

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 892 148**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2017** **PCT/CU2017/050008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2018** **WO18121802**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2017** **E 17840472 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021** **EP 3564264**

54 Título: **Composición vacunal que comprende un mutante de la interleucina-15 humana**

30 Prioridad:

30.12.2016 CU 20160194

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

02.02.2022

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y
BIOTECNOLOGIA (100.0%)
Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa
La Habana 11600, CU**

72 Inventor/es:

**RODRIGUEZ ALVAREZ, YUNIER;
MORERA DÍAZ, YANELYS y
GERONIMO PEREZ, HAYDEÉ**

74 Agente/Representante:

CAPITAN GARCÍA, Nuria

ES 2 892 148 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición vacunal que comprende un mutante de la interleucina-15 humana

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se relaciona con la rama de la biotecnología, la inmunología y la industria farmacéutica, en particular con la inmunización activa con polipéptidos que comprenden una interleucina-15 (IL-15) mutada, para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la sobre-expresión de la IL-15.

10 **Estado de la técnica anterior**

La citocina conocida como IL-15 es una glicoproteína de 14-15 kDa, que fue identificada simultáneamente por dos grupos, como un factor que activa células T (Grabstein, K.H. *et al.*, Science 1994; 264: 965-8; Burton, J.D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91(11): 4935-9). El ácido ribonucleico (ARN) mensajero (ARNm) de la IL-15 está presente en una amplia variedad de células y tejidos, sin embargo la proteína es raramente encontrada en las células o en el sobrenadante de cultivo de estas células que expresan el transcritto, ya que existe un fuerte control post-transcripcional de su expresión, a nivel de la traducción y del tráfico intracelular (Bamford R.N. *et al.* J. Immunol 1998; 160: 4418-26; Kurys G. *et al.*, J Biol Chem 2000; 275: 30653-9).

Los efectos biológicos de la IL-15 son mediados a través de la unión a un receptor en la membrana celular, compuesto por tres subunidades α , β , y γ . La subunidad α (IL-15R α) es específica para esta citocina, a la cual se une con muy alta afinidad (Kd de 10^{-11}). La subunidad β es compartida con la IL-2, y la subunidad γ es un receptor común para varias citocinas, como la IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (Burton J.D. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91(11): 4935-9; Giri J.G. *et al.*, EMBO J. 1995, 14: 3654-63).

La IL-15 es una citocina inmunoestimuladora, que promueve la proliferación y actividad funcional de las células T, B y NK, (Giri, J.G. *et al.*, EMBO J. 1994, 13, 2822-30), activa neutrófilos y modifica la secreción de monocinas (Girard D. *et al.*, Blood. 1996, 88: 3176-84; Alleva D.G. *et al.*, J. Immunol. 1997, 159(6): 2941-51). Además, induce la proliferación de las células NK CD56⁺, y actúa junto con la IL-12 en la inducción de interferón (IFN) γ y factor de necrosis tumoral (TNF α) (Ross M.E. y Caligiuri M.A. Blood. 1997, 89: 910-8; Fehniger T.A. *et al.*, Transplant Proc. 1999, 31: 1476-8).

La expresión no regulada o sobre-expresión de la IL-15 se ha relacionado con el desarrollo de varias enfermedades, incluyendo la enfermedad de Crohn (Kirman I. y Nielsen O.H. Am. J. Gastroenterol. 1996, 91(9):1789-94), psoriasis (Rückert R. *et al.*, J. Immunol. 2000, 165: 2240-50), leucemia (Yamada Y. *et al.*, Blood. 1998, 91: 4265-72; Yamada Y y Kamihira S. Leuk Lymphoma. 1999, 35(1-2):37-45) y artritis reumatoide (AR), (McInnes I.B. Immunology Today. 1998, 19: 75-9).

Estudios previos sugieren que la IL-15 precede al TNF α en la cascada de citocinas, actuando como un factor importante en la migración de células T hacia el fluido sinovial (Feldmann M. *et al.*, Annu Rev Immunol. 1996, 14: 397-440; McInnes I.B. *et al.*, Nat Med. 1997, 3:189-95). Adicionalmente, Ziolkowska y colaboradores describieron que la IL-15 induce la expresión de IL-17 en la articulación de pacientes con AR, estimula la liberación de mediadores de la inflamación, como la IL-6, la IL-8, el factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y la prostaglandina E₂, sugiriendo que la IL-15 desempeña un papel importante en la patogénesis de la AR (Ziolkowska M. *et al.*, J Immunol. 2000, 164:2832-8).

El uso de moléculas antagonistas de IL-15 ha mostrado ser efectivo en modelos animales. Ruchatz y colaboradores generaron un fragmento soluble de la subunidad α del receptor murino, y demostraron que la administración de este fragmento inhibe la artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones DBA/1 (Ruchatz H. J. Immunol. 1998, 160: 5654-60).

Se han protegido por patentes otras moléculas antagonistas de IL-15, que incluyen mutantes de esta en uno o más residuos de aminoácidos, y anticuerpos monoclonales que se unen a la IL-15 e impiden la traducción de las señales a través del receptor (Patentes No. US6001973, US6177079, US6168783, US6013480). Su aplicación aparece en los documentos de patentes antes mencionados, pero existen pocos estudios en la literatura que avalen su efectividad.

En mayo del año 2002 la compañía Genmab anunció el estudio, en fase clínica I y II, de un anticuerpo anti-IL-15 (HuMax-IL-15) (Patente No. US6177079). Aunque el tratamiento fue bien tolerado, no se evidenció eficacia significativa en un estudio fase II que involucró 110 pacientes con AR (Baslund B. *et al.*

Arthritis & Rheumatism. 2005, 52:2686-92). Otros estudios se han realizado con una proteína quimérica que consiste en una mutante de IL-15 y el fragmento Fc de una inmunoglobulina, que se une a células que expresan el receptor de IL-15. Esta proteína de fusión, denominada CRB-15, ha demostrado ser efectiva en un modelo murino de AIC, reportándose que el tratamiento con CRB-15 disminuye la incidencia y la severidad de la enfermedad, y previene la progresión de la artritis una vez establecida (Ferrari-Lacraz S. *et al.*, J Immunol 2004, 173(9):5818-26).

En el año 2003, Santos y colaboradores propusieron un método de vacunación que comprendía la inmunización activa con IL-15, obtenida en *Escherichia coli* (Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 2004/032956). Sin embargo, la proteína obtenida en ese hospedero es biológicamente activa, ya que promueve la proliferación de la línea celular CTLL-2, dependiente de IL-2 e IL-15 (Santos-Savio A. *et al.* Biotecn Aplic. 2000, 17:221-4). Este elemento constituye un inconveniente, teniendo en cuenta que pequeñas cantidades del inmunógeno que se liberen, y entren en circulación, desencadenarían una respuesta no deseada. Se conoce que esta citocina, en condiciones fisiológicas, es un factor de crecimiento de células T de memoria (Kanai T *et al.*, J Immunol. 1996, 157(8):3681-7; Kanegane H. y Tosato G. Blood. 1996, 88(1):230-5). El proceso inflamatorio en la AR se caracteriza por una activación y reclutamiento de células T hacia la sinovial (Wilkinson P.C. y Liew F.Y. Exp Med. 1995, 181:1255-9), por lo que la inmunización con una molécula de IL-15 activa puede contribuir al desarrollo de la enfermedad.

En "*Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model*" (Louise S. Villadsen, *et al.* Publicado el 15 de noviembre de 2003, J Clin Invest. 2003;112(10):1571-1580. <https://doi.org/10.1172/JCI18986>.), utilizando un anticuerpo humano contra IL-15, se recogió evidencia de un papel destacado de IL-15 en la patogénesis del psoriasis. En este documento, estudios in vitro e in vivo indican que mAb 146B7 es capaz de inhibir la proliferación de células T inducida por IL-15, inhibir la producción de TNF- α inducida por IL-15, revertir la protección mediada por IL-15 contra la apoptosis de monocitos y disminuir el número de células inflamatorias en la lesión psoriásica. El documento WO2006017853 describe métodos para tratar pacientes que han recibido, o que están programados para recibir, un trasplante de corazón, pulmón o corazón-pulmón con la administración al paciente un agente que antagoniza el receptor de IL-15 (IL-15R).

En "*Structure-Function Studies of Interleukin 15 using Site-specific Mutagenesis, Polyethylene Glycol Conjugation, and Homology Modeling*" (Dean K. Pettit *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 272, 2312-2318 doi: 10.1074/jbc.272.4. 2312, 24 de enero de 1997), se pegiló IL-15 humana recombinante mediante química de conjugación específica de lisina para prolongar la vida media en circulación de esta citocina. Específicamente, PEG-IL-15 perdió su capacidad para estimular la proliferación de CTLL, pero adquirió las propiedades de un antagonista específico de IL-15 in vitro. Al comparar alineamientos de secuencia y modelos moleculares para IL-2 e IL-15, se observó que los residuos de lisina residían en regiones de IL-15 que pueden haber alterado selectivamente la unión de la subunidad del receptor. Se planteó la hipótesis de que la pegilación de IL-15 interfiere con la unión de la subunidad del receptor β pero no α , lo que da como resultado la actividad antagonista de IL-15 observada in vitro.

La validez de esta hipótesis fue probada por ingeniería genética de mutantes específicos de sitio de IL-15 humana como sugiere el modelo de IL-15 (IL-15D8S e IL-15Q108S bloquean la unión de la subunidad del receptor β y γ , respectivamente). Al igual que con PEG-IL-15, estos mutantes no pudieron estimular la proliferación de CTLL, pero pudieron inhibir específicamente la proliferación de CTLL en respuesta a IL-15 no modificada.

Sigue siendo de interés la obtención de vacunas para la inmunoterapia activa de enfermedades relacionadas con la sobre-expresión de la IL-15, que ofrezcan ventajas terapéuticas con respecto a las terapias que existen en el tratamiento de este tipo de enfermedades.

Descripción detallada de la Invención

La presente invención resuelve el problema antes planteado, al proveer una composición vacunal caracterizada porque comprende un polipéptido que es un mutante de la IL-15 humana identificado como SEQ ID No. 1, al menos un adyuvante vacunal y excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

El gen de la IL-15 fue aislado a partir de monocitos activados con lipopolisacáridos, y se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*), empleando oligonucleótidos específicos para la mutación en la secuencia de la IL-15. Específicamente se mutaron el Asp 8 y Gln 108 por Ser. Se obtuvo el polipéptido mutado en dichos residuos aminoácidos, denominado en lo adelante IL-15Mut, con una pureza superior al 95%.

En una materialización de la invención, la composición vacunal comprende un polipéptido que contiene el mutante de IL-15 identificado SEQ ID No. 1 (IL-15Mut) que se obtiene por la vía del ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante. Para su obtención por esta vía, se pueden emplear los hospederos que son conocidos por los versados en este campo de la técnica, tales como bacterias, levaduras, células de mamíferos, etc.

En una realización de la invención, el polipéptido IL-15Mut se obtuvo a partir de *E. coli*, por lo que no está glicosilado, a diferencia de la proteína autóloga presente en el humano. Esta citocina mutada no es biológicamente activa en el ensayo de proliferación celular en CTLL-2, ya que no es capaz de inducir el crecimiento de estas células, que son dependientes de IL-15. En las células CTLL-2, la IL-15Mut compete con la IL-15 nativa por la unión al receptor, pero no induce señalización por tener mutados los residuos Asp 8 y Gln 108, que son residuos claves en la interacción con la subunidad β y γ del receptor. Este elemento constituye una ventaja con respecto al método propuesto por Santos y colaboradores (Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 2004/032956), en cuanto a una menor ocurrencia de eventos adversos en los pacientes tratados, que se relacionen con la actividad proinflamatoria de esta citocina.

El polipéptido que es el mutante de IL-15 identificado como SEQ ID No. 1, que forma parte de una composición vacunal, es un polipéptido de fusión. El polipéptido de fusión que es el mutante de IL-15 identificado como SEQ ID No. 1 también comprende epítopes T, en una concentración proteica de 200 μ g. En la presente invención se diseñó un mutante de la IL-15 que consiste en la SEQ ID No. 1, obtenida de forma recombinante, con características moleculares diferentes a la citocina natural, en cuanto a la disposición de los puentes disulfuro. Este elemento favorece el desarrollo de la respuesta inmune por exposición de epítopes crípticos o inmunodominantes.

Para demostrar el concepto planteado, en esta invención se utilizaron primates no humanos, específicamente monos verdes *Chlorocebus sabaeus*, por ser la especie con mayor homología en la secuencia de aminoácidos de la IL-15 respecto al humano (~97% de similitud) (Grabstein K.H. *et al.* Science. 1994; 264(5161):965-8). Se demostró que la inmunización activa de dichos primates con una composición vacunal que comprende el polipéptido IL-15Mut, identificado como SEQ ID No. 1, empleando hidróxido de aluminio (denominado indistintamente alúmina) y el adyuvante oleoso Montanide™ ISA-51, genera una respuesta de anticuerpos que inhiben la actividad biológica de la IL-15 nativa, en las células CTLL-2. Esta línea celular, empleada para los ensayos de neutralización, expresa las tres subunidades del receptor de la IL-15, y es dependiente de esta citocina para proliferar (Eisenman J. *et al.* Cytokine. 2002; 20(3):121-9). En este ensayo, los sueros mostraron una inhibición de la proliferación dosis-dependiente. Esta respuesta es mayor si se compara con el grupo de animales que se inmunizaron con el polipéptido identificado como SEQ ID No. 2, proteína IL-15 obtenida en *E. coli*. También se demuestra que la inmunización con una mayor dosis del polipéptido de SEQ ID No. 1 (350 μ g) genera una mayor respuesta de anticuerpos neutralizantes, desde los 15 días posteriores a la segunda inmunización. Este aspecto constituye una ventaja, ya que se alcanza el efecto deseado con un menor número de administraciones de la composición vacunal de la invención.

Teniendo en cuenta el alto por ciento de similitud entre el polipéptido mutado de SEQ ID No. 1 y la IL-15 de simio resulta inesperado que la inmunización con esta proteína mutada genere una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra la IL-15 nativa. Sin embargo, en la presente invención se demuestra que la inmunización con la vacuna según la reivindicación 1 que incluye el polipéptido mutado identificado como SEQ ID No. 1 genera autoanticuerpos neutralizantes contra la IL-15 autóloga. Además, la respuesta de anticuerpos neutralizantes generada por la administración de esa vacuna que incluye el polipéptido (SEQ ID No. 1) es mayor que la obtenida tras la inmunización activa con IL-15 obtenida por vía recombinante en *E. coli* (SEQ ID No. 2), lo que es sorprendente.

La composición vacunal de la invención se puede administrar por varias rutas, tal como es conocido por los versados en este campo de la técnica. La cantidad de antígeno vacunal en la composición puede variar, según la enfermedad a tratar. En una materialización de la invención, la cantidad de antígeno (polipéptido que comprende un mutante de la interleucina-15 (IL-15) humana identificado como SEQ ID No. 1) se encuentra en el rango de 200-500 μ g por dosis de vacuna. En el curso de la inmunización del individuo que lo requiere, se pueden administrar reiteradas dosis, y las composiciones pueden contener adyuvantes vacunales que son bien conocidos en la vacunología actual, como las sales de aluminio y las emulsiones de agua en aceite, y otros que se encuentran en desarrollo, con vistas a generar en el paciente los niveles de anticuerpos contra la IL-15 que se requieren.

La invención también revela el uso de un polipéptido que es un mutante de la IL-15 humana, identificado como SEQ ID No. 1, para fabricar un medicamento para la inmunoterapia activa de una enfermedad relacionada con la sobre-expresión de la IL-15. Es bien conocido por los versados en este campo de la técnica aquellas enfermedades que cursan con una expresión aberrante, o sobre-expresión, de la IL-15.

Se hace uso del polipéptido que es un mutante de la IL-15 humana, identificado como SEQ ID No. 1, para fabricar un medicamento para la inmunoterapia activa de una enfermedad autoinmune, seleccionada del grupo compuesto por la AR, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa y la psoriasis.

5

La vacuna es usada para la inmunoterapia activa de una enfermedad relacionada con la sobre-expresión de la IL-15, como las neoplasias hematológicas. En una realización particular la neoplasia hematológica es una leucemia o un linfoma.

- 10 También se divulga un método para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la sobre-expresión de la IL-15 caracterizado porque comprende la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición vacunal que comprende un polipéptido que es un mutante de la interleucina-15 (IL-15) humana identificado como SEQ ID No. 1. Como se ha expresado, dicha composición vacunal es adecuada para su administración en humanos, y genera una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra la IL-15 autóloga.

15 El método que comprende la inmunización activa con la IL-15Mut (de SEQ ID No. 1) en una formulación adecuada para generar autoanticuerpos neutralizantes contra la IL-15, posibilita la neutralización de cantidades no reguladas de esta citocina, en pacientes con enfermedades autoinmunes y neoplasias hematológicas. Este método es superior al propuesto en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 2004/032956, si se tiene en cuenta que el antígeno empleado para la inmunización activa carece de actividad biológica.

20 El método es útil en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la sobre-expresión de IL-15, entre ellas la AR, la psoriasis y la enfermedad inflamatoria intestinal. Particularmente en estas patologías, la generación de anticuerpos que neutralicen la actividad de la citocina IL-15 resulta ventajosa. En los pacientes aquejados de esas enfermedades, el método de inmunoterapia activa de la invención se puede combinar con la administración de otros medicamentos, como los antiinflamatorios o antagonistas de otras citocinas. Dentro de esos medicamentos están, por ejemplo, los medicamentos esteroideos, como los corticosteroides, y los modificadores del curso de la enfermedad (como el metotrexato).

25 El método es útil, además, en el tratamiento de enfermedades como las neoplasias hematológicas, dentro de las que se encuentran las leucemias y los linfomas. En dicho contexto, se puede combinar la inmunoterapia activa que emplea la composición vacunal de la invención con la administración, al individuo que lo requiere, de al menos un citostático farmacéuticamente aceptable.

30 El método es ventajoso, ya que los niveles de anticuerpos generados en el propio paciente son más estables en el tiempo que los administrados en una inmunización pasiva. Por otra parte, la frecuencia de aplicación de las composiciones vacunales que comprenden el mutante de IL-15 es mucho menor que en una inmunización pasiva con anticuerpos contra la citocina (en el método de la invención están espaciadas por un mayor intervalo de tiempo). Además, la cantidad de proteína por dosis, y la cantidad de administraciones que se requieren para la vacunación, son inferiores a las que se requieren para el tratamiento con moléculas antagonistas de IL-15, lo que implica un menor costo de producción, y mayor adherencia de los pacientes al tratamiento.

45

La inmunización con la vacuna según la reivindicación 1 que incluye el polipéptido identificado como SEQ ID No. 1 genera anticuerpos con una mayor capacidad neutralizante que los obtenidos en el grupo que se inmunizó con la proteína recombinante de SEQ ID No. 2. La utilización de un antígeno que no es biológicamente activo resulta en una menor frecuencia de eventos no deseados en los pacientes tratados con la vacuna que lo contiene.

50

Breve descripción de las Figuras

55 **Figura 1.** Estado de pureza de la IL-15Mut. Se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC, del inglés *reversed phase-high performance liquid chromatography*) de: (A) la IL-15Mut y (B) la IL-15 recombinante obtenida en *E. coli*, usadas como antígeno en la preparación vacunal.

60 **Figura 2.** Evaluación de la actividad biológica de la IL-15Mut mediante el ensayo de proliferación en CTLL-2. (A) Proliferación celular inducida por diluciones seriadas de la IL-15 nativa (R&D), IL-15Mut, IL-15 recombinante obtenida en *E. coli*. (B). Curva de proliferación celular en presencia de diluciones seriadas de la IL-15Mut con una concentración fija de la IL-15 nativa.

Figura 3. Evaluación mediante ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*), de la respuesta de anticuerpos anti-IL-15 en los monos inmunizados con IL-15Mut e IL-15 recombinante, usando hidróxido de aluminio (A) y Montanide™ ISA-51 (B) como adyuvantes. En los gráficos, se representa la media de los valores del título de anticuerpos de los tres animales de cada grupo experimental, correspondientes a 15 días después de la segunda y de la tercera inmunización.

Figura 4. Evaluación en las células CTLL-2 de la capacidad neutralizante de los sueros individuales de los animales inmunizados, después de la tercera inmunización, empleando el adyuvante alúmina. (A) Grupo IL-15, (B) Grupo IL-15Mut a la dosis de 200 µg, (C) Grupo IL-15Mut a la dosis de 350 µg, y (D) grupo placebo. La línea denominada Dilución IL-15 nativa representa el máximo valor de proliferación celular. La línea denominada Mínimo representa el mínimo valor de proliferación correspondiente a células crecidas en medio de cultivo sin citocina.

Figura 5. Evaluación en las células CTLL-2 de la capacidad neutralizante de la mezcla de los sueros de los animales inmunizados con la IL-15Mut y la IL15 recombinante. Se muestra el efecto neutralizante de cada grupo, 15 días después de la segunda y tercera inmunización, usando el adyuvante hidróxido de aluminio (A) o Montanide™ (B). La línea denominada Dilución IL-15 nativa representa el máximo valor de proliferación celular. La línea denominada Mínimo representa el mínimo valor de proliferación correspondiente a células crecidas en medio de cultivo sin citocina.

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos de realización

Ejemplo 1. Obtención del polipéptido IL-15Mut en *E. coli*.

El ADN que codifica para la IL-15 humana fue aislado por RT-PCR (del inglés *reverse transcription - polymerase chain reaction*, transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa) de monocitos activados con lipopolisacáridos, y se amplificó mediante PCR (T_a 60°C, 25 ciclos), usando oligonucleótidos específicos para la mutación del Asp 8 y Gln 108 por Ser en la secuencia de la IL-15 (oligonucleótido 5' CAT GCC ATG GCA AAC TGG GTG AATGTA ATA AGT TCT TTG AAA y oligonucleótido 3' C GGGATCCCG TTA AGA AGT GTT GAT GAA CAT AGA GAC AAT). La banda de PCR se digirió con Nco I/BamH I (Promega, EUA), y se clonó en un vector de expresión en *E. coli*. La IL-15Mut, obtenida como cuerpos de inclusión, fue extraída de la fracción insoluble con urea 8M. El proceso de renaturalización se llevó a cabo en una columna de 1,6x40 cm (GE Healthcare Life Sciences, EUA), empacada con Sephadex G-25 Fine (Pharmacia Biotech, Suecia) y equilibrada en tampón Tris 0,1 M y NaCl 0,15 M; pH 8,0; a razón de 7 mL/min. La muestra colectada se aplicó a una columna de 1,6x10cm (GE Healthcare, EUA) empacada con Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, EUA), usando un gradiente lineal de elución desde 0,2 M hasta 0,5 M de NaCl, a razón de 2 mL/min. La fracción correspondiente a la elución con 0,5M de NaCl se aplicó a una columna C₄ (10 µM, 1x25 cm, Vydac, EUA), a razón de 1 mL/min. Las proteínas se separaron usando una fase móvil que contenía ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% y acetonitrilo (AcN) grado HPLC, usando el siguiente gradiente: 0-30% 5 min; 30% 10 min; 30-40% 5 min; 40-50% 30 min; 50-60% 60 min; 60-80% 5 min a 2,5 mL/min. La separación fue monitoreada a 226 nm. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford, siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína IL-15 sin mutaciones también se obtuvo de forma recombinante en *E. coli*, según se ha descrito anteriormente (Santos-Savio A. *et al.* Biotechnol. 2000, 17:221-4).

Ejemplo 2. Determinación de la pureza de la IL-15Mut mediante RP-HPLC.

Las muestras colectadas de los picos principales de la purificación en RP-HPLC se chequearon para estimar el porcentaje de pureza. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry modificado, con el juego de reactivos "*Modified Lowry Protein Assay Kit*" (Thermo Scientific, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aplicaron 50 µg de cada muestra en una columna Chromolith Performance C₈ (4.6 x 100 mm, 2 µm, Merck, EUA) con un gradiente de 0-80% de AcN/TFA 0,1% en 15 min, a un flujo de 2,5 mL/min. La señal se detectó a 226 nm. La determinación de la pureza se realizó mediante el programa Image J v1.32. La IL-15Mut se obtuvo con una pureza del 96%, según se aprecia en la Figura 1, mientras que la IL-15 recombinante sin mutar se obtuvo con un 98% de pureza.

Ejemplo 3. Evaluación de la actividad biológica de la IL-15Mut en la línea celular CTLL-2.

Con el objetivo de evaluar la actividad biológica de la IL-15Mut se utilizó el ensayo de proliferación en la línea celular CTLL-2. La actividad biológica fue medida por estimulación de la proliferación de estas células, empleando la tinción mitocondrial con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolob (MTT, del inglés *3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (Mossman T. J. Immunol. Methods. 1983; 65(1-2):55-63), siguiendo el procedimiento descrito a continuación. Se realizaron

diluciones seriadas de la IL-15 recombinante, de la IL-15 nativa (R&D, EUA) y de la IL-15Mut, a partir de una concentración de 25 ng/mL, en una placa de cultivo de 96 pocillos (Costar, EUA), en un volumen de 50 µL de medio RPMI, suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% y gentamicina 50 µg/mL. Adicionalmente, se realizaron diluciones seriadas de la IL-15 mutada a partir de 6 µg/mL, en 30 µL de medio RPMI suplementado. Las diluciones de la IL-15Mut se co-incubaron con 300 pg/mL de la IL-15 nativa, en un volumen de 20 µL. Las células CTLL-2 se lavaron previamente 5 veces con medio RPMI, y se adicionaron a la placa, a razón de 5×10^3 células por pocillo, en un volumen de 50 µL. Se incubó por 72 h a 37°C, 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. La viabilidad celular se determinó mediante tinción con MTT. La IL-15Mut no fue biológicamente activa, ya que no indujo la proliferación de las células CTLL-2, a diferencia de la IL-15 recombinante (SEQ ID No. 2) y de la IL-15 nativa, que estimularon una proliferación dosis-dependiente (Figura 2).

Ejemplo 4. Esquema de inmunización en monos verdes.

Los animales, monos verdes (*Chlorocebus sabaeus*), se dividieron en 6 grupos, de 3 animales cada uno: un grupo placebo, que recibió solución de tampón fosfato salino (PBS) en adyuvante hidróxido de aluminio (Brenntag Biosector, Dinamarca), un grupo inmunizado con 200 µg del polipéptido identificado como SEQ ID No. 2 adyuvada en hidróxido de aluminio (grupo IL-15), y otros dos grupos, que recibieron 200 µg o 350 µg del polipéptido identificado como SEQ ID No. 1, combinado con hidróxido de aluminio, que en ambos casos fue a una concentración de 1.8 mg/mL. Además, se incluyeron otros dos grupos experimentales, inmunizados con 200 µg del polipéptido identificado como SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, en adyuvante Montanide™ ISA-51, (50:50 v/v). La administración del inmunógeno se realizó por vía subcutánea, en varios sitios de la región interescapular, inoculando un volumen total de 500 µL. Se realizaron 3 inmunizaciones, espaciadas por un periodo de 15 días entre la primera y la segunda, y dos meses entre la segunda y la tercera inmunización. Se tomaron muestras de sangre, para obtener el suero, antes de comenzar el esquema de inmunización (suero preinmune) y 15 días después de la segunda y tercera inmunización. El suero obtenido se descomplementó, por incubación a 56°C durante 30 min. Durante el esquema, se tomaron los signos vitales, la temperatura, el ritmo cardíaco y el peso corporal de los animales.

Ejemplo 5. Determinación de anticuerpos anti-IL-15 en el suero de los animales inmunizados.

La determinación de anticuerpos anti-IL-15 se hizo mediante un sistema indirecto tipo ELISA, donde la placa se recubrió con el polipéptido identificado como SEQ ID No. 2 (1 µg/mL) en PBS, y se incubó durante 16 horas a 25°C. Se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich, EUA) al 1%, en PBS durante 90 min a 37°C. Se lavó 3 veces con solución de lavado (PBS 1x + Tween 20 al 0,05%). Se realizaron diluciones seriadas de los sueros descomplementados, a partir de 1:5 000 en PBS; Tween 20 0,05% y BSA 0,01% y se aplicaron 100 µL por pocillo del suero diluido, incubando 90 min a 37°C. Se lavó 3 veces, y se adicionó el conjugado anti-Fc de la IgG humana conjugado a peroxidasa (dilución 1:10 000 en PBS). Se incubó durante 1 h a 37°C. Se realizaron 5 lavados y se añadió el sustrato de la peroxidasa (100 µL por pocillo). La reacción se detuvo aproximadamente a los 15 min, con 50 µL de H₂SO₄ 0,5 M. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un equipo lector de placas. El título de anticuerpos se consideró como la dilución del suero que corresponde al menos con el doble del valor de la densidad óptica (DO) a 450 nm del suero preinmune de cada animal a la menor dilución. Los datos fueron procesados utilizando el programa GraphPad Prism 6. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3, que indica que la inmunización activa con el polipéptido mutado de IL-15, correspondiente a la SEQ ID No. 1, genera una respuesta de anticuerpos anti-IL-15, tanto cuando se emplea el adyuvante alúmina como el Montanide™.

Ejemplo 6. Determinación de la capacidad neutralizante de los sueros de animales inmunizados.

La determinación se hizo mediante el ensayo de proliferación celular en la línea CTLL-2. Esta línea, dependiente de IL-2, también prolifera en presencia de IL-15 (máximo de proliferación se considera la alcanzada en células tratadas con dicha citocina nativa, a 300 pg/mL), mientras que en ausencia de la citocina las células no proliferan (mínimo: células crecidas en medio de cultivo sin IL-15). En este ensayo las moléculas que se unen a la IL-15 e impiden la traducción de la señal, a través de su receptor, se detectan porque inhiben la proliferación de esta línea.

Para evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos presentes en el suero de los monos, se realizaron diluciones seriadas de los sueros descomplementados (dilución inicial 1:100), en una placa de cultivo de 96 pocillos en un volumen de 30 µL de medio RPMI, suplementado con SFB 10% y gentamicina (50 µg/mL). Se adicionaron 20 µL de IL-15 nativa (300 pg/mL) por pocillo, y se incubó a 37°C durante 30 min. Las células CTLL-2 se lavaron previamente 5 veces con medio RPMI, y se adicionaron a la placa a razón de 5×10^3 células por pocillo, en un volumen de 50 µL. Se incubó por 72 h a 37°C, 5% de CO₂ y 98%

- de humedad relativa (Rodríguez Y. *et al.*, Biotecnología Aplicada. 2014; 31: 291-6). Se usó como control positivo un anticuerpo neutralizante anti-IL-15 (Mab 2471, R&D, EUA), en diluciones seriadas a partir de una concentración inicial de 1 µg/mL. La viabilidad celular se determinó mediante tinción con MTT. La dilución inhibitoria media (DI₅₀), o título de neutralización, se expresó como la dilución del suero requerida para inhibir la proliferación celular en al menos un 50%, y se determinó a través del programa Curve Expert Versión 1.3.8.0. En los resultados mostrados en la Figura 4 se observa la inhibición que producen los anticuerpos del suero de animales inmunizados con el polipéptido de SEQ ID No. 1 (IL-15Mut) y la SEQ ID No. 2 (IL-15 recombinante), con el adyuvante hidróxido de aluminio, sobre la proliferación inducida por la IL-15 nativa en las células CTLL-2. Los valores de DI₅₀, del suero de los animales individuales dentro de cada grupo experimental (3 animales por grupo) se reflejan en la Tabla 1. Si se comparan los títulos de neutralización de los animales que recibieron la misma dosis (200 µg) de IL-15Mut (SEQ ID No. 1) y de IL-15 recombinante (SEQ ID No. 2), se aprecia que son mayores para la citocina mutada.
- Tabla 1.** Valores de DI₅₀ del suero de los animales, correspondientes a 15 días después de la tercera inmunización.

Inmunógeno/Dosis	Animal	Título de neutralización (DI ₅₀)
IL-15/200 µg	1	1946
IL-15/200 µg	2	859
IL-15/200 µg	3	280
IL-15Mut/200 µg	1	3547
IL-15Mut/200 µg	2	809
IL-15Mut/200 µg	3	3238
IL-15Mut/350 µg	1	2273
IL-15Mut/350 µg	2	5218
IL-15Mut/350 µg	3	1171

- La Figura 5 muestra la capacidad neutralizante de la mezcla de los sueros de los animales inmunizados con la IL-15Mut y la IL15 recombinante, determinada en las células CTLL-2. Los sueros corresponden a los 15 días después de la segunda y tercera inmunización, empleando el adyuvante hidróxido de aluminio o Montanide™. Se aprecia que los sueros poseen capacidad neutralizante después de la tercera inmunización, cuando se administran 200 µg de IL-15Mut e IL-15 recombinante. Sin embargo, los sueros correspondientes a la dosis de 350 µg mostraron capacidad neutralizante a los 15 días después de la segunda administración.

- La Tabla 2 recoge los valores de DI₅₀ de la mezcla de sueros correspondientes a 15 días después de la segunda y la tercera inmunización. Se muestra el título de neutralización para los tres grupos experimentales. Se demuestra que la inmunización con una mayor dosis (350 µg) de la IL-15Mut (SEQ ID No. 1) genera una mayor respuesta neutralizante, desde los 15 días posteriores a la segunda inmunización, cuando se utiliza alúmina como adyuvante. Este aspecto constituye una ventaja, teniendo en cuenta que se podría alcanzar el efecto deseado con un menor número de administraciones. En los grupos inmunizados con el adyuvante Montanide™, donde se comparó la dosis de 200 µg, los valores de DI₅₀ para la IL-15Mut también son superiores a los alcanzados para la IL-15 recombinante, tanto después de segunda como de tercera administración.

Tabla 2. Valores de DI_{50} de la mezcla de sueros, correspondientes a 15 días después de la segunda y la tercera inmunización.

Inmunógeno/Dosis	No. de inmunizaciones	Adyuvante	Título de neutralización (DI_{50})
IL-15/200 µg	2	Hidróxido de aluminio	80
IL-15Mut/200 µg	2	Hidróxido de aluminio	206
IL-15Mut/350 µg	2	Hidróxido de aluminio	1308
IL-15/200 µg	3	Hidróxido de aluminio	1256
IL-15Mut/200 µg	3	Hidróxido de aluminio	2836
IL-15Mut/350 µg	3	Hidróxido de aluminio	3576
IL-15/200 µg	2	Montanide™ ISA-51	50
IL-15Mut/200 µg	2	Montanide™ ISA-51	175
IL-15/200 µg	3	Montanide™ ISA-51	1154
IL-15Mut/200 µg	3	Montanide™ ISA-51	1952

LISTA DE SECUENCIAS

5

<110> CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

<120> COMPOSICIÓN VACUNAL QUE COMPRENDE UN MUTANTE DE LA INTERLEUCINA-15 HUMANA

10

<130> Vacuna IL-15 mutada

<140> CU 2016-0194

<141> 30.12.2016

15

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Mutante de Interleucina-15 humana

<400> 1

30

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Ser Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

35

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

40

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60

ES 2 892 148 T3

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 65 70 75 80
 5 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 85 90 95
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Ser Met Phe Ile Asn
 100 105 110
 10 Thr Ser
 <210> 2
 15 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 20 Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
 1 5 10 15
 Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 20 25 30
 25 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 35 40 45
 Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 50 55 60
 30 Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 65 70 75 80
 35 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 85 90 95
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 100 105 110
 40 Thr Ser
 <210> 3
 45 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligonucleotido 5' para la obtención de mutante de Interleucina-15
 <400> 3
 catgccatgg caaactgggt gaatgtaata agttctttga aa 42
 55
 <210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligonucleotido 3' para la obtención de mutante de Interleucina-15

<400> 4

5 cgggatcccg ttaagaagtg ttgatgaaca tagagacaat 40
1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición vacunal **caracterizada por** que contiene un polipéptido que es un mutante de la interleucina-15 (IL-15) humana que consiste en la SEQ ID No. 1, al menos un adyuvante vacunal seleccionado entre las sales de aluminio o las emulsiones de agua en aceite y excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 10 2. La composición vacunal de acuerdo a la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sobre-expresión de la IL-15 seleccionada entre enfermedades autoinmunes o neoplasias hematológica.
- 15 3. La composición vacunal para el uso de acuerdo a la reivindicación 2, donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en la artritis reumatoide (AR), la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa y la psoriasis.
- 20 4. La composición vacunal para el uso de acuerdo a la reivindicación 2, donde la neoplasia hematológica es una leucemia o un linfoma.
- 5 5. La composición vacunal para el uso de acuerdo a la reivindicación 2, donde esta es combinada adicionalmente con un anti-inflamatorio o con un antagonista de otras citosinas.
- 25 6. La composición vacunal para el uso de acuerdo a la reivindicación 2, donde esta es combinada adicionalmente con un citostático farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

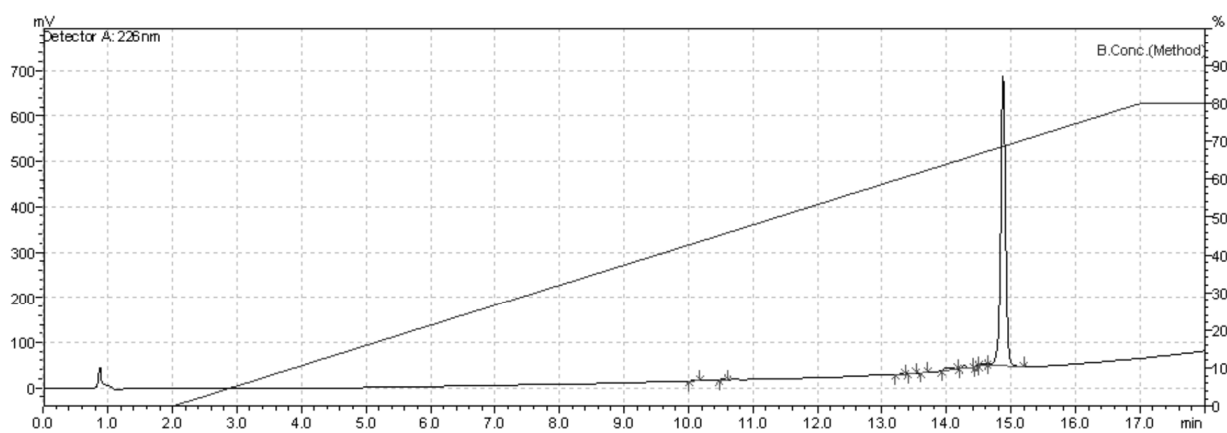
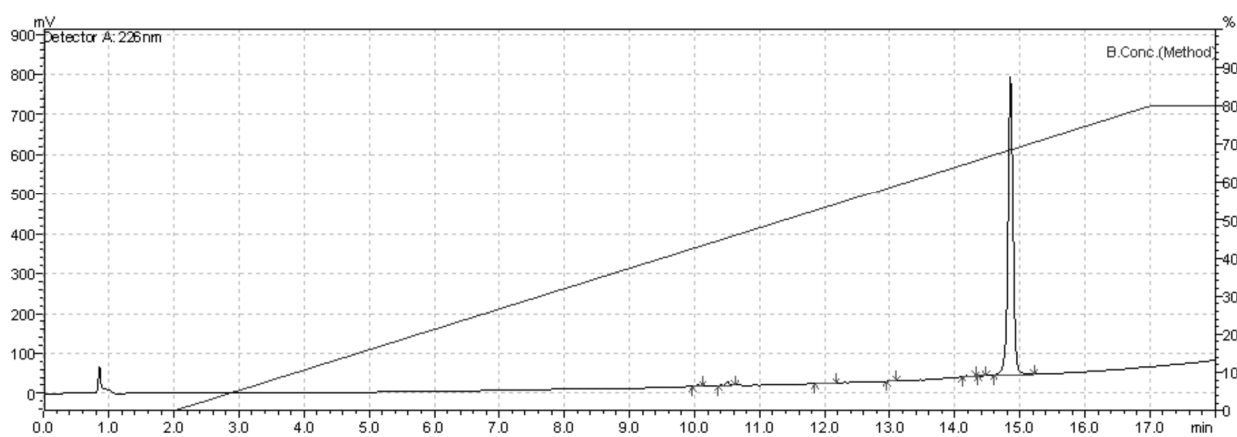
A**B**

Figura 2

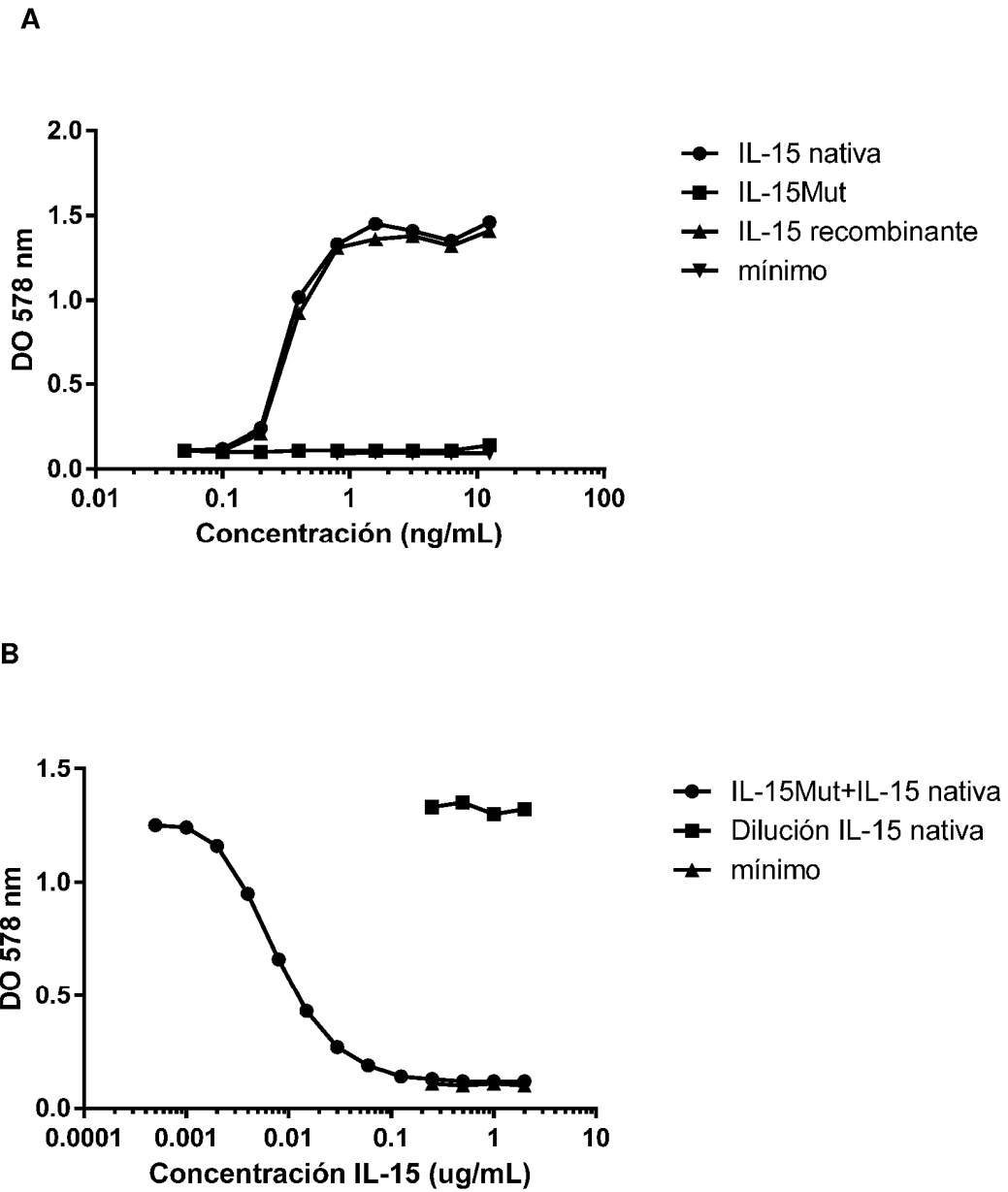
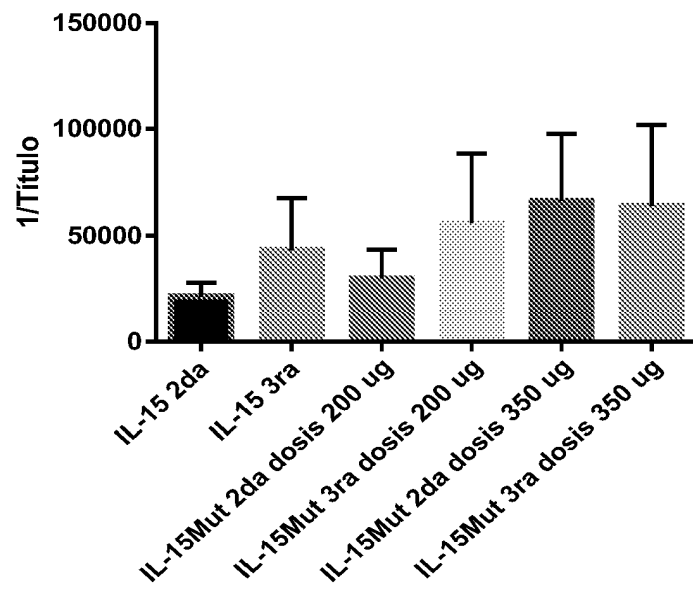


Figura 3

A



B

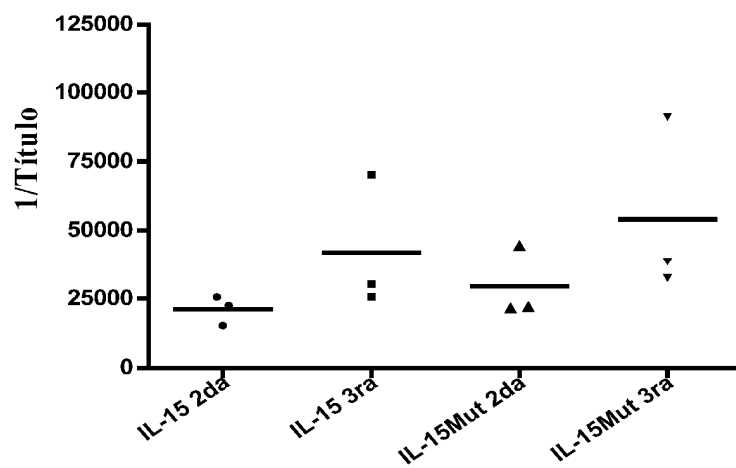


Figura 4

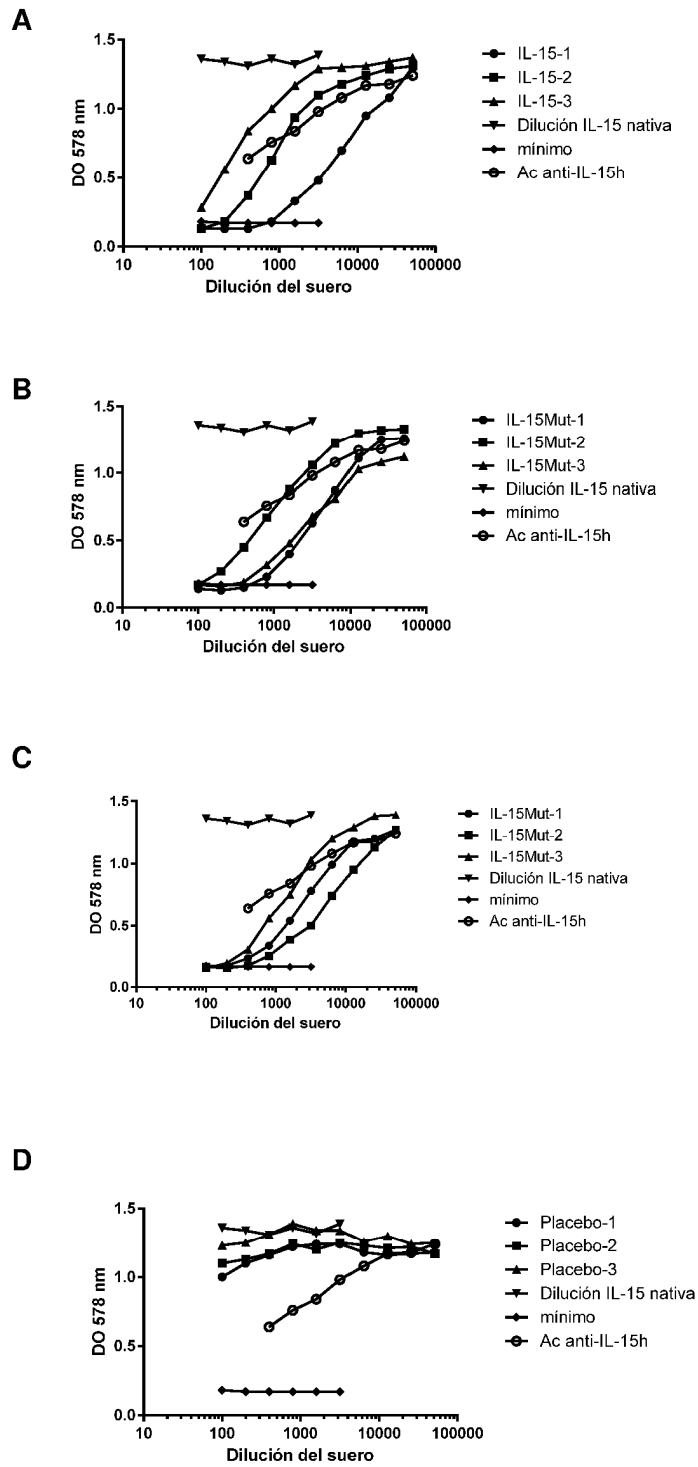
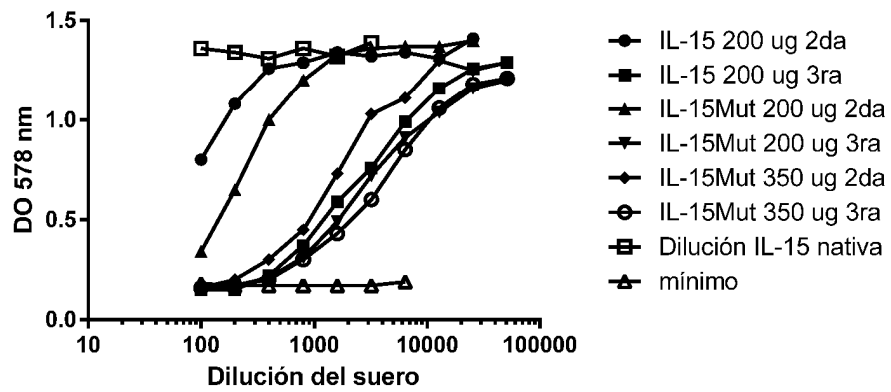


Figura 5

A



B

