POLIPÉPTIDOS INMUNOMODULADORES DERIVADOS DE LA IL-2 Y SU USO TERAPÉUTICO EN CÁNCER Y EN INFECCIONES CRÓNICAS. \

CAMPO DE LA INVENCIÓN.

La presente invención se relaciona con la rama de la biotecnología y particularmente con la inmunología. En un aspecto la invención se relaciona con soluciones técnicas con aplicación terapéutica para la salud humana. Particularmente se relaciona con la aplicación terapéutica de la modulación del sistema inmune mediante análogos de moléculas naturales.

ESTADO DEL ARTE RELACIONADO:

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

La interleucina 2 ha sido además propuesta como un actor relevante en el mecanismo por el cual las células T reguladoras suprimen la actividad y expansión de otras células efectoras como las T CD4 auxiliadoras, las T CD8 citotóxicas y las células asesinas naturales NK. En particular ha sido propuesto recientemente que las células T reguladoras suprimen a otras células T, induciendo la disminución local de los niveles de IL-2 (Pandiyan, P., *et al.* (2007) Nat Immunol. 8, 1353-62). Este efecto supresor se sustenta: a) En su capacidad de inhibir directamente la producción de nueva IL-2 en las células T efectoras que suprime (Almeida, A.R., *et al.* (2002) J Immunol. 169, 4850-60; Takahashi, T., *et al.* (1998) Int Immunol. 10, 1969-80; Thornton, A.M., *et al.* (1998) J Exp Med. 188, 287-96; Wolf, M., *et al.* (2001) Eur J Immunol. 31, 1637-45); b) La capacidad de consumir de forma rápida y eficiente la IL-2 presente en su microambiente (Pandiyan, P., *et al.* (2007) Nat Immunol. 8, 1353-62); y c) Su capacidad de sobre-expresar la cadena alfa del receptor de IL-2 (Kuniyasu, Y., *et al.* (2000) Int Immunol. 12, 1145-55), lo que le permite usar más eficientemente la IL-2 cuando hay bajas concentraciones de la misma.

Resumiendo, la IL-2 es una citocina con propiedades altamente pleiotrópicas, siendo muy relevante en la actividad biológica de diferentes poblaciones celulares. Esta propiedad hace de la IL-2 un nodo importante en la regulación de la respuesta inmune, convirtiéndola en un blanco atractivo y complejo para terapias de inmuno modulación. En particular, el carácter pleitrópico de la acción de esta citocina, hace que sea muy

relevante el diseño de estrategias terapéuticas que modulen de modo selectivo/preferencial la actividad de esta citocina en distintas poblaciones celulares. La IL-2 ha sido utilizada por varios años en la terapia del cáncer. En particular su uso en altas dosis es una terapia aprobada en varios países para el tratamiento del melanoma y carcinoma renal metastásico. Sin embargo, el uso directo de la IL-2 en pacientes está severamente limitado por los efectos tóxicos de la misma. Tanto es así que apenas el 20% de los pacientes elegibles reciben la terapia y más aún solo el 17% de los tratados muestra respuesta objetiva relevante. Una posible explicación para este dramático fallo en la clínica es que la terapia con IL-2 nativa estimula también poblaciones de células T reguladoras (Ahmadzadeh, M., *et al.* (2006) Blood. 107, 2409-14) que pudieran actuar en contra de la inmuno-estimulación perseguida con el mismo. Varias estrategias se han desarrollado con el objetivo de mitigar los efectos tóxicos de la terapia con IL-2. Algunas de estas estrategias se basan en el empleo de variantes mutadas de IL-2, diseñadas para aumentar la capacidad de esta molécula de señalizar mayormente por el receptor de alta afinidad (cadenas alfa, beta y gamma) y no por el de afinidad intermedia (cadenas beta y gamma). La idea básica es promover la señalización en células T versus la señalización en células NK que son las células que se consideran responsables por los efectos tóxicos observados. En esta línea de trabajo se encuentran las invenciones siguientes: U.S. Pat. 7,186,804, U.S. Pat. 7,105,653, U.S. Pat. 6,955,807, U.S. Pat. No. 5,229,109, U.S. Patent aplication 20050142106. Es importante notar en cualquier caso que ninguna de estas invenciones se relaciona con mutantes de IL-2 con capacidad para modular diferencialmente la actividad de células T reguladoras. Las mutantes en estas invenciones son agonistas de la IL-2 y no inhibidores como los descritos en la presenta aplicación. Otras variantes mutadas de la IL-2 han sido creadas con el objetivo de incrementar su actividad farmacológica. Por ejemplo mejorando su plegamiento o incrementando su tiempo de vida en sangre. Entre otras las siguientes invenciones van en esta línea de trabajo: U.S. Pat. No. 4,959,314, U.S. Pat. No. 5,116,943, U.S. Pat. No. 4,853,332. Nuevamente ninguna de estas mutantes posee capacidad demostrada de modular diferencialmente la actividad de células T reguladoras. Otras invenciones existentes se relacionan con inhibidores de la actividad de la IL-2, fundamentalmente para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o prevenir el rechazo a trasplante de órganos. Entre estas invenciones están: U.S. Pat. 5,876,717,

U.S. Pat 5,635,597, U.S. Pat 6,906,170, U.S. Pat 6,168,785. Ninguno de estos inhibidores posee capacidad demostrada de modular diferencialmente la actividad de células T reguladoras. Más aún ninguno de ellos ha sido reclamado con potencial uso para promover respuestas inmunes en terapia de cáncer o infecciones crónicas. Finalmente se debe referir que existen en la literatura numerosas propuestas de agentes terapéuticos (Kreitman, R.J. (2009) Curr Pharm Des. 15, 2652-64; Litzinger, M.T., Fernando, R., Curiel, T.J., Grosenbach, D.W., Schlom, J. and Palena, C. (2007) Blood. 110, 3192-201; Morse, M.A., Hobeika, A.C., Osada, T., Serra, D., Niedzwiecki, D., Lyerly, H.K. and Clay, T.M. (2008) Blood. 112, 610-8; Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T. and Nakayama, E. (1999) Cancer Res. 59, 3128

33; Quezada, S.A., Peggs, K.S., Curran, M.A. and Allison, J.P. (2006) J Clin Invest. 116,

1935-45) que proponen modular o reducir la actividad de las células T reguladoras *in vivo*. Estos agentes terapéuticos han sido probados en modelos animales o incluso en pacientes para la terapia directa de cáncer o para potenciar el 5 efecto de vacunas. También hay algunos reportes que proponen modular la actividad de la IL-2, en particular con anticuerpos monoclonales (Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M.P., Surh, C.D. and Sprent, J. (2006) Science. 311, 1924-1927; Boyman, O., *et al.* (2006) Expert Opin Biol Ther. 6, 1323-31; Kamimura, D., *et al.* (2006) J Immunol. 177, 306-14; Murakami, M., Sakamoto, A., Bender, J., Kappler, J. and 10 Marrack, P. (2002) Proc Natl Acad Sci USA. 99, 8832-7; Tomala, J., Chmelova, H., Mrkvan, T., Rihova, B. and Kovar, M. (2009) J Immunol. 183, 4904-4912), para promover mejores o más efectivas respuestas inmunes. Sin embargo, para nuestro conocimiento no existe ningún reporte en la literatura, basado en variantes mutadas de la IL-2, que muestre la posibilidad de su uso para modular selectivamente o
15 preferencialmente en las células T reguladoras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en el hallazgo científico de que variantes mutadas de IL-2 pueden ejercer una inhibición preferencial sobre las células T reguladoras. Los
20 inventores encontraron por primera vez en experimentos *in vitro* que variantes mutadas de IL-2 pueden inhibir sustancialmente la actividad de las células T reguladoras (T CD4+CD25+FoxP3+), afectando mínimamente la activación y/o proliferación de otros linfocitos con funciones efectoras. Este hallazgo sienta las bases para una nueva estrategia de inmunomodulación de las células T reguladoras en
25 enfermedades como el cáncer o infecciones crónicas donde las mismas resultan relevantes. La presente invención se refiere a polipéptidos que comparten secuencia primaria con la IL-2 humana, excepto porque varios aminoácidos han sido mutados eliminando o reduciendo sustancialmente su capacidad de señalizar por las diferentes formas del
30 receptor de IL-2. Estas variantes mutadas de IL-2 mantienen su capacidad de unión a uno o varios componentes del receptor de IL-2, teniendo una actividad inhibidora que es preferencial sobre poblaciones de células T reguladoras, modulando negativamente su función. Se protegen en particular varias variantes específicas de mutantes de IL-2 que tienen propiedad inhibidora preferencial sobre células T reguladoras. La invención
35 incluye además las aplicaciones terapéuticas de estas variantes mutadas, solas o en combinación con vacunas, para la terapia de enfermedades como el cáncer o infecciones crónicas donde la actividad de las células T reguladoras (Tregs) es relevante. La presente invención propone una nueva estrategia para modular la actividad de las
40 células T reguladoras en enfermedades donde la supresión mediada por estas células reduce la respuesta inmune protectiva, ya sea natural o inducida por vacunación. Las ventajas de esta nueva estrategia terapéutica con respecto a otras propuestas para modular la actividad de la Tregs serían múltiples. Por ejemplo:

- Las mutantes de IL-2 son proteínas prácticamente propias (excepto por una pocas mutaciones). Este factor reduce el riesgo de toxicidades no esperadas (comunes en estrategias basadas en inhibidores de pequeña talla) o de una

respuesta inmune contra la droga (como serían posibles en estrategias como el ONTAK, que acoplan la IL-2 a una molécula foránea y tóxica como es la toxina diftérica).

- Estas variantes mutadas de IL-2 mantendrían afinidades de unión al 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 superar con estrategias de inhibición del receptor o el ligando, con anticuerpos monoclonales u otras drogas.

- La pequeña talla de estas mutantes (15 kD) le pudiera permitir a las mismas tener una alta movilidad y penetrar fácilmente el microambiente tumoral. Algo que se sabe en ocasiones es complejo para moléculas más grandes como anticuerpos y otros.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN.

Obtención de los polipéptidos análogos de la IL-2.

La presente invención se relaciona con polipéptidos de tamaño entre 100 y 500 aminoácidos, preferiblemente de tamaño 140 cuyo peso molecular aparente es de al menos 15 kD. Estos polipéptidos mantienen una alta identidad de secuencia con la IL2 nativa, más de un 90% de identidad, en una zona de su secuencia, incluyen de 2 a 6 mutaciones respecto a la IL-2 nativa. En dichas posiciones, estos polipéptidos son mutados introduciendo residuos de aminoácidos diferentes a los que existen en la misma posición en la IL-2 nativa. Los residuos que sustituyen a los residuos originales se seleccionan para poseer propiedades fisicoquímicas bien distintas al aminoácido original, cambio de residuo polar por apolar, cargado por no cargado, grande por pequeño, acido por básico, entre otros. Los polipéptidos de la presente invención también pueden denominarse indistintamente como polipéptidos inmunomoduladores, análogos de la IL-2 o muteínas de la IL-2, entre otros. Estos polipéptidos se diseñan a partir de la estructura 3D de la IL-2 (depositadas en la base de datos PDB), introduciendo mutaciones sólo en las posiciones de la IL2 que corresponden a aminoácidos significativamente expuestos al solvente, identificados usando programas bioinformáticos de dominio público como RASMOL, SwissPDBviewer u otros. Los polipéptidos de esta invención se pueden obtener por diferentes vías, entre otras, por síntesis de proteínas. También podrían obtenerse por técnicas de ingeniería genética, por ejemplo expresándolos como cuerpos de inclusión en bacterias como la E. coli. 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 de la IL-2 por su actividad biológica;** Los polipéptidos de la presente invención son seleccionados a partir de experimentación *in vitro* y *o in vivo* para poseer simultáneamente las siguientes propiedades:

1) Estas variantes mutadas de IL-2 pierden o reducen sustancialmente su

capacidad de señalizar en las diferentes formas del receptor de IL-2. Esta propiedad puede evaluarse directamente en ensayos de proliferación *in-vitro* con líneas celulares dependientes de IL-2 como la CTLL2 o la Kitt225, o con ensayos con linfocitos T o células NK, múridas y/o humanas. Estas mutantes deben poseer una actividad estimulatoria que sea al menos 100 veces inferior a la de la IL-2 nativa. 2) Estas variantes mutadas de IL-2 (muteínas) mantienen su capacidad de unión a uno o varios componentes moleculares del receptor de IL-2. Esta capacidad de unión puede ser evaluada directamente por ELISA contra cadenas del receptor comercialmente disponible como la cadena alpha y beta del receptor o indirectamente sobre poblaciones celulares positivas para el receptor. Los niveles de reconocimiento del receptor de IL-2 debeN ser comparables con los de la IL-2 nativa en estos ensayos.

3) Estas variantes mutadas de IL-2 tienen una actividad inhibitoria de la actividad de la IL-2 nativa sobre linfocitos, pero que es preferencial sobre poblaciones de células T reguladoras (al menos en las células T CD4+CD25+FoxP3+). Como mínimo las muteínas de IL-2 comprendidas en esta invención, son capaces en cierto rango de concentraciones de inhibir preferencial o selectivamente la actividad o expansión de las células T reguladoras, sin afectar o afectando solo mínimamente la actividad y/o expansión de otros linfocitos con funciones efectoras como las células T auxiliadoras, células T citotóxicas o células NK. La actividad inhibitoria preferencial o selectiva de estas muteínas puede ser evidenciada con diversos ensayos *in vitro*, donde se estudie la respuesta a estímulos de mezclas de poblaciones efectoras y reguladoras en presencia de cantidades crecientes de las muteínas. En un rango de concentraciones de las muteínas, las mismas deben exhibir una capacidad de inhibir al menos tres veces más la expansión o actividad de la células T reguladoras de lo que inhiben la actividad o expansión delas poblaciones efectoras utilizadas en el ensayo, por ejemplo células T auxiliadoras, células T citotóxicas o células NK. Esta invención también incluye varias variantes particulares de IL-2 mutadas (mutaciones específicas referidas en la tabla 1), que han sido seleccionadas para mostrar las propiedades referidas anteriormente. Estas muteínas incluyen múltiples sustituciones de aminoácidos que reducen significativamente su capacidad de señalizar (estimular) especialmente a los linfocitos múridos y humanos. No obstante, ellas mantienen intacta su capacidad de unirse a las cadenas alfa y beta del receptor, ganando capacidades inhibitorias de la actividad de la IL-2 nativa. Como el aspecto más significativo de estas muteínas, ellas muestran en cierto rango de concentraciones una marcada capacidad de inhibir preferencialmente a las células T CD4+CD25+FoxP3+, en un cultivo de linfocitos que contiene estas células y otras células T efectoras.

Mutaciones	**Nombre de referencia**
Q22V, Q126A, I129D, S130G	M1

L18N, Q126Y, S130R	M2
Q13Y, Q126Y, I129D, S130R	M3
L18N, Q22V, T123A, I129D, S130R	M4

Tabla 1: Mutantes construidas, refiriendo la mutación según la numeración de la IL2 humana.

La presente invención también comprende modificaciones adicionales de la clase de mutantes de IL-2 antes referida y en especial las descritas en la tabla 1. Ya sea para aumentar la afinidad de las mismas por componentes específicos del receptor de IL-2, pero sin afectar o incluso mejorando su carácter de inhibidor preferencial; o para mejorar su farmacodinámica *in vivo*: aumentar el tiempo de vida o reducir su internalización por las células T. Estas mutaciones adicionales pudieran ser obtenidas por diseño racional con herramientas bioinformáticas, o utilizando bibliotecas moleculares combinatorias de diferente naturaleza (bibliotecas de fagos, bibliotecas de expresión génica en levadura o en bacterias). **Aplicación terapéutica de los polipéptidos análogos de la IL-2;** Esta invención incluye además las composiciones farmacéuticas que comprenden como principio activo las muteínas de IL-2 y sus análogos, divulgadas por la presente invención, así como sus posibles aplicaciones terapéuticas con el objetivo de modular selectivamente la actividad de la IL-2 en células T reguladoras, promoviendo consecuentemente la potenciación de la respuesta inmune natural o inducida por vacunas en enfermedades como el cáncer o infecciones crónicas donde las células T reguladoras sean particularmente relevantes. Para su uso terapéutico, el polipéptido de la presente invención deberá ser administrado a un sujeto portador de la enfermedad de forma independiente o combinado con otros polipéptidos o con otras sustancias que faciliten o potencien su acción terapéutica. La ruta de administración podrá ser cualquiera de las rutas de administración descritas por el arte previo para la administración parenteral de fármacos. Podrá administrarse preferiblemente por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intratumoral. 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 y enfermedades infecciosas crónicas. Para obtener el efecto terapéutico deseado, el polipéptido de la presente invención deberá ser administrado a dosis suficientemente altas como para garantizar una concentración del mismo en el nodo linfático o sitio periférico relevante para la enfermedad en estudio, que esté en el rango de concentraciones para el cual la muteína muestra un efecto inhibidor preferencial sobre las células T reguladoras. La dosis en cuestión deberá por tanto ser ajustada para el tipo de enfermedad y via de administración en estudio. Por ejemplo en el caso de terapia de tumores, la dosis debe ajustarse para lograr concentraciones de la mutante en el interior del tumor y/o en el

nodo linfático loco-regional que garanticen un efecto inhibidor preferencial sobre células T reguladoras. Los rangos de dosis a explorar pueden variar desde decenas de microgramos hasta pocos miligramos por dosis El número de administraciones a aplicar deberá también ajustarse a la biodistribución de la muteína en cuestión. En general se deberá lograr sostener las concentraciones efectivas antes referidas por un tiempo que va desde 2 días hasta 30 días consecutivos. Note por ejemplo que si la muteína es acoplada a una proteína transportadora, la frecuencia de administraciones de la misma deberá ser ajustada en consecuencia. 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. Finalmente, debe resaltarse que las ventajas de esta nueva estrategia terapéutica con respecto a otras propuestas para modular la actividad de la Tregs serían múltiples. Por ejemplo:

Las mutantes de IL-2 son proteínas prácticamente propias (excepto por unas pocas mutaciones). Este factor reduce el riesgo de toxicidades no esperadas (comunes en estrategias basadas en inhibidores de pequeña talla) o de una respuesta inmune contra la droga (como serían posibles en estrategias como el ONTAK, que acoplan la IL-2 a una molécula foránea y tóxica como es la toxina diftérica).

Nuestras variantes mutadas de IL-2 mantendrían afinidades de unión al 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 superar con estrategias de inhibición del receptor o el ligando, con anticuerpos monoclonales u otras drogas.

La pequeña talla de nuestras mutantes (15 kD) le pudiera permitir a la misma tener una alta movilidad y penetrar fácilmente el microambiente tumoral. Algo que se sabe en ocasiones es complejo para moléculas más grandes como anticuerpos y otros.

EJEMPLOS Ejemplo 1. Las mutantes fueron diseñadas computacionalmente, a partir de técnicas bioinformáticas, usando como base la estructura reportada del complejo cuaternario de IL-2 humana unida al receptor según reporte de 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): p. 1159-63 y algoritmos de cálculo energéticos de la interacción proteína-ligando de dominio público. Diversas variantes de muteínas fueron predichas inicialmente, para no afectar la capacidad de unión por las cadenas alfa y beta del receptor. Estas muteínas fueron expresadas en E.coli a partir de una construcción genética en el vector pET28a incluyéndoles una secuencia identificadora de 6 histidinas en el amino terminal. Las muteínas fueron purificadas por fase reversa (fig 1) obteniéndose con una elevada pureza (>95%). Las muteínas obtenidas fueron seleccionadas a partir de sus propiedades en ensayos experimentales in vitro. De todas la muteínas construidas en la tabla 1 se describe un conjunto de mutaciones específicas que tienen la propiedad de inhibir preferencialmente la actividad de las Tregs.

Ejemplo 2. Las muteínas seleccionadas retienen la capacidad de unión a diferentes componentes del receptor de IL2. En particular la cadena beta y alfa del receptor. La figura 2 muestra utilizando técnicas de ELISA que varias de las mutantes especificadas en la tabla 1 mantienen prácticamente intacta su capacidad de unión a la cadena alfa (fig.2a) y la cadena beta (fig.2b) del receptor de la IL-2 humana. La figura 3 muestra adicionalmente la

confirmación de que estas mutantes se unen al receptor sobre la superficie de una célula (fig.3a) y que esa unión puede ser desplazada gradualmente por la adición de IL-2 nativa (fig.3b).

Ejemplo 3. Las muteínas seleccionadas reducen significativamente su capacidad de señalizar por el receptor de IL-2. La figura 3 ilustra este hecho a partir de medir la capacidad de las mismas de estimular el crecimiento de la línea celular CTLL2 (fig. 4a)
o de estimular la diferenciación de células NK a partir de linfocitos totales de bazo (fig. 4b). Estas muteínas en altas concentraciones inhiben la actividad de la IL-2 nativa, tanto sobre linfocitos T (fig. 5a) como sobre células NK (fig. 5b).

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

Ejemplo 5. Las muteínas seleccionadas son secuestradas preferencialmente por las células T reguladoras en un cultivo, reduciendo su capacidad de afectar la actividad de células T efectoras. Estas muteínas inhiben la señalización (estimulación) mediada por la IL-2 producida de forma endógena en poblaciones de células T auxiliadoras 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, reduce paradójicamente la inhibición mediada por la mutante sobre las poblaciones T efectoras (fig. 7). Este efecto se explica por la capacidad que tienen las muteínas descritas de inhibir preferencialmente la actividad de la IL-2 sobre las poblaciones T reguladoras. La presencia de células T reguladoras aún en pequeñas cantidades desvía la actividad de las mutantes hacia estas células, reduciendo la actividad supresora de la muteína sobre la población efectora.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS Figura 1. Producción y purificación de variantes mutadas de IL-2 humana. **a**: Western blot que muestra la expresión de algunas variantes mutadas y la IL-2 nativa control en cepas de E. coli transfectada con la construcción genética realizada; **b:** Ejemplo de un perfil de purificación típico obtenido en la purificación por fase reversa.

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 referidas en la tabla 1. Como control positivo se usa la IL-2 nativa. Como se puede observar todas las muteínas ensayadas mantienen niveles de reconocimiento comparables al de la IL-2 nativa.

Figura 3. Evaluación por citometría de flujo de la capacidad de varias de las muteínas referidas en la tabla 1 de unirse al receptor de IL-2 sobre la superficie de las células. En particular de la línea celular múrida CTLL2. Las muteínas o el control de la IL-2 nativa en la

superficie de las células fueron detectadas con un anticuerpo anti-6-His-PE que reconoce un cabeza de histidina que está incluida en la construcción genética de estas moléculas. **a)**: Histogramas mostrando los niveles de unión directa detectados. **b)**: Desplazamiento de las muteínas unidas a las células, medido por la disminución de la intensidad media de fluorescencia, provocado por la adición de cantidades crecientes de IL-2 nativa (una variante de esta molécula que no tiene cabeza de histidina y no interfiere con el revelado).

Figura 4. Evaluación de la capacidad de señalización de varias de las muteínas referidas en la tabla 1. **a)**: La actividad de las muteínas fue evaluada en un ensayo de proliferación de la línea celular CTLL2 medido por un ensayo colorimétrico de utilización de MTT. **b)**: Las muteínas fueron evaluadas también en un ensayo de diferenciación de células NK1.1+ a partir de esplenocitos totales de ratón. En ambos casos se compara la capacidad de estimular de las muteínas contra un control de IL-2 nativa que es producido exactamente en el mismo sistema experimental (igual construcción genética, cepa de *E.coli* productora, sistema de purificación). Similares resultados al gráfico mostrado en la Fig.3a se obtienen con la línea celular Kitt225, donde el sistema de receptores es humano.

Figura 5. Evaluación de la capacidad de varias de las muteínas referidas en la tabla 1 de inhibir la actividad de la IL-2 nativa *in vitro*. **a**: Inhibición de la proliferación de linfocitos totales de ganglio estimulados con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clon 2C11 a 10 ❖g/mL) por concentraciones crecientes de las muteínas. **b**. Inhibición de la diferenciación de células NK1.1+ a partir de esplenocitos totales de ratón estimulados con 500 UI/mL cantidad de IL-2 nativa, por la adición de cantidades crecientes de muteínas en el cultivo.

Figura 6. Evaluación de la capacidad de las muteínas de inhibir preferencialmente a los linfocitos CD4+Foxp3+. Los linfocitos de ganglio de ratón fueron estimulados *in vitro* con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clon 2C11 a 10 ❖g/mL) en presencia de las cantidades indicadas de la muteína M1 (según referencia en tabla 1). Al cabo de 72 horas de cultivo se determinó por citometría de flujo, usando perlas de referencia, el número de linfocitos vivos reguladores CD4+Foxp3+ y efectores CD4+Foxp3-. El gráfico en **a** muestra el marcaje de citometría usado para diferenciar las poblaciones. El gráfico en **b** muestra los niveles de inhibición de la proliferación inducida por

5 diferentes cantidades de la muteína añadida. Esta inhibición se calcula tomando como referencia el número de células vivas que se recupera en ausencia de muteína. Como se observa en **b** existe un rango intermedio de concentraciones de las muteína M1 para el cual la inhibición de la población reguladora CD4+FoxP3+ es mucho más significativa que para las células T auxiliadoras o efectoras CD4+FoxP3-.

10 **Figura 7.** Evaluación de la capacidad de las células T reguladoras de secuestrar preferencialmente a las muteinas de IL2 diseñadas, liberando a las células T efectoras del efecto inhibidor de las mismas. Células efectoras T CD4+CD25-FoxP3- fueron purificadas utilizando perlas magnéticas, marcadas con CFSE y puestas en cultivos

15 pareados unos en presencia y otro en ausencia de de muteínas (gráfico con muteína M1, dos concentraciones diferentes 10 ❖g/mL y 5❖g/mL) y estimuladas con anticuerpos

anti-CD3 (clone 2C11, 10 µg/mL) y anti-CD28 (clone 37.51, 10 µg/mL). Diferentes cantidades de células T reguladoras purificadas (CD4+CD25+ FoxP3+), fueron adicionadas a estos cultivos. El grafico 6a muestra los altos niveles de pureza (92% Tregs y 97% para T efectoras) alcanzados con la separación por perlas magnéticas. El gráfico 6b muestra los niveles de proliferación en las células efectoras, medidos por la dilución del CFSE, para diferentes cantidades de células reguladoras en el cultivo. Como se puede observar en ausencia de Tregs, la presencia de las muteínas afecta sustancialmente la proliferación de las células efectoras (efecto inhibitorio), pero en la medida que se adicionan Tregs, la proliferación se recupera en las células T efectoras, pues las Tregs secuestran preferencialmente la muteína liberando a las células efectoras de su efecto inhibidor.

REIVINDICACIONES

1. Un poli-péptido inmunomodulador derivado de la IL-2, caracterizado porque comprende varias mutaciones puntuales dentro la secuencia de la IL-2 nativa que le confieren la propiedad de inhibir selectiva y preferencialmente la actividad de la IL-2 sobre células T reguladoras in vitro.

2. El poli-péptido de la reivindicación 1, caracterizado porque comprende varias mutaciones puntuales dentro la secuencia de la IL-2 nativa que le confieren la propiedad de inhibir selectiva y preferencialmente la actividad de la IL-2 sobre células T reguladoras naturales (CD4+ CD25+FoxP3+).

3. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque inhibe preferencialmente a las células T reguladoras *in vivo*.

4. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las mutaciones Q22V, Q126A, I129D y S130G.

5. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las mutaciones L18N, Q126Y y S130R.

6. El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las mutaciones Q13Y, Q126Y, I129D y S130R.

El polipéptido de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende las mutaciones L18N, Q22V, T123A, I129D y S130R.

Una proteína de fusión que comprende el polipéptido inmunomodulador de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, acoplado a una proteína transportadora.

La proteína de fusión de la reivindicación 8 caracterizada porque la proteína transportadora es la Albúmina.

La proteína de fusión reivindicación 9 caracterizada porque la proteína transportadora es la región Fc de las inmunoglobulinas humanas.

11. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la manufactura de un medicamento útil en la terapia de enfermedades crónicas.

El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la manufactura de un medicamento útil en la terapia del cáncer.

El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la manufactura de un medicamento útil en la terapia de enfermedades infecciosas crónicas.

14. Una composición farmacéutica útil en la terapia de cáncer y enfermedades infecciosas crónicas, caracterizada porque comprende como principio activo el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, caracterizada porque comprende como principio activo el polipéptido de la reivindicación 4.

La composición farmacéutica de la reivindicación 14, caracterizada porque comprende como principio activo el polipéptido de la reivindicación 5.

La composición farmacéutica de la reivindicación 14, caracterizada porque comprende como principio activo el polipéptido de la reivindicación 6.

3 La composición farmacéutica de la reivindicación 14, caracterizada porque comprende como principio activo el polipéptido de la reivindicación 7.

19. Una composición farmacéutica útil en la terapia de cáncer y enfermedades infecciosas crónicas, caracterizada porque comprende como principio activo la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 10.

20. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la terapia de enfermedades crónicas.

21. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la terapia de cáncer.

22. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la terapia de enfermedades infecciosas crónicas.

23. Uso de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a 15 la 10 para la terapia de enfermedades crónicas.

1 Uso de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 10 para la terapia de cáncer.

2 Uso de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 10 para la terapia de enfermedades crónicas.

26. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para la manufactura de un medicamento que modula el sistema inmune.

27. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 y sus aplicaciones cuando se introducen nuevas mutaciones que incrementan su afinidad de unión a los diferentes componentes del receptor de IL-2.

28. Los polipéptido de las reivindicaciones 4, 5, 6,7 y sus aplicaciones cuando se introducen nuevas mutaciones que incrementan su afinidad de unión a los diferentes componentes del receptor de IL-2.