

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 465**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2010 PCT/CU2010/000005**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO11063770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2010 E 10803437 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2505206**

54 Título: **Polipéptidos inmunomoduladores derivados de IL-2 y su uso terapéutico contra el cáncer e infecciones crónicas**

30 Prioridad:

27.11.2009 CU 20090203

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

23.11.2017

73 Titular/es:

**CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CIM)
(100.0%)**

**Calle 216 sq. 15 Atabey Playa Habana
11600 Ciudad de la Habana, CU**

72 Inventor/es:

**LEÓN MONZÓN, KALET;
CARMENATE PORTILLA, TANIA;
GARCÍA MATÍNEZ, KARINA;
LAGE DÁVILA, AGUSTÍN BIENVENIDO;
PÉREZ RODRIGUEZ, SAUMEL;
GONZÁLEZ ROCHE, DIAMILE y
MÁRQUEZ PERERA, GABRIEL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 643 465 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

Polipéptidos inmunomoduladores derivados de IL-2 y su uso terapéutico contra el cáncer e infecciones crónicas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología y particularmente a la inmunología. La invención se refiere a soluciones técnicas con aplicaciones terapéuticas para la salud humana. Se refiere en particular a la modulación terapéutica del sistema inmune utilizando análogos de moléculas naturales.

10

Estado de la técnica

La interleuquina 2 (IL-2) fue el primer factor de crecimiento descrito para las células T. Desde su descubrimiento mostró una fuerte capacidad para promover la proliferación y supervivencia de células T *in vitro* (Smith, KA (1988) Science 240, 1169-76) y para mejorar la respuesta inmune de las células T *in vivo*, en el contexto de infecciones vírales (Blattman, JN 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, CT, et al., (2007) Immunol Lett., 114, 86-93). Sin embargo, este papel clásico de la IL-2 como promotor de la respuesta inmunitaria T ha sido cuestionado recientemente por numerosos datos experimentales (Almeida, AR, 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 que esta citoquina es un factor de crecimiento homeostático para la regulación natural de células T CD4+CD25+FoxP3+ (Tregs).

La interleuquina 2 es un actor principal en el mecanismo mediante el cual las células T reguladoras suprimen la actividad y la expansión de otras células efectoras tales como células T auxiliares CD4, células T citotóxicas CD8 y células NK. Específicamente, se ha propuesto recientemente que las células T reguladoras suprimen a otras células T, induciendo la disminución local en los niveles de IL-2 (Pandiyán, P., et al., (2007) Nat Immunol, 8, 1353-62). Este efecto supresor se basa en: a) su capacidad para inhibir directamente la producción de IL-2 por las células T efectoras que suprimen: (Almeida, AR, et al., (2002) J Immunol 169, 485060; Takahashi, T et al., (1998) Int. Immunol., 10, 1969-80; Thornton, AM, et al., (1998) J Exp Med. 188, 287-96; Wolf, M., et al., (2001) Eur J Immunol., 31, 1637-45); b) la capacidad de consumir rápida y eficientemente la IL-2 en su microambiente (Pandiyán, P., et al., (2007) Nat Immunol., 8, 1353-62); y c) su capacidad para sobreexpresar el receptor de la cadena alfa de IL-2 (Kuniyasu, Y., et al., (2000) Int Immunol. 12, 1145-55), que les permite usar la IL-2 más eficientemente cuando sus concentraciones son bajas.

Resumiendo, la IL-2 es una citoquina altamente pleiotrópica que es muy significativa para la actividad biológica de diferentes poblaciones celulares. Esta propiedad hace que la IL-2 sea un nodo importante en la regulación de la respuesta inmune, convirtiéndola en un objetivo atractivo y complejo para las terapias de modulación inmune. En particular, la naturaleza pleiotrópica de la acción de esta citoquina, la hace muy significativa para el diseño de estrategias terapéuticas que modulan de manera selectiva /preferencial la actividad de esta citoquina en diferentes poblaciones celulares.

La IL-2 se ha utilizado durante varios años en la terapia del cáncer. En particular, su uso en dosis altas es un tratamiento aprobado en varios países para el tratamiento de melanoma y carcinoma de células renales. Sin embargo, el uso directo de IL-2 en pacientes está severamente limitado por los efectos tóxicos. Tanto es así que sólo el 20% de los pacientes elegibles recibieron terapia adicional y sólo el 17% de los pacientes muestran una respuesta objetiva relevante. Una posible explicación de este dramático fracaso en la etapa clínica es que la terapia con IL-2 nativa también estimula las poblaciones de células T reguladoras (Ahmadzadeh, M., et al., (2006) Blood, 107, 2409-14), que obstaculizan la inmunoestimulación perseguida con eso.

Se han desarrollado varias estrategias para mitigar los efectos tóxicos de la terapia con IL-2. Algunas de estas estrategias se basan en el uso de variantes mutadas de IL-2, diseñadas para aumentar la capacidad de señalización de esta molécula principalmente por medio del receptor de alta afinidad (cadenas alfa, beta y gamma) y no por medio del receptor intermedio de afinidad (cadenas beta y gamma). La idea básica es promover la señalización preferencial en células T frente a la señalización en células NK, que son las células que se cree que son responsables de los efectos tóxicos observados. Las siguientes invenciones están en la misma línea de trabajo: las patentes estadounidenses Nos. 7,186,804, 7.105.653, 6.955.807, 5.229.109, la solicitud de patente estadounidense No. 20050142106. Es importante observar de todos modos que ninguna de estas invenciones está relacionada con mutantes de IL-2 con la capacidad de modular diferencialmente la actividad de las células T reguladoras. Además, los mutantes en estas invenciones son agonistas de la IL-2 y no antagonistas/inhibidores tales como los descritos en esta solicitud.

Se han creado otras variantes mutadas de la IL-2 con el fin de aumentar su actividad farmacológica. Por ejemplo, mejorando su plegado o aumentando su vida útil en sangre. Entre otras, las siguientes invenciones están relacionadas con esta línea de trabajo: las patentes estadounidenses Nos. 4.959.314, 5.116.943, 4.853.332. De nuevo, ninguno de estos mutantes ha demostrado capacidad para modular diferencialmente la actividad de las

células T reguladoras.

Otras invenciones existentes se refieren a inhibidores de la actividad de IL-2, principalmente para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o para prevenir el rechazo de trasplante de órganos. Entre estas invenciones se encuentran: las patentes estadounidenses Nos. 5.876.717, 5.635.597, 6.906.170, 6.168.785.

Por último, debe hacerse referencia a que en la bibliografía hay muchas propuestas de agentes terapéuticos (Kreitman, RJ (2009) *Curr Pharm Des.* 15, 2652-64; Litzinger, MT, Fernando, R., Curiel, TJ, Grosenbach, DW, Schlom, J. y Palena, C. (2007) *Blood.* 110, 3192-201; Morse, MA, Hobeika, AC, Osada, T., Serra, D., Niedzwiecki, D., Lyerly, HK y Clay, TM (2008) *Blood.* 112, 610-8; Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T. y Nakayama, E. (1999) *Cancer Res.* 59, 312833; Quezada, SA, Peggs, KS, Curran, MA y Allison, JP (2006) *J Clin Invest.* 116, 1935-45) que proponen modular o reducir la actividad de células T reguladoras *in vivo*. Estos agentes terapéuticos han sido ensayados en modelos animales e incluso en pacientes para terapia directa del cáncer o para mejorar el efecto de las vacunas. También hay algunos informes que proponen modular la actividad de IL-2, particularmente con anticuerpos monoclonales (Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, MP, Surh, CD y 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. y Marrack, P. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8832-7; Tomala, J., Chmelova, H., Mrkvan, T., Rihova, B. y Kovar, M. (2009) *J Immunol.* 183, 4904-4912), para promover respuestas inmunes mejores o más eficaces. Sin embargo, hasta donde sabemos, no hay ningún informe en la bibliografía sobre las variantes mutadas de la IL-2, que apoyan la posibilidad de su uso para modular, selectiva o preferentemente, la actividad de las células T reguladoras. En particular, las muteínas de IL2 capaces de antagonizar de forma selectiva/preferencial la actividad de IL2 en células T reguladoras, afectando así su función y promoviendo en consecuencia una potenciación terapéutica de respuestas inmunes.

Liu et al. 2009, *J. Immunother.* 32 (9), 887-894, divulgan variantes de IL-2 que comprenden varias mutaciones puntuales con respecto a la IL-2 nativa y tienen la propiedad de inhibir la actividad de IL-2 por antagonización del receptor de IL-2 *in vitro*, preferentemente en las células T reguladoras.

Breve descripción de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente invención se basa en el descubrimiento científico que demuestra que las variantes mutantes de IL-2 pueden ejercer una inhibición preferencial sobre las células T reguladoras. Los inventores descubrieron por primera vez en experimentos *in vitro* que las variantes mutadas de IL-2 pueden inhibir sustancialmente la actividad de las células T reguladoras (T CD4+ CD25+ FoxP3+), mientras que apenas afectan la activación y/o proliferación de otros linfocitos con funciones efectoras. Este hallazgo proporciona la base para una nueva estrategia de inmunomodulación de células T reguladoras en enfermedades tales como cáncer o infecciones crónicas donde estas células son relevantes. La presente invención se refiere a polipéptidos que comparten su secuencia primaria con IL-2 humana, excepto en el hecho de que se han mutado varios aminoácidos eliminando o reduciendo sustancialmente su capacidad de señalización a través de las diferentes formas del receptor de IL-2

Estas variantes mutantes de IL-2 mantienen su capacidad para unirse a uno o más componentes del receptor de IL-2, y tienen una actividad inhibitoria observada preferentemente en poblaciones de células T reguladoras, donde modulan negativamente su función. Se protegen diversas variantes específicas de mutantes de IL-2 con propiedades inhibitorias preferenciales sobre células T reguladoras. La invención también incluye los usos terapéuticos de estas variantes mutadas, utilizadas solas o en combinación con vacunas para la terapia de enfermedades tales como cáncer o infecciones crónicas donde es relevante la actividad de las células T reguladoras (Tregs).

La presente invención propone una nueva estrategia para modular la actividad de células T reguladoras en enfermedades en las que la supresión por medio de estas células reduce la respuesta inmune protectora inducida naturalmente o por vacunación. Las ventajas de esta nueva estrategia terapéutica frente a otras propuestas para modular la actividad de las Tregs son numerosas. Por ejemplo:

- Los mutantes de IL-2 son virtualmente proteínas en sí mismos (salvo algunas mutaciones). Este hecho reduce el riesgo de toxicidades inesperadas (que son comunes en las estrategias basadas en inhibidores de pequeño tamaño) o el riesgo de aumentar una respuesta inmune contra los fármacos inyectados (como sucedería en estrategias tales como Ontak, en la que IL-2 está acoplada a una molécula foránea y tóxica como la toxina de la difteria).
- Estas variantes mutantes de IL-2 mantendrían afinidades de unión con el receptor de IL-2 al menos del orden de la afinidad de la IL-2 nativa (10 pM para el receptor de alta afinidad). Esta afinidad es difícil de conseguir con estrategias de inhibición del receptor o ligando, con anticuerpos monoclonales u otros fármacos.
- El pequeño tamaño de estos mutantes (15 kD) podría permitirles tener una alta movilidad y penetrar fácilmente en el microambiente del tumor. Algo que se sabe que es complejo para las moléculas más grandes, tales como los anticuerpos y otros.

Descripción detallada de la invención

Obtención de polipéptidos análogos de IL-2

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos de 100 a 500 aminoácidos, preferiblemente aquellos cuyo tamaño es de 140 aminoácidos y cuyo peso molecular aparente es de al menos 15 kD. Estos polipéptidos mantienen un alto nivel de identidad de secuencia con IL2 nativa, más del 90% de identidad, en un área de su secuencia, incluyen 3 a 5 mutaciones con respecto a IL-2 nativa, y se indican aquí como M1-M4 (tabla 1).
- 10 En estas posiciones, estos polipéptidos se mutan insertando residuos de aminoácidos diferentes a aquellos aminoácidos colocados en la misma posición en la IL-2 nativa. Los residuos que sustituyen a los residuos originales se seleccionan porque tienen propiedades fisicoquímicas muy diferentes de las del aminoácido original, los residuos han cambiado de polar a apolar, de cargado a no cargado, de grande a pequeño, de ácido a base, entre otros.
- 15 Los polipéptidos de la presente invención también se pueden denominar polipéptidos inmunomoduladores indistintos, análogos de IL-2 o muteínas de IL-2, entre otros. Estos polipéptidos están diseñados a partir de la estructura tridimensional de la IL-2 (depositada en la base de datos PDB), introduciendo mutaciones sólo en las posiciones de la IL2 que corresponden a aminoácidos expuestos significativamente al disolvente, que se identifican utilizando programas bioinformáticos de dominio público como RASMOL, SwissPDBviewer y otros.
- 20 Los polipéptidos de esta invención se pueden obtener de varias maneras, entre otros mediante síntesis de proteínas. También podrían obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética, tales como su expresión en cuerpos de inclusión en bacterias tales como *E. coli*. También se pueden obtener mutaciones puntuales en las posiciones específicas mediante técnicas de mutagénesis dirigida usando la reacción en cadena de la polimerasa.
- 25 Selección de polipéptidos análogos de IL-2 por su actividad biológica
- Los polipéptidos de la presente invención se seleccionan realizando experimentos *in vitro* o *in vivo* para tener simultáneamente las siguientes propiedades
- 30 1) Estas variantes mutantes de IL-2 pierden o reducen sustancialmente su capacidad de señalización para las diferentes formas del receptor de IL-2. Esta propiedad se puede evaluar directamente en ensayos de proliferación *in vitro* con líneas celulares, que son dependientes de IL-2 como CTLL2 o Kitt225, o con linfocitos T o células NK de origen murino y/o humano. Estos mutantes deben tener una actividad estimuladora en estos ensayos al menos 100 veces menor que la de la IL-2 nativa.
- 35 2) Estas variantes mutadas de IL-2 (muteínas) mantienen su capacidad para unirse a uno o más componentes moleculares del receptor de IL-2. Esta capacidad de unión se puede evaluar directamente mediante ELISA frente a cadenas del receptor comercialmente disponibles tales como cadenas alfa y beta del receptor o indirectamente sobre poblaciones celulares positivas para el receptor. Las tasas de reconocimiento de las muteínas de IL-2 deberían ser comparables a las de la IL-2 nativa en estos ensayos.
- 40 3) Las variantes mutadas de IL-2 tienen una actividad inhibidora de la actividad nativa de IL-2 en linfocitos, que es preferente a poblaciones de células T reguladoras (al menos en células T CD4+ CD25+ FoxP3+). Las muteínas de IL-2 incluidas en esta invención son capaces en un cierto intervalo de concentraciones de inhibir preferentemente o selectivamente la actividad o expansión de células T reguladoras, sin afectar o afectar solo mínimamente la actividad y/o expansión de otros linfocitos con funciones efectoras tales como células T auxiliares, células T citotóxicas o células NK. La actividad inhibidora preferencial o selectiva de estas muteínas puede evidenciarse en varios ensayos *in vitro* que examinan la respuesta a los estímulos de mezclas de poblaciones efectoras y reguladoras en presencia de cantidades crecientes de las muteínas. En el intervalo apropiado de concentración, las muteínas deben ser capaces de inhibir al menos tres veces más el crecimiento o la actividad de las células T reguladoras que inhiben la actividad o expansión de las poblaciones efectoras usadas en el experimento, por ejemplo, células T auxiliares, células T citotóxicas o células NK.
- 45 50 55 Esta invención se refiere a diversas variantes específicas de muteínas de IL-2 (mutaciones específicas descritas en la Tabla 1), que han sido seleccionadas para tener las propiedades mencionadas anteriormente. Estas muteínas incluyen múltiples sustituciones de aminoácidos que reducen significativamente su capacidad para estimular linfocitos murinos y humanos. Sin embargo, su capacidad para unirse a las cadenas alfa y beta del receptor permanece intacta, y adquieren capacidades inhibitoras (antagonistas) de la actividad nativa de IL-2. El aspecto más significativo de estas muteínas es que presentan una capacidad marcada, en cierto intervalo de concentraciones, para inhibir preferentemente las células T reguladoras (CD4+ CD25+ FoxP3+), en un cultivo de linfocitos que contienen estas células y otras células T efectoras.
- 60

Tabla 1: Mutantes construidos, con referencia a la mutación según la numeración de la IL2 humana.

Mutaciones	Nombre de referencia
Q22V, Q126A, 1129D, S130G	M1

L18N, Q126Y, S130R	M2
Q13Y, Q126Y, 1129D, S130	M3
L18N, Q22V, T123A, 1129D, S130R	M4

La presente invención también incluye modificaciones adicionales del tipo de mutantes de IL-2 mencionados anteriormente y en particular los descritos en la Tabla 1. O bien para aumentar su afinidad por componentes específicos de IL-2, pero sin afectar o incluso mejorar sus propiedades inhibitorias preferenciales, o para mejorar su farmacodinámica *in vivo*: aumento de la esperanza de vida o reducción de su internalización por células T. Estas mutaciones adicionales pueden obtenerse mediante diseño racional con herramientas bioinformáticas o utilizando bibliotecas moleculares combinatorias de diferente naturaleza (bibliotecas de presentación en fagos, bibliotecas de expresión génica en levaduras o bacterias).

10 Aplicación terapéutica de polipéptidos análogos a IL-2

Esta invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden como ingrediente activo muteínas de IL-2 y sus análogos, descritos en la presente invención, así como sus posibles aplicaciones terapéuticas con el objetivo de modular selectivamente la actividad de IL-2 en células T reguladoras. En particular, esta invención protege el uso de estas muteínas para promover la respuesta inmune inducida naturalmente o por vacunas en enfermedades tales como cáncer o infecciones crónicas donde las células T reguladoras son particularmente relevantes.

Para uso terapéutico, el polipéptido de la presente invención se debe administrar a un sujeto portador de la enfermedad independientemente o en combinación con otros polipéptidos u otras sustancias que facilitan o mejoran su acción terapéutica. La vía de administración puede ser cualquiera de las vías de administración descritas por la técnica anterior para la administración parenteral de fármacos. Se puede administrar preferiblemente por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intratumoral.

Los polipéptidos o proteínas de fusión descritos por la presente invención también pueden administrarse como parte de una composición farmacéutica útil en el tratamiento de cáncer y enfermedades infecciosas crónicas.

Para obtener el efecto terapéutico deseado, el polipéptido de la presente invención debe administrarse en dosis lo suficientemente altas como para asegurar una concentración adecuada en el ganglio linfático o en el sitio periférico relevante para la enfermedad estudiada, debe estar en el intervalo adecuado de concentraciones para que la muteína muestre un efecto inhibitorio preferencial sobre las células T reguladoras. Por lo tanto, la dosis referida debe ajustarse de acuerdo con el tipo de enfermedad y la vía de administración en el estudio. Por ejemplo, en el caso de la terapia tumoral, la dosis debe ajustarse hasta que las concentraciones del mutante dentro del tumor y/o del ganglio linfático regional local sean adecuadas para asegurar un efecto inhibitorio preferencial sobre las células T reguladoras. Los intervalos de dosis a explorar pueden oscilar entre decenas de microgramos hasta unos pocos miligramos por dosis.

El número de administraciones a aplicar también se ajustará de acuerdo con la biodistribución de la muteína en cuestión. En general, las concentraciones efectivas antes mencionadas deben mantenerse durante un periodo que oscila entre 2 días y 30 días consecutivos. Obsérvese, por ejemplo, que, si la muteína se acopla a una proteína portadora, la frecuencia de administración debe ajustarse en consecuencia. Se entiende por acción terapéutica la remisión total o parcial de los síntomas de la enfermedad. Para el cáncer, se considerará, entre otros, una disminución del volumen del tumor o un aumento del tiempo hasta la recaída como criterios de remisión. Por último, cabe señalar que los beneficios de esta nueva estrategia terapéutica en comparación con otras propuestas para modular la actividad de Tregs sería múltiple. Por ejemplo:

- Los mutantes de IL-2 son virtualmente proteínas en sí mismos (salvo para unas pocas mutaciones). Este hecho reduce el riesgo de toxicidades inesperadas (que son comunes en las estrategias basadas en inhibidores de pequeño tamaño) o el riesgo de aumentar una respuesta inmune contra los fármacos inyectados (como sucedería en estrategias tales como Ontak, en la que IL-2 está acoplada a una molécula foránea y tóxica como la toxina de la difteria).
- Estas variantes mutantes de IL-2 mantendrían afinidades de unión con el receptor de IL-2 al menos del orden de la afinidad de la IL-2 nativa (10 pM para el receptor de alta afinidad). Esta afinidad es difícil de conseguir con estrategias de inhibición del receptor o ligando, con anticuerpos monoclonales u otros fármacos.
- El pequeño tamaño de estos mutantes (15 kD) podría permitirles tener una alta movilidad y penetrar fácilmente en el microambiente del tumor. Algo que se sabe que es complejo para las moléculas más grandes, tales como los anticuerpos y otros.

Ejemplos

Ejemplo 1. Los mutantes se diseñaron informáticamente a partir de técnicas bioinformáticas, utilizando como base la estructura reportada del complejo cuaternario de IL-2 humana acoplada al receptor en línea con lo reportado por

Wang, X., Rickert, M. y Garcia, K.C. en Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. Science, 2005. 310 (5751): páginas 1159-63 y algoritmos de cálculo de energía para la interacción proteína-ligando en el dominio público. Inicialmente se predijo que diferentes variantes de muteínas no afectaban la capacidad de unión de las cadenas alfa y beta del receptor. Estas muteínas se expresaron en *E. coli* a partir de una construcción genética en el vector pET28a que incluye una secuencia identificadora de 6 histidinas en el extremo terminal amino. Las muteínas se purificaron usando fase inversa (Figura 1) obteniéndose con alta pureza (> 95%). Las muteínas obtenidas se seleccionaron según sus propiedades en ensayos experimentales *in vitro*. Entre las muteínas construidas en la Tabla 1 se describe un conjunto de mutaciones específicas que tiene la propiedad de inhibir preferentemente la actividad de Tregs.

Ejemplo 2. Las muteínas seleccionadas conservan la capacidad de unirse a diferentes componentes del receptor de IL2, especialmente a las cadenas alfa y beta del receptor. La Figura 2 muestra que usando pruebas ELISA, varios de los mutantes especificados en la Tabla 1 mantienen prácticamente intacta su capacidad para unirse a la cadena alfa (Figura 2) y la cadena beta (Figura 2b) del receptor humano de IL-2. La Figura 3 muestra una confirmación adicional de que estos mutantes se unen al receptor en la superficie celular (Figura 3a) y que esta unión se puede desplazar gradualmente mediante la adición de IL-2 nativa (Figura 3b).

Ejemplo 3. Las muteínas seleccionadas reducen significativamente su capacidad de señalización por el receptor de IL-2. La Figura 3 ilustra este hecho midiendo su capacidad para estimular el crecimiento de la línea celular CTLL2 (Figura 4a) o estimular la diferenciación de células NK de los linfocitos totales del bazo (Figura 4b). Estas muteínas en altas concentraciones inhiben la actividad de IL-2 nativa, tanto en linfocitos T (Figura 5a) como en células NK (Figura 5b).

Ejemplo 4. Las muteínas seleccionadas inhiben preferentemente la expansión *in vitro* de células T reguladoras (CD4+ CD25+ FoxP3+). La Figura 6 ilustra esta propiedad para uno de los mutantes de la Tabla 1, particularmente se muestra que en un cultivo de células de linfocitos donde hay una mezcla de células T efectoras y reguladoras estimuladas con anticuerpos anti-CD3, la adición de dosis intermedias de muteínas sustancialmente inhibe la proliferación de CD4+FoxP3+ sin afectar significativamente a la expansión de las poblaciones efectoras de CD4+FoxP3-.

Ejemplo 5. Las muteínas seleccionadas son secuestradas preferentemente por las células T reguladoras en un cultivo, reduciendo su capacidad para afectar la actividad de las células T efectoras. Estas muteínas inhiben la señalización (estimulación) mediada por la IL-2 producida endógenamente por las poblaciones de células T auxiliares CD4+CD25-FoxP3- purificadas y estimuladas con anticuerpos anti-CD3. Sin embargo, la adición de cantidades crecientes de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3+ a estos cultivos, paradójicamente reduce la inhibición mediada por el mutante en las poblaciones efectoras T (Figura 7). Este efecto se explica por la capacidad de las muteínas descritas para inhibir preferentemente la actividad de IL-2 en poblaciones T reguladoras. La presencia de células T reguladoras incluso en pequeñas cantidades dirige la actividad de los mutantes a estas células, reduciendo así la actividad supresora de la muteína en la población efectora.

Ejemplo 6. Las muteínas seleccionadas muestran actividad antitumoral en un modelo murino de tumor trasplantable. La Figura 8 muestra la propiedad descrita para una de las muteínas de la Tabla 1. La muteína se evaluó en un modelo de tumor primario con una línea celular de melanoma MB16F10, implantada subcutáneamente en el flanco derecho. La Figura 8 muestra la reducción del volumen tumoral en ratones tratados con la muteína en comparación con el grupo de control tratado con PBS. Además, se incluyó un grupo de control, tratado con el anticuerpo monoclonal anti CD25 (MAb), mostrando que el sistema experimental es sensible al agotamiento de células Tregs.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Producción y purificación de variantes mutadas de IL-2 humana. a: Transferencia Western que muestra la expresión de algunas variantes mutadas e IL-2 nativa de control en cepas de *E. coli* transfectadas con la construcción génica realizada; b: Ejemplo de un perfil de purificación típico obtenido usando purificación de fase inversa.

Figura 2. Evaluación por ELISA del reconocimiento de las cadenas alfa (a) y beta (b) del receptor de IL-2 por varias de las muteínas mencionadas en la tabla 1. La IL-2 nativa se usa como control positivo. Como puede verse, todas las muteínas analizadas mantienen tasas de reconocimiento comparables a las de la IL-2 nativa.

Figura 3. Evaluación por citometría de flujo de la capacidad de varias de las muteínas mencionadas en la Tabla 1 para unirse al receptor de IL-2 en la superficie de las células. Especialmente a la línea celular CTLL2 murina. Tanto las muteínas como el control de la IL-2 nativa en la superficie de las células se detectaron con un anticuerpo anti-6-His-PE que reconoce la cabeza de la histidina que está incluida en la construcción genética de estas moléculas. a): Histogramas que muestran los niveles de unión directa detectados. b) Reducción de la unión de muteínas a las células, medida por la reducción de la intensidad media de la fluorescencia detectada, causada por la adición de cantidades crecientes de IL-2 nativa (una variante de esta molécula no tiene cabeza de histidina y no interfiere con la tinción).

- 5
10
15
20
25
30
35
40
45
- Figura 4. Evaluación de la capacidad de señalización de varias de las muteínas mencionadas en la Tabla 1. a) Se evaluó la actividad de las muteínas en un ensayo de proliferación de la línea celular CTLL2 medida mediante un ensayo colorimétrico usando MTT. b): Las muteínas también se evaluaron en una prueba de diferenciación de células NK1.1+ de esplenocitos totales de ratón. En ambos casos se comparó la capacidad de estimulación de las muteínas frente a un control de la IL-2 nativa que se produce exactamente en el mismo sistema experimental (la misma construcción genética, cepa productora de *E. coli*, sistema de purificación). Se obtienen resultados similares a los mostrados en la Figura3a con la línea celular Kítt225, donde el sistema de receptores es humano.
- Figura 5. Evaluación de la capacidad de varias de las muteínas mencionadas en la Tabla 1 para inhibir la actividad *in vitro* de IL-2 nativa. a: Inhibición de la proliferación total de linfocitos de los ganglios estimulada con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clon 2C11 a razón de 10 µg/mL) aumentando las concentraciones de muteínas. b. Inhibición de la diferenciación de células NK1.1+ de esplenocitos totales de ratón estimulados con 500 UI/mL de IL-2 nativa, añadiendo cantidades crecientes de muteínas en el cultivo.
- Figura 6. Evaluación de la capacidad de las muteínas para inhibir preferentemente los linfocitos CD4+Foxp3+. Los linfocitos de los ganglios linfáticos de ratón se estimularon *in vitro* con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clon 2C11 a razón de 10 µg /mL) en presencia de las cantidades indicadas de la muteína M1 (como se hace referencia en la Tabla 1). Después de 72 horas de cultivo se determinó mediante citometría de flujo, usando perlas de referencia, el número de linfocitos CD4+Foxp3+ reguladores y CD4+Foxp3 efectoras. La gráfica en **a** muestra la tinción básica en citometría de flujo utilizada para diferenciar las poblaciones de células reguladoras y efectoras. La gráfica en **b** muestra los niveles de inhibición de la proliferación inducida por diferentes cantidades de la muteína añadida. Esta inhibición se calcula con base en el número de células vivas recuperadas en ausencia de la muteína. Como se muestra en **b**, existe un intervalo intermedio de concentraciones de muteína M1 en el que la inhibición de la población reguladora de CD4+FoxP3+ es mucho más significativa que para las células T auxiliares o efectoras CD4+FoxP3-.
- Figura 7. Evaluación de la capacidad de las células T reguladoras para secuestrar preferentemente las muteínas de IL-2 diseñadas, liberando células T efectoras con un efecto inhibitor sobre ellas. Las células T efectoras CD4+CD25-FoxP3- se purificaron usando perlas magnéticas marcadas con CFSE y se colocaron en cultivo acopladas algunas en presencia y algunas en ausencia de muteínas (gráfico de muteínas M1, dos concentraciones diferentes de 10 µg/mL y 5 µg/mL) y se estimularon con anticuerpos anti-CD3 (clon 2C11, 10 µg/mL) y anti-CD28 (clon 37.51, 10 µg/mL). A estos cultivos se les añadieron diferentes cantidades de células T reguladoras purificadas (CD4+CD25+FoxP3+). El gráfico 6a muestra altos niveles de pureza (92% de Tregs y 97% de células T efectoras) logrados con separación de perlas magnéticas. La Figura 6b muestra los niveles de proliferación en células efectoras medidos por dilución de CFSE, para diferentes cantidades de células reguladoras en cultivo. Como se puede observar en ausencia de Tregs, la presencia de muteínas afecta sustancialmente la proliferación de células efectoras (efecto inhibitor), pero a medida que se añaden Tregs, la proliferación de células T efectoras se recupera, ya que las Tregs preferentemente secuestran las células efectoras liberadoras de muteína de su efecto inhibitorio.
- Figura 8. Evaluación del efecto antitumoral directo de las muteínas de IL-2 usando el modelo de tumor primario con línea celular tumoral MB16F10 de melanoma. Se usaron 12 ratones C57BL6, distribuidos en tres grupos de cuatro ratones cada uno. Todos los tratamientos se administraron subcutáneamente desde el día -5 al día 0. El grupo 1 recibió 200 µL de PBS, el grupo 2 recibió 100 µg de MAb anti CD25 y el grupo 3 recibió 200 µg de muteína de IL-2. El día cero, todos los ratones recibieron 250.000 células en el flanco derecho. Se midió el volumen del tumor cada dos días hasta el día 30. Los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA y la prueba de Bonferroni de comparación múltiple. La muteína de IL-2 como MAb anti CD25 causó un retraso significativo en el crecimiento tumoral ($p < 0,001$)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido inmunomodulador derivado de la IL-2, que comprende varias mutaciones puntuales con respecto a la secuencia de la IL-2 humana nativa y tiene la propiedad de inhibir la actividad de IL-2 *in vitro* en células T reguladoras y tiene la propiedad de unión al receptor de IL-2 murino y humano, en donde dichas mutaciones dentro de la secuencia de IL-2 humana nativa consisten en:
- 10 (i) Q22V, Q126A, S130G e I129D;
(ii) L18N, Q126Y y S130R;
(iii) Q13Y, Q126Y, I129D y S130R; o
(iv) L18N, Q22V, T123A, S130R e I129D.
- 15 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dichas mutaciones dentro de la secuencia de la IL-2 humana nativa consisten en:
Q22V, Q126A, S130G e I129D.
- 20 3. El polipéptido de la reivindicación 1, caracterizado por su capacidad para inhibir las células T reguladoras *in vivo*.
4. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido inmunomodulador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, acoplado a una proteína portadora.
5. La proteína de fusión de la reivindicación 4, caracterizada porque la proteína portadora es albúmina.
- 25 6. La proteína de fusión de la reivindicación 4, caracterizada porque la proteína portadora es la región Fc de la inmunoglobulina humana.
7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento del cáncer.
- 30 8. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer, que comprende como ingrediente activo el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
9. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer, caracterizada porque comprende como ingrediente activo la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 35 10. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para uso en el tratamiento de cáncer.

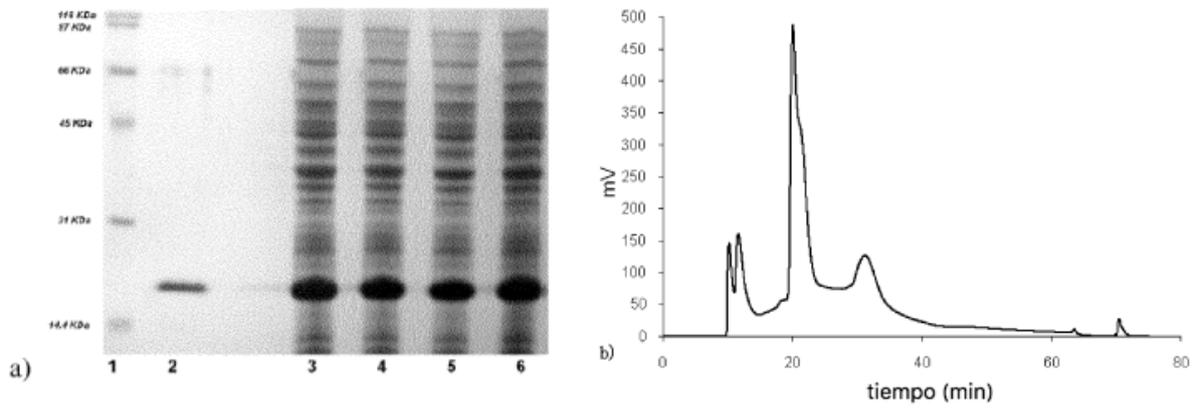


Figura 1

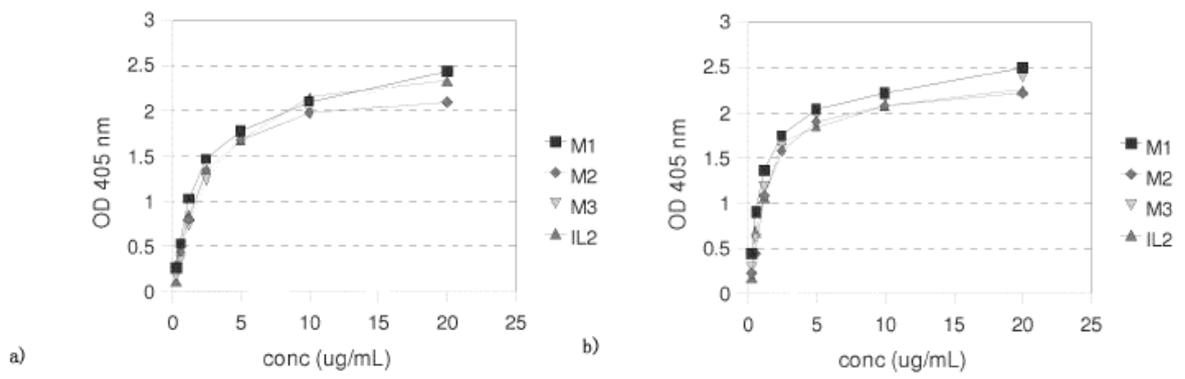


Figura 2

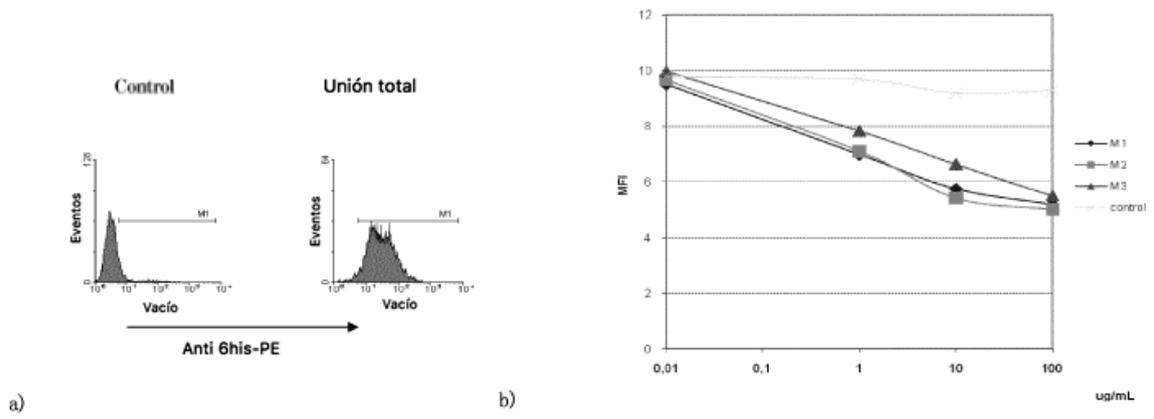


Figura 3

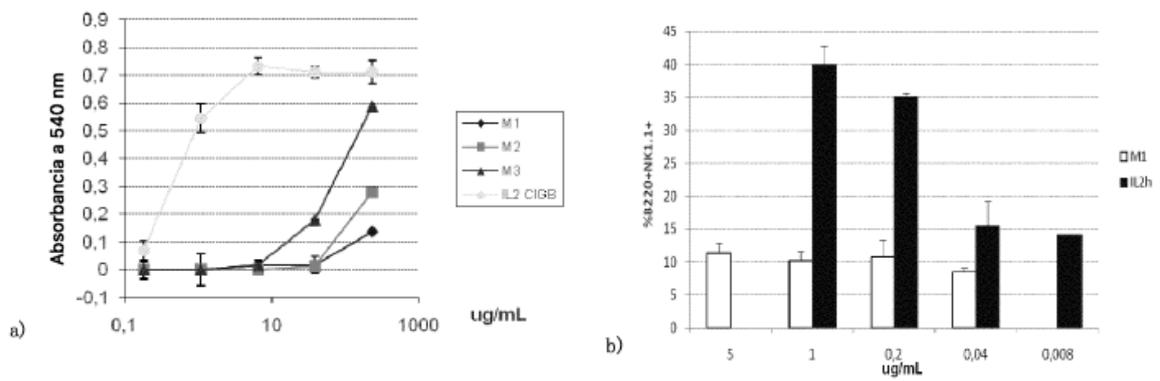


Figura 4

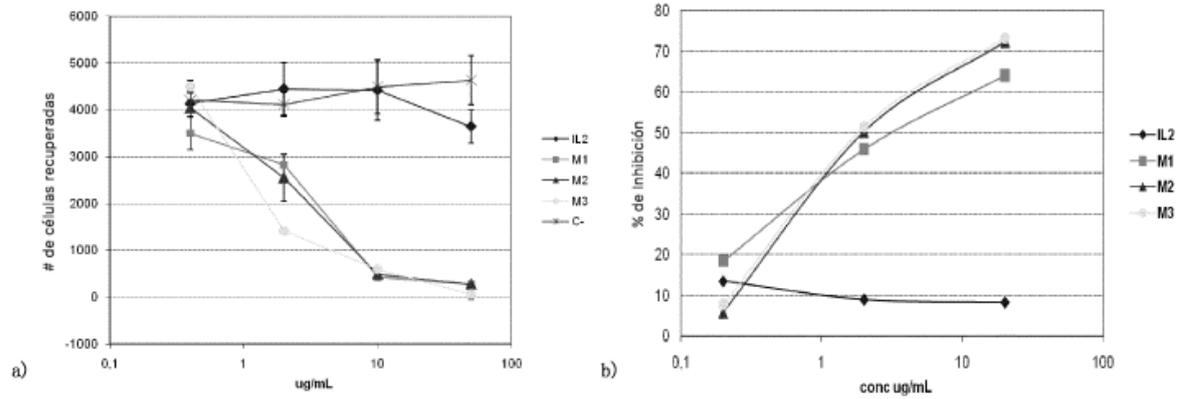
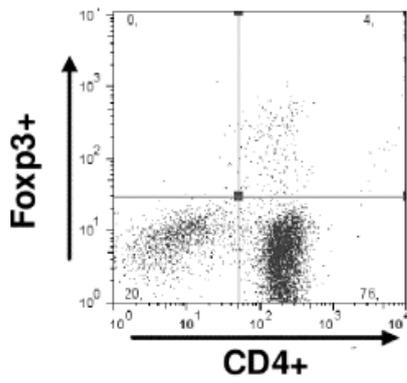
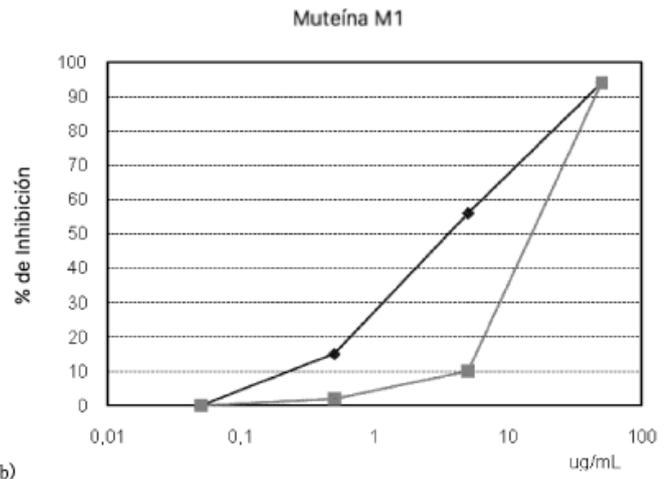


Figura 5

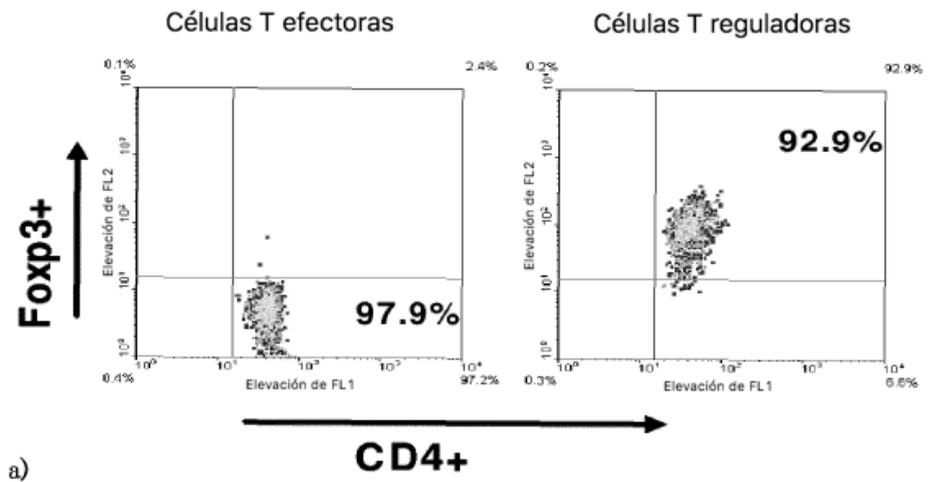


a)



b)

Figura 6



a)

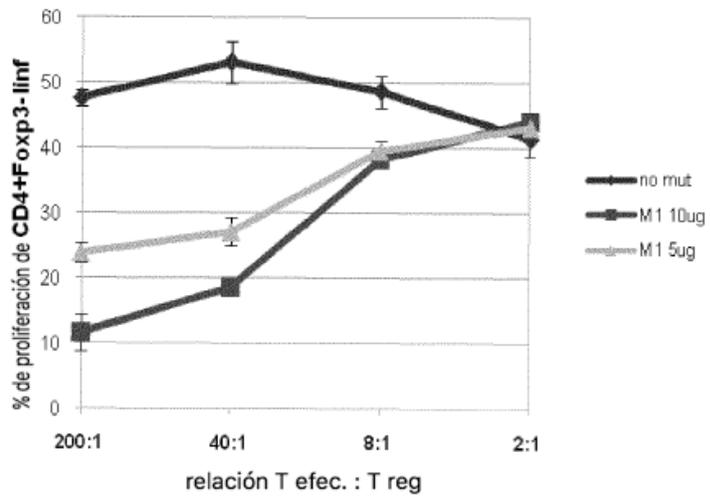


Figura 7

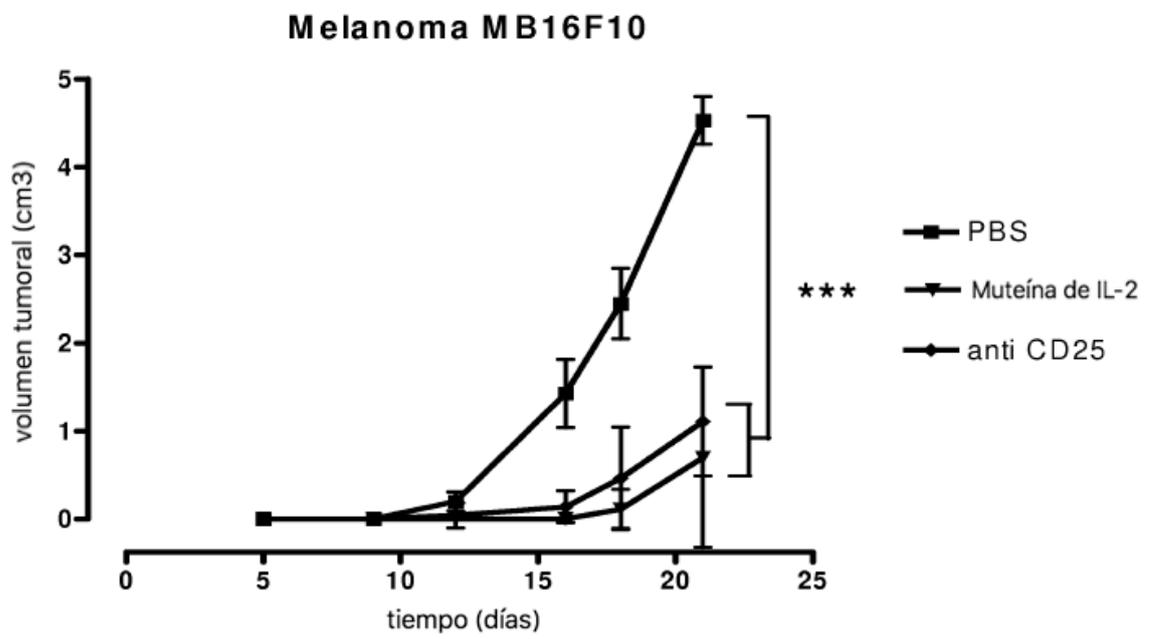


Figura 8