conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un portador, adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 15. Uso de un análogo o conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad seleccionada de cáncer, enfermedad fibrótica y enfermedad esclerótica.
- 20 16. Análogo o conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad seleccionada de cáncer, enfermedad fibrótica y enfermedad esclerótica.
17. Análogo o conjugado según la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de una enfermedad hepática, preferiblemente una enfermedad hepática crónica tal como la cirrosis hepática.

Figura 1



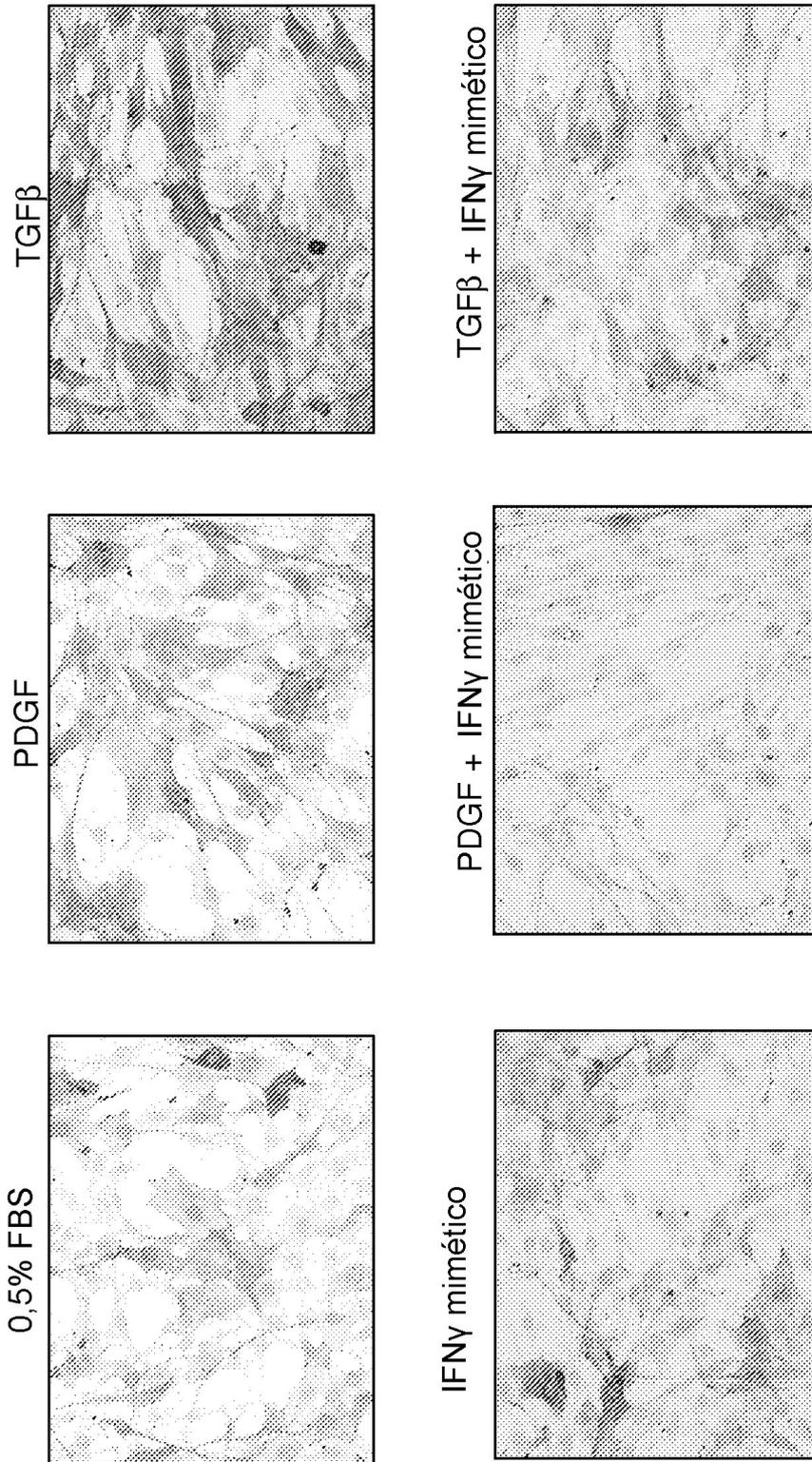
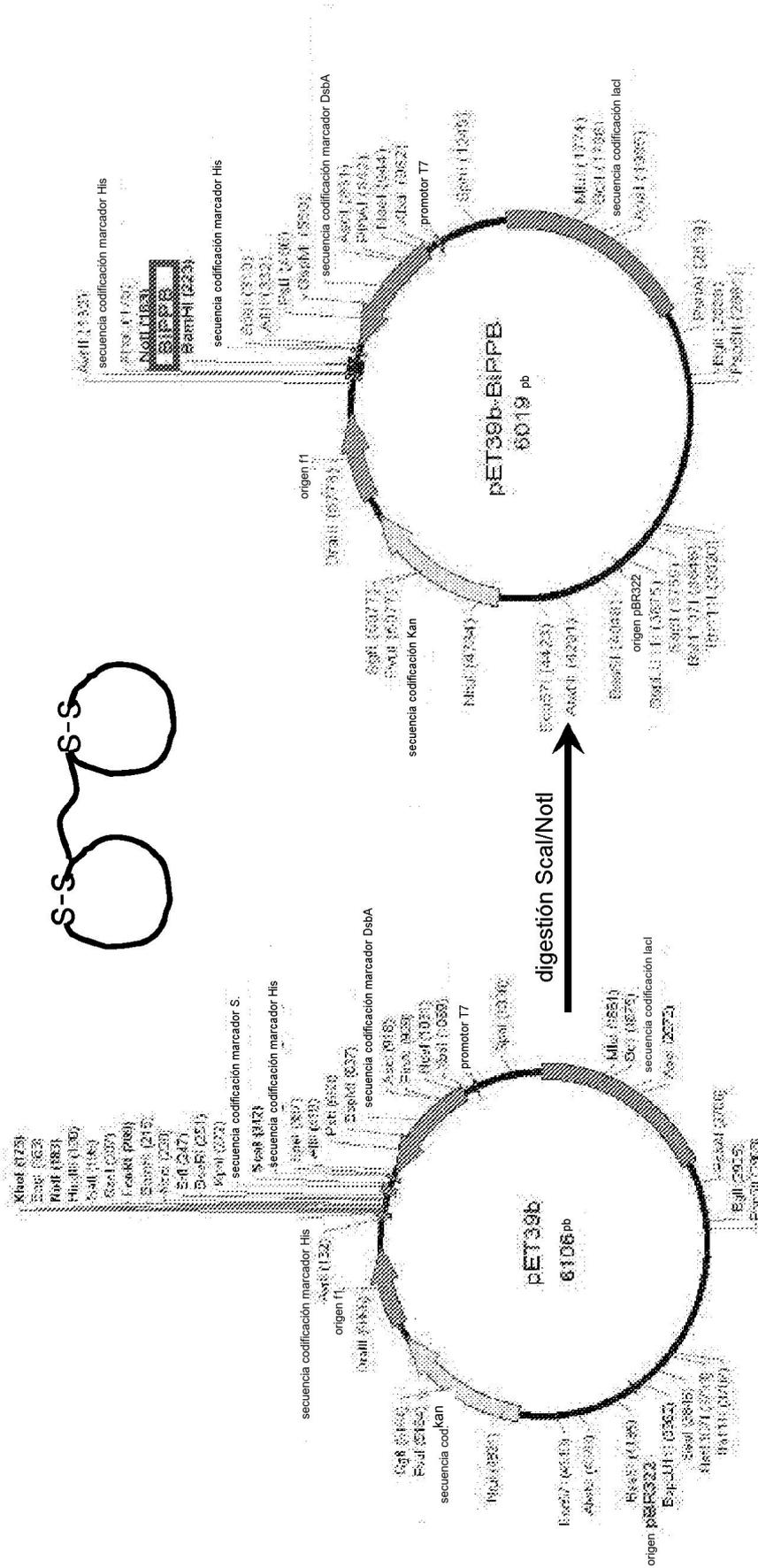


Figura 2

Figura 3



secuencia BIPPB (23 aminoácidos)

cys ser arg asn leu ile asp cys lys gly ser gly ser gly cys ser arg asn leu ile asp cys \*  
 TGT TCG CCG AAC CTC ATC GAT TGT AAG GGA TCC GGA GGT TGT TCA CGT AAT CTA ATA GAT TGT GAT TGT TTA

Figura 4

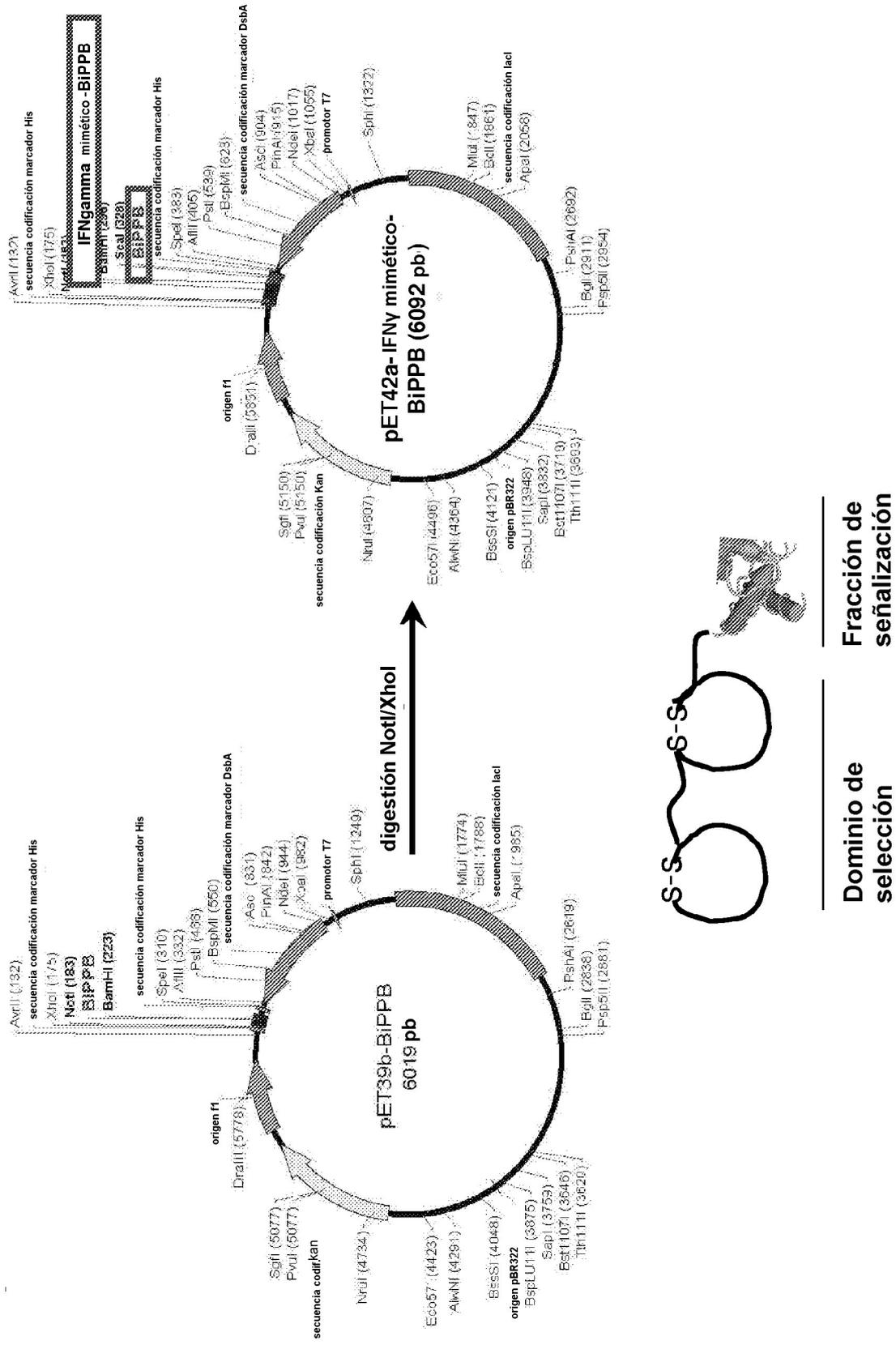


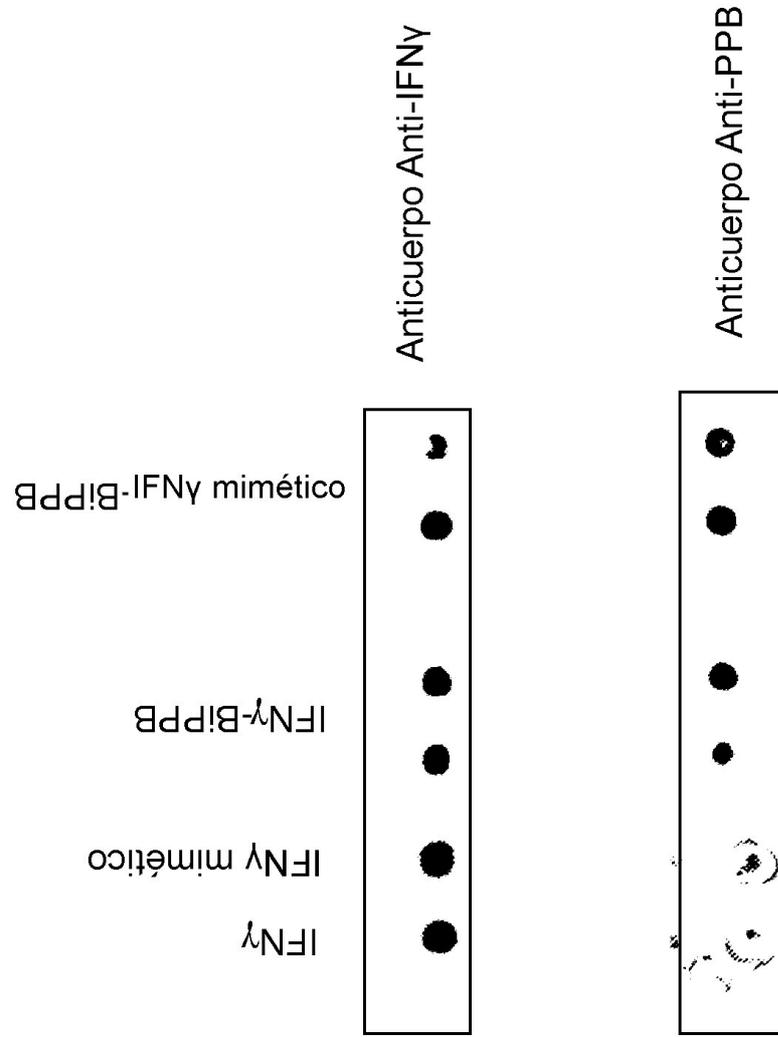
Compueto de interés

---

Dominio de selección

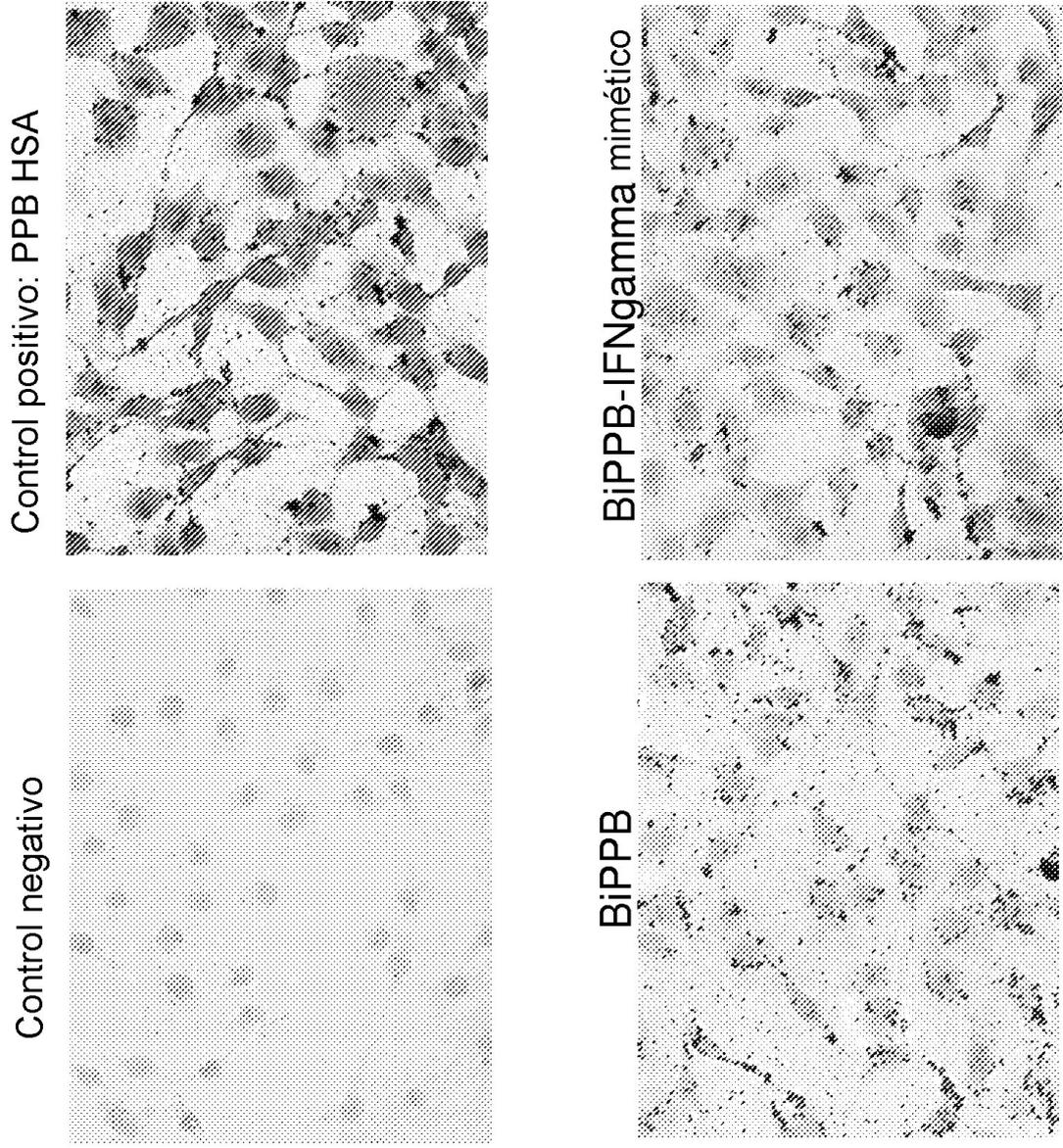
Figura 5





**Figura 6**

Figura 7



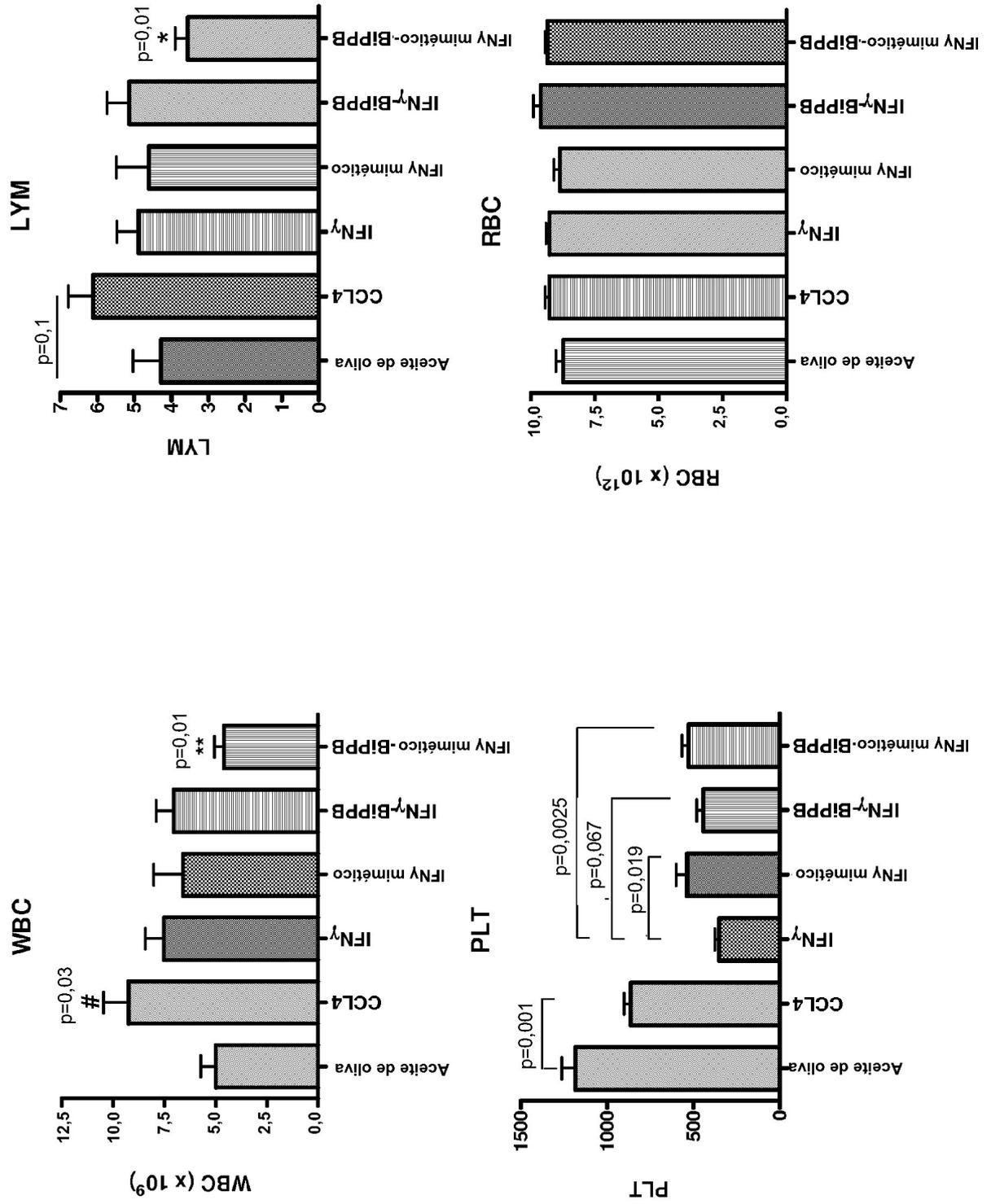


Figura 8

Figura 9

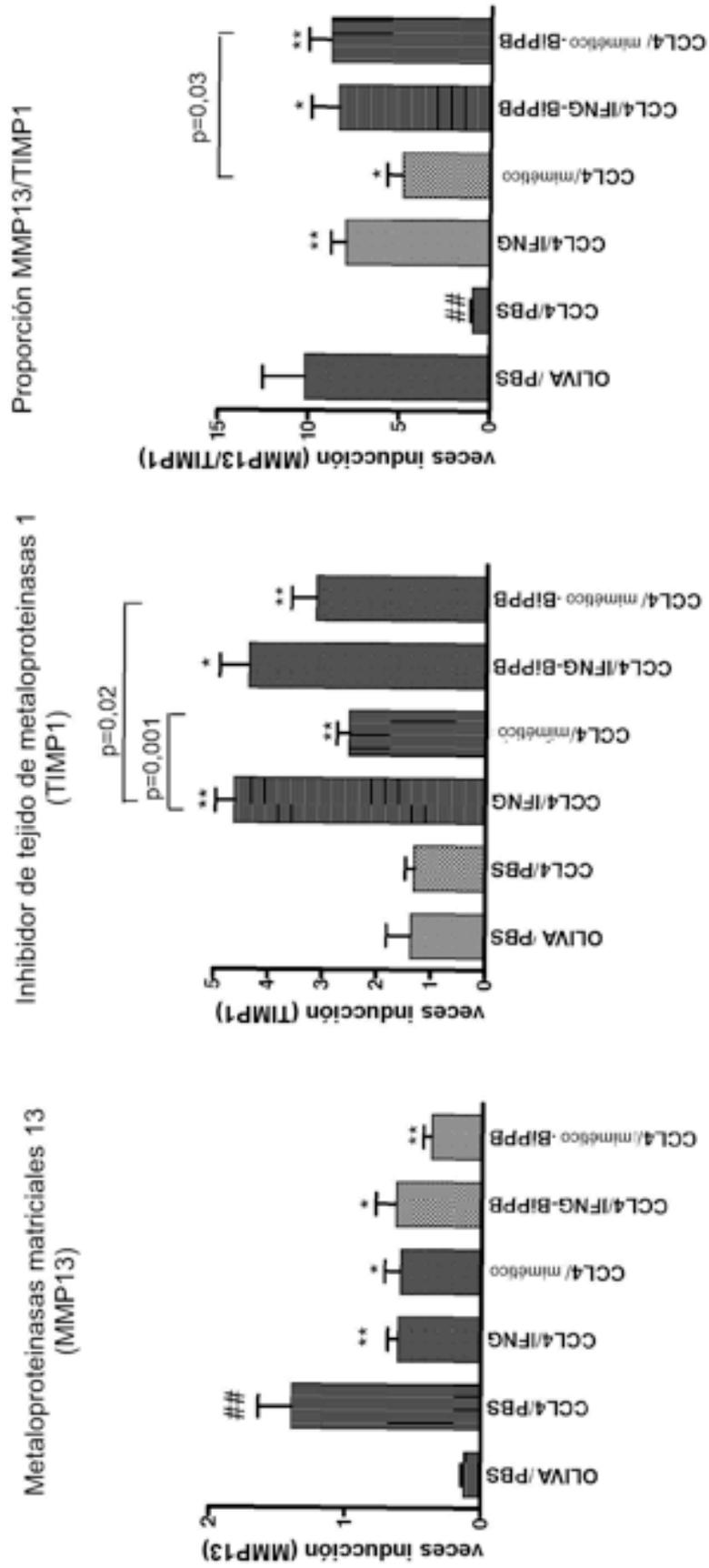


Figura 10

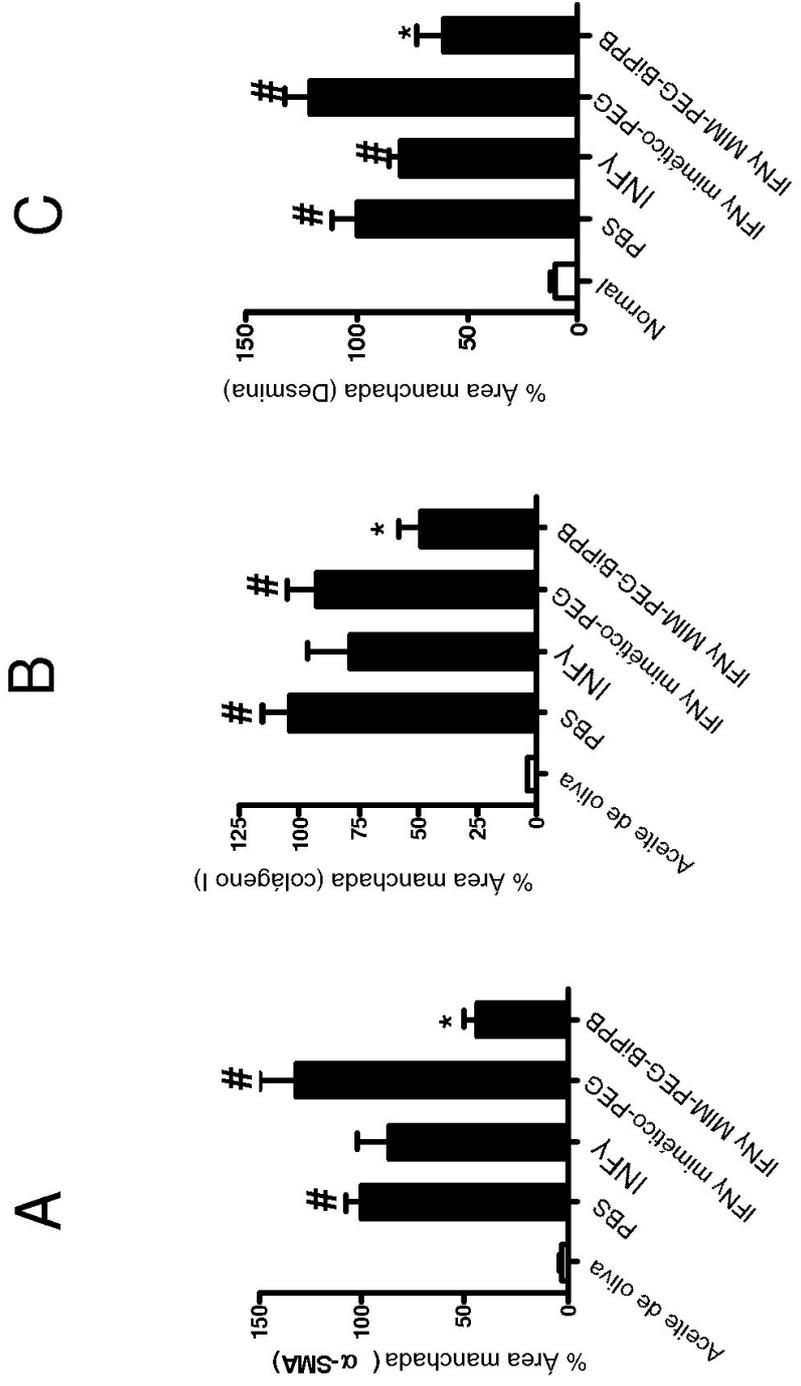


Figura 11

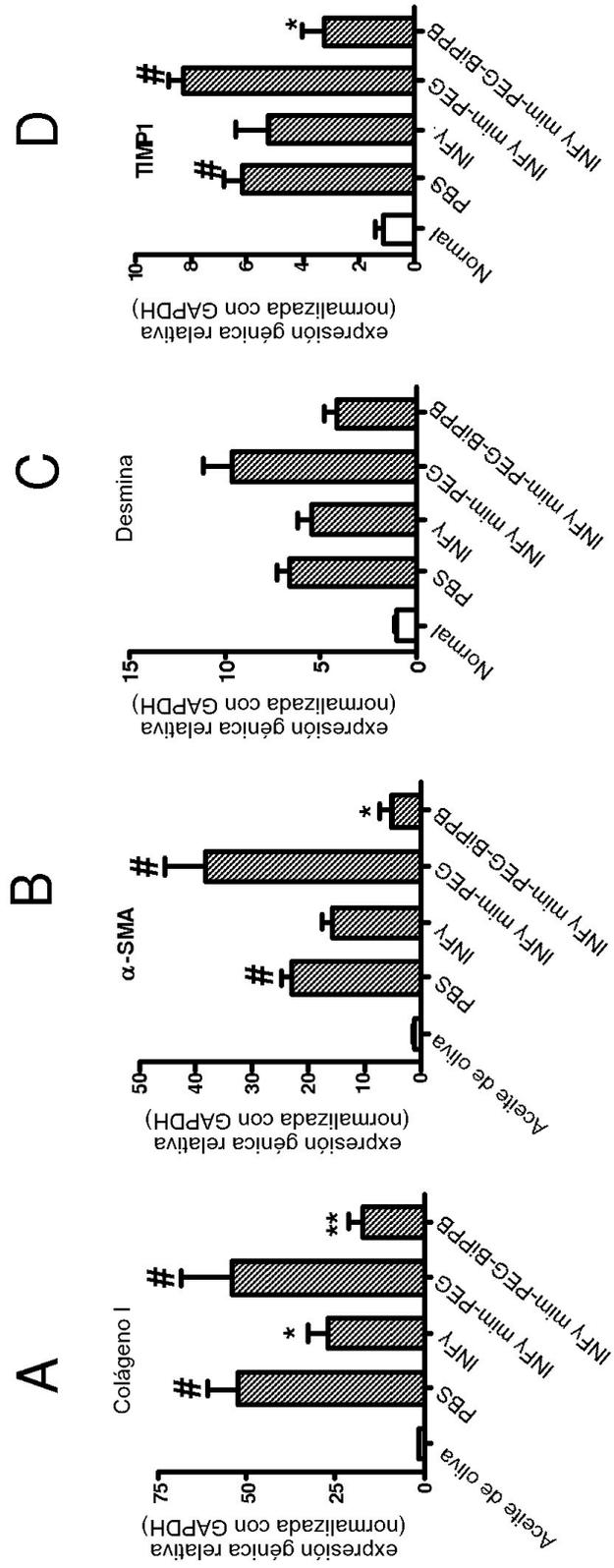


Figura 12

