



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 328 717**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05779505 .6**

(96) Fecha de presentación : **16.09.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1801119**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

(54) Título: **Péptido antagonista de interleuquina-15.**

(30) Prioridad: **17.09.2004 CU 1982004**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.11.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2009

(73) Titular/es: **CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB)**
Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacan Playa
Ciudad de la Habana 10600, CU

(72) Inventor/es: **Santos Savio, Alicia;**
Cabrales Rico, Ania;
Reyes Acosta, Osvaldo;
Gerónimo Pérez, Haydee;
Arrieta Agüero, Celia A. y
Perea Rodríguez, Silvio, Ernesto

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Péptido antagonista de interleuquina-15.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la rama de la farmacología molecular, de forma particular a un péptido de interleuquina-15 (IL-15) que perjudica la unión de IL-15 a la subunidad alfa del receptor; por tanto se podría usar para el tratamiento de enfermedades asociadas con expresión aberrada de IL-15 o IL-15R α .

10 **Técnica anterior**

La citoquina conocida como IL-15 es una glicoproteína de 14 a 15 kDa identificada simultáneamente por dos grupos de autores como un factor de activación de células T (Grabstein, K.H. y col., Science 1994, 264, 965; Burton, J.D. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 1994, 91, 4935). El ARNm de IL-15 es ampliamente expresado en diferentes células y tejidos, no obstante, es difícil de encontrar la proteína en estas células o en el sobrenadante de células debido a un fuerte control post-transcripcional de su expresión a nivel translacional y el tráfico intracelular (Bamford RN, y col., J. Immunol. 1998, 160: 4418-4426; Kurys G, y col., J. Biol. Chem. 2000, 275: 30653-30659). Además se ha mostrado que IL-15 puede existir en una forma activa como una proteína de membrana (Musso y col., Blood 1999, volumen 93, nº 10 (15 de Mayo): páginas 3531 a 3539) y recientemente se observó que puede funcionar bien como ligando o bien como receptor (Budalgian y col., JBC 2004, volumen 279, nº 40: páginas 42192 a 42201) induciendo a través de esta ruta la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.

Se ha asociado un alto nivel de expresión de la proteína soluble a la patogénesis de enfermedades auto-inmunes e inflamatorias. La IL-15 se ha detectado en varias enfermedades, incluyendo enfermedad de Crohn (Kirman I., 1996, Am. J. Gastroenterol. 91, 1789), psoriasis (Rückert R. 2000, 165: 2240-2250), leucemias (Yamada Y. 1999, Leukemia and Lymphoma, 35(1-2): 37-45 y artritis reumatoide (RA) (McInnes I.B. 1998, Immunology Today, 19, 75-79). La unión del ligando al receptor de células T induce la expresión de IL-15R α y la expresión de varios antígenos de activación tales como CD69, CD25 y TNFRII. También IL-15 es un quimioatractor para los linfocitos T de sangre humana (Wilkinson 1995, J. Exp. Med. 181, 1255-1259). Todos estos datos sugieren que la IL-15 expresada por células que presentan antígeno podría ser de importancia en la activación temprana de células T en el sitio de inflamación.

McInnes y col., encontraron anormalidades en la expresión de IL-15 en esta enfermedad, alta concentración de IL-15 en el fluido sinovial y su expresión en células sinoviales de membrana. Estos autores sugirieron que la IL-15 precede al TNF α en la cascada de citoquina, proponiendo un mecanismo dependiente del contacto celular, donde células T activadas por IL-15 inducen la síntesis de TNF α por macrófagos. Además se propone que IL-15 actúa como un factor importante en la migración de células T al fluido sinovial (McInnes, 1997, Nat Med, 3: 189-195).

Ziolkowska y col., describieron que IL-15 induce la expresión de IL-17 en articulaciones de pacientes de RA, ya se conoce que esta citoquina estimula la liberación mediante sinoviocitos de diversos mediadores inflamatorios tales como IL-6, IL-8, GM-CSF y prostaglandina E2, lo que sugiere un importante papel para IL-15 en la patogénesis de RA (Ziolkowska y col 2000, J. Immunol, 164: 2832 a 2838).

El reclutamiento y activación de células T puede tener lugar como una consecuencia de la síntesis local de IL-15 y tal activación no específica podría traer como consecuencia una inflamación continua. Todo esto sugiere que la inhibición de IL-15 podría tener un potencial terapéutico en el tratamiento de la enfermedad así como también de otras enfermedades auto-inmunes e inflamatorias.

Los efectos biológicos de IL-15 son mediados por su unión a un receptor de membrana celular constituido por tres subunidades α , β y γ . El IL-15R α es una subunidad específica de esta citoquina a la que está unida con una afinidad muy fuerte Kd 10^{-11} , y puede encontrarse como un receptor de membrana o en una forma soluble (Budagian V. y col., JBC2004, 279, 39: 40368-40375; Mortier y col., The Journal of Immunology, 2004, 173: 1681-1688).

Las subunidades β y γ son compartidas con IL-2, una citoquina con una gran homología estructural con IL-15. Se ha descrito previamente que Asp56 en la molécula de IL-15 es importante en la unión a la subunidad β del receptor y Gln156 es importante en la unión a la subunidad γ del receptor.

Las muteínas se comportan como moléculas antagonistas de IL-15 unidas a la subunidad α del receptor y dificultan la transducción de señal mediante subunidades β y γ . Los anticuerpos que reconocen estos aminoácidos también actúan como antagonistas de IL-15 (documentos US 6177079, US 6168783, US 6013480, US 6001973, US 9706931, WO 9741232).

Ruchatz y col. (Ruchatz H. 1998, J. Immunol. 160:5654 a 5660) generaron un fragmento soluble de la subunidad α del receptor murino (IL-15R α) y demostraron que la inyección de este fragmento inhibía la artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones DBA/1.

Genmab Company es propietaria de la patente de anticuerpos humanos específicos frente a IL-15, documento WO 03017935, donde se describen 4 anticuerpos y 2 de ellos, 146B7 y 146H5, se unen a IL-15 en la región de interacción

de la subunidad γ del receptor e inhiben la proliferación de células inducida por IL-15 en la línea celular CTLL2 y en PBMC (células mononucleares sanguíneas periféricas), y anticuerpos 404A8 y 404E4 que no inhiben la proliferación. El anticuerpo 146B7 (Amgen) con el nombre AMG714 se encuentra en Rheumatoid Arthritis Clinical Trials Phase II.

- 5 Recientemente se identificaron dos secuencias de unión de la IL-15 a la subunidad α del receptor, desde el aminoácido 44 al 52 y desde el aminoácido 64 al 68 (Bernard y col., JBC 2004, 279 (23), 24313-24322). Estos autores describieron muteínas que pueden actuar bien como agonista o bien como antagonista de IL-15.

- 10 Hasta ahora no se ha descrito péptido antagonista de IL-15 alguno. El uso de un péptido de longitud corta (10 aa) como un antagonista de IL-15 tiene la ventaja de bloquear de forma selectiva la unión de IL-15 a la subunidad α del receptor y mediar o alterar los efectos de IL-15 debido a la interacción con el receptor de IL-15. Por ejemplo, como se describe en la presente invención, el péptido denominado Sec n° 1 ocupa una región de 10 aminoácidos de IL-15 que se ha identificado como la región de interacción con la subunidad α del receptor (figura 1). Tal péptido se une a la proteína de fusión IL-15R α -Fc en ensayo ELISA y en ensayo de resina Tentagel (figura 2), inhibe la proliferación de
15 línea celular CTLL-2 dependiente de IL-15 (figuras 3a y 3b) y protege de apoptosis inducida por TNF α (figura 4), este efecto es mediado por la unión de IL-15 a la cadena α del receptor. Este último efecto permite su uso en enfermedades en las que es necesario inhibir el proceso apoptótico. Igualmente, la unión de este péptido a la cadena α soluble como se describe en la presente invención puede inhibir la señalización inversa mediada por IL-15 asociada a membrana (Buldalgian y col., JBC 2004, volumen 274, n° 40: páginas 42192-42201).

20 Descripción detallada de la invención

- De forma particular, esta invención se refiere a la identificación de una región de IL-15 que es capaz de unirse a la subunidad IL-15R α . El péptido que comprende esta región aquí denominado Sec n° 1 se sintetizó químicamente y
25 presenta capacidad de unión a IL-15R α -Fc (figura 2), inhibe la proliferación de CTLL2 inducida por IL-15 y protege de la fragmentación de ADN inducida por TNF α (figura 4).

- Igualmente esta invención también incluye el uso del péptido anteriormente citado, solo o en combinación con cualquier otra molécula apropiada, por ejemplo, fármacos esteroideos anti-inflamatorios (corticoesteroides), fármacos
30 modificadores de enfermedad (metotrexato) u otro antagonista de citoquinas usados en tratamiento de artritis reumatoide y uso de este péptido para inhibir la unión de IL-15 a la subunidad α del receptor bien en formas solubles o bien en formas asociadas a membrana.

- El péptido de la presente invención presenta una estructura lineal y se caracteriza principalmente por su capacidad
35 de antagonizar IL-15. Por otro lado el efecto *in vitro* producido por el péptido de la presente invención se demuestra con un ensayo de proliferación de células CTLL-2 y con el ensayo de inhibición de apoptosis inducida por TNF α .

- Para la definición del péptido descrito se usó una técnica de mapeo en un filtro de celulosa que contiene secuencia completa de IL-15 en péptidos consecutivos de 10 aa con 5 aminoácidos de solapamiento.
40

- En la presente invención el péptido Sec n° 1 se sintetizó químicamente mediante técnica de fase sólida, se purificó mediante HPLC, se analizó por espectrometría de masas y finalmente se evaluó en lo que respecta a su efecto sobre la actividad de IL-15.

- 45 Los resultados mostrados en la presente invención indican que la región identificada y sintetizada como un péptido de 10 aa (Sec n° 1) corresponde a una región de IL-15 que interacciona con la subunidad α del receptor y por tanto interfiere con la unión de IL-15 a su receptor inhibiendo la actividad de proliferación de células T inducida por IL-15. El péptido (Sec n° 1) que comprende aminoácidos de IL-15 que interaccionan con IL-15R α imita el efecto de protección de IL-15 de la apoptosis inducida por TNF α , que es mediada por unión de IL-15 a IL-15R α (Bulfone-Paus y col., The FASEB Journal, 1999, septiembre volumen 13).
50

- Los resultados aquí obtenidos sugieren su uso como una herramienta terapéutica en el tratamiento de enfermedades asociadas con alta expresión de IL-15 anteriormente citadas, donde está justificado el uso de antagonistas de IL-15 y en aquellas patologías donde se necesita un efecto de protección frente a apoptosis así como también en patologías
55 asociadas con la alta expresión de IL-15R α soluble. Igualmente los anticuerpos que reconocen una región comprendida en Sec n° 1 en IL-15 inhibirán la unión de IL-15 a IL-15R α y mostrarán una actividad antagonista de IL-15 mediante inhibición de la unión de las moléculas a dicha subunidad del receptor, por esta razón se podría usar un péptido acoplado a una molécula vehículo o conjugado químico MAP (péptido antigénico múltiple) para la obtención de anticuerpos antagonistas de IL-15. La ayuda de la presente invención se aplica también a ADN que codifica péptidos
60 anteriormente citados. Se puede usar también un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica el péptido de la presente invención como una alternativa para la expresión de la secuencia de péptido.

- El péptido aquí descrito se puede usar en combinación con otros agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores u otros antagonistas de citoquinas usados en artritis reumatoides, psoriasis, enfermedad de Crohn, etc. El péptido
65 descrito se puede incluir en vacunas terapéuticas para elucida una respuesta humoral anti-IL15.

Esencia de la invención

La presente invención consiste en la identificación de una secuencia de IL-15 (Sec nº 1) que interacciona con la subunidad α del receptor. Tal secuencia sintetizada como un péptido de 10 aminoácidos lineal muestra la capacidad antagonista de IL-15 que implica la inducción de proliferación de células T y un efecto agonista que implica la protección frente a apoptosis inducida por TNF α .

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

Mapeo de IL-15R en filtro de celulosa

IL-15R α -Fc reconoce el péptido 8 que corresponde a la Sec nº 1 y a un péptido 7 de menor extensión.

Figura 2

Ensayo colorimétrico en esferas de Tentagel S

Se observó un desarrollo de color en esferas que contienen péptido Sec nº 1 incubado con IL-15R α -Fc (R&D) a 5 μ g/ml.

2a) incubación de resina que contiene a) péptido no relacionado o b) resina que contiene péptido Sec nº 1 incubada con 15R α -Fc (R&D).

2b) incubación de resina que contiene péptido Sec nº 1 con 15R α -Fc (R&D) (a) o péptido Sec nº 1, IL 15R α -Fc (R&D) en presencia de exceso de IL-15 (b).

Figura 3

Ensayo de proliferación de CTLL-2 con IL-15 humana (R&D) con una actividad específica de 10⁸ UI/mg

3a) ensayo de CTLL-2 a diferentes concentraciones de IL-15 y una concentración de péptido fija de 260 μ M

3b) ensayo de CTLL-2 a concentraciones de péptido Sec nº 1 diferentes y una concentración de IL-15 fija de 300 pg/ml.

Figura 4

Ensayo de inducción de apoptosis en la línea celular L929

Se incubaron células con TNF α (100 ng/ml) solas o en combinación con péptido Sec nº 1 (260 μ M)

Ejemplos para realización

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar las realizaciones de la presente invención.

Ejemplo 1

A. Identificación de región de unión a IL-15R α

Síntesis de péptidos 10-méricos en soporte de celulosa que corresponde a la secuencia de aminoácido de IL-15

Para identificar regiones de IL-15 implicadas en la unión de IL-15R α se usó el enfoque de síntesis de péptido por manchas como describieron previamente Frank y col. Se llevó a cabo la derivación de papel Whatman 540 esterificando el primer componente de anclaje, Fmoc- β -Ala-OH, usando N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y N-metilimidazol (NMI) en N,N-dimetilformamida (DMF) seca. La disposición de manchas en la membrana de celulosa se definió anclando el Fmoc- β -Ala-OH en las posiciones previamente marcadas, de acuerdo con el número requerido de péptidos 10-méricos (22 péptidos, que solapan en 5 residuos, 114 aminoácidos de secuencia de IL-15). Además, se sintetizó un péptido de 10 aminoácidos no relacionados en la mancha 23 y también sobre la mancha 24 se ancló únicamente Fmoc- β -Ala-OH, ambos como controles. Para el ensamblaje de todas estas moléculas se usó la química de Fmoc-/tBu convencional. Después del ciclo final de síntesis se desprotegeron el término N y las cadenas laterales de todos los péptidos.

Unión de anti-IL-15 Abs a péptidos sintetizados sobre soporte de celulosa

Se humedeció hoja de celulosa en etanol para evitar posibles interacciones hidrófobas entre los péptidos sobre la misma. Se intercambió etanol con solución salina tamponada con Tris (TBS) (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,6)

mediante lavado secuencial. Se bloqueó la unión no específica mediante incubación de membrana durante la noche en 10 ml de tampón de bloqueo TBS (leche en polvo al 5% en TBS). Se incubó subsiguientemente la hoja durante 3 horas con receptor α de IL-15, se diluyó en 10 ml de tampón de muestra T-TBS (leche en polvo al 5%, 0,5% de Tween-20 en TBS). Para el suero se usó dilución 1:50. Se preparó el receptor IL-15 α a 5 μ g/ml, en la misma solución
 5 tampón. Se lavó hoja de celulosa cuatro veces con tampón T-TBS. Luego se añadió un conjugado de fosfatasa alcalina anti-IgG (específico de Fc) (Sigma), diluido en tampón de muestra T-TBS, durante 1 hora (dilución 1:25000 para la anti-IgG humana en ensayo de receptor α de IL-15. Se lavó la hoja de celulosa cuatro veces de nuevo, con T-TBS y se consiguió la detección de unión de péptido incubando la membrana con 0,5 mg/ml de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) (Sigma) en tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM, Tris 100 mM, pH 8,9). Las manchas
 10 positivas desarrollaron un color azul/violeta. Lavando con PBS se detuvo la tinción. Finalmente se regeneró la hoja de celulosa para otros ensayos como se describió previamente (Frank, R. (1992) Tetrahedron 48, 9217). Se observó el reconocimiento de dos péptidos, 8 y 7. Como control experimental se incubó la membrana con un anticuerpo monoclonal humanizado que contiene la región Fc de la IgG1 humana. En este caso no se observó reconocimiento de péptido alguno sobre la membrana.

15 *Ensayo colorimétrico con esferas que demuestra la unión del péptido a IL-15R α*

Síntesis del péptido Sec n° 1 en resina NH₂-Tentagel-S

20 Se lavó la resina NH₂-Tentagel-S (0,24 mmol/g) varias veces con diclorometano (DCM) y metanol. Luego se incubó en una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 30% durante 10 minutos; se lavó varias veces con DCM y se incubó en di-isopropiletilamina (DIEA) al 5% en DCM durante 1 minuto. Este procedimiento activó los grupos NH₂ para la síntesis. Después se lavó con DCM y se incubó en di-metilformamida (DMF) durante 5 minutos para sintetizar el péptido. Se usó la estrategia de Fmoc/tBu de síntesis convencional. Las reacciones de acoplamiento fueron seguidas
 25 de ensayo con ninhidrina. Una vez se completó la secuencia de péptido Sec n° 1 se desprotegeron las cadenas laterales de aminoácidos, dejándolas ancladas por su terminal C a la resina.

Ensayo en esferas

30 Se lavaron varias veces esferas de resina con péptido anclado con solución salina (PBS). Se bloquearon las interacciones no específicas con BSA (1%) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces, se incubaron estas con proteína de fusión IL-15R α -Fc (R&D 147-IR) a 5 μ g/ml en BSA (1% / PBS) durante 16 horas a 4°C. Luego se lavaron las esferas en PBS tres veces durante 5 minutos con agitación y luego se incubaron con conjugado de anti-Fc de IgG humana-fosfatasa diluido 1:25000 en BSA (1% / PBS) durante tres horas a temperatura ambiente. Se lavaron de forma
 35 extensiva con una solución salina (TBS/Tween-20, 1%) y se incubaron con BCIP (0,45 mg/ml) en solución de sustrato (Tris 100 mM, pH 8,9; NaCl 100 mM; MgCl₂ 2 mM) durante aproximadamente 30 minutos. Estas se lavaron cuatro veces con PBS para detener la reacción. Se observó únicamente un color azul intenso cuando se incubó la resina que contiene péptido Sec n° 1 con la proteína IL-15R α -Fc y no cuando se incubó una resina que contiene un péptido no relacionado con IL-15R α -Fc. En ese caso el sustrato cromógeno no precipita y no desarrolla color. Igualmente no se
 40 observó color en presencia de un exceso de IL-15 humana.

Síntesis de péptidos

Se sintetizaron los péptidos por estrategia Fmoc/tBu, usando resina Fmoc-AM-MBHA a 0,54 mmol/g y protocolos
 45 de síntesis con agitación mecánica. Después del tratamiento con TFA se liofilizó el péptido y se ensayó mediante HPLC-EM.

Ejemplo 2

50 *Efecto de los péptidos descritos en proliferación de línea celular CTLL2*

La línea celular dependiente de citoquina CTLL-2 prolifera en presencia de IL-15. Las moléculas unidas a IL-15 que deterioran la transducción de señal dependiente del receptor inhibirían esta proliferación de línea celular.

55 Para evaluar la capacidad de neutralización del péptido de la presente invención se prepararon diluciones en serie del mismo en placas de 96 pocillos (Costar, EEUU) en volumen de 25 μ l de medio RPMI (Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco). Previamente se añadieron células CTLL-2 lavadas hasta 5 x 10³ células/pocillo y se incubó durante 30 minutos. Luego se añadieron a cada pocillo 300 pg de IL-15. Se incubó la placa durante 72 horas con 5% de CO₂ y 37°C. Se muestran los resultados en la figura 3b. Se observa que el péptido designado como Sec n° 1
 60 inhibió la proliferación inducida por IL-15 con una CI₅₀ de 130 μ M. Para medir la proliferación de MTT se usó tinción mitocondrial (Cosman y col. 1984, Nature, 312: 768-771). Se ha evaluado también el efecto antagonista de 260 μ M de este péptido a diferentes concentraciones de IL-15 (figura 3a). El efecto inhibitorio del péptido fue dependiente de las dosis de IL-15.

Ejemplo 3

Inducción de apoptosis en células L929

El ensayo de fragmentación de ADN permite determinar la cantidad de ADN que se degrada tras tratamiento de células con TNF-alfa. El ADN de la célula es marcado radioactivamente mediante crecimiento de las células en presencia de 3H-timidina de modo que se incorpora 3H-timidina radioactiva al ADN. Después de 24 horas se trataron las células con tripsina/EDTA, se lavó y se sembró a 5000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Luego se incubaron las células marcadas con TNF α (100 ng/ml), IL-15 (100 ng/ml), péptidos (260 μ M) o combinaciones de TNF α con diferentes péptidos.

Durante esta incubación el agente añadido (por ejemplo, TNF α induce a las células a morir por apoptosis y en consecuencia la fragmentación del ADN mientras que el ADN de células no tratadas se mantiene intacto). Después de 24 horas se cosecharon las células: durante la cosecha se arrastraron las células de los pocillos de la placa de 96 pocillos con agua bidestilada: las células y orgánulos se rompen y el ADN de la célula queda libre. Se pasan los fragmentos celulares y ADN a través de una membrana filtrante (fibra de vidrio). Sólo las partículas menores de 1,5 μ m pueden atravesar el filtro. De este modo el ADN intacto (con una longitud de fragmento en el intervalo de milímetros o incluso centímetros) no será capaz de atravesar el filtro pero se recogerá en la membrana filtrante. El ADN que se escindió/degradó en fragmentos de aproximadamente 5000 bp o inferior será suficientemente pequeño para atravesar los poros del filtro y no se recogerá en el filtro. La membrana filtrante se secó y se recuenta la cantidad de radioactividad (que corresponde a la cantidad de ADN intacto) en un contador de centelleos. Se calculó el porcentaje de fragmentación de ADN mediante comparación de la radioactividad contada (conteos por minuto = cpm) de células que no se trataron con el cpm en células que se trataron con agente. Como resultado se observó que el péptido Sec n° 1 protegió de la apoptosis inducida por TNF.

Ejemplo 4

Preparación de anticuerpos monoclonales

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales tal como lo describieron Georges Kohler y Cesar Millstein (Nature, 256: 495-497, 1975). Se usaron el péptido Sec n° 1 conjugado con KLH o un conjugado químico que contiene 4 moléculas de este péptido para anticuerpos monoclonales producidos que se unen e inhiben la actividad de IL-15.

Se inmunizaron ratones por vía subcutánea con un péptido conjugado que se preparó para inyección mediante emulsificación con adyuvante de Freund en cantidad de 10 a 100 μ g, seguido de inmunizaciones por vía subcutánea cada semana con péptido en adyuvante de Freund incompleto. La respuesta inmune a IL-15 se controló mediante ELISA. Se reforzaron ratones con suficientes títulos de anti-inmunoglobulina IL-15 por vía intravenosa 3 días antes del sacrificio y la extirpación del bazo. Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales para IL-15 se usa el protocolo indicado publicado en Nature, 256: 495-497, 1975. Se tamizaron los hibridomas resultantes para la producción de anticuerpos específicos para IL-15 o péptido mediante ELISA y mediante efecto inhibitorio en la actividad de IL-15 en el ensayo de CTLL-2. Se inocularon los clones positivos en la cavidad peritoneal de ratones singénicos para producir ascitis y se purificó el anticuerpo monoclonal resultante mediante precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A de *Staphylococcus aureus*.

Ejemplo 5

Evaluación del péptido Sec n° 1 en la generación de anticuerpos neutralizantes en monos Macacus irus

Se evaluaron tres grupos en un esquema de inmunización de monos, inmunizados con un péptido conjugado con una proteína vehículo, péptido conjugado químicamente como un tetrámero (MAP); y placebo. Se administraron las proteínas en cantidades de 100 μ g a 200 μ g por inoculación en adyuvante de Freund. Se realizó la segunda inmunización un mes después y se realizó la tercera inmunización dos meses después. Se extrajo sangre dos semanas tras la segunda y tercera inmunización para evaluar el nivel de anticuerpos anti-IL15 en el suero de monos. La capacidad de neutralización de anticuerpos presentes en suero de monos se ensayó mediante ensayo con CTLL-2 en presencia de 300 pg de IL-15.

Ventajas de la solución propuesta

El péptido Sec n° 1 inhibe de forma selectiva la unión de IL-15 a IL-15R α .

El péptido Sec n° 1 antagoniza el efecto de proliferación inducido por IL-15 en células T (células CTLL-2) y además, es un agonista del efecto protector de apoptosis de IL-15 en células sensibles a apoptosis inducida por TNF α .

REIVINDICACIONES

1. Péptido antagonista de la actividad de IL-15 **caracterizado** porque consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la Sec ID nº 1.

2. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por su unión a la subunidad celular IL-15R α o su fracción soluble.

3. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por su inhibición de la actividad biológica de IL-15 dependiente de IL-15R α de acuerdo con la reivindicación 2.

4. Péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por ser un componente activo de la formulación farmacéutica capaz de inhibir la actividad biológica de IL-15 dependiente de IL-15R α celular.

5. Péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se obtiene mediante manipulación genética o mediante síntesis química.

6. Cadena de ácido nucleico **caracterizada** porque codifica un péptido de la reivindicación 1.

7. Cadena de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 como parte de un vector de expresión.

8. Formulación farmacéutica **caracterizada** porque es una formulación terapéutica capaz de inhibir la actividad biológica de IL-15 dependiente de IL-15R α y porque contiene un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, sola, conjugada o combinada.

9. Formulación farmacéutica **caracterizada** porque es una formulación terapéutica capaz de inhibir la actividad biológica de IL-15 dependiente de IL-15R α celular y porque contiene una cadena de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6.

10. Formulación de vacuna **caracterizada** porque es una vacuna terapéutica que contiene un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y es capaz de elucidar una respuesta inhibitoria de la actividad biológica de IL-15 dependiente de IL-15R α celular.

11. Uso de un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad de Crohn o psoriasis.

12. Anticuerpo monoclonal que reconoce el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

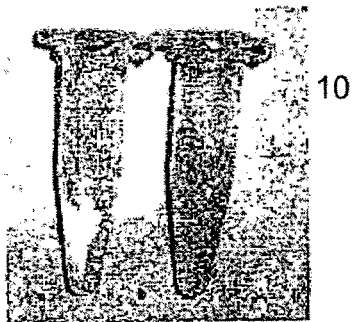
13. Uso del anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 12 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y psoriasis.

Figura 1:



Figura 2:

Figura 2a



- a) Péptido no relacionado
- b) Péptido Sec nº 1

Figura 2b

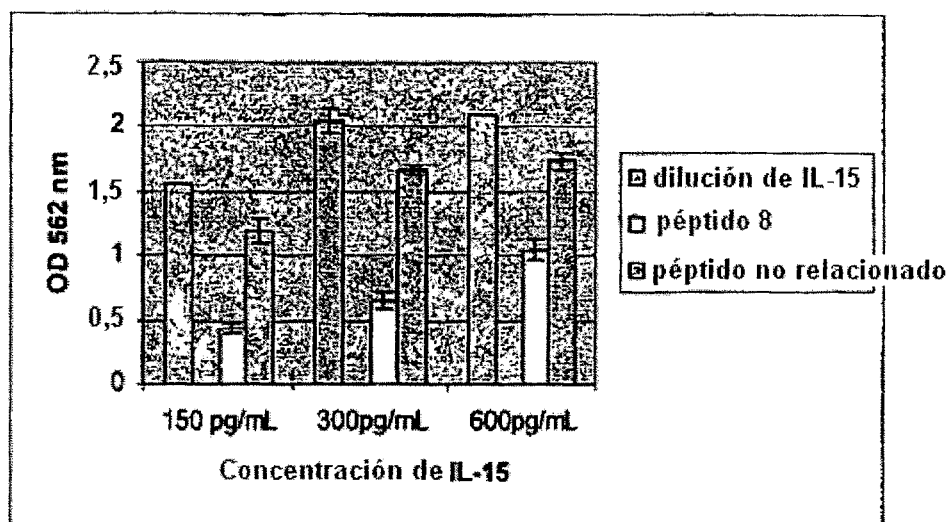
- a) Péptido Sec nº 1
- b) Péptido Sec nº 1



más IL-15

Figura 3:

3a)



3b)

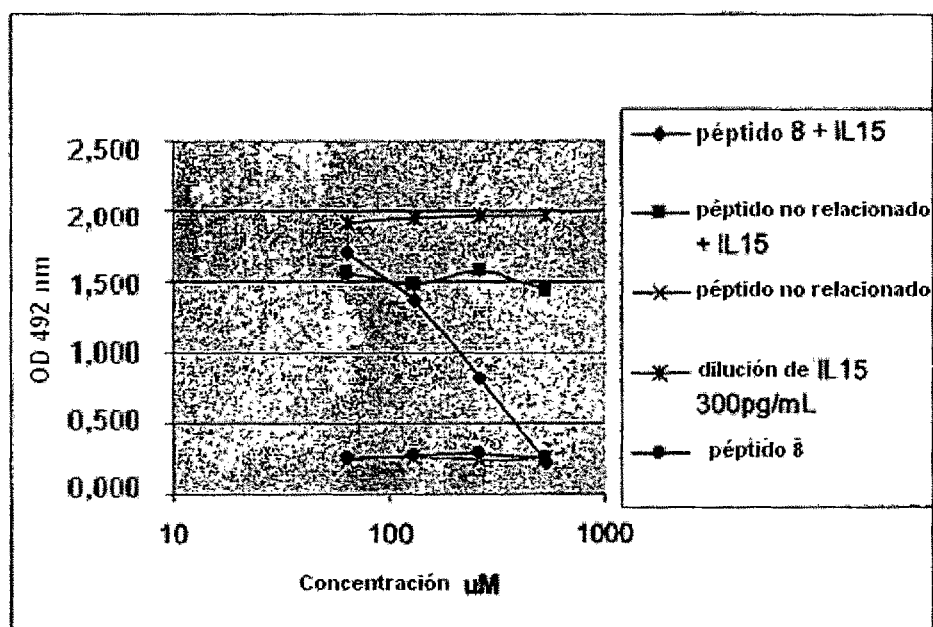
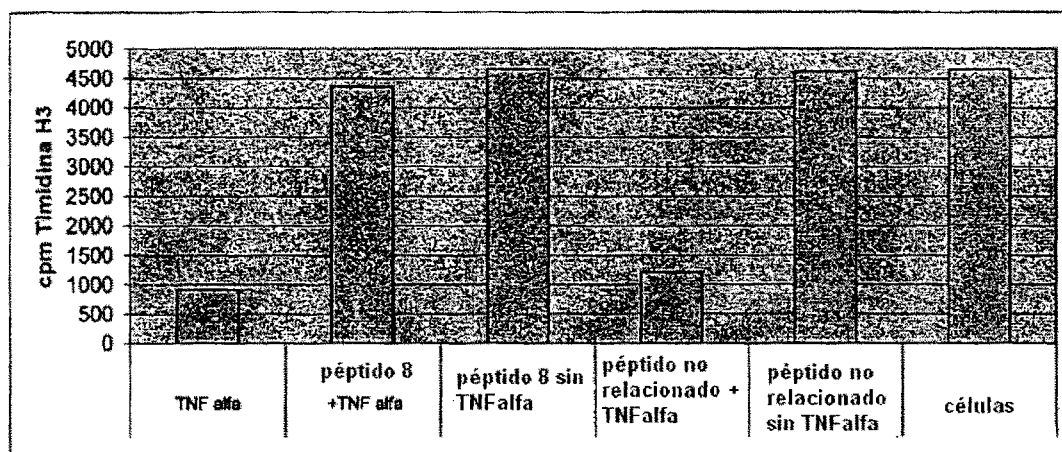


Figura 4:



ES 2 328 717 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Center of Genetic Engineering and Biotechnology

5 <120> Péptido antagonista de IL-15

<130> péptido8

<140> CU 2004-0198

10 <141> 17-09-2004

<160> 1

15 <170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético que se une a la cadena de IL-15R α

<400> 1

30 **Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu**

1

5

10

35

40

45

50

55

60

65