Polipéptidos derivados del TGFβ y sus usos

CAMPO DE LA TECNICA.

La presente invención se relaciona con las ramas de la Biotecnología y la Medicina. Particularmente con el uso de variantes mutadas de la molécula TGFβ, antagonistas de la señalización de sus homólogos naturales y la aplicación terapéutica de estas.

ANTECEDENTES

La citocinas TGFβ fueron descubiertas por su capacidad de estimular la formación de colonias celulares (Roberts AB, y otros, Proc Natl Acad Sci USA 78: 5339–43, 1981), debido a que este proceso es un marcador clásico de transformación celular, esta molécula fue llamada Factor Transformante del Crecimiento beta. Hoy en día los ligandos TGFβ (TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3) son reconocidos como el prototipo de factores de crecimientos multifuncionales. Casi cualquier tipo celular en el organismo los produce y expresan su complejo receptor. Estas moléculas son potentes inhibidores de la proliferación de las células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas, (Ravitz MJ, y otros, Adv Cancer Res 71: 165–207, 1997), es uno de los más potentes reguladores de la producción y deposición de matrix extracelular (Massague J. The Annu Rev Cell Biol 6: 597–641, 1990) y de la cascada de reparación tisular (Roberts AB. y otros, irrelaePlenum 275–308, 1996). También regula diversos mecanismos durante el desarrollo embrionario tales como la diferenciación celular, la migración y la angiogénesis. (Taya Y. y otros, Development 126: 3869–79, 1999; Lidral A. y otros Am J Hum Genet 63: 557–68, 1998)

En el sistema inmune la señalización mediada por el TGFβ constituye un nodo de regulación muy importante. Una de sus funciones más relevantes es el mantenimiento de la homeostasis linfocitaria y la tolerancia inmunológica, a través de la inhibición de la proliferación de las células T vírgenes inducida por antígenos propios en ambientes linfopénicos. (Bevan M. y otros, Nat Immunol. 27; 13(7): 667-73; 2012). Esta molécula también suprime o altera la activación, maduración y diferenciación de las células asesinas naturales (Laouar, Y. y otros Nature Immunol 6: 600–607, 2005), las células dendríticas (Luo, X. y otros, Proc. Natl Acad. Sci. USA 104: 2821–2826, 2007; Bekeredjian-Ding, I. y otros, Immunology 128: 439–450, 2009), los macrófagos (Sica, A. y otros, Semin. Cancer Biol. 18, 349–355, 2008, Torroella. M y otros, Cancer Res 69: 4800–09, 2009), los neutrófilos (Fridlender, Z. G. y otros, Cancer Cell 16: 183–194, 2009) y de poblaciones de células T efectoras y de memoria (Gorelik, L. & Flavell, R. A. Nature Med.; 7: 1118–22, 2001; Flavell, R. A. Immunity 31:131–44, 2009). El TGFβ desempeña un rol esencial en la inducción, diferenciación y mantenimiento de las células T reguladoras (CD4+Foxp3+) naturales e inducidas y de la población T efectora TCD4+IL17+ (TH17) (Kryczek, I. y otros, J. Immunol. 178: 6730–33, 2007; Moo-Young, T. A. et al. J. Immunother 32: 12–21, 2009; Fantini, MC et al J. Immunol. 172: 5149–53, 2004; Flavell, R. A. Cell 134: 392–404, 2008).

Los ligandos TGFβ maduros son homodímeros de 112 residuos de aminoácidos. Ellos se derivan

de una molécula precursora formada por el pro-péptido asociado a la latencia (LAP) hacia el extremo N-terminal y el dominio activo hacia el extremo C-terminal. Ambos dominios son separados intracelularmente por proteólisis, y los ligandos son secretados como precursores inactivos, formados por el prodominio unido reversiblemente al dominio activo, regulándose de esta forma su acceso a los receptores celulares (Geoffrey D. Young and Joanne E. Murphy-Ullrich. JBC Vol. 279, No. 36: 38032–39, 2004). Se ha postulado que el pro-péptido asociado a la latencia también es importante para la secreción del dominio maduro (Gray A. and A Mason Science 247:1328-30, 1990).

Las tres isoformas (TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3) interactúan en la membrana plasmática con los receptores TβRI, TβRII y TβRIII. Este último, también conocido como Betaglicano, no se expresa en todos los tipos celulares, y aunque es dispensable para la señalización mediada por los ligandos TGFβ1 y TGFβ3, constituye un reservorio de los mismos cuando se satura TβRII. (Wang, X. F. y otros, Cell 67: 797–805, 1991; Lebrin F. y otros Cardiovasc. Res. 65: 599–608, 2005). El TβRIII forma complejos con los receptores TβRI y TβRII presentándoles el ligando. Estos se unen primeramente a TβRII, y el complejo TβRII/TGFβ recluta y activa cooperativamente y con alta afinidad, al receptor TβRI, lo que resulta en la formación de un complejo hetero-trimérico de señalización. TGFβ1 y TGFβ3 pueden unirse a TβRII con alta afinidad (5-30pM), mientras que TGF-β2 solo puede hacerlo de igual forma en la presencia de TβRIII (De Crescenzo, y otros, J. Biol. Chem 279: 26013–18, 2004; De Crescenzo y otros, J. Mol. Biol 328: 1173–1183, 2003; Groppe y otros, Molecular Cell 29, 157–168, 2008).

Hasta el momento no se ha reportado que los ligandos TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 puedan unirse a los otros receptores tipo II, que forman parte de la misma familia de proteínas a la que pertenece TβRII (Huang F and YG Chen Cell Biosc Mar 15; 2: 9, 2012). Entre tanto si pueden hacerlo con varios de los receptores tipo I. ALK5 es el clásicamente descrito como el receptor TβRI de esta subfamilia de ligandos. Luego de su reclutamiento en el complejo TβRII/TGF-β, induce la fosforilación de las proteínas SMAD2/3 (Huang F and YG Chen Cell Biosc; Mar 15; 2:9, 2012). ALK1 se activa en respuesta a la formación del complejo TGFβ/TβRII en las células endoteliales, y señaliza por SMAD1 y SMAD5 (Goumans MJ y otros, Mol Cell 12(4): 817-28, 2003). En algunas células epiteliales, la señalización SMAD1/5 se induce por los receptores ALK2, ALK3 y ALK6 (Daly AC y otros, Mol Cell Biol, 28: 6889-6902, 2008). ALK2 también se asocia con procesos relacionados con el desarrollo cardiovascular *in vivo* (Olivey HE y otros, Dev Dyn 235(1): 50-9, 2006). En sentido inverso, debemos destacar que tanto TβRII como ALK5 son exclusivos de la familia de ligandos TGFβ1,TGFβ2 y TGFβ3, entre tanto ALK1/2/6/3 son más promiscuos, compartidos además por las activinas y las proteínas morfogenéticas del hueso (Sebald W. y otros, Biol Chem.; 385(8): 697-710, 2004).

La señalización mediada por ALK5 se asocia con varios mecanismos patogénicos en determinadas enfermedades. En cáncer, por ejemplo, su papel es complejo y tiene que ver con sus habilidades de suprimir o promover la progresión tumoral. La primera, opera principalmente

durante etapas tempranas de la tumorigénesis. Mientras que su papel como progesor tumoral ocurre en etapas avanzadas de la carcinogénesis, a través de la inducción de fenotipos invasivos y metatásicos, y de la supresión de la respuesta inmune antitumoral (Miyazono K. Nat. Rev. Cancer 10: 415-24, 2010; Miyazono K. Cancer Sci 101(2): 306-12, 2010; Hawinkels LJ. y otros, Growth Factors 29(4):140-52, 2011). Otros ejemplos en los cuales el TGFβ tiene también efecto deletéreo son las infecciones crónicas por patógenos tales como el VIH, VHB, VHC, CMV, micobacterias y el parásito *Tripanosoma cruzi*. El TGFβ ejerce una influencia negativa sobre la respuesta inmune protectora, beneficiendo de esta forma el crecimiento y la supervivencia de estos patógenos intracelulares (Reed GS. Microbes and Infection 1: 1313−1325, 1999). En muchas enfermedades la sobreproducción de TGFβ contribuye al exceso patológico de tejido fibrótico, lo cual compromete la función normal del órgano dañado. Algunos ejemplos son la fibrosis pulmonar, la sarcoidosis, la fibrosis cardíaca, las cardiomiopatías, la cirrosis hepática, la esclerosis sistémica, la esclerosis glomerular y la cirrosis biliar primaria, entre otras (Kopp JB y otros, Microbes and Infection; 1: 1349−1365, 1999).

La señalización TGFβ ha sido objeto de múltiples estrategias de inhibición. La mayoría de los inhibidores han sido evaluados en modelos preclínicos, aunque algunos de estos han empezado a probarse en varios tipos de cáncer y fibrosis en estudios clínicos (Flavell RA. Nat Rev Immunol. 10(8): 554-67, 2010; Connolly EC y otros, Int J Biol Sci. 8(7): 964-78, 2012; Hawinkels LJ. y otros, Growth Factors 29(4): 140-52, 2011). En el estado de la técnica se pueden encontrar las siguientes estrategias de inhibición:

1- **La neutralización de los ligandos** utilizando formas solubles de los dominios extracelulares de sus receptores (US 2002/0004037 y US 2007/0244042), anticuerpos anti-TGFβ (US 2002/076858, US 2005/0276802) u oligonucleótidos que bloquean la traducción de los genes de las citocinas (US 2004/0006036 US2007/0155685).

2-**El bloqueo de la señalización** con el uso de moléculas pequeñas que se unen al dominio quinasa de TβRI /ALK5 (US 2006/0057145, US 2005/0136043, US 2006/0234911)

3- **El bloqueo del receptor II** con anticuerpos que reconocen su dominio extracelular (US 2010/0119516, US 2009/7579186).

Hasta el momento no se ha reportado una estrategia de inhibición que utilice muteínas de los ligandos TGFβ como antagonistas de la señalización.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en el hallazgo científico de que variantes mutadas de la familia del TGFβ (TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3) pueden inhibir la función de sus homólogos naturales. Los inventores encontraron por primera vez en experimentos *in vitro* que variantes mutadas del TGFβ pueden inhibir sustancialmente la señalización inducida por las variantes nativas y de esta forma neutralizar sus efectos biológicos. Este hallazgo sienta las bases para una nueva estrategia de modulación de la señalización TGFβ en enfermedades como el cáncer, fibrosis o infecciones

crónicas donde los ligandos TGFβ tengan una actividad deletérea.

La presente invención se refiere a polipéptidos que comparten secuencia primaria con el TGFβ humano, excepto porque varios aminoácidos han sido mutados, eliminando o reduciendo sustancialmente su capacidad de señalizar por el receptor tipo I ALK5. Estas variantes mutadas del TGFβ mantienen su capacidad de unión con alta afinidad al receptor TβRII y TβRIII, pero son incapaces de señalizar porque no interactúan con el receptor tipo I ALK5, modulando negativamente la señalización de las variantes naturales al competir con ellas por la unión al receptor de alta afinidad TβRII y al TβRIII. La invención incluye además las aplicaciones terapéuticas de estas variantes mutadas, solas o en combinación con vacunas u otras modalidades terapéuticas, para la terapia de enfermedades como el cáncer, fibrosis o infecciones crónicas donde el TGFβ resulta relevante.

La novedad de la presente invención consiste en proporcionar una nueva estrategia terapéutica para modular la señalización TGFβ y por ende modular la capacidad invasiva y metástasica de varios tumores y la actividad de varias células del sistema inmune y del tejido connectivo; en enfermedades donde sus funciones reducen la respuesta inmune protectiva ya sea natural o inducida por vacunación o inducen una excesiva reparación tisular y fibrosis. Ninguna de las estrategias de inhibición mencionadas anteriormente utilizan muteínas de los ligandos TGFβ como antagonistas de la señalización. Las mutantes de TGFβ de la presente invención son proteínas prácticamente propias y por tanto de baja inmunogenicidad, lo que reduce al mínimo el riesgo de respuestas de anticuerpos contra la misma. La alta especificidad por el sistema de receptores reduce las toxicidades no esperadas (comunes en estrategias basadas en inhibidores de pequeña talla). Estas variantes mutadas de TGFβ mantienen afinidades de unión al receptor TβRII al menos del orden de la afinidad del TGFβ1 y TGFβ3 nativos (6-10 pM). Esta afinidad es difícil de superar con estrategias de inhibición del receptor o el ligando, con anticuerpos monoclonales u otras drogas. Sorprendentemente los autores de la presente invención encontraron que estas variantes mutadas de TGFβ conservan la capacidad de interactuar con el receptor TβRIII y TβRII, lo que constituye una ventaja sobre los anticuerpos anti-receptor TβRII, pues las muteínas bloquean todos los posibles sitios de unión de los ligandos naturales a la superficie celular.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN.

La presente invención se relaciona con polipéptidos que antagonizan la actividad mediada por el receptor ALK5, de los ligandos TGFβ naturales y poseen una homología mayor del 90% con respecto a la secuencia de aminoácidos de los ligandos TGFβ naturales. Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos una mutación en su secuencia primaria de aminoácidos en uno de los residuos seleccionado del grupo que consiste en Y6, W30, W32, I51, L51, Q67 y L101.

En una realización particular de la invención el residuo de aminoácido original se muta por uno de los residuos de aminoácidos que se selecciona del grupo que comprende;

para la posición 6: A

para la posición 30: N,R,K,D,Q,L,S,P,V,I,G,C,T,A,E;

para la posición 32: A;

para la posición 51: Q,W,Y,A;

para la posición 67: H, F, Y, W y

para la posición 101: A, E;

Es otro objeto de la presente invención polipéptidos donde se han adicionado mutaciones en la interface de interacción con los receptores TGFβRII y/o TGFβRIII aumentando su afinidad por los mismos.

Además, la presente invención se relaciona con composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer, enfermedades que cursan con fibrosis y enfermedades infecciosas crónicas, caracterizadas porque contienen uno o una mezcla de los polipéptidos descritos en la presente invención y un vehículo farmacéuticamente adecuado para su aplicación. Dichos polipéptidos pueden estar unidos covalentemente a una proteína transportadora y esta proteína puede ser la Albúmina o la región Fc de las inmunoglobulinas humanas. En otra realización los polipéptidos de la presente invención pueden estar pegilados.

Por último la presente invención se relaciona con el uso de los polipéptidos descritos, para su uso en la fabricación de una composición farmacéutica útil en el tratamiento del cáncer, enfermedades que cursan con fibrosis y enfermedades infecciosas crónicas, así como para potenciar la respuesta celular y/o humoral a vacunas en sustitución del TGFβ nativo en especial cuando la vacuna a potenciar es una vacuna terapéutica para cáncer.

Obtención de los polipéptidos análogos del TGFβ

La presente invención se relaciona con polipéptidos de 112 aminoácidos de tamaño. Estos polipéptidos mantienen una alta identidad de secuencia con las diferentes moléculas de TGFβ nativo, más de un 90% de identidad. En una zona de su secuencia, incluyen de 1 a 6 mutaciones respecto al TGFβ nativo. Los residuos que sustituyen a los residuos originales se seleccionan para poseer propiedades fisicoquímicas bien distintas al aminoácido original, cambio de residuo apolar por polar, cargado por no cargado, grande por pequeño, acido por básico.

Estos polipéptidos, que también pueden llamarse muteínas del TGFβ, se diseñaron a partir de la estructura tridimensional del TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 nativos en complejo con sus receptores TβRII y ALK5 (depositadas en la base de datos PDB). Se introdujeron mutaciones solo en las posiciones del TGFβ que corresponden a aminoácidos significativamente expuestos al solvente y que forman parte de la zona de unión al receptor ALK5 pero no de TβRII. Estos residuos se predicen como importantes en la interacción con ALK5 usando programas bioinformáticos de dominio público. La siguiente tabla muestra los residuos de la interfase de unión a ALK5 que se predicen como importantes en la interacción y las posibles mutaciones que afectan la unión. Con estos resultados se confeccionó una base de datos de muteínas teóricas y se seleccionaron las de mayor potencia antagonista *in vitro*.

Tabla 1: Aminoácidos de la secuencia del TGFβ importantes para la interacción con TβRI/ALK5 y mutaciones que según la predicción teórica deben desestabilizar la unión.

Residuo TGFβ	**Conservación Evolutiva**	**Mutaciones**
W30	Conservado Idéntico	N,R,K,D,Q,L,S,P,V,I,G,C,T,A,E
W32	Conservado Idéntico	A
L101	Conservado Idéntico	A,E
I51	Conservado Idéntico	Q,W,Y,A
Q67	No conservado	H, F, Y, W
Y6	No conservado	A

Los polipéptidos de esta invención se pueden obtener por diferentes vías, entre otras, por síntesis química de proteínas. También podrían obtenerse por técnicas de ingeniería genética, por ejemplo expresándolos como cuerpos de inclusión en bacterias como *E. coli* o en células de mamíferos como la CHO y la HEK293 utilizando cualquier protocolo de transfeción recogido en el estado de la técnica. Las mutaciones puntuales en las posiciones específicas podrían obtenerse además por técnicas de mutagénesis dirigida mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Selección de los polipéptidos análogos del TGFβ nativo por su actividad biológica;

Los polipéptidos de la presente invención se seleccionaron a partir de los experimentos *in vitro* y *o in vivo* para poseer simultáneamente las siguientes propiedades:

- Estas variantes mutadas del TGFβ también denominadas como muteínas en la presente invención, mantienen su capacidad de unión al receptor TβRII. Esta capacidad de unión se puede evaluar directamente por un ensayo de ELISA contra la cadena del receptor TβRII, disponible comercialmente, o indirectamente sobre poblaciones celulares positivas para el receptor. Los niveles de reconocimiento del receptor TβRII deben ser comparables con los del TGFβ nativo.
- Estas muteínas deben bloquear la unión de los ligandos TGFβ (TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3) al receptor TβRII. Esto se puede medir directamente por un ELISA competitivo recubriendo las placas con cada uno de los ligandos TGFβ (disponibles comercialmente) y evaluando la capacidad de la muteína para inhibir la unión del TβRII a los mismos.
- Estas variantes mutadas del TGFβ pierden o reducen sustancialmente su capacidad de señalizar por el receptor TβRI. Esta propiedad se puede evaluar directamente en ensayos de inmunodetección por Western cuantificando los niveles de Smad2 y Smad3 fosforiladas en lisados de células tumorales de la línea murina 4T1 y humana MDA-MB231 tratadas con las muteínas o con el TGFβ nativo. Estas muteínas deben inducir la fosforilación de

Smad2 y Smad3 como mínimo 100 veces menos que el TGFβ nativo. La referida propiedad también se puede evaluar *in vitro* en ensayos de inhibición de la proliferación inducida por la IL-2 en la línea celular CTLL-2. Estas mutantes deben poseer una actividad inhibitoria que sea al menos 100 veces inferior a la del TGFβ nativo.

- Estas variantes mutadas del TGFβ tienen la capacidad de inhibir la señalización inducida por cada uno de los ligandos TGFβ (TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3). Esta propiedad se puede evaluar directamente en ensayos de inmunodetección por Western cuantificando los niveles de Smad2 y Smad3 fosforiladas en lisados de células tumorales de la línea murina 4T1 y humana MDA-MB231 tratadas con las muteínas y con el TGFβ nativo. En un rango de concentraciones de las muteínas entre 50ng/mL-10µg/mL, las mismas deben exhibir una capacidad de inhibir al menos 100 veces la señalización inducida por los ligandos comerciales.
- Estas variantes mutadas de TGFβ tienen efecto antitumoral *in vitro*. Las mismas pueden inhibir la migración de varias líneas celulares tumorales tratadas o no con el ligando nativo. Un ejemplo de estas lo constituyen la línea murina 4T1 y la linea humana MDA-MB231. En ensayos de migración celular, estas muteínas deben ser capaces de inhibir significativamente desde el punto de vista estadístico la migración de las células tumorales.
- Estas variantes mutadas del TGFβ pierden o reducen sustancialmente su capacidad de inducir la diferenciación de las células T CD4+ vírgenes a los fenotipos Treg foxp3+ o TH17 en presencia de IL-2 o IL-6 e IL-23 respectivamente. Esta propiedad se puede evaluar directamente en ensayos in vitro de inducción de células Treg y TH17. Estas mutantes deben poseer una actividad inductora que sea al menos 100 veces inferior a la del TGFβ nativo.
- Estas variantes mutadas del TGFβ tienen la capacidad de inhibir la diferenciación de las células T CD4+ vírgenes a los fenotipos Treg foxp3+ o TH17 inducida por los sus homológos naturales. Esta propiedad se puede evaluar directamente en ensayos *in vitro* de inducción de células Treg y TH17. En un rango de concentraciones de las muteínas entre 50ng/mL-10µg/mL, las mismas deben exhibir una capacidad de inhibir al menos 100 veces la señalización inducida por los ligandos comerciales.
- Estas variantes mutadas de TGFβ tienen efecto antitumoral *in vivo*. Las mismas pueden inhibir *in vivo* el crecimiento tumoral y la capacidad metastásica de varias líneas tumorales en un modelo de tumor transplantable. Esta propiedad se puede evaluar utilizando un modelo de tumor primario ortotópico, de la línea de mama 4T1 en ratones BALB/c y de la línea tumoral humana MDA-MB231 en ratones inmunodeficientes. Estas muteínas deben causar una reducción estadísticamente significativa del tamaño tumoral y del número de metastásis pulmonares en comparación con el grupo control tratado con PBS.
- Estas variantes mutadas de TGFβ tienen la habilidad de incrementar *in vivo* la respuesta

inmune antitumoral natural o inducida por vacunación, en un modelo de tumor transplantable. Esta propiedad se puede evaluar utilizando un modelo de tumor primario ortotópico, de la línea de mama 4T1 y subcutáneo de la línea tumoral de colón CT26, en ratones *BALB/c* Estas muteínas deben incrementar la actividad citolítica y la secreción de citocinas, de las células asesinas naturales y de los linfocitos T CD8+. Deben incrementar la actividad de las células dendríticas y de las células T CD4+ patrón TH1 y deben reducir significativamente el número de células T reguladoras y células mielodes supresoras y su actividad protumoral.

La presente invención comprende modificaciones adicionales de las muteínas del TGFβ que pudieran significar producir el dominio maduro carente del LAP, sin que se afecte la secreción del mismo. Esto implica que las muteínas se puedan obtener en su forma activa para la interacción con TβRII. Lo que redunda en simplificación del proceso productivo.

En otro aspecto la presente invención se relaciona con modificaciones adicionales de las muteínas del TGFβ que aumentan su tiempo de vida media. Entre estas modificaciones se encuentran la fusión de cualquiera de los polipéptido inmunomoduladores antes descritos a una proteína transportadora que puede ser la Albúmina o la región Fc de las inmunoglobulinas humanas, la pegilación entre otras.

En una modalidad más particular la presente invención se relaciona con variantes mutadas del TGFβ (mutaciones específicas referidas en la Tabla 2) fusionada a un fragmento Fc de una IgG1 humana, que ha sido seleccionada para mostrar las propiedades referidas anteriormente. La región Fc seleccionada para el acoplamiento tiene un conjunto de mutaciones (ala234, ala235) en el dominio Cγ2 que le impiden interactuar con los receptores Fc gamma, excepto con el neonatal, de esta forma se silencia su capacidad de inducir mecanismos efectores inmunes (Labrijn AF y otros, Curr Opin Immunol. Aug; 20(4):479-85, 2008. Epub 2008 Jul 9).

Estas muteínas incluyen múltiples sustituciones de aminoácidos que reducen significativamente su capacidad de señalizar por ALK5. No obstante, mantienen intacta su capacidad de unirse al TβRII y al TβRIII, ganando capacidades inhibitorias de la actividad del TGFβ nativo.

Tabla 2: Mutante construida, refiriendo la mutación según la numeración del TGFβ humano.

Mutaciones	Nombre de referencia
• W30E, L101E, I51Q	• G_M1
• W30E, L101A, L51Q	• G_M2
• W30E, L101E, I51Q, Q67H	• G_M3
• W30E, L101A, K97D, E12H,I51Q, Q67H	• G_M4

En otro aspecto la presente invención también comprende modificaciones adicionales de las muteínas del TGFβ, ya sea para aumentar la afinidad de las mismas por TβRII y TβRIII, pero sin afectar o incluso mejorando su carácter de inhibidor; o para mejorar su farmacodinámica *in vivo* con el aumento del tiempo de vida. Estas mutaciones adicionales pudieran ser obtenidas por diseño racional con herramientas bioinformáticas, o utilizando bibliotecas moleculares combinatorias de diferente naturaleza (bibliotecas de fagos, bibliotecas de expresión génica en levadura o en bacterias).

- **Aplicación terapéutica de los polipéptidos análogos del TGFβ.**

Esta invención incluye además las composiciones farmacéuticas que comprenden como principio activo las muteínas de TGFβ y sus análogos o las proteínas de fusión divulgadas por la presente invención, así como sus posibles aplicaciones terapéuticas con el objetivo de modular la capacidad invasiva y metástasica de varios tumores y la actividad de varias células del sistema inmune y del tejido conectivo, en enfermedades donde sus funciones reducen la respuesta inmune protectiva ya sea natural o inducida por vacunación o inducen una excesiva reparación tisular y fibrosis.

Para su uso terapéutico, los polipéptidos de la presente invención se deben administrar a un sujeto portador de la enfermedad de forma independiente o combinado con otros polipéptidos o con otras sustancias que faciliten o potencien su acción terapéutica. La ruta de administración podrá ser cualquiera de las rutas de administración descritas en el estado de la técnica para la administración parenteral de fármacos. Podrá administrarse preferentemente por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intratumoral.

Los polipéptidos o proteínas de fusión descritos por la presente invención también pueden administrarse formando parte de una composición farmacéutica útil en la terapia de cáncer, enfermedades que cursan con fibrosis y en enfermedades infecciosas crónicas. Preferentemente, la presente invención engloba composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición incluye portadores farmacéuticamente aceptables. Entre los farmacéuticamente aceptables se incluyen, pero no se limitan, salina, agua estéril, salina amortiguada con fosfato, y otros parecidos. Otros agentes de amortiguación, agentes dispersos, y sustancias inertes no tóxicas apropiadas para entregar a un paciente podrán ser incluidas en las composiciones de la presente invención. Las composiciones podrán ser soluciones apropiadas para la administración, y son normalmente estériles y libres de partículas indeseables.

En un aspecto la presente invención también se refiere a métodos de tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de los polipéctidos, proteínas de fusión o composiciones descritos en la presente invención a sujetos con cáncer, enfermedades que cursan con fibrosis o enfermedades infecciosas crónicas. En una modalidad particular el sujeto es un humano.

Los polipéptidos o proteínas de fusión descritos por la presente invención también pueden administrarse en combinación con las terapias oncológicas tradicionales (quimioterapia y radioterapia) como potenciador del efecto de las mismas.

Para obtener el efecto terapéutico deseado, los polipéptidos de la presente invención deberá ser administrado a dosis suficientemente altas como para garantizar una concentración del mismo en el nodo linfático o sitio periférico relevante para la enfermedad en estudio, que esté en el rango de concentraciones para el cual la muteína muestra un efecto inhibidor del TGFβ nativo. La dosis en cuestión deberá por tanto ser ajustada para el tipo de enfermedad y vía de administración en estudio. Por ejemplo en el caso de terapia de tumores, la dosis debe ajustarse para lograr concentraciones de la mutante en el interior del tumor y/o en el nodo linfático loco-regional que garanticen su efecto inhibidor. Los rangos de dosis a explorar pueden variar entre 1.25-20 mg/Kg/dosis semanal o quincenal.

El número de administraciones a aplicar deberá también ajustarse a la biodistribución de la muteína en cuestión. En general se deberá lograr sostener las concentraciones efectivas antes referidas por un tiempo que va desde 2 días hasta 30 días consecutivos. Si la muteína es acoplada a una proteína transportadora, la frecuencia de administraciones de la misma deberá ser ajustada en consecuencia.

Cuando un compuesto o una composición de la invención se usan en combinación con otro agente anticancerígeno, la presente invención proporciona, por ejemplo, tratamiento simultáneo, escalonado, o alterno. Así, el/los compuestos de la invención se pueden administrar al mismo tiempo en composiciones farmacéuticas separadas, y donde un compuesto de la invención se puede administrar antes o después que el otro agente anticancerígeno, por ejemplo, con una diferencia de segundos, minutos, horas, días o semanas.

Debe entenderse por acción terapéutica la remisión total o parcial de los síntomas de la enfermedad. En cáncer, la disminución del volumen tumoral o el incremento del tiempo de recaída será, entre otros, el criterio de remisión de la enfermedad.

Las ventajas de esta nueva estrategia terapéutica con respecto a otras propuestas para modular la señalización TGFβ serían múltiples. Por ejemplo:

- Las mutantes de TGFβ son proteínas prácticamente propias (excepto por una pocas mutaciones) y por tanto de baja inmunogenicidad. Este factor reduce al mínimo el riesgo de respuestas de anticuerpos contra la misma.
- La alta especificidad por el sistema de receptores reduce las toxicidades no esperadas (comunes en estrategias basadas en inhibidores de pequeña talla).
- Estas variantes mutadas de TGFβ mantienen afinidades de unión al receptor TβRII al menos del orden de la afinidad del TGFβ1 y TGFβ3 nativos (6-10 pM). Esta afinidad es difícil de superar con estrategias de inhibición del receptor o el ligando, con anticuerpos monoclonales u otras drogas.

- Estas variantes mutadas de TGFβ son de menor talla que los anticuerpos monoclonales y que los receptores acopados a Fc. Lo cual en el escenario terapéutico de enfermedades oncológicas le garantizará mejor penetrabilidad al tumor que las drogas descritas anteriormente que inhiben la señalización del TGFβ.
- Estas variantes mutadas de TGFβ inhiben la señalización de cualquier ligando que señalice por el sistema de receptores TβRII/TβRI (ALK5), lo cual es una ventaja teórica sobre los anticuerpos pan-ligandos, pues estos están dirigidos solo a las isoformas TGFβ conocidas, si existiesen otras estos anticuerpos podrían no inhibirlas.
- Estas variantes mutadas de TGFβ conservan la capacidad de interactuar con el receptor TβRIII. Esto constituye una ventaja sobre los anticuerpos anti-receptor TβRII, pues las muteínas bloquearán todos los posibles sitios de unión de los ligandos naturales a la superficie celular.
- La unión a un fragmento Fc aumenta el tiempo de vida media de las muteínas, lo cual le daría una ventaja con respecto a las drogas de pequeña talla, ya que las dosis y su frecuencia serían menores. Esto reduce las toxicidades no esperadas.
- La unión a un fragmento Fc de una IgG1 humana que no interactúa con los receptores Fc gamma, excepto con el neonatal, evitaría que se desencadenen mecanismos efectores inmunes sobre células del hospedero no tumorales, reduciendo el potencial de toxicidades no esperadas en comparación con los anticuerpos anti-receptor II los cuales mantienen intacta su capacidad de interactuar con los receptores Fc gamma.

La presente invención queda aún más elaborada con los siguientes ejemplos y dibujos. Sin embargo, estos ejemplos no deberían ser interpretados como una limitación del ámbito de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ensayo de inmunodetección por Western de la muteína G_M1 y el TGFβ nativo. El SDS-PAGE de estas proteínas fue realizado bajo condiciones no reductoras y reductoras y se tiñó con un anticuerpo anti-TGFβ1 humano. La primera banda corresponde a un patrón de bajo peso molecular, la segunda banda a la muteína G_M1, la tercera banda corresponde al TGFβ1 nativo y la cuarta al anticuerpo irrelevante hR3.

Figura 2. Evaluación por ensayo de ELISA del reconocimiento del receptor TβRII por la muteína G_M1. Como control negativo se usó el anticuerpo irrelevante hR3. La muteína G_M1 retiene su capacidad de unión al receptor TβRI, la cual es similar al del TGFβ1 nativo.

Figura 3. Ensayo de inhibición de la proliferación en la línea celular dependiente de IL-2, CTLL-2, inducida por el TGFβ mutado o nativo. Se demuestra que la capacidad de la muteína de inhibir la proliferación de la línea celular CTLL-2 es mucho menor que la del TGFβ1 humano nativo. Los

datos se expresaron como porcentaje medio de inhibición de 3 experimentos independientes.

Figura 4. Ensayo para evaluar la capacidad de la muteína G_M1 de neutralizar la inhibición de la línea celular dependiente de IL-2, CTLL-2, inducida por el TGFβ1 nativo. La figura muestra el porcentaje medio de proliferación celular de 3 experimentos independientes.

Figura 5. La muteína G_M1 inhibe la migración de la línea tumoral 4T1 *in vitro* Se tomaron fotos de la cicatrización a distintos intervalos de tiempo como se indica en la figura la cual muestra que la cicatrización es menor en cada punto de tiempo cuando las células son tratadas con la muteína.

Figura 6. La muteína G_M1 inhibe la diferenciación/conversión de células T vírgenes CD4+CD25-Foxp3-al fenotipo de células reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ inducido por el TGFβ nativo. El porcentaje de células T reguladoras recobrado del cultivo de células T se reduce casi a 0disminuye casi completamente cuando se incuban las células con 500 ng/ml de la muteína. Esta concentración es solo 30 veces mayor que la del TGFβ1 humano recombinante que se utiliza para la inducción de la conversión.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Diseño de las muteínas de TGFβ.

Las muteínas se diseñaron computacionalmente, a partir de técnicas bioinformáticas, usando como base la estructura reportada del complejo ternario del TGFβ1 y TGFβ3 humano con el receptor del TGFβ. La energía de unión de las isoformas nativas y de todas las posibles variantes mutadas se determinó usando programas bioinformáticos de dominio público. La muteína G_M1 se expresó en las células CHO-K1 a partir de una construcción genética en el vector lentiviral pIW y se le incluyo en el extremo C-terminal la región bisagra y los dominios Cγ2 y Cγ3 de una IgG1 humana y una cola de histinas. G_M1 se purificó por cromatografía de afinidad con proteína A (Figura 1) y se obtuvo una elevada pureza (>95%).

Ejemplo 2. Capacidad de unión de la muteína G_M1 al TβRII.

Se realizó un ensayo de ELISA donde se recubrió con el TBRII (1ug/ml) y se reveló con un anticuerpo anti-Fc humano, acoplado a fosfatasa alcalina. Se utilizó como control negativo el anticuerpo irrelevante hR3. La Figura 2 muestra que la mutante G_M1 mantiene su capacidad de unión al receptor TβRII, la cual es similar al TGFβ1 nativo.

Ejemplo 3. La muteína G_M1 tiene una reducida capacidad de señalizar a través del receptor TβRI (ALK5) y por tanto de mimetizar la actividad biológica del TGFβ nativo.

Se comparó la inhibición de la proliferación de la línea celular CTLL-2 dependiente de IL-2, inducida por el TGFβ mutante o nativo. 5000 células/pozo de la línea CTLL-2 fueron estimuladas con 50 U/ml de IL-2 comercial y determinadas concentraciones de rTGFβ1 comercial o de la muteína G_M1 por 48 horas. Más tarde, se añadió el reactivo alamar blue al cultivo y se midió la reducción a 540 y 630nm.

La muteína G_M1 fue incapaz de inhibir la proliferación de la línea CTLL-2, al menos a concentraciones 200 veces mayores que las del TGFβ1 comercial empleado como control positivo del experimento (Figura 3), por lo que la capacidad de dicha muteína de inhibir la proliferación de inhibir la proliferación celular de la línea CTLL-2 es mucho menor que la del TGFβ1 comercial.

Ejemplo 4. La muteína G_M1 es un antagonista de la señalización TGFβ *in vitro*.

5000 células/pozo de la línea CTLL-2 fueron estimuladas con 50 U/ml de IL-2 comercial y se cultivaron en presencia de 2 pM de TGFβ1 comercial y de determinadas concentraciones de la muteína G_M1, el anticuerpo control de isotipo hR3 o del control positivo, un anticuerpo anti-TGFβ1. Después de 48 horas se añadió el reactivo alamar blue al cultivo y se midió su reducción a 540 y 630nm.

La muteína G_M1 no así el hR3, neutralizó la inhibición de la proliferación de la línea CTLL-2 inducida por el TGFβ1 comercial (Figura 4). El efecto neutralizante causado por la muteína es similar al obtenido por el anticuerpo anti-TGFβ1, que fue usado como control positivo del experimento.

Ejemplo 5. La muteína G_M1 tiene efecto anti-tumoral *in vitro*.

La habilidad de la muteína G_M1 de inhibir la migración de la línea tumoral murina 4T1 se evaluó en un ensayo *in vitro*, empleando el método de la herida en la monocapa de células adherentes (Liang CC y otros, Nat Protoc. 2(2): 329-33, 2007). Las células confluentes se hirieron raspando la monocapa con una pipeta estéril y la muteína G_M1 o el TGFβ1 comercial (control negativo), se añadieron al pocillo. En la Figura 5 se observa que la velocidad de cierre se reduce significativamente ($p<0,05$ Prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn en cada punto de tiempo) cuando las células se tratan con la muteína.

Ejemplo 6. La muteína G_M1 inhibe la diferenciación de células T convencionales vírgenes.

Se purificó la población de células vírgenes CD4+CD25-GITR- del bazo de 4 ratones C57/BL6 por citometría de flujo. $5x10^4$ de estas células se estimularon con 5 ng/mL de IL-2 y 5 ng/mL de TGFβ, en presencia de 3 µg/mL de anti-CD3 pegado a la placa y 3 µg/mL de anti-CD28 soluble. La muteína se evalúo a las concentraciones de 250 y 500 ng/mL. Bajo estas condiciones el porcentaje de conversión a células T reguladoras inducidas fue de 55,6%. Se midió el porcentaje de células T reguladoras Foxp3+ recobrado en presencia o ausencia de la muteína. La Figura 6 muestra cómo el porcentaje de células T reguladoras recobrado en el cultivo de células T se reduce casi a 0 en presencia de la muteína G_M1.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que antagoniza la actividad de los ligandos TGFβ naturales mediada por el receptor ALK5, caracterizado porque posee una homología mayor del 90% con respecto a la secuencia de aminoácidos de los ligandos TGFβ naturales.

2. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende al menos una mutación en uno de los residuos de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en W30, W32, L101, I51, L51, Q67 y Y6.

3. El polipéptido de la reivindicación 2 caracterizado porque el residuo original se muta por uno de los residuos de aminoácidos que se selecciona del grupo que comprende;

   para la posición 30: N,R,K,D,Q,L,S,P,V,I,G,C,T,A,E;

   para la posición 32: A;

   para la posición 101: A, E;

   para la posición 51: Q,W,Y,A;

   para la posición 67: H, F, Y, W y

   para la posición 6: A

4. El polipéptido de la reivindicación 3 donde se han adicionado mutaciones en la interface de interacción con los receptores TGFβRII y/o TGFβRIII aumentando su afinidad por los mismos.

5. El polipéptido de la reivindicación 3 caracterizado porque comprende modificaciones para producir el dominio maduro carente del LAP sin que se afecte la secreción del dominio maduro.

6. El polipéptido de la reivindicación 3 caracterizado está fusionado a un fragmento Fc de una IgG1 humana que comprende las mutaciones ala234 y ala235 en el dominio Cγ2.

7. Una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, enfermedades que cursan con fibrosis y enfermedades infecciosas crónicas que comprende;

   al menos un polipéptido de la reivindicación 3 en un rango 50ng/mL-10μg/mL y

   un vehículo farmacéuticamente adecuado

8. Una composición farmacéutica según reivindicación 7 que comprende;

una cantidad terapéuticamente eficaz de una mezcla de los polipéptidos de la reivindicación 3 y

un vehículo farmacéuticamente adecuado

9. La composición farmacéutica según reivindicación 7 caracterizada porque el polipéptido está unido covalentemente a una proteína transportadora.

10. La composición farmacéutica según reivindicación 9 caracterizada porque la proteína transportadora es la región Fc de las inmunoglobulinas humanas.

11. La composición farmacéutica según reivindicación 9 caracterizada porque el polipéptido está pegilado.

12. El polipéptido de las reivindicaciones 1 a 6 para la fabricación de un medicamento útil en el tratamiento del cáncer, enfermedades que cursan con fibrosis y enfermedades infecciosas crónicas.

13. El polipéptido de las reivindicaciones 1 a 6 para la fabricación de un medicamento útil para potenciar la respuesta celular y/o humoral a vacunas.

14. El polipéptido según reivindicación 13 cuando la vacuna a potenciar es una vacuna terapéutica para cáncer.