



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 845**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

C12N 15/26 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99936898 .8**

96 Fecha de presentación : **16.07.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1097173**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2001**

54 Título: **La utilización de péptidos de IL-2 y derivados de los mismos como agentes terapéuticos.**

30 Prioridad: **16.07.1998 US 116594**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **INSTITUT PASTEUR**
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR

72 Inventor/es: **Theze, Jacques;**
Eckenberg, Ralph;
Moreau, Jean-Louis;
Goldberg, Michel;
Rose, Thierry;
Alzari, Pedro y
Mazie, Jean-Claude

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofia**

ES 2 308 845 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

La utilización de péptidos de IL-2 y derivados de los mismos como agentes terapéuticos.

- 5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos de IL-2 y derivados de los mismos y, a su utilización como agentes terapéuticos.

10 La interleucina-2 (IL-2) es el principal factor de crecimiento de los linfocitos T (THÈZE *et al.* 1996, Immunol. Today 17:481-486). Al regular la actividad de los linfocitos T colaboradores la IL-2 aumenta las respuestas inmunes humorales y celulares. Al estimular células T citotóxicas CD8 y células NK esta citocina participa a los mecanismos de defensa contra tumores e infecciones virales. La IL-2 se utiliza en terapia contra el melanoma metastático y el adenocarcinoma renal. La IL-2 se utiliza en ensayos clínicos en muchas formas de cáncer (LOTZE and ROSENBERG 1988, Interleukin 2 as a Pharmacologic Reagent, in Interleukin 2, K.A. Smith, Academic Press: p. 237-89). También se utiliza en pacientes infectados con el VIH y conduce a un aumento significativo de CD4 (KOVACS *et al.* 1996, New Engl. J. of Medicine 1350-6).

20 La IL-2 humana es una proteína de 133 aminoácidos (aa) compuesta por cuatro hélices α conectadas mediante bucles de diversas longitudes; se ha establecido su estructura tridimensional. La IL-2R está compuesta por tres cadenas α , β y γ . La IL-2R α controla la afinidad del receptor. La IL-2R β y la IL-2R γ son responsables de la transducción de señales de IL-2. Se han definido las diferentes áreas moleculares de IL-2 que interactúan con las tres cadenas de IL-2R. Más concretamente, se ha determinado que hélice- α A así como el área terminal NH₂ de IL-2 (residuos 1 a 30) controlan las interacciones IL-2/IL-2R β (ECKENBERG *et al.* 1997, Cytokine 9:488-98); la cadena IL-2R β es la más importante en la señalización dependiente de IL-2 (THÈZE *et al.* 1990).

25 Los efectos de la interleucina-2 (IL-2) humana en sus células diana son mediadas por medio de receptores de superficie celular (IL-2R) (TANIGUCHI *et al.* (1983) Nature 302:305-310; ROBB *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6486-6490; SMITH KA. 1988a. Interleukin-2; SMITH KA (1988b) Science 240:1169-1176). El IL-2R comprende por lo menos tres subunidades codificadas mediante diferentes genes (MINAMI *et al.* (1993) Annu. Rev. Immunol. 11:245-267; TANIGUCHI *et al.* (1993) Cell 73:5-8). El primer componente a identificar, IL-2R α , es una proteína de 55 kDa que fija IL-2 con Kd de $\approx$ 10 nM (UCHIYAMA *et al.* (1981) J. Immunol. 126:1293-1297; LEONARD *et al.* (1984) Nature 311:626-631). Se han estudiado el papel de IL-2R α (KUMAR *et al.* (1987) J. Immunol. 139:3680-3684) y la influencia de la IL-2 sobre la expresión genética de IL-2R α (BISMUTH *et al.* (1985) Eur. J. Immunol. 15:723-727; FROUSSARD *et al.* (1991) Mol. Immunol. 28:87-93). El segundo componente de IL-2R, IL-2R β es una proteína de 75 kDa con un dominio intracitoplásmico grande (286 aa) (TESHIGAWARA *et al.* (1987) J. Exp. Med. 165:223-238; HATAKEYAMA *et al.* (1989) Science 244:551-556; TSUDO *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1982-1986). El último componente a identificar, IL-2R γ , es una proteína de 64 kDa (TAKESHITA *et al.* (1992) Science 257:379-382; ISHII *et al.* (1994) Int. Immunol. 6:1273-1277). IL-2R β e IL-2R γ pertenecen a la familia del receptor de la hematopoyetina mientras que la IL-2R α pertenece a otra familia de moléculas (THÈZE J (1994) Eur. Cytokine Netw. 5:353-368). En el sistema de ratones se requieren las tres cadenas para formar un receptor funcional (MOREAU *et al.* (1995a) J. Immunol. 155: 3401-3408; CHASTAGNER *et al.* (1996) Eur. J. Immunol. 26:201-206). En el sistema humano dos receptores son funcionales. Cuando están asociados, la IL-2R β humana más la IL-2R γ forman un receptor de afinidad intermedia con un Kd de $\approx$ 1 nM, mientras que la expresión de las tres cadenas conduce a la formación de un IL-2R de alta afinidad (Kd $\approx$ 10 pM).

45 La estructura de la IL-2 (MACKAY D (1992) Science 257:410-413) se compone de un conjunto central compacto de cuatro hélices α antiparalelas conectadas mediante tres bucles (figura 1). Se han elucidado algunas de las interacciones entre la IL-2 e IL-2R α (SAUV *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4636-4640; WANG *et al.* (1995) Eur. J. Immunol. 25:1212-1-216) y las subunidades IL-2R γ (Voss *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2428-2432; Buchli *et al.* (1993) Arch. Biochem. Biophys. 307: 411-415), pero se conoce menos sobre la interacción IL-2/IL-2R β , a pesar del hecho de que la cadena IL-2R β juega un papel muy crítico en la transducción de señales (TANIGUCHI T (1995) Science 268:251-255).

55 Se ha mostrado que una sustitución Asp20 por Lys (mutante-D20K) previene la fijación a IL-2R β (COLLINS *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7709-7713). En un informe reciente se analizó el papel de la secuencia (Leu17, Leu18, Leu19, Asp20, Leu21) de la hélice- α A de IL-2, en las interacciones IL-2/IL-2R β mediante la mutagénesis con casete (BERNDT *et al.* (1994) Biochemistry 33:6571-6577). Sin embargo resultó difícil interpretar los datos dado que la mayoría de las proteínas producidas tienen múltiples mutaciones dentro y fuera de la secuencia de interés. Únicamente se estudió un análogo con una única mutación (L21V). Más sorprendentemente, en este estudio se informó que la eliminación del segmento que abarca los residuos 17-31 (Dell) proporciona una proteína con actividad agonista completa.

65 Los péptidos de IL-2 y sus derivados se describieron en Cytokine (1997) 7:488-498, pero no fueron sometidos a ensayo en un sistema *in vitro* de comprobación de actividad bioquímica como la actividad de citocina, y en particular de una actividad similar a IL-2.

La solicitud de patente internacional PCT WO 9.1/02000 describe el uso de una proteína IL-2 mutante (IL-2m) resistente a la proteólisis, para el tratamiento de enfermedades en la que el receptor de IL-2 juega un papel. La IL-2m

ES 2 308 845 T3

de esta solicitud de patente internacional PCT comprende una supresión de 1 a 5 aminoácidos en la secuencia de IL-2 correspondiente a los residuos 74, 74-78, 75-77, 76-78, 76-79, 75, 78 y 79 de la hélice C.

La solicitud de patente internacional PCT WO 90/00565 describe análogos de IL-2 con una o más sustituciones de aminoácido en la hélice A, B, B', E o F, lo que alteran el dominio de fijación del receptor y/o que estabiliza la estructura de la IL-2 con el fin de modificar la especificidad de estos mutantes hacia las células portantes del receptor de IL-2 p55 o p75 y a su vez de inducir la deseada actividad de IL-2.

La solicitud de patente internacional PCT WO 90/00565 también describe análogos en los que se ha sustituido un residuo de cisteína por un residuo en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o entre las hélices C y D de la IL-2, para permitir la unión de un ligando (toxina, anticuerpo, fármaco, marcador).

Esta solicitud de patente internacional PCT utiliza los análogos anteriormente descritos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y de inmunodeficiencia.

En vista de las deficiencias anteriormente indicadas relacionadas con el análisis de la técnica anterior de los agonistas y los antagonistas de IL-2, así como con los procedimientos de modulación de la actividad de IL-2 con los mismos, está claro que existe una necesidad en la técnica para los mismos.

Por consiguiente, un objeto de esta invención es proporcionar composiciones que presenten una actividad similar a IL-2 y unos procedimientos para su uso como agentes terapéuticos. Las aplicaciones de tales péptidos recombinantes, sintéticos o híbridos son por tanto un objeto de la invención. Estas composiciones se definen como poseedoras de las siguientes características: a) contienen uno o más péptidos de por lo menos cinco aminoácidos en longitud; y b) inhiben o mimetizan la fijación de la hélice A de la interleucina-2 (IL-2) a una subunidad de un receptor de IL-2 (IL-2R).

Otro objeto de la invención es el uso de un péptido purificante que presenta las siguientes características: a) el péptido tiene por lo menos una longitud de cinco aminoácidos; b) el péptido se fija a una subunidad de un receptor de IL-2 (IL-2R); y c) el péptido induce la fosforilación de la subunidad de IL-2R.

Un objeto adicional de la invención se refiere a la preparación de los anticuerpos que reconocen los péptidos de la invención, y el uso terapéutico de estos anticuerpos.

Un objeto adicional de la invención es el uso de secuencias de ADN que codifican los péptidos de la invención y sus derivados. Dichos fragmentos de ADN son útiles, entre otras aplicaciones, para la terapia génica. El uso de un ADN de la siguiente secuencia ATG GCT CCG ACG AGC AGC TCC ACC AAG AAA ACC CAG CTC CAG CTC GAA CAC CTG CTG CTG GAC CTG CAG ATG ATC CTG AAC GGT ATC AAC AAC (SEC ID NO.: 1) o dicha SEC ID NO.: 1 sin el primer codón ATG (SEC ID NO.: 3) es un objeto particular de la invención.

Es también otro objeto de la invención proporcionar un procedimiento de detección de un péptido similar a IL-2, en el que la actividad de IL-2 se mide mediante la fijación de IL-2R al péptido con actividad agonista o antagonista de IL-2. Es también otro objeto de la invención el uso de compuestos que inhiben la actividad de un receptor IL-2R contactando IL-2R con una cantidad del péptido antagonista seleccionado suficiente como para inhibir la fijación de IL-2 al receptor IL-2R bajo condiciones que permiten que se produzca la fijación del péptido al receptor IL-2R.

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para la selección de anticuerpos específicos para péptido purificado con actividad similar a IL-2 tal como se define en la presente memoria. Estos anticuerpos monoclonales o policlonales pueden inhibir la fijación de IL-2 al receptor IL-2R bajo condiciones que permiten que se produzca la fijación al receptor IL-2R. El uso terapéutico de estos anticuerpos es también una parte de la presente invención. En particular, estos anticuerpos específicos para los péptidos purificados son útiles para el tratamiento o la prevención de reacciones inmunes no deseadas como por ejemplo el rechazo a un injerto o trastornos autoinmunes, por ejemplo, la artritis reumatoide.

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para la inducción en un paciente de efectos biológicos de la IL-2 administrando al paciente una cantidad del péptido agonista de la invención suficiente como para inducir esos efectos biológicos, o administrando una combinación de diversas citocinas péptido purificado. Por diversas citocinas se refiere por ejemplo a IL-4, IL-9, IL-15 o IL-2.

Otro objeto de la invención se refiere a las secuencias de ácidos nucleicos que corresponden a la secuencia de aminoácidos del péptido purificado y sus derivados según la invención. Un forma de realización preferente es la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido purificado IP130 que presenta la siguiente secuencia (SEC ID NO.: 2): Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn o una secuencia que no comprende la primera Met (SEC ID NO.: 4).

Esta secuencia o una secuencia derivada de la misma puede insertarse en un vector apropiado capaz de expresar el producto *in vivo*, en una bacteria o en una célula eucariótica, particularmente en levadura o una célula de mamífero. Estas construcciones son, entre otros usos, útiles para la terapia génica.

Con los anteriores y otros objetos, ventajas y características de la invención que se pondrán de manifiesto a continuación en la presente memoria, la naturaleza de la invención puede entenderse con mayor claridad haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de las formas de realización preferentes de la invención y a las reivindicaciones adjuntas.

Se tendrá fácilmente una apreciación más completa de la invención y de muchas de las ventajas relacionadas con la misma a medida que la misma se entienda mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada al considerarse en conexión con los dibujos adjuntos, entre los que:

La figura 1 muestra una representación esquemática de la estructura de la IL-2 humana. La proteína contiene 133 residuos aminoácidos (peso molecular: 15-18 kDa, dependiendo del grado de glicosilación). Cuatro hélices α , indicadas como A (posiciones de residuos 6-29), B-B' (posiciones 53-72), C (posiciones 81-97) y D (posiciones 113-113) rodean un núcleo hidrofóbico central. Los residuos Leu17 y Asp20 (véase el texto) se producen en la hélice A del extremo N-terminal. La estructura del bucle entre la hélice- α C y la hélice- α D resultó indeterminada. Las coordenadas atómicas fueron obtenidas a partir del enlace de acceso al banco de datos Brookhaven Protein Data Bank (BERNSTEIN *et al.* (1977) J. Mol. Biol. 112:535-542), depositadas por D.B. MCKAY (MACKAY D (1992) Science 257:410-413). La figura fue dibujada con el programa Molscript (KRAULIS (1991) J. Appl. Crystallogr. 24:946-950).

La figura 2 muestra la fijación y la inhibición de la fijación del anticuerpo monoclonal (mAb) H2-8. Experimentos de fijación: se recubrieron placas con IL-2, péptido 1-22 o péptido 1-30. El control lo representan las placas no recubiertas. La fijación del anticuerpo monoclonal (mAb) fue revelada con anticuerpo Ig polivalente antiratón en cabra conjugado con fosfatasa alcalina. Experimentos de inhibición: se utilizaron unas concentraciones de los anticuerpos monoclonales (mAb) H2-8 o 19B11 con una fijación máxima de $\frac{1}{2}$ en placas recubiertas con IL-2. Estas diluciones se mezclaron durante 1 hora a 37°C con la concentración indicada de inhibidores antes de ser añadidos a los pocillos recubiertos con IL-2.

La figura 3 muestra la fijación del anticuerpo monoclonal (mAb) H2-8 con el péptido 1-30. Se recubrieron placas con el anticuerpo monoclonal (mAb) H2-8 y se incubaron con el péptido 1-30 como se describe.

La figura 4 muestra los efectos biológicos del anticuerpo monoclonal (mAb) H2-8 sobre IL-2 Pro¹²⁵. Se sometieron a ensayo diferentes concentraciones de IL-2 Pro¹²⁵ con motivo de la proliferación de células TS1 β (IL-2R α -, IL-2R β + de humano, IL-2R γ + de ratón). La proliferación se midió mediante la incorporación de [³H]TdR como se indica.

Se sometieron a ensayo diversas concentraciones de (indicado en paréntesis μ g/ml) del anticuerpo monoclonal (mAb) H2-8. Como control se verificó la ausencia de efectos del anticuerpo monoclonal (mAb) H2-8 sobre la proliferación dependiente de IL-2 de las células TS1 β .

La figura 5 muestra el modelo de las interacciones de IL-2/IL-2R. Figura 5(A) Posición de los residuos Leu17 y Asp20 en la estructura de la IL-2 con respecto a las hélices A, C y D, en una vista perpendicular al eje de la hélice A. Figura 5(B) Posición del residuo Leu17 con respecto a las hélices A y B-B'. La cadena lateral de Leu17 se encuentra situada en un núcleo hidrofóbico rico en leucina de la molécula. La cadena lateral cargada de Asp20 se expone parcialmente a un solvente. Las dos orientaciones de la molécula mostradas en la presente memoria son aproximadamente perpendiculares a la mostrada en la figura 1.

Figura 5(C) El modelo del complejo IL-2/IL-2R (BAMBOROUGH *et al.* (1994) Structure 2:839-851) se basa en la estructura de la hormona de crecimiento humana y su receptor (DE VOS *et al.* (1992) Science 255:306-312). Para mayor claridad, únicamente se muestran las hélices- α A y D de IL-2 y las cadenas β y γ del receptor. Las posiciones estudiadas de IL-2, Leu17, Asp20 y los residuos Arg15 y Tyr134 de IL-2R β están marcadas. También se muestran las posiciones Cys125 y Ser127. Elementos estructurales secundarios como los define el programa DSSP (KABSCH *et al.* (1983) Biopolymers 22:2577-2637). Las coordenadas atómicas del complejo fueron obtenidas a partir de la película de código de acceso del banco de datos Brookhaven Protein Data Bank.

La figura 6 es una representación esquemática de las interacciones de IL-2/IL-2R y la secuencia de IP130 (SEC ID NO.: 4). El receptor de IL-2 está compuesto de tres subunidades (α , β , γ). (Véase Imm. Today, 1996).

La figura 7 demuestra que IP130 induce la proliferación y actúa en sinergia con la IL-2. La actividad proliferativa se sometió a ensayo sobre TS1 β 2 (crecida en IL-2). Se restó el fondo de $1,4 \times 10^3$ cpm. También se observa una sinergia con la IL-2. Las células diana TS1 β se derivan a partir de células murinas de TS1 (que únicamente expresan la IL-2R γ murina), tras la transfección con el gen humano IL-2R β .

La figura 8 muestra que la proliferación inducida por IP130 no se debe a la sinergia con el factor de crecimiento residual obtenido a partir del medio de cultivo. Las células TS1 β , utilizadas en este estudio, son cultivadas en IL-4. La célula TS1 β prolifera con IP130 y esta proliferación no es inhibida por el anticuerpo monoclonal (mAb) 11B11, que neutraliza la proliferación inducida por IL-4. La figura 8A muestra la actividad proliferativa de IP130. La figura 8B muestra la actividad proliferativa de IL-4. La figura 8C muestra IP130 + anticuerpo monoclonal (mAb) 11B11 (anti-IL-4). La figura 8D muestra IL-4 + anticuerpo monoclonal (mAb) 11B11 ($\square$) e IL-4 + anticuerpo monoclonal (mAb) 145 (anticuerpo monoclonal (mAb) de control) ($\blacktriangledown$). La actividad proliferativa se sometió a ensayo sobre TS1 β 4 (crecida en IL-4).

La figura 9 demuestra que la IL-2R β humana es esencial para la proliferación inducida por IP130. La figura 9A muestra la actividad de IP130 sobre células de TS1 transfectadas con IL-2R β humana. La figura 9B muestra el efecto del anticuerpo (A41) antihumano que neutraliza la cadena IL-2R β sobre la actividad de IP130. Las células de TS1 únicamente proliferan tras la transfección mediante el gen humano IL-2R β . Al igual que para la IL-2, la cadena IL-2R β murina no permite la proliferación en la presencia de IP130. La proliferación de TS1 β inducida por IP130 es específicamente neutralizada por el anticuerpo monoclonal (mAb) A41 (IL-2R β antihumano).

La figura 10 es un resumen de IP130 (SEC ID NO.: 4) y de los estudios de la estructura-función de las moléculas derivadas. Se estudió la helicidad, la oligomerización y la actividad biológica en una familia de péptidos (véase también la presentación general de los datos).

La figura 11 es un modelo de las interacciones de IP130/IL-2R β . IP130 es tetramérico e IL-2R β forma un dímero en solución. Propuesto a partir de los resultados obtenidos con la estructura tridimensional de la IL-2 y complejo de hormona de crecimiento/receptor.

La figura 12 muestra el patrón de la fosforilación inducida por IP130 y la implicación de SHC. IP130 induce la fosforilación de la proteína SHC. Las dos bandas correspondientes a isoformas de SHC son fosforiladas tras una estimulación de diez minutos mediante IP130. En la izquierda se muestra la cinética de la fosforilación de Shc. En la derecha se muestra una transferencia Western o "Western blot" de la proteína Shc.

La figura 13 es un ensayo de cambio de movilidad electroforética que muestra que IP130 no induce una actividad de STAT. La activación de STAT se analiza en extractos nucleares de células KIT225 tras una estimulación mediante IL-2, IP130 o IL-2 + IP130. Únicamente muestran una activación de STAT las células estimuladas mediante IL-2 o IL-2 + IP130. En el estudio de utilizaron sondas de β -caseína. Se obtuvieron los mismos resultados con otras dos sondas (GAS y GIRE).

La figura 14 muestra un modelo de transducción de señal e IP130. La IL-2 utiliza tres vías o rutas principales: 1º/JAK/STAT dependiendo del complejo IL-2R γ ; 2º/SHC/MAPK iniciada en la cadena IL-2R β fosforilada y 3º/PI3K. De acuerdo con el modelo de (IP130) $_4$ /(IL-2R β) $_2$ (figura 14), IP130 no induce la vía o ruta JAK/STAT sino que induce la vía o ruta SHC/MAPK. (JAK: quinasa janus; PI3K: quinasa fosfatidilinositol-3 fosfato; STAT: transductores de señal y activadores de transcripción; MAPKK: proteína quinasa activada por mitógenos; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; $\rightarrow$): inducción de la transcripción).

La figura 15 muestra la entrada al ciclo celular (S+G2/M) de células NK estimuladas por IP130. Se estimulan células PBMC mediante IL-2, IP130 o IL-2 + IP130. Se sustraen respuestas no específicas (J+1 en medio). Se mide la entrada de las células NK en las fases de S+G2/M mediante ioduro de propidio y se analiza con el software ModFit 2.0 (Becton Dickinson).

La figura 16 muestra que el péptido IP130 estimula la actividad LAK. En este experimento, se ha estudiado la cinética de la estimulación de la actividad LAK. Los histogramas muestran los resultados con una relación de efector/diana de diez. $\Delta\%$ lisis = lisis inducida mediante IL-2 y/o IP130 - lisis espontánea.

La presente invención se refiere al uso de péptidos de IL-2 derivados de la interleucina-2 (IL-2), para su uso terapéutico en mamíferos, y particularmente en humanos. Los péptidos se seleccionan a partir de fragmentos de IL-2 y derivados de IL-2. Los derivados se definen como contenedores de una secuencia de aminoácidos con capacidad de fijación a la cadena IL-2R β bajo las condiciones descritas en la presente memoria, o con capacidad de fijación a los anticuerpos monoclonales producidos por el hibridoma H2-8. La invención también se refiere a los anticuerpos dirigidos contra los péptidos según la invención que asimismo mimetizan y/o modulan la actividad de IL-2. El diagnóstico y los procedimientos terapéuticos implican el uso de los péptidos purificados y los anticuerpos para la detección y/o la modulación de la fijación de IL-2 a IL-2R *in vitro* e *in vivo*. De acuerdo con la presente invención pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de las capacidades de la técnica. Dichas técnicas se explican al completo en la literatura. Véase por ejemplo, SAMBROOK *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

Por tanto, en caso de aparecer en la presente memoria, las siguientes expresiones tendrán las definiciones que se describen a continuación.

Las expresiones "péptido de IL-2", "agonista/antagonista de IL-2", "IP130/derivados de IP130", y cualquier variante no indicada específicamente, pueden utilizarse en la presente memoria de manera intercambiable, y como se utilizan durante toda la presente solicitud. Estas expresiones hacen referencia a un material proteináceo que incluye una única proteína o múltiples proteínas o un producto recombinante o péptidos obtenidos mediante síntesis química, y se extiende a aquellas proteínas que presentan unos datos de secuencia de aminoácidos descritos en la presente memoria y presentados en la figura 10 (SEC ID NO.: 3). El perfil de las actividades biológicas presentadas a continuación

en la presente memoria es uno de los aspectos de la presente solicitud. Por consiguiente, se contemplan asimismo las proteínas que muestran una actividad considerablemente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como por ejemplo, las modificaciones obtenidas mediante la mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, como por ejemplo las obtenidas por medio de mutaciones en huéspedes que son productores del complejo o sus correspondientes subunidades. También, las expresiones “péptido de IL-2”, “agonista/antagonista de IL-2”, e “IP130/derivados o péptido(s) purificado(s) de IP130” están destinadas a incluir dentro de su alcance proteínas específicamente enumeradas en la presente memoria así como todos los análogos considerablemente homólogos y todas las variaciones alélicas.

Los residuos de aminoácidos descritos en la presente memoria preferentemente se encuentran en la forma isomérica “L”. Sin embargo, los residuos en la forma isomérica “D” pueden sustituirse por cualquier residuo de aminoácido L, siempre que la deseada propiedad funcional o fijación de la inmunoglobulina sea retenida por el polipéptido. NH₂ hace referencia al grupo amino libre presente en el aminoterminal de un polipéptido. COOH hace referencia al grupo carboxi libre presente en el terminal carboxi de un polipéptido. En la siguiente Tabla de Correspondencia se muestran abreviaciones de residuos de aminoácidos, de acuerdo con la nomenclatura estándar de los polipéptidos, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969):

TABLA DE CORRESPONDENCIA

	SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
	1-Letra	3-Letras	
25	Y	Tyr	Tirosina
	G	Gly	Glicina
	F	Phe	Fenilalanina
30	M	Met	Metionina
	A	Ala	Alanita
	S	Ser	Serina
35	I	Ile	Isoleucina
	L	Leu	Leucina
40	T	Thr	Threonina
	V	Val	Valina
	P	Pro	Prolina
45	K	Lys	Lisina
	H	His	Histidina
	Q	Gln	Glutamina
50	E	Glu	Ácido glutámico
	W	Trp	Triptofan
	R	Arg	Arginina
55	D	Asp	Ácido aspártico
	N	Asn	Asparagina
60	C	Cys	Cisteína

Hay que reseñar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos en la presente memoria se representan mediante fórmulas cuya orientación izquierda y derecha se encuentra en la dirección convencional de aminoterminal a terminales carboxi. Además, debe reseñarse que una raya al comienzo o al final de una secuencia de residuo de aminoácido indica un enlace peptídico a otra secuencia de uno o más residuos de aminoácidos. La tabla anteriormente mostrada se presenta para correlacionar las notaciones de tres letras y de una letra que pueden aparecer en la presente memoria de forma alternante.

Un “replicón” es cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación del ADN *in vivo*; es decir, con capacidad de replicación bajo su propio control.

Un “vector” es un replicón, como por ejemplo plásmido, fago o cósmido, al cual puede fijarse otro segmento de ADN para provocar la replicación del segmento fijado.

Una “molécula de ADN” hace referencia a la forma polimérica de los desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina) en su forma de cadena simple o, hélice de cadena doble. Esta expresión hace referencia únicamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no la limita a ninguna forma terciaria particular. Así, esta expresión incluye el ADN de cadena doble que se encuentra, entre otros, en las moléculas lineales de ADN (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. Al analizar la estructura de moléculas de ADN de cadena doble particulares, las secuencias pueden describirse en la presente memoria según la convención normal de proporcionar únicamente la secuencia en la dirección de 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que presenta una secuencia homóloga al ARNm).

Un “origen de replicación” hace referencia a aquellas secuencias de ADN que participan en la síntesis del ADN.

Una “secuencia de codificación” de ADN es una secuencia de ADN de cadena doble que se transcribe y se traduce en un polipéptido *in vivo* situado bajo el control de secuencias regulatorias apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación se determinan mediante un codón de arranque en el terminal (amino) 5' y un codón de parada de traducción en el terminal (carboxi) 3'. Una secuencia de codificación puede incluir, aunque sin limitarse a ello, secuencias procarióticas, ADNc a partir de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico a partir de ADN eucariótico (por ejemplo, de mamífero), e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de transcripción y señal de poliadenilación generalmente estará situada en 3' con respecto a la secuencia de codificación.

Las secuencias de control de transcripción y de traducción son secuencias regulatorias de ADN, como por ejemplo promotores, mejoradores, señales de poliadenilación, terminadores, y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia de codificación en una célula huésped.

Una “secuencia promotora” es una región regulatoria de ADN con capacidad de fijación de la ARN polimerasa en una célula y de inicio de la transcripción de una secuencia de codificación aguas abajo (dirección 3'). Con el fin de definir la presente invención, la secuencia promotora se fija en el terminal 3' junto el sitio de inicio de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el mínimo número de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables sobre el fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (convenientemente definido mediante el mapeo con la nucleasa S1), así como unos dominios de fijación a proteína (secuencias consenso) responsables de la fijación de la ARN polimerasa. Los promotores eucarióticos con frecuencia contendrán, aunque no siempre, cajas “TATA” y cajas “CAT”. Los promotores procarióticos contienen secuencias Shine-Dalgarno además de las secuencias consenso -10 y -35.

Una “secuencia de control de la expresión” es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y la traducción de otra secuencia de ADN. Una secuencia de codificación se encuentra “bajo el control” de las secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia de codificación en ARNm, que seguidamente es traducida en la proteína codificada por la secuencia de codificación.

Una “secuencia de señal” puede incluirse antes que una secuencia de codificación. Esta secuencia codifica un péptido de señal, N-terminal con respecto al polipéptido, que se comunica con la célula huésped para dirigir el polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido en los medios, y este péptido de señal es cortado por la célula huésped antes de que la proteína abandone la célula. Pueden encontrarse secuencias de señal asociadas a una variedad de proteínas nativas a los procariotas y los eucariotas.

El término “oligonucleótido” se define como una molécula compuesta por dos o más ribonucleótidos, preferentemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez, dependen de la función y el uso final del oligonucleótido.

Una célula habrá sido “transformada” por un ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN haya sido introducido dentro de la célula. El ADN transformador puede estar o no integrado (enlazado covalentemente) en un ADN cromosómico formando el genoma de la célula. En los procariotas, la levadura y las células de mamífero, por ejemplo, el ADN transformador puede mantenerse sobre un elemento episomal como por ejemplo un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula establemente transformada en una en la que el ADN transformador se ha integrado en un cromosoma de manera que es heredado por células hijas a través de la replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra mediante la capacidad de la célula eucariótica de establecer líneas celulares o clones compuestos por una población de células hijas que contienen el ADN transformador. Un “clon” es una población de células derivadas a partir de una única célula o antecesor común mediante mitosis. Una “línea celular” es un clon de una célula primaria que tiene la capacidad de un crecimiento estable *in vitro* por muchas generaciones.

Dos secuencias de ADN son “considerablemente homólogas” cuando por lo menos aproximadamente el 75% (preferentemente por lo menos aproximadamente el 80% y, lo más preferentemente por lo menos aproximadamente entre el 90% y el 95%) de los nucleótidos coinciden sobre la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias

ES 2 308 845 T3

que son considerablemente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias utilizando software estándar disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación "Southern" bajo, por ejemplo, condiciones rigurosas como las que se definen para aquél sistema particular. La definición de condiciones de hibridación adecuadas se encuentra dentro de las capacidades de la técnica. Véase pro ejemplo MANIATIS *et al.*, *supra*; DNA Cloning, Vols. I & II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

Debe observarse que también dentro del alcance de la presente invención se encuentran los usos biológicos de las secuencias de ADN que codifican los péptidos de IL-2 con la misma secuencia de aminoácidos que IP130 (SEC ID NO.: 2 o SEC ID NO.: 4), pero que están degeneradas con respecto a las secuencias de codificación de ADN SEC ID NO.: 2 o SEC ID NO.: 4. "Degeneradas con respecto a" hace referencia a que se utiliza un codón diferente de tres letras para especificar un aminoácido particular. Es bien conocido en la técnica que pueden utilizarse los siguientes codones de forma intercambiable para codificar cada aminoácido específico:

15	Fenilalanina (Phe o F)	UUU o UUC
	Leucina (Leu o L)	UUA o UUG o CUU o CUC o CUA o CUG
20	Isoleucina (Ile o I)	AUU o AUC o AUA
	Metionina (Met o M)	AUG
	Valina (Val o V)	GUU o GUC o GUA o GUG
25	Serina (Ser o S)	UCU o UCC o UCA o UCG o AGU o AGC
	Prolina (Pro o P)	CCU o CCC o CCA o CCG
30	Treonina (Thr o T)	ACU o ACC o ACA o ACG
	Alanina (Ala o A)	GCU o GCG o GCA o GCG
35	Tirosina (Tir o Y)	UAU o UAC
	Histidina (His o H)	CAU o CAC
	Glutamina (Gln o Q)	CAA o CAG
40	Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
	Lisina (Lys o K)	AAA o AAG
	Ácido Aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
45	Ácido Glutámico (Glu o E)	GAA o GAG
	Cisteína (Cys o C)	UGU o UGC
50	Arginina (Arg o R)	CGU o CGC o CGA o CGG o AGA o AGG
	Glicina (Gly o G)	GGU o GGC o GGA o GGG
55	Triptofan (Tro o W)	UGG
	Codón de terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (ópalo)

60 Debe entenderse que los codones anteriormente especificados son para secuencias de ARN. Los correspondientes condones para ADN tienen una T como sustituta de U.

65 Pueden realizarse modificaciones de los péptidos en la secuencia de codificación de ADN, SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.: 4 de manera que se cambia de un codón particular a un codón que codifica un aminoácido diferente. Dicha mutación generalmente se lleva a cabo realizando el menor número posible de cambios de nucleótidos. Puede realizarse una mutación de sustitución de este tipo para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de una manera no conservadora (es decir, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a un grupo de aminoácidos con unas

ES 2 308 845 T3

dimensiones o características particulares a un aminoácido perteneciente a otro grupo) o de una manera conservadora (es decir, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a un grupo de aminoácidos con unas dimensiones o características particulares a un aminoácido perteneciente al mismo grupo). Dicho cambio conservador generalmente conduce a menos cambios en la estructura y la función de la proteína resultante. Es más probable que un cambio no conservador altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. Debería considerarse que la presente invención incluya secuencias que contengan cambios conservadores que no alteran de manera significativa las características de fijación o actividad de la proteína resultante.

El siguiente es un ejemplo de diversos grupos de aminoácidos:

Aminoácidos con grupos R no polares

Alanina

Valina

Leucina

Isoleucina

Prolina

Fenilalanina

Triptofan

Metionina

Aminoácidos con grupos R polares descargados

Glicina

Serina

Treonina

Cisteína

Tirosina

Asparagina

Glutamina

Aminoácidos con grupos R polares cargados (negativamente cargados a pH 6,0)

Ácido aspártico

Ácido glutámico

Aminoácidos básicos (positivamente cargados a pH 6,0)

Lisina

Arginina

Histidina (a pH 6,0)

Otro grupo puede ser el de aquellos aminoácidos con grupos fenilo:

Fenilalanina

Triptofan

Tirosina

ES 2 308 845 T3

Otro grupo puede ser según el peso molecular (es decir, tamaño de los grupos R):

	Glicina	75
5	Alanina	89
	Serina	105
	Prolina	115
10	Valina	117
	Treonina	119
15	Cisteína	121
	Leucina	131
	Isoleucina	131
20	Asparagina	132
	Ácido aspártico	133
25	Glutamina	146
	Lisina	146
	Ácido glutámico	147
30	Metionina	149
	Histidina (a pH 6,0)	155
35	Fenilalanina	165
	Arginina	174
	Tirosina	181
40	Triptofan	204

Las sustituciones conservadoras particularmente preferentes son;

- 45 - Lys por Arg y viceversa de manera que puede mantenerse una carga positiva;
- Glu por Asp y viceversa de manera que puede mantenerse una carga negativa;
- 50 - Ser por Thr de manera que puede mantenerse un -OH libre;
- Gln por Asn de manera que puede mantenerse un NH₂ libre;

55 También pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en la IL-2 o péptidos de la misma para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferente. Por ejemplo, puede introducirse un Cys como un potencial sitio para puentes disulfuro con otro Cys. Puede introducirse un His como un sitio particularmente "catalítico" (es decir, His puede actuar como un ácido o base y es el aminoácido más común en la catálisis química). Puede introducirse Pro debido a su estructura particularmente planar, que induce giros β en la estructura de la proteína.

60 Los péptidos biológicamente activos de la invención preferentemente abarcan una región de la secuencia de la IL-2 que incluye los aminoácidos 17-20, a pesar de que uno o más de estos residuos de aminoácidos pueden sustituirse con otro aminoácido o, un aminoácido modificado. El uso del péptido preferente que contiene por lo menos 5 aminoácidos en longitud, más preferentemente de 8 a 12 aminoácidos, y más preferentemente por lo menos 15 aminoácidos en longitud es un aspecto de la invención, así como el uso del péptido de la invención basado en los aminoácidos 1-30 de la IL-2.

Puede considerarse que la actividad biológica o fisiológica de la IL-2 incluya la estimulación de células CD4, CD8 y NK, y puede incluir actividades antivirales y antitumorales. La actividad biológica o fisiológica de IP130 y otros péptidos de la invención puede incluir las actividades de IL-2 anteriormente indicadas, así como la inducción de la fosforilación de SHC y la inducción de la vía o ruta SHC/MAPK.

Una región “heteróloga” de la construcción de ADN es un segmento inidentificable de ADN dentro de una molécula más grande de ADN que no se encuentra en asociación con la molécula más grande en la naturaleza. De esta manera, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen generalmente estará flanqueado por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo fuente. Otro ejemplo de una secuencia de codificación heteróloga es una construcción en la que la propia secuencia de codificación no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un ADNc en el que la secuencia de codificación genómica contiene intrones, o secuencias sintéticas con codones diferentes al gen nativo). Las variaciones alélicas o los sucesos mutacionales que se producen de manera natural no dan lugar a una región heteróloga de ADN como se define en la presente memoria.

Un “anticuerpo” es cualquier inmunoglobulina, incluyendo sus anticuerpos y fragmentos, que fija un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos, estando los últimos descritos con mayor detalle en las patentes estadounidenses US nº 4.816.397 y US nº 4.816.567.

Un “sitio de combinación del anticuerpo” es aquella parte estructural de una molécula de anticuerpo compuesta por regiones variables e hipervariables de cadena pesada y cadena ligera que específicamente fija el antígeno.

La frase “molécula de anticuerpo” en sus diversas formas gramaticales como se utiliza en la presente memoria contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina.

Son Moléculas de anticuerpo ejemplares las moléculas de inmunoglobulina intacta, las moléculas de inmunoglobulina considerablemente intacta y aquellas partes de una molécula de inmunoglobulina que contiene el paratopo, incluyendo aquellas partes conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), partes que preferentemente se utilizan en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria.

Las partes Fab y F(ab')₂ de las moléculas de anticuerpo se preparan mediante la reacción proteolítica de la papaína y la pepsina, respectivamente, en moléculas de anticuerpo considerablemente intacto por medio de procedimientos de que son bien conocidos. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense de US nº 4.342.566 de Theofilopoulos *et al.* También son conocidas las partes de molécula de anticuerpo Fab' y son producidas a partir de partes F(ab')₂ seguido de la reducción de los enlaces disulfuro que unen las dos partes de cadena pesada como con el mercaptoetanol, y seguido de la alquilación de la proteína-mercaptano resultante con un reactivo como la iodoacetamida. En la presente memoria resulta preferente un anticuerpo que contenga moléculas de anticuerpo intacto.

La frase “anticuerpo monoclonal” en sus diversas formas gramaticales hace referencia a un anticuerpo que presenta únicamente una especie de sitio de combinación del anticuerpo con capacidad para inmunoreaccionar con un antígeno particular. De esta manera un anticuerpo monoclonal generalmente muestra una afinidad de fijación simple para cualquier antígeno con el que inmunoreacciona. Por tanto un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo con una pluralidad de sitios de combinación del anticuerpo, cada uno inmuno-específico para un antígeno diferente; por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

Los anticuerpos preferentes de la invención se fijan a los péptidos de la invención, anteriormente descritos. Los anticuerpos que se fijan a los péptidos de la invención pueden utilizarse como agentes de diagnóstico para el análisis de la fijación de IL-2 a su receptor, y también pueden utilizarse como agentes terapéuticos, para mejorar o inhibir la fijación de IL-2 a su receptor. En una forma de realización preferente, el anticuerpo de la invención inhibe la fijación de IL-2 y/o IP130 al receptor IL-2R.

La frase “farmacéuticamente aceptable” hace referencia a composiciones y entidades moleculares que son fisiológicamente tolerables y generalmente no producen una reacción adversa alérgica o similar, como por ejemplo molestias gástricas, mareos y similares, al ser administradas a un humano.

La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a una cantidad suficiente para prevenir, y preferentemente reducir por lo menos en un 30 por ciento, más preferentemente por lo menos en un 50 por ciento, lo más preferentemente por lo menos en un 90 por ciento, un cambio clínicamente significativo en una característica de patología como por ejemplo, presión sanguínea elevada, fiebre o número de células blancas como puede comportar su presencia y actividad.

Una secuencia de ADN se encuentra “operativamente ligada” a una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción y la traducción de la secuencia de ADN. La expresión “operativamente ligada” incluye el tener una señal de inicio apropiada (por ejemplo, ATG) frente a la secuencia de ADN a expresar y mantener el correcto marco de lectura para permitir la expresión de la secuencia de ADN bajo el control de la secuencia de control de la expresión y producción del producto deseado codificado por la secuencia de ADN. Si un gen que uno desea insertar en una molécula de ADN recombinante no contiene una apropiada señal de inicio, dicha señal de inicio puede insertarse frente al gen.

La expresión “condiciones estándares de hibridación” hace referencia a condiciones de sal y temperatura considerablemente equivalentes a 5 x SSC y 65°C tanto para la hibridación como para el lavado. Sin embargo, un experto en la materia podrá observar que dichas “condiciones estándares de hibridación” son dependientes de condiciones particulares que incluyen la concentración de sodio y magnesio en el tampón, longitud y concentración de la secuencia de nucleótidos, porcentaje de desemparejamiento, porcentaje de formamida, y similares. También es importante en la determinación de las “condiciones estándares de hibridación” si las dos secuencias de hibridación son ARN-ARN, ADN-ADN, o ARN-ADN. Dichas condiciones estándares de hibridación las determina fácilmente un experto en la materia según formulas bien conocidas, en el que la hibridación generalmente es de entre el 10°C y el 20°C por debajo del T_m predicho o determinado con lavados de mayor severidad, si se desea.

En su aspecto primario, la presente invención se refiere al uso de los péptidos de IL-2 que modulan la actividad de IL-2. El término “modular” hace referencia a la actividad agonista o antagonista que incrementa o elimina los efectos fisiológicos de IL-2, como por ejemplo la proliferación de las células, tal como se describe a continuación.

Tal y como se ha indicado anteriormente, la presente invención también se refiere a un gen clonado o molécula de ADN recombinante, o una variante degenerada del mismo, que codifica un péptido de IL-2, o un fragmento del mismo, que posea un peso molecular preferentemente de entre 2 kD y 5 kD y una secuencia de aminoácidos presentada en la figura 10 (SEC ID NO.: 4) o una secuencia en la que la secuencia SEC ID NO.: 4 se modifica por inserción, eliminación y/o sustitución; preferentemente una molécula de ácido nucleico, en particular un gen clonado o molécula de ADN recombinante, que codifica el péptido tiene una secuencia de nucleótidos, es complementaria a, o se hibridiza bajo condiciones estándares de hibridación a una secuencia de ADN que codifica la secuencia SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.: 4.

Las posibilidades tanto diagnósticas como terapéuticas que surgen o se elevan por la existencia de los péptidos de IL-2, se derivan del hecho de que los péptidos parecen participar en una interacción proteína-proteína directa y causal entre el péptido de IL-2 y el receptor de IL-2, específicamente IL-2R β , y aquellos factores que seguidamente median sucesos celulares. En particular se ha comprobado que el péptido IP130 induce la fosforilación de IL-2R β , para inducir c-myc; y que induce que las células asesinas naturales o “natural killer” (NK) entren al ciclo celular. Tal como se ha sugerido anteriormente y como se elabora más adelante en la presente memoria, la presente invención contempla la intervención farmacéutica en la cascada de reacciones en las que se encuentra implicado el receptor IL-2R, para modular la actividad iniciada por IL-2 y los péptidos de la misma.

De esta manera, en casos en los que se desea reducir o inhibir la actividad inducida por IL-2, podría introducirse un inhibidor de IL-2 del péptido de IL-2 apropiado para bloquear la interacción de la IL-2 con el receptor IL-2R. Por consiguiente, los casos en los que tiene lugar una actividad inducida por IL-2 insuficiente podrían remediarse mediante la introducción de cantidades adicionales del agonista del péptido de IL-2 apropiado, como por ejemplo IP130, o sus cognados, análogos, fragmentos y similares químicos o farmacéuticos.

Tal y como se ha analizado anteriormente, los péptidos de IL-2 o sus parejas de fijación u otros ligandos o agentes que muestran mimetismo o antagonismo a IL-2 o control sobre su producción, pueden prepararse en composiciones farmacéuticas, con un portador adecuado y a una fuerza efectiva para la administración por medio de diversos medios a un paciente que esté experimentando un estado médico adverso asociado a niveles no deseables de IL-2 para el tratamiento del mismo. Pueden utilizarse una diversidad de técnicas de administración, entre ellas las técnicas parenterales como las inyecciones subcutáneas, intravenosas e intraperitoneales, cateterizaciones y similares. Las cantidades medias de los péptidos de IL-2 o sus subunidades pueden variar y en particular deberían basarse en las recomendaciones y prescripción de un médico o veterinario cualificado.

También, los anticuerpos que incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, y los fármacos que modulan la producción o actividad de IL-2 y/o péptidos de la misma pueden tener ciertas aplicaciones diagnósticas y pueden por ejemplo, utilizarse con el fin de detectar y/o medir la actividad del receptor de IL-2 o similares. Por ejemplo, la IL-2 o péptidos de la misma pueden utilizarse para producir tanto anticuerpos policlonales como monoclonales a sí mismos en una diversidad de medios celulares, mediante técnicas conocidas como por ejemplo la técnica del hibridoma utilizando, por ejemplo, linfocitos de bazo de ratón fusionados y células de mieloma. Asimismo, pueden descubrirse o sintetizarse pequeñas moléculas que mimetizan o antagonizan la actividad o las actividades de los péptidos de IL-2 de la invención, y pueden utilizarse en protocolos diagnósticos y/o terapéuticos.

La metodología general para fabricar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es bien conocida. También pueden crearse líneas celulares productoras de anticuerpos, inmortales, mediante técnicas diferentes a la fusión, como por ejemplo la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o la transfección con el virus Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, M. SCHREIER *et al.*, “Hybridoma Techniques” (1980); HAMMERLING *et al.*, “Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas” (1981); KENNETT *et al.*, “Monoclonal Antibodies” (1980); véanse también las patentes estadounidenses US n° 4.341.761; US n° 4.399.121; US n° 4.427.783; US n° 4.44US n° 4.887; US n° 4.451.570; US n° 4.466.917; US n° 4.472.500; US n° 4.491.632; US n° 4.493.890.

Pueden cribarse paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra péptidos de IL-2 por diversas propiedades; es decir, isotipo, epítipo, afinidad, etc. Son de un interés particular los anticuerpos monoclonales que modulan la actividad de IL-2 o péptidos de la misma. Dichos anticuerpos monoclonales pueden identificarse fácilmente en ensayos

de proliferación celular. También son útiles los anticuerpos de alta afinidad cuando es posible la purificación por inmunoafinidad de la IL-2 nativa o recombinante o péptidos de IL-2 nativos o recombinantes.

Preferentemente, el anticuerpo anti-IL-2 utilizado en los procedimientos de diagnóstico de esta invención es un anticuerpo policlonal purificado por afinidad. Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal (mAb). Además, es preferente que las moléculas de anticuerpo anti-IL-2 utilizados en la presente memoria se encuentren en la forma de partes Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v) o moléculas de anticuerpo enteras.

Un procedimiento de diagnóstico de la presente invención comprende el examen de un medio o muestra celular por medio de un ensayo que incluye una cantidad efectiva de un péptido de IL-2 marcado o un antagonista del mismo, como por ejemplo un anticuerpo anti-IP130, preferentemente un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, y más preferentemente un anticuerpo monoclonal (mAb). Además, es preferente que las moléculas de anticuerpo anti-IL-2 utilizadas en la presente memoria se encuentren en la forma de partes Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v) o moléculas de anticuerpo enteras. Tal como se ha analizado anteriormente, entre los pacientes con capacidad de beneficiarse de este procedimiento se incluyen aquellos que sufren de cáncer, una lesión precancerosa, una infección viral u otro trastorno patológico similar. Los procedimientos para aislar el péptido de IL-2 e inducir anticuerpos anti-IL-2 y determinar y optimizar la capacidad de los anticuerpos anti-IL-2 para facilitar el examen de las células diana son bien conocidos en la técnica.

Los procedimientos para producir anticuerpos antipolipéptido policlonales son bien conocidos en la técnica. Véase la patente estadounidense US nº 4.493.795 de Nestor *et al.* Un anticuerpo monoclonal, que generalmente contiene partes Fab y/o F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo útiles, puede prepararse utilizando la tecnología del hibridoma descrita en *Antibodies - A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988). En resumen, para formar el hibridoma a partir del que se produce la composición del anticuerpo monoclonal, se fusiona un mieloma u otra línea celular autoperpetuante con linfocitos obtenidos a partir del bazo de un mamífero hiperinmunizado con un péptido de IL-2 o una parte de fijación al receptor IL-2R del mismo.

Los esplenocitos generalmente se fusionan con células de mieloma utilizando polietilenglicol (PEG) 6000. Los híbridos fusionados son seleccionados por su sensibilidad a HAT. Los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal útil para llevar a la práctica esta invención son identificados por su capacidad para inmunoreaccionar con el presente péptido o mutante de IL-2 y su capacidad para inhibir la especificada actividad de IL-2 en las células diana.

Un anticuerpo monoclonal útil para llevar a la práctica la presente invención puede producirse iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio de nutriente que contiene un hibridoma que segrega moléculas de anticuerpo de la especificidad antigénica apropiada. El cultivo se mantiene bajo unas condiciones y por un periodo de tiempo suficientes para que el hibridoma segregue las moléculas de anticuerpo en el medio. A continuación se recoge el medio que contiene el anticuerpo. A continuación pueden aislarse más las moléculas de anticuerpo mediante técnicas bien conocidas.

Los medios útiles para la preparación de estas composiciones son bien conocidos en la técnica y se encuentran comercialmente disponibles e incluyen medios de cultivo sintéticos, ratones endogámicos y similares. Un medio sintético ejemplar es el medio "medio mínimo esencial" de Dulbecco (DMEM; DULBECCO *et al.*, Virol. 8:396 (1959)) suplementado con 4,5 mg/l de glucosa, 20 mm de glutamina y 20% de suero fetal bovino. Una cepa de ratón endogámico ejemplar es el Balb/c.

Los procedimientos para producir anticuerpos anti-IL2 monoclonales también son bien conocidos en la técnica. Véase NIMAN *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953 (1983). Generalmente, se utiliza el presente péptido de IL-2 o un péptido análogo bien sea solo o conjugado con un portador inmunogénico, como el inmunogen del procedimiento anteriormente descrito para producir anticuerpos anti-IL-2 monoclonales. Los hibridomas son cribados para medir la capacidad para producir un anticuerpo que inmunoreaccione con el mutante o péptido análogo de IL-2.

La presente invención contempla además el uso de composiciones terapéuticas que sean útiles para llevar a la práctica los procedimientos terapéuticos de esta invención. En una forma de realización, la composición terapéutica incluye, en mezcla, un excipiente (portador) farmacéuticamente aceptable y uno o más de un péptido de IL-2, un péptido purificado o un derivado del mismo o un polipéptido análogo del mismo o fragmento del mismo, tal y como se describe en la presente memoria como un ingrediente activo. En una forma preferente, la composición terapéutica comprende un compuesto activo que contiene un péptido purificado con capacidad de modular la fijación específica del la presente IL-2 con el receptor IL-2R.

La preparación de las composiciones terapéuticas que contienen polipéptidos, análogos o fragmentos activos como ingredientes activos se entiende bien en la técnica. Generalmente, dichas composiciones se preparan como soluciones líquidas o suspensiones inyectables, aunque, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para una solución en líquido, o una suspensión en líquido previamente a la inyección. El preparado también puede ser emulsionado. El ingrediente terapéutico activo con frecuencia se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Son excipientes adecuados, por ejemplo, el agua, la salina, la dextrosa, el glicerol, el etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener menores cantidades de sustancias auxiliares como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampón de pH que mejoran la efectividad del ingrediente activo.

El uso de las composiciones puede ser mediante la administración en una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema inmune del sujeto para utilizar el ingrediente activo, y el grado de modulación de la capacidad de fijación de IL-2 deseada. Las cantidades de ingrediente activo requeridas para su administración dependen de la opinión del médico y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, las dosis adecuadas pueden encontrarse en un intervalo de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20, preferentemente de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10, y más preferentemente de uno a varios, miligramos de ingrediente activo por kilogramo de peso corporal del individuo por día y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo o recuerdo son también variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una hora o más mediante una posterior inyección u otra administración. Alternativamente, se contemplan infusiones intravenosas continuas suficientes para mantener concentraciones en la sangre de entre diez nanomolar y diez micromolar.

El uso de las composiciones terapéuticas puede ser mediante la administración en una composición que incluye además una cantidad efectiva del agonista/antagonista de IL-2 o análogo del mismo, y uno o más de los siguientes ingredientes activos: un antibiótico, un esteroide.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “pg” hace referencia a picogramo, “ng” hace referencia a nanogramo, “ug” o “μg” hace referencia a microgramo, “mg” hace referencia a miligramo, “ul” o “μl” hace referencia a microlitro, “ml” hace referencia a mililitro, “l” hace referencia a litro.

Otra característica de esta invención es la expresión de las secuencias de ADN descritas en la presente memoria. Como bien es conocido en la técnica, las secuencias de ADN pueden expresarse enlazando operativamente las mismas a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión adecuado y empleando ese vector de expresión para transformar un huésped unicelular adecuado.

Por supuesto, dicho enlace operativo de una secuencia de ADN de esta invención a una secuencia de control de la expresión incluye, si no es que ya es parte de la secuencia de ADN, la provisión de un codón de iniciación, ATG, en el marco de lectura correcto aguas arriba de la secuencia de ADN.

Puede emplearse una gran variedad de combinaciones huésped/vector de expresión al expresar las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo; pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, plásmidos de *E. coli* col El, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos como RP4; ADN de fago, por ejemplo, los numerosos derivados de fago λ, por ejemplo, NM989, y otro ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago filamentosos de cadena simple; plásmidos de levadura como el plásmido 2 μ o derivados de los mismos; vectores útiles en células eucarióticas, como por ejemplo vectores útiles en células de insectos o de mamíferos; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, como por ejemplo plásmidos que han sido modificados para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de la expresión; y similares.

Puede utilizarse cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión (secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN operativamente ligadas a la misma) en estos vectores para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos de SV40, CMV, vacunas, poliovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, el sistema *LTR*, las principales regiones de operadores y promotores de fago λ, las regiones de control de la proteína de recubrimiento fd, el promotor para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), los promotores de los factores de apareamiento α de la levadura, y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procarióticas o eucarióticas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos.

También son útiles una amplia variedad de células huésped unicelulares al expresar las secuencias de ADN de esta invención. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucarióticos y procarióticos bien conocidos, como por ejemplo las cepas *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos como por ejemplo las levaduras, y células de animales, como por ejemplo células CHO, R1.1, B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, y BMT10), células de insectos (por ejemplo, Sf9), y células de humano y células de planta en cultivo de tejido.

Se podrá entender que no todos los vectores, secuencias de control de la expresión y huéspedes funcionarán igual de bien para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Ni tampoco funcionarán todos los huéspedes igual de bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la materia podrá seleccionar vectores, secuencias de control de la expresión y huéspedes apropiados sin excesiva experimentación para completar la expresión deseada sin alejarse del alcance de esta invención. Por ejemplo, al seleccionar un vector, debe considerarse el huésped debido a que el vector debe funcionar en el mismo. También se considerarán el número de copia del vector, la capacidad de controlar dicho número de copia, y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como por ejemplo marcadores antibióticos.

Al seleccionar una secuencia de control de la expresión, normalmente se considerarán una diversidad de factores. Entre estos se incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa del sistema, su control habilidad, y su compatibilidad con la particular secuencia de ADN o gen a expresar, particularmente en lo que se refiere a potenciales estructuras secundarias. Los huéspedes unicelulares adecuados serán seleccionados mediante la consideración de, por ejemplo, su compatibilidad con el vector elegido, sus características secretoras, su capacidad para doblar proteínas correctamente, y sus requerimientos de fermentación, así como la toxicidad con respecto al huésped del producto codificado por las secuencias de ADN a expresar, y la facilidad de purificación de los productos de expresión.

Considerando estos y otros factores un experto en la materia podrá construir una diversidad de combinaciones de vector/secuencia de control de la expresión/huésped que expresarán las secuencias de ADN de esta invención sobre la fermentación o en cultivo animal a gran escala.

Se pretende además que para el uso terapéutico de los péptidos según la invención, los análogos de péptido de IL-2 puedan prepararse a partir de secuencias de nucleótidos del complejo/la subunidad de proteína derivado/a dentro del alcance de la presente invención. Los análogos, como los fragmentos, pueden producirse, por ejemplo, mediante la digestión con pepsina de material de IL-2. Otros análogos, como por ejemplo las muteínas, pueden producirse mediante la mutagénesis dirigida estándar de secuencias de codificación de IL-2. Los análogos que muestran la "actividad de IL-2" como las moléculas pequeñas, funcionen como promotores o como inhibidores, pueden identificarse mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* conocidos.

Tal como se he indicado anteriormente, una secuencia de ADN que codifica péptidos de IL-2 puede prepararse sintéticamente en vez de ser clonado. La secuencia de ADN puede diseñarse con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos del péptido de IL-2. En general, se seleccionarán codones preferentes para el pretendido huésped si se desea utilizar la secuencia para la expresión. La secuencia completa se monta a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados mediante procedimientos estándares y montados en una secuencia de codificación completa. Véase, por ejemplo, EDGE, Nature, 292:756 (1981); NAMBAIR *et al.*, Science, 223:1299 (1984); JAY *et al.*, J. Biol. Chem., 259:6311 (1984).

Las secuencias de ADN sintético permiten la adecuada construcción de genes que expresarán los análogos de péptidos de IL-2 o "muteínas". Alternativamente, las muteínas codificadoras de ADN pueden producirse mediante la mutagénesis dirigida de ADNc-s o genes nativos de IL-2, y las muteínas pueden producirse directamente utilizando la síntesis convencional de polipéptidos.

Se describe un procedimiento general para la incorporación específica de sitio de aminoácidos no naturales en proteínas en Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, Science, 244:182-188 (April 1989). Este procedimiento puede utilizarse para crear análogos con aminoácidos no naturales.

De acuerdo con las aplicaciones de terapia génica de la presente invención, puede utilizarse la preparación de oligonucleótidos antisentido y ribozimas para modular la expresión de IL-2 al nivel de traducción. Este procedimiento utiliza ácido nucleico y ribozimas para bloquear la traducción de un ARNm específico, bien sea mediante enmascarado del ARNm con un ácido nucleico antisentido o clivando el mismo con una ribozima.

Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias a por lo menos una parte de una molécula específica de ARNm (véase WEINTRAUB, 1990; MARCUS-SEKURA, 1988). En la célula, se hibridizan a dicho ARNm, formando una molécula de cadena doble. La célula no traduce un ARNm en esta forma de cadena doble. Por tanto, los ácidos nucleicos interfieren con la expresión del ARNm en la proteína. Los oligómeros de aproximadamente quince nucleótidos y moléculas que se hibridizan al codón de iniciación AUG serán particularmente eficientes, dado que son fáciles de sintetizar y es probable que presenten menos problemas que las moléculas más grandes al introducirlos en las células. Los procedimientos antisentido se han utilizado para inhibir la expresión de muchos genes *in vivo* (MARCUS-SEKURA, 1988; HAMBOR *et al.*, 1988).

Las secuencias de ADN descritas en la presente memoria pueden por tanto utilizarse para preparar moléculas antisentido en contra, y ribozimas que clivan ARNm-s para IL-2 o moléculas que estimulan o reducen la secreción de IL-2 y sus ligandos.

La presente invención también se refiere a una diversidad de aplicaciones de diagnóstico, incluyendo procedimientos para detectar la presencia y la actividad de IL-2, como referencia a su capacidad de provocar las actividades que son mediadas por los presentes péptidos de IL-2. Tal como se ha indicado anteriormente, el péptido de IL-2 puede utilizarse para producir anticuerpos a sí mismo mediante una diversidad de técnicas conocidas, y a continuación dichos anticuerpos podrían ser aislados y utilizados como en los ensayos de detección de la presencia de una actividad particular de IL-2 y/o IL-2R en presuntas células diana.

Tal y como se ha indicado en detalle anteriormente, el anticuerpo o los anticuerpos para los péptidos de IL-2 pueden producirse y aislarse mediante procedimientos estándares que incluyen las bien conocidas técnicas del hibridoma. Por comodidad, el anticuerpo o los anticuerpos para el péptido de IL-2 serán referidos en la presente memoria como Ab₁ y el anticuerpo o los anticuerpos crecidos en otras especies serán referidos como Ab₂.

La presencia de IL-2 y péptidos de IL-2 en células puede determinarse mediante los habituales procedimientos inmunológicos aplicables a dichas determinaciones. Son conocidos una serie de procedimientos útiles. Tres de dichos procedimientos que son especialmente útiles utilizan bien sea el péptido de IL-2 marcado con un marcador detectable, el anticuerpo Ab₁ marcado con un marcador detectable, o el anticuerpo Ab₂ marcado con un marcador detectable. Los procedimientos pueden resumirse mediante las siguientes ecuaciones en las que el asterisco indica que la partícula está marcada, e "ILP" hace referencia al péptido de IL-2:



Los procedimientos y su aplicación son todos familiares a los expertos en la materia y por consiguiente pueden utilizarse dentro del alcance de la presente invención. El procedimiento "competitivo", Procedimiento A, se describe en las patentes estadounidenses US n° 3.654.090 y US n° 3.850.752. El Procedimiento C, procedimiento "sándwich", se describe en las patentes estadounidenses US n° RE 31.006 y US n° 4.016.043. También se conocen otros procedimientos como por ejemplo el del "doble anticuerpo" o procedimiento "DASP".

En cada caso, el ILP forma complejos con uno o más anticuerpos o parejas de fijación y un miembro del complejo es marcado con un marcador que es detectable. El hecho de que se ha formado un complejo y, si se desea, la cantidad del mismo, pueden determinarse mediante procedimientos conocidos aplicables a la detección de marcadores.

A partir de lo anteriormente indicado podrá apreciarse que, una propiedad característica de Ab₂ es que reaccionará con Ab₁. Esto se debe a que Ab₁ crecido en una especie de mamífero ha sido utilizado en otras especies como un antígeno para crecer el anticuerpo Ab₂. Por ejemplo, Ab₂ puede crecerse en cabras utilizando anticuerpos para conejo como antígenos. Por tanto Ab₂ sería un anticuerpo anticonejo crecido en cabras. Para los fines de esta descripción y de las reivindicaciones, Ab₁ será referenciado como anticuerpo primario o anti-ILP, y Ab₂ será referenciado como anticuerpo secundario o anti-Ab.

Los marcadores más comúnmente empleados para estos estudios son elementos radioactivos, enzimas, químicos que son fluorescentes cuando son expuestos a la luz ultravioleta, y otros.

Se conoce una serie de materiales fluorescentes y pueden utilizarse como marcadores. Entre estos se incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, Rojo Texas, azul AMCA y Amarillo Lucifer. Un material particular de detección es el anticuerpo anticonejo preparado en cabras y conjugado en fluoresceína a través de un isotiocianato.

El péptido de IL-2 o su pareja o parejas de fijación también pueden marcarse con un elemento radioactivo o con una enzima. El marcador radioactivo puede detectarse por cualquiera de los procedimientos de conteo disponibles en la actualidad. El isótopo preferente puede seleccionarse de entre ³H ¹⁴C ³²P ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr ⁵⁷Co, ⁵⁸Co ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y ¹²⁵I ¹³¹I y ¹⁸⁶Re.

Los marcadores de enzima son asimismo útiles, y pueden detectarse por cualquiera de las actualmente utilizadas técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas. La enzima se conjuga a la partícula seleccionada mediante reacción con moléculas puente como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Se conocen y pueden utilizarse muchas enzimas que pueden utilizarse en estos procedimientos. Las preferentes son peroxidasa, β-glucuronidasa, β-D-glucosidasa, β-D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Son referenciadas las patentes estadounidenses US n° 3.654.090; US n° 3.850.752; y US n° 4.016.043 a modo de ejemplo por su descripción de material de marcado alternante y procedimientos.

Un sistema de ensayo particular que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención es conocido como ensayo receptor. En un ensayo receptor, el material a ensayar es marcado apropiadamente y a continuación son inoculadas ciertas colonias celulares de ensayo con una cantidad del material marcado y no marcado tras los cual son llevados a cabo unos estudios de fijación para determinar el grado al que se fija el material marcado a los receptores celulares. De esta manera, pueden determinarse las diferencias en afinidad entre materiales.

Una forma de realización adicional de esta invención es la aplicación diagnóstica de kits de ensayo comerciales para su uso por un especialista médico. El kit puede prepararse para determinar la presencia o ausencia de capacidad de la actividad predeterminada de IL-2R o de la actividad predeterminada de IL-2 en presuntas células dianas. De acuerdo con las técnicas de ensayo anteriormente analizadas, una clase de dichos kits contendrá por lo menos el péptido de IL-2 marcado o su pareja de fijación, por ejemplo un anticuerpo específico del mismo, e instrucciones, por supuesto,

ES 2 308 845 T3

dependido del procedimiento seleccionado, por ejemplo, “competitivo”, “sándwich”, “DASP” y similares. Los kits pueden también contener reactivos periféricos como tampones, estabilizadores, etc.

Por consiguiente, puede prepararse un kit de ensayo para la demostración de la presencia o capacidad de las células de una actividad de IL-2R predeterminada, que comprende:

a) Una cantidad predeterminada de por lo menos un componente inmunoquímicamente reactivo marcado obtenido mediante la fijación directa o indirecta del presente factor peptídico de IL-2 o una pareja de fijación específica del mismo, a un marcador detectable;

b) Otros reactivos; y

c) Instrucciones de uso de dicho kit.

Más específicamente, el kit de ensayo de diagnóstico puede comprender:

a) Una cantidad conocida del péptido de IL-2 tal como se ha descrito anteriormente (o una pareja de fijación) generalmente fijado a una fase sólida para formar un inmunosorbente, o alternativamente, fijado a un marcador adecuado, o varios de dichos productos finales, etc. (o sus parejas de fijación) uno de cada;

b) En caso de ser necesario, otros reactivos; y

c) Instrucciones de uso de dicho kit de ensayo.

En otra variación, el kit de ensayo puede prepararse y utilizarse para los fines anteriormente indicados, operando según un protocolo predeterminado (por ejemplo, “competitivo”, “sándwich”, “doble anticuerpo”, etc.), y comprende:

a) Un componente marcado que ha sido obtenido mediante el acoplamiento del péptido 11-2 a un marcador detectable;

b) Un o más reactivos inmunoquímicos adicionales de los cuales por lo menos un reactivo es un ligando o un ligando inmovilizado, cuyo ligando es seleccionado a partir de un grupo que consiste en:

i) Un ligando con capacidad de fijación con el componente marcado (a);

ii) Un ligando con capacidad de fijación con una pareja de fijación del componente marcado (a);

iii) Un ligando con capacidad de fijación con por lo menos uno de los componentes a determinar; y

iv) Un ligando con capacidad de fijación con por lo menos una de las parejas de fijación de por lo menos uno de los componentes a determinar; y

c) Instrucciones para la realización de un protocolo para la detección y/o determinación de uno o más componentes de una reacción inmunoquímica entre el péptido de IL-2 y una pareja de fijación específica del mismo.

Habiendo descrito la invención de forma general, puede obtenerse un mayor entendimiento haciendo referencia a algunos ejemplos específicos que son proporcionados en la presente memoria únicamente con fines ilustrativos y que no son en modo alguno limitativos a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplos

Ejemplo 1

Caracterización del anticuerpo monoclonal de ratón H2.8

Se inmunizaron repetidamente ratones hembra BALB/c con una cantidad de entre 25 μ g y 50 μ g del péptido 1-30 por inyección. El péptido se acopló a la portadora KLH y se inyectó con adyuvante completo de Freund (primera inyección) o con adyuvante incompleto de Freund (inyecciones posteriores). El título de la actividad anti-IL-2 fue evaluado en un grupo de cinco animales. Se utilizaron células de bazo del animal con la mejor respuesta para la fusión con la línea celular SP2-0. Se clonaron cuatro hibridomas con una actividad anti-IL-2 específica. Los anticuerpos monoclonales (mAbs) fueron purificados a partir del correspondiente fluido ascítico mediante una precipitación de sulfato de amonio. Se verificó la pureza de los reactivos (>80%) mediante geles de poliacrilamida. Se caracterizaron las propiedades de los mAbs. Se muestran únicamente resultados para el mAb H2-8. Se determinaron el isótopo (IgG1) y el Kd ($1,4 \times 10^{-9}$ M) del mAb H2-8.

Se utilizaron como controles los mAbs 19B11 (IgG1) y 2C4 (IgG1) de ratón previamente caracterizados (MOREAU *et al.* (1995b) *Mol. Immunol.* 32:1047-1056; REBOLLO *et al.* (1992) *Mol. Immunol.* 29:119-130). Los mAbs 19B11 y 2C4 inhiben la fijación de IL-2 a IL-2R β y reconocen los péptidos 1-10 (véase abajo), 1-22 y 1-30. El 11B11 monoclonal de rata (IgG, k) específico para IL-4 murina lo proporcionó el Dr. W. PAUL (National Institute of Health, Bethesda MD, USA) y se utilizó tal como se ha descrito anteriormente (MOREAU *et al.* (1995b) *Mol. Immunol.* 32:1047-1056).

Primero se sometió a ensayo el efecto inhibitorio del mAb H2-8 purificado sobre la fijación de IL-2 marcada con ¹²⁵I. Sus efectos se midieron en dos transfectantes derivados de una línea celular de ratón que expresaba únicamente mL-2R γ . Se obtuvieron los transfectantes TS1 β y TS1 α tras una transfección con IL-2R β de humano y ADNc de IL-2R α de humano, respectivamente. Ambas líneas celulares fijan la IL-2. El mAb H2-8 inhibe la fijación de IL-2 a TS1 β sin afectar de manera significativa la fijación de IL-2 a TS1 α (datos no mostrados).

Las propiedades de fijación del mAb H2-8 fueron estudiadas con ELISA. Las placas fueron recubiertas con IL-2 o con los péptidos 1-22 o 1-30. El mAb H2-8 se fija a IL-2 y al péptido 1-30, pero no reconoce el péptido 1-22. Como control el mAb 19B11 (previamente caracterizado) reconoció ambos péptidos (figura 2).

Se llevaron a cabo experimentos de inhibición de la fijación para caracterizar adicionalmente la especificidad del mAb H2-8. Las placas se recubrieron con IL-2 y se utilizó una concentración del mAb H2-8 con aproximadamente el 50% de la fijación máxima. Se preincubó el H2-8 con diferentes péptidos que incluyen cinco decapeptidos (1-10, 5-15, 10-20, 15-25, 20-30). Únicamente la IL-2 y el péptido 1-30 fueron capaces de inhibir la fijación del mAb H2-8 a IL-2. El péptido 1-30 fue el inhibidor más eficiente en estos experimentos (figura 2). Este resultado es compatible con el hecho de que el péptido aislado 1-30 se dobla en una configuración de hélice α (contenido de hélice α del 50% $\pm$ 7%) mientras que el péptido 1-22 (13% $\pm$ 5%) no se dobla según medición por dicroísmo circular. Por tanto el péptido 1-30 puede adoptar una conformación estructural única muy cercana a la de la IL-2 nativa. Como control la fijación del mAb 19B11 es inhibida por la IL-2 pero también por los péptidos 1-10, 1-22 y 1-30. Esto confirma que el epítipo del mAb 19B11 se encuentra próximo a la posición terminal NH₂ de IL-2 tal como se ha sugerido anteriormente (MOREAU *et al.* (1995b) *Mol. Immunol.* 32:1047-1056).

Ejemplo 2

Síntesis del péptido

Los péptidos fueron sintetizados por medio de la fase sólida progresiva utilizando el procedimiento de Boc/ácido trifluoroacético (MERRIFIELD (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2145), sobre una resina p-metil-benzidrilamina (Applied Biosystems) con un sintetizador de péptidos 430A de Applied Biosystems.

Ejemplo 3

Implicación de los aa en las posiciones 17 y 20 en el reconocimiento del mAb H2-8

Fueron sometidos a ensayo la reactividad del mAb H2-8 a diversos mutantes de IL-2 incluyendo un mutante en la posición 17 (Leu $\rightarrow$ Asp), cuatro mutantes en la posición 20 (Asp $\rightarrow$ Asn; Asp $\rightarrow$ Lys; Asp $\rightarrow$ Arg y Asp $\rightarrow$ Leu) y un doble mutante 17-20 (Leu17 $\rightarrow$ Asp y Asp20 $\rightarrow$ Leu) mediante el análisis de transferencia Western o "Western blot" (figura 3).

El mAb H2-8 no reconoce mutaciones en la posición 20 o el doble mutante (THÈZE J (1994) *Eur. Cytokine Netw.* 5:353-368; MOREAU *et al.* (1995a) *J. Immunol.* 155:3401-3408; CHASTAGNER *et al.* (1996) *Eur. J. Immunol.* 26:201-206; MACKAY D (1992) *Science* 257:410-413). También se ve afectada el reconocimiento de la mutación en la posición 17. Como control positivo son mostrados los resultados obtenidos con el mAb 2C4 que reconoce un epítipo próximo al área terminal NH₂ de IL-2. Dado que este mAb (como 19B11) reconoce el péptido 1-10 sin mutación alguna, su fijación a IL-2 no se ve afectada. Asimismo las mutaciones en las posiciones 125 y/o 127 no afectan a la fijación a los mAbs H28 y 2C4, y sirven como controles adicionales. Los experimentos ELISA llevados a cabo con todos los mutantes soportan los datos obtenidos con las transferencias Western o "Western blots" (datos no mostrados).

El mAb H2-8 según es caracterizado en el Ejemplo 1 y el 19B11 (descrito en *Molec. Immunol.* (1995) 32:1047-1056) presentan propiedades similares: ambos se fijan al extremo terminal NH₂ de IL-2 e inhiben específicamente la fijación de IL-2 a la cadena IL-2R β . Dado que ambos anticuerpos reconocen las secuencias situadas en el péptido 1-30 resultaba interesante comparar la relación entre los correspondientes epítopos. Se utilizaron placas recubiertas con el mAb H2-8 para fijar el péptido 1-30. La fijación del mAb 19B11 a estas placas fue positiva, indicando de esta manera que los epítopos de los mAbs H2-8 y 19B11 no se superponen de manera significativa. Se muestran varios controles llevados a cabo para verificar estos resultados (figura 3). La fijación de 19B11 depende estrictamente de la presencia del péptido 1-30 y del recubrimiento mediante el mAb H2-8. Los resultados obtenidos con el mAb 3H9 reconociendo el péptido 30-54 demostraron adicionalmente la especificidad de los datos presentados en la figura 3.

Ejemplo 4

Líneas celulares, medios de cultivo y ensayo de proliferación

5 Las células de TS1 expresan únicamente la cadena IL-2R γ de ratón. Se obtuvieron células TS1 β tras la transfección de las células de TS1 con ADNc de IL-2R β de humano clonado en el vector de expresión pKCR amablemente proporcionado por el Dr. T. TANIGUCHI (Institute for Molecular and Cellular Biology, Tokyo University, Japón). Se obtuvieron células TS1 α tras la transfección de las células de TS1 con ADNc de IL-2R α de humano clonado en el vector de expresión pCMV4 proporcionado por los Drs W.A. KUZIEL y W.C. GREENE (Gladstone Institute Virol./ Immunol., San Francisco CA, USA). Las células TS1 β y TS1 α fueron previamente caracterizadas (PITTON *et al.* 10 (1993) Cytokine 5:362-371). También se utilizaron CTLL2 y YT para los estudios de fijación de IL-2.

15 Todos los cultivos fueron realizados en un medio completo compuesto por RPMI 1640 (BioProducts, Walkerville, MD), 10% de FCS inactivado por calor (Serovial, Vogelgsun, Francia), 2 mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, 50 mM de 2- β -mercaptoetanol (2 β ME). Las líneas celulares de TS1 β y TS1 α fueron crecidas como células de TS1 en un medio completo suplementado con supernadante de baculovirus recombinante que expresa proteínas de IL-9 murina (DIB 349) (UYTTENHOVE *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6934-6938).

20 Las células TS1 β fueron cultivadas (10⁴ células/pocillo) en placas de microtitulación con fondo plano de 96 pocillos con un volumen final de 0,2 ml. Se sometieron a ensayo diversas concentraciones de rIL-2 de humano, muteínas de IL-2 o rIL-9 de ratón. Con el fin de analizar el efecto inhibitorio de los mAbs, se mezclaron diferentes concentraciones de estos reactivos en los pocillos de cultivo con las respectivas linfoquinas durante 30 minutos a baja temperatura antes de añadir las células. Se estudiaron los efectos inhibitorios de la muteína 20 Leu (descrita en Cytokine (1997) 9:488-498, 25 que se incorpora en la presente memoria en su totalidad por referencia) preincubando las células (30 minutos a 4°C) con la concentración indicada de inhibidor antes de añadir IL-2 o IL-9 a los pocillos. Los cultivos fueron pulsados con 0,5 μ Ci/pocillo de (³H) TdR tras 36 horas de incubación y cosechados 15 horas después.

Ejemplo 5

30 *Propiedades biológicas del mAb H2-8*

Las propiedades biológicas del mAb H2-8 fueron evaluadas sobre la proliferación de la línea celular de TS1 β dependiente de IL-2 o IL-9 (figura 4). En estos experimentos se utilizó el mutante de IL-2, IL-2 Pro¹²⁵ (Cys $\rightarrow$ Pro). 35 Esta mutación reduce sensiblemente la afinidad de IL-2 por IL-2R sin afectar la proliferación máxima obtenida al utilizar mayores concentraciones de mutante.

La figura 4 muestra que las diferentes concentraciones del mAb H2-8 reducen la proliferación de TS1 β dependiente de IL-2. Se observa un cambio progresivo de la curva de titulación o titración de IL-2 con concentraciones crecientes del mAb H2-8. Los efectos inhibitorios del mAb H2-8 son comparables a los obtenidos con el mAb 19B11, para el que también se descubrió que inhibe la proliferación de células con IL-2R de gran afinidad (MOREAU *et al.* (1995b) Mol. Immunol. 32:1047-1056). La adición tanto del mAb H2-8 como del 19B11 elimina completamente la proliferación dependiente de IL-2 incluso a dosis muy elevada de IL-2. 40

45 Como controles la figura 4 muestra que el mAb 11B11 (específico para la IL-4 de ratón) no afecta a la proliferación dependiente de IL-2 de TS1 β . La proliferación de TS1 β inducida por IL-9 tampoco se ve afectada ni por H2-8 ni por 19B11.

Ejemplo 6

50 *Ensayo de fijación de IL-2 e inhibición*

El ensayo de fijación de IL-2 se realizó tal y como ya ha sido descrito anteriormente (MOREAU *et al.* (1995b) Mol. Immunol. 32: 1047-1056). Primero se estudió la fijación de IL-2 marcada con ¹²⁵I a diferentes líneas celulares. 55 Se realizaron experimentos de inhibición a concentraciones de IL-2 marcada con ¹²⁵I con una fijación máxima de entre el 50% y el 70%. Fueron analizados los efectos de las diferentes muteínas tras 1 hora de preincubación a 4°C seguido de una incubación con IL-2 marcada con ¹²⁵I (3 horas a 4°C). En cada experimento se determinó una fijación no específica. Los datos se expresaron como % de la capacidad inhibitoria de las diferentes muteínas versus proteína de tipo salvaje.

Ejemplo 7

Propiedades físico-químicas del péptido IP130 (Cytokine, 1997)

65 El péptido aminoterminal de IL-2 que incluye los aa 1 a 30 tiene un peso molecular de 3422.

Los estudios de dicroísmo circular llevados a cabo con IP130 indican que a 20°C, en tampón fosfato (20 mM, pH 7,2), el 50% de los residuos se encuentran en una configuración de hélice α .

También se estudió la estructura cuaternaria del péptido IP130 por equilibrio de sedimentación - difusión. A una concentración por encima de $5 \times 10^{-6} \text{M}$, la mayoría de las moléculas tienen forma tetramérica (en equilibrio con un complejo octomérico).

La secuencia de aminoácidos 1 a 30 muestra 7 leucinas y 2 isoleucinas entre los primeros 20 residuos. La periodicidad de estos aa así como los resultados anteriormente indicados sugieren un modelo estructural para IP130 que comprendería 4 péptidos organizados en 4 hélices α . En este modelo las cadenas laterales de leucinas e isoleucinas aparecen en la misma cara. Esta cara es hidrofóbica y cuatro de estas caras formarían un núcleo hidrofóbico inaccesible al agua. A elevadas concentraciones los péptidos 1-10 tienden a dimerizar y esto explicaría la formación de péptidos octaméricos.

Se estudió la fijación de IP130 a una cadena IL-2R β soluble. Se ha descubierto que la cadena IL-2R β soluble es dimerica en solución. A partir de los resultados, se ha propuesto un modelo estructural: el complejo incluiría cuatro péptidos IP130 y dos cadenas IL-2R β ((IP130) $_4$ /(IL-2R β) $_2$).

Ejemplo 8

Propiedades biológicas de IP130

Se llevaron a cabo estudios con una línea celular murina transfectada por un gen de IL-2R β de humano (TS1 β) o con una línea celular leucémica de humano dependiente de IL-2 (Kit 225 del Dr. T. HORI).

IP130 estimula la proliferación de TS1 β en la ausencia de IL-2. En la presencia de IL-2 se observa una gran sinergia con el péptido. Ambas actividades se obtienen a concentraciones comparables ($\text{IC}_{50} \approx \mu\text{M}$).

IP130 actúa únicamente sobre líneas celulares que expresan la cadena IL-2R β de humano. Esto concuerda con estudios previos que muestran que la cadena IL-2R β murina no se fija a IL-2 (CHASTAGNER *et al.* 1996, Eur. J. immunol. 26:201-6). Por consiguiente, las líneas celulares murinas clásicas (C30-1, CTLL, HT-2, ...) habitualmente utilizadas para someter a ensayo la actividad IL-2 permanecen insensibles a los efectos de IP130. Además el mAb bloqueante de IL-2R β antihumano neutraliza los efectos de IP130.

Solo el péptido induce la fosforilación de las proteínas en la línea celular Kit 225. Sobre el patrón de las proteínas fosforiladas, la quinasa Shc se reconoce fácilmente. Tras una inmunoprecipitación específica y transferencia o "blotting" con el mAb 4G10 (anti-Ptyr), la cadena IL-2R β fosforilada se identifica en lisados a partir de la línea celular Kit 225 estimulada por IP130. También se observa una inducción de c-myc que depende de la fosforilación IL-2R β tras la estimulación con IP130. STAT-3 y STAT-5 no se activan tras la estimulación con IP130 dado que la cadena IL-2R γ no está implicada en la interacción de IP130 con Kit 225.

Ejemplo 9

Propiedades inmunológicas de IP130 y uso como agente terapéutico

La cadena IL-2R β se expresa constitutivamente mediante células NK de humano de todos los donantes estudiados (DAVID *et al.*, Blood 91: 165-172, 1998). Los monocitos únicamente expresan la cadena IL-2R γ . Otros linfocitos no expresan ni la cadena IL-2R β ni la IL-2R α ni la IL-2R γ (DAVID *et al.*, 1998).

IP130 induce a que las células NK entren al ciclo celular.

IP130 también ha sido analizado sobre la generación de LAK *in Vitro*. IP130 induce la actividad LAK como en el ensayo con las dianas K562.

Al mAb H2-8 fue aislado tras la inmunización con el péptido 1-30 de IL-2. Reconoce tanto la IL-2 como el péptido 1-30, pero no péptidos más cortos que cubren la misma región (figura 2). Este resultado sugiere que el mAb H2-8 reconoce un epítipo conformacional en la región del extremo N-terminal de IL-2, y que este epítipo es mimetizado por el péptido 1-30. De hecho, las mediciones del diámetro circular revelan una fracción significativa de la estructura de la hélice α para el péptido 1-30. Además, el H2-8 puede fijarse al péptido 1-30 incluso en la presencia del mAb 19B11 (que reconoce un epítipo lineal dentro de la parte no helicoidal del péptido 1-30), pero no reconoce los mutantes de IL-2 en la posición 20 (en el centro de la hélice- α A) según lo determina el análisis de transferencia Western o "Western blot" o, ELISA (figura 3 y otros datos no mostrados). El anticuerpo también inhibe la bioactividad de IL-2 sobre células TS1 β (figura 4), cuya proliferación es estrictamente dependiente de la expresión de la cadena IL-2R β de humano. Consideradas a la vez, estos resultados demuestran que el mAb H2-8 reconoce un epítipo alrededor de Asp20 de IL-2, una región que influye directamente sobre la interacción de la citocina con la cadena IL-2R β .

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es solamente para conveniencia del lector. La misma no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que se ha tenido mucho cuidado durante la recopilación de las referencias, no deben excluirse errores u omisiones y a este respecto la OEP se exime de toda responsabilidad.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9102000 A
- US 4466917 A
- WO 9000565 A
- US 4472500 A
- US 4816397 A
- US 4491632 A
- US 4816567 A
- US 4493890 A
- US 4342566 A
- US 4493795 A
- US 4341761 A
- US 3654090 A
- US 4399121 A
- US 3850752 A
- US 4427783 A
- US RE31006 E
- US 4444887 A
- US 4016043 A
- US 4451570 A

Literatura (no patentes) citada en la descripción

- THÈZE *et al.* *Immunol. Today*, 1996, vol. 17, 481-486
- LOTZE; ROSENBERG. *Interleukin 2 as a Pharmacologic Reagent. in Interleukin 2*, 1988, 237-89
- ISHII *et al.* *Int. Immunol.*, 1994, vol. 6, 1273-1277
- THÈZE J. *Eur. Cytokine Netw.*, 1994, vol. 5, 353-368
- MOREAU *et al.* *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 3401-3408
- KOVACS *et al.* *New Engl. J. of Medicine*, 1996, 1350-6
- ECKENBERG *et al.* *Cytokine*, 1997, vol. 9, 488-98
- TANIGUCHI *et al.* *Nature*, 1983, vol. 302, 305-310
- ROBB *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6486-6490
- *Science*, vol. 240, 1169-1176
- MINAMI *et al.* *Annu. Rev. Immunol.*, 1993, vol. 11, 245-267
- TANIGUCHI *et al.* *Cell*, 1993, vol. 73, 5-8
- UCHIYAMA *et al.* *J. Immunol.*, 1981, vol. 126, 1293-1297
- LEONARD *et al.* *Nature*, 1984, vol. 311, 626-631
- KUMAR *et al.* *J. Immunol.*, 1987, vol. 139, 3680-3684
- BISMUTH *et al.* *Eur. J. Immunol.*, 1985, vol. 15, 723-727
- FROUSSARD *et al.* *Mol. Immunol.*, 1991, vol. 28, 87-93
- TESHIGAWARA *et al.* *J. Exp. Med.*, 1987, vol. 165, 223-238
- CHASTAGNER *et al.* *Eur. J. Immunol.*, 1996, vol. 26, 201-206

ES 2 308 845 T3

- **MACKAY D.** *Science*, 1992, vol. 257, 410-413
- **SAUV et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 4636-4640
- 5 • **WANG et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1995, vol. 25, 1212-1216
- **VOSS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2428-2432
- 10 • **BUCHLI et al.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, vol. 307, 411-415
- **TANIGUCHI T.** *Science*, 1995, vol. 268, 251-255
- **COLLINS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 7709-7713
- 15 • **BERNDT et al.** *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 6571-6577
- *Cytokine*, 1997, vol. 7, 488-498
- 20 • **BERNSTEIN et al.** *J. Mol. Biol.*, 1977, vol. 112, 535-542
- **KRAULIS.** *J. Appl. Crystallogr.*, 1991, vol. 24, 946-950
- **BAMBOROUGH et al.** *Structure*, 1994, vol. 2, 839-851
- 25 • **HATAKEYAMA et al.** *Science*, 1989, vol. 244, 551-556
- **TSUDO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 1982-1986
- **TAKESHITA et al.** *Science*, 1992, vol. 257, 379-382
- 30 • **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 1989
- *Current Protocols in Molecular Biology.* 1994, vol. I-III
- 35 • *Cell Biology: A Laboratory Handbook.* 1994, vol. I-III
- *Current Protocols in Immunology.* 1994, vol. I-III
- 40 • *Oligonucleotide Synthesis.* 1984
- *Nucleic Acid Hybridization.* 1985
- *Transcription And Translation.* 1984
- 45 • *Animal Cell Culture.* 1986
- *Immobilized Cells And Enzymes.* IRL Press, 1986
- **B. PERBAL.** *A Practical Guide To Molecular Cloning.* 1984
- 50 • *J. Biol. Chem.*, 1969, vol. 243, 3552-59
- **DE VOS et al.** *Science*, 1992, vol. 255, 306-312
- 55 • **KABSCH et al.** *Biopolymers*, 1983, vol. 22, 2577-2637
- **NAMBAIR et al.** *Science*, 1984, vol. 223, 1299
- **JAY et al.** *J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 259, 6311
- 60 • **CHRISTOPHER J. NOREN; SPENCER J. ANTHONY-CAHILL; MICHAEL C. GRIFFITH; PETER G. SCHULTZ.** *Science*, April 1989, vol. 244, 182-188
- 65 • **MOREAU et al.** *Mol. Immunol.*, 1995, vol. 32, 1047-1056
- **REBOLLO et al.** *Mol. Immunol.*, 1992, vol. 29, 119-130
- **MERRIFIELD.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2145

ES 2 308 845 T3

- *Molec. Immunol.*, 1995, vol. 32, 1047-1056
- **PITTON** *et al. Cytokine*, 1993, vol. 5, 362-371
- 5 • **UYTTENHOVE** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 6934-6938
- *Cytokine*, 1997, vol. 9, 488-498
- Antibodies - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- 10 • **NIMAN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 4949-4953
- **EDGE**. *Nature*, 1981, vol. 292, 756
- 15 • **CHASTAGNER** *et al. Eur. J. immunol.*, 1996, vol. 26, 201-6
- **DAVID** *et al. Blood*, 1998, vol. 91, 165-172

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección *in vitro* de la presencia o actividad de IL-2R, en el que dicho IL-2R se mide de la siguiente manera:

a) Contactando (1) una muestra biológica de un mamífero en el que se sospecha de la presencia o actividad de dicho IL-2R con (2) un péptido que consiste en la secuencia SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4 bajo las condiciones que permiten que se produzca la fijación de dicho IL-2R a dicho péptido; y

b) Detectando si ha ocurrido o no la fijación entre dicho IL-2R de dicha muestra y el péptido que consiste en la secuencia SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4.

2. Procedimiento de inhibición de la actividad de un IL-2R que comprende contactar dicho IL-2R con una cantidad del péptido que consiste en una secuencia SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4 suficiente para inhibir la fijación de IL-2 a dicho IL-2R bajo condiciones que permiten que se produzca la fijación de dicho péptido a dicho IL-2R.

3. Uso de un péptido que consiste en una secuencia SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4 útil para inducir en un paciente seleccionado actividades de IL-2 útiles seleccionadas de entre el grupo que consiste en la estimulación de células CD4, estimulación de células CD8+, estimulación de células NK, inducción de actividad antiviral o antitumoral de la fosforilación de SHC e inducción de la vía o ruta SHK/MAPK, para la preparación de un medicamento.

4. Uso de un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica un péptido que consiste en una secuencia SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4 para la preparación de un medicamento útil para tratar una paciente deficiente en actividad IL-2.

5. Uso según la reivindicación 3 en el que dicho péptido que consiste en una secuencia SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4 se incluye en una mezcla que comprende una citocina.

6. Uso según la reivindicación 5 en el que la citocina es IL-2, IL-4, IL-9, IL-7 o IL-15.

7. Uso según la reivindicación 6 en el que la cantidad de IL-2, administrada por inyección, es de 1×10^6 unidades internacionales.

8. Uso de un péptido que consiste en la secuencia homóloga de SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4, estando dicho péptido codificado mediante una secuencia de nucleótidos que presenta por lo menos aproximadamente el 75% de los nucleótidos de la secuencia que codifica SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4, difiriendo dicho péptido de SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4 en uno o más cambios conservadores, en el que dicha secuencia homóloga muestra prácticamente la misma actividad o características de fijación o los dos que la secuencia SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4, útil para inducir en un paciente seleccionado actividades de IL-2 útiles, seleccionadas de entre un grupo que consiste en la estimulación de células CD4, estimulación de células CD8+, estimulación de células NK, inducción de actividad antiviral o antitumoral de la fosforilación de SHC e inducción de la vía o ruta SHK/MAPK, para la preparación de un medicamento.

9. Uso de un péptido según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicho cambio conservador es el cambio de grupos R no polares por otros grupos R no polares en aminoácidos del mismo, para la preparación de un medicamento útil para inducir en un paciente seleccionado actividades de IL-2 útiles, seleccionadas de entre un grupo que consiste en la estimulación de células CD4, estimulación de células CD8+, estimulación de células NK, actividad antiviral, actividad antitumoral, inducción de la fosforilación de SHC e inducción de la vía o ruta SHK/MAPK.

10. Uso de un péptido según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicho cambio conservador es el cambio de grupos R polares no cargados por otros grupos R polares no cargados en aminoácidos del mismo, para la preparación de un medicamento útil para inducir en un paciente seleccionado actividades de IL-2 útiles, seleccionadas de entre un grupo que consiste en la estimulación de células CD4, estimulación de células CD8+, estimulación de células NK, actividad antiviral, actividad antitumoral, inducción de la fosforilación de SHC e inducción de la vía o ruta SHK/MAPK.

11. Uso de un péptido según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicho cambio conservador es el cambio de grupos R polares cargados por otros grupos R polares cargados en aminoácidos del mismo, para la preparación de un medicamento útil para inducir en un paciente seleccionado actividades de IL-2 útiles, seleccionadas de entre un grupo que consiste en la estimulación de células CD4, estimulación de células CD8+, estimulación de células NK, actividad antiviral, actividad antitumoral, inducción de la fosforilación de SHC e inducción de la vía o ruta SHK/MAPK.

12. Uso de un péptido según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicho cambio conservador corresponde a una Lys sustituida por Arg, o viceversa de manera que se mantiene una carga positiva, para la preparación de un medicamento útil para inducir en un paciente seleccionado actividades de IL-2 útiles, seleccionadas de entre un grupo que consiste en la estimulación de células CD4, estimulación de células CD8+, estimulación de células NK, actividad antiviral, actividad antitumoral, inducción de la fosforilación de SHC e inducción de la vía o ruta SHK/MAPK.

13. Uso de un péptido según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicho cambio conservador corresponde a un Glu sustituido por Asp, o viceversa de manera que se mantiene una carga negativa, para la preparación de un medicamento útil para inducir en un paciente seleccionado actividades de IL-2 útiles, seleccionadas de entre un grupo que consiste en la estimulación de células CD4, estimulación de células CD8+, estimulación de células NK, actividad antiviral, actividad antitumoral, inducción de la fosforilación de SHC e inducción de la vía o ruta SHK/MAPK.

14. Uso de un péptido según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicho cambio conservador corresponde a una Ser sustituida por Thr, de manera que se mantiene un grupo OH libre, para la preparación de un medicamento útil para inducir en un paciente seleccionado actividades de IL-2 útiles, seleccionadas de entre un grupo que consiste en la estimulación de células CD4, estimulación de células CD8+, estimulación de células NK, actividad antiviral, actividad antitumoral, inducción de la fosforilación de SHC e inducción de la vía o ruta SHK/MAPK.

15. Uso de un péptido según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicho cambio conservador corresponde a una Gln sustituida por Asn, de manera que se mantiene un grupo NH₂ libre, para la preparación de un medicamento útil para inducir en un paciente seleccionado actividades de IL-2 útiles, seleccionadas de entre un grupo que consiste en la estimulación de células CD4, estimulación de células CD8+, estimulación de células NK, actividad antiviral, actividad antitumoral, inducción de la fosforilación de SHC e inducción de la vía o ruta SHK/MAPK.

16. Uso de un péptido que consiste en una secuencia homóloga de SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4, estando dicho péptido codificado mediante una secuencia de nucleótidos que presenta por lo menos aproximadamente el 75% de los nucleótidos de la secuencia que codifica SEC ID NO.:2 o SEC ID NO.:4 y que presenta una actividad que comprende la inducción de la fosforilación de SHC; o la inducción de la vía o ruta SHK/MAPK, para la preparación de un medicamento útil para inducir en un paciente seleccionado actividades de IL-2 antivirales o antitumorales útiles.

17. Uso según las reivindicaciones 8 a 16, en el que dicho péptido se incluye en una mezcla que comprende citocina.

18. Uso según las reivindicaciones 8 a 16, en el que dicho péptido se encuentra en una cantidad capaz de inducir dichas actividades útiles, seleccionadas del grupo que consiste en la estimulación de células CD4, estimulación de células CD8+, estimulación de células NK, actividad antiviral, actividad antitumoral, inducción de la fosforilación de SHC e inducción de la vía o ruta SHK/MAPK.

19. Uso según la reivindicación 17 en el que la citocina es IL-2, IL-4, IL-9, IL-7 o IL-15.

20. Uso según la reivindicación 19 en el que la cantidad de IL-2, administrada por inyección, es de 1 x 10⁶ unidades internacionales.

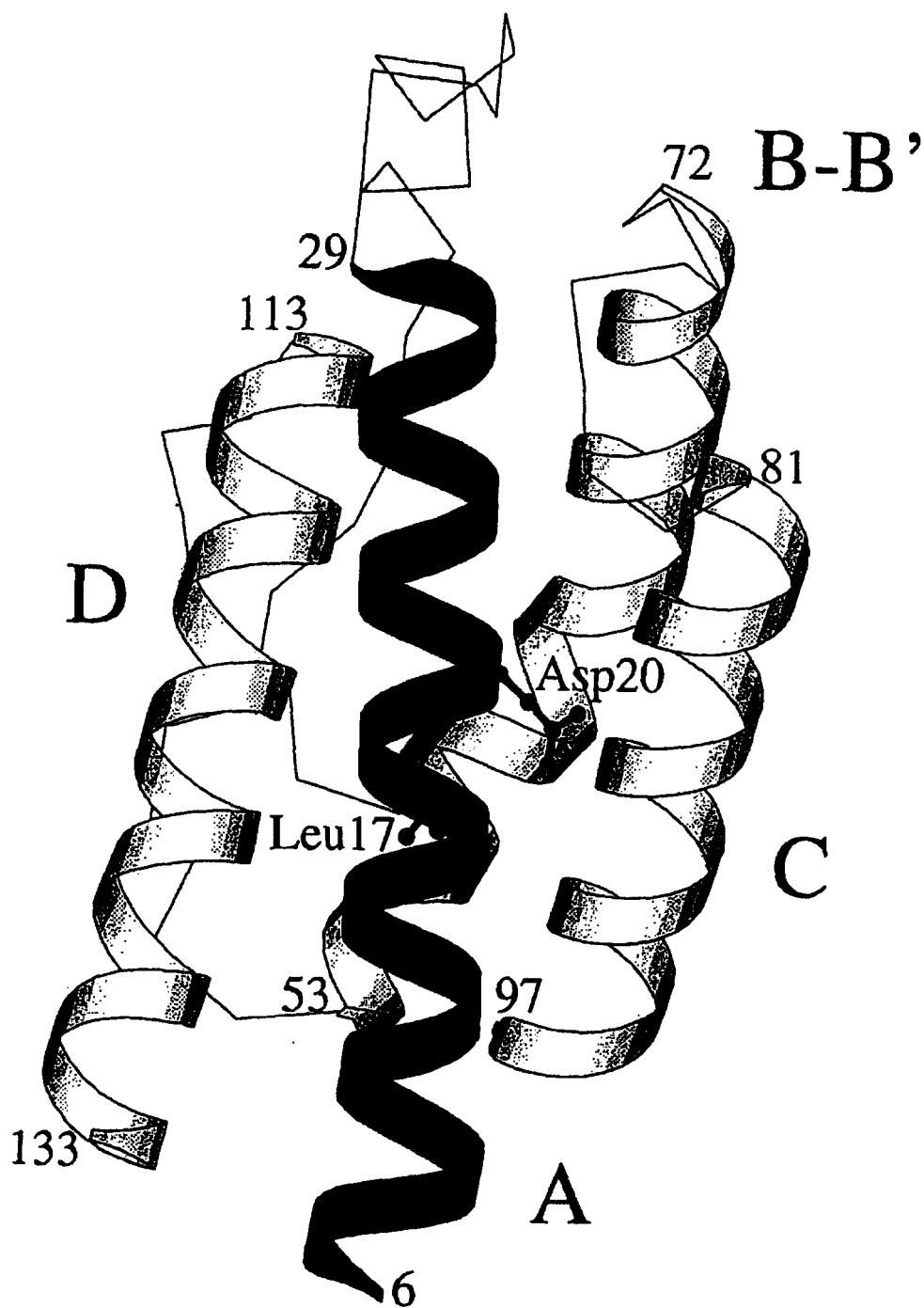


FIGURA 1

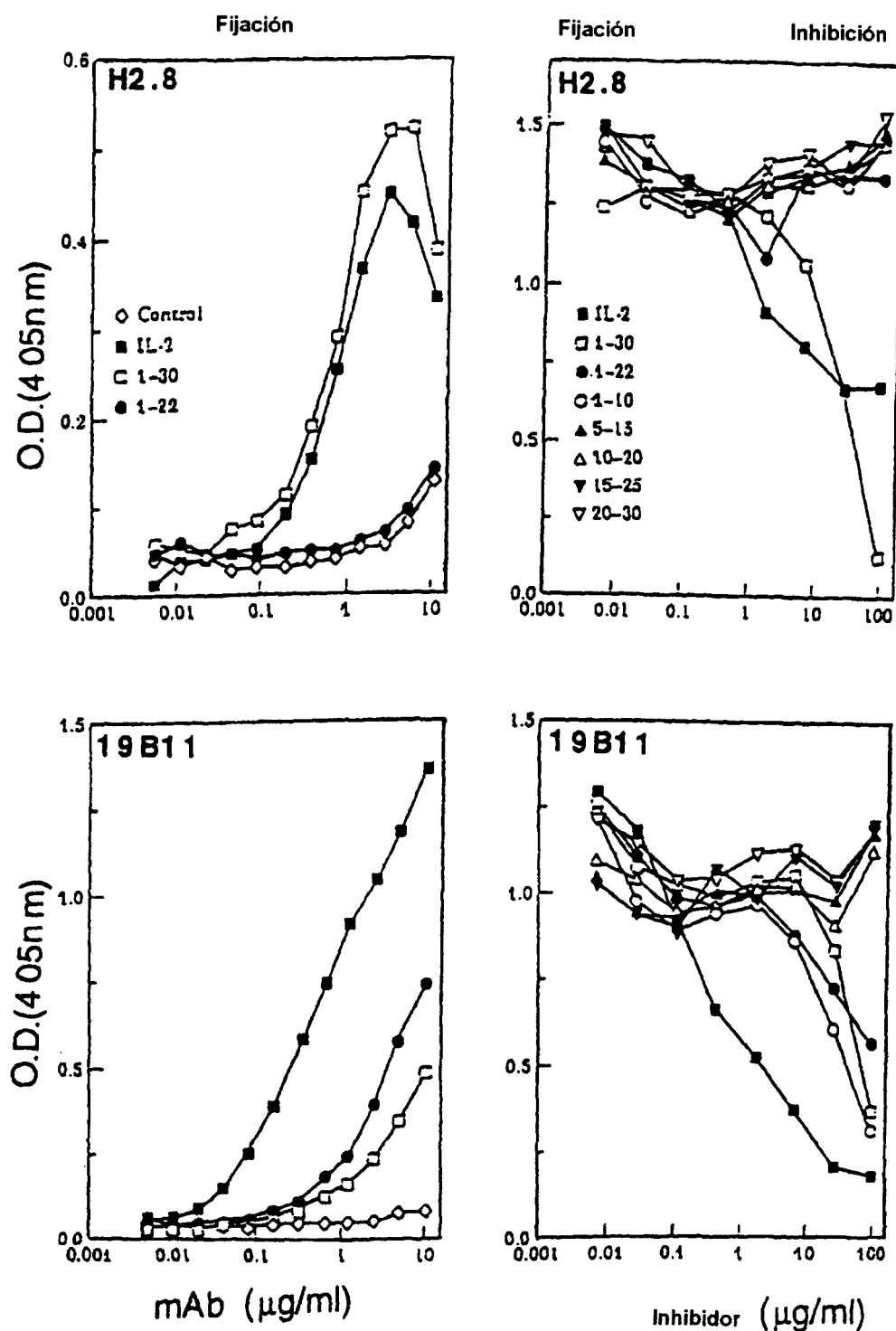


FIGURA 2

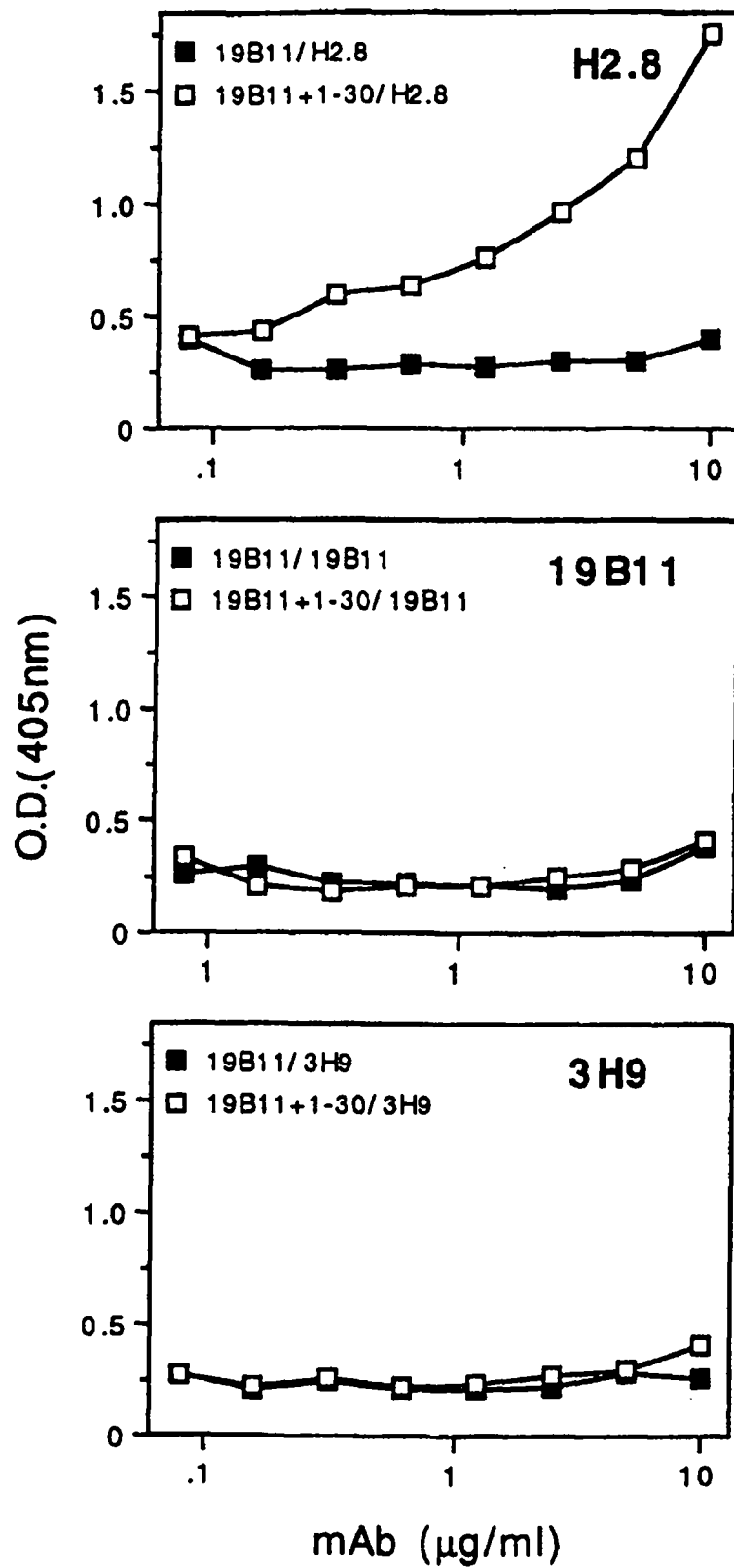


FIGURA 3

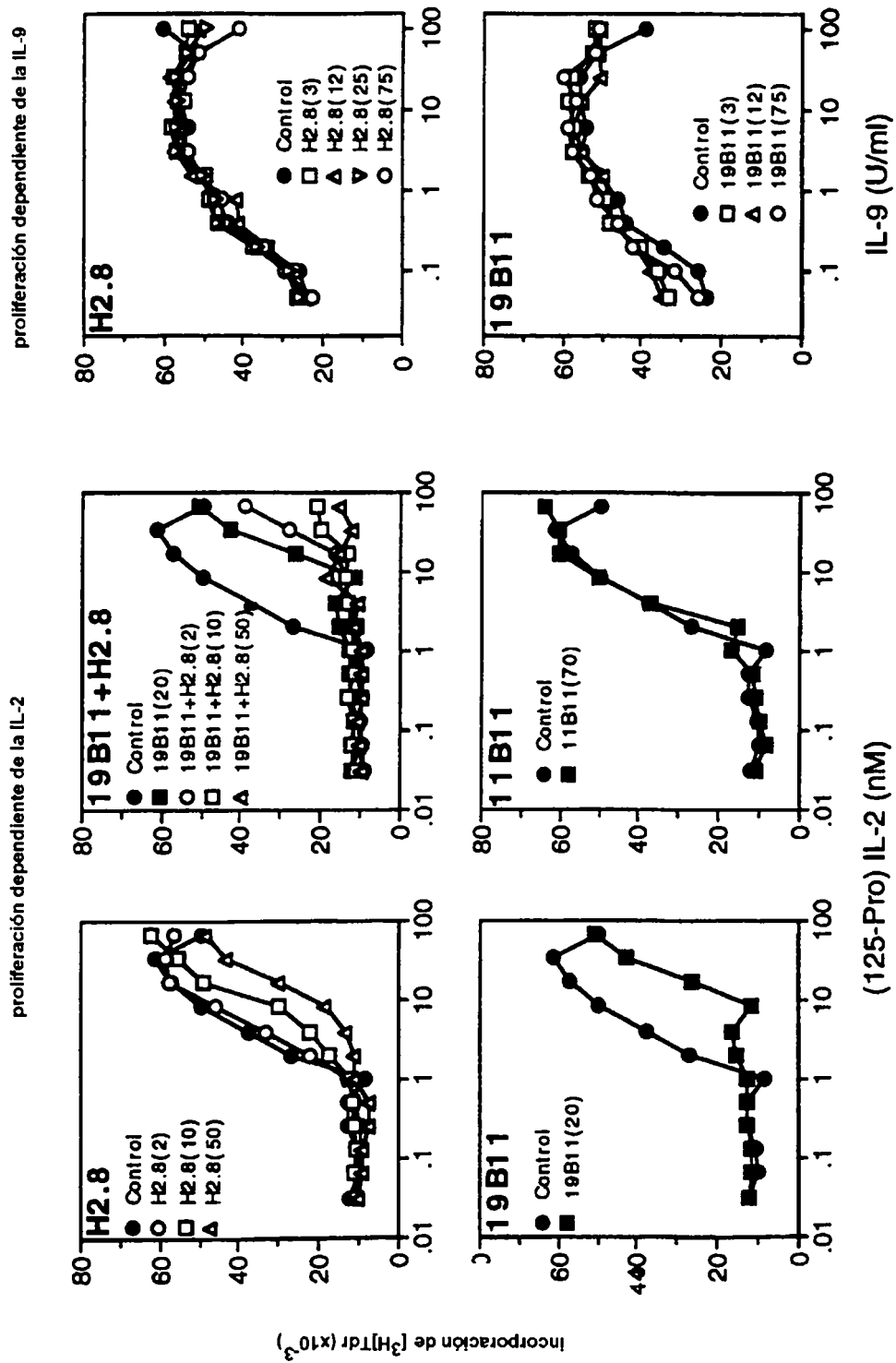


FIGURA 4

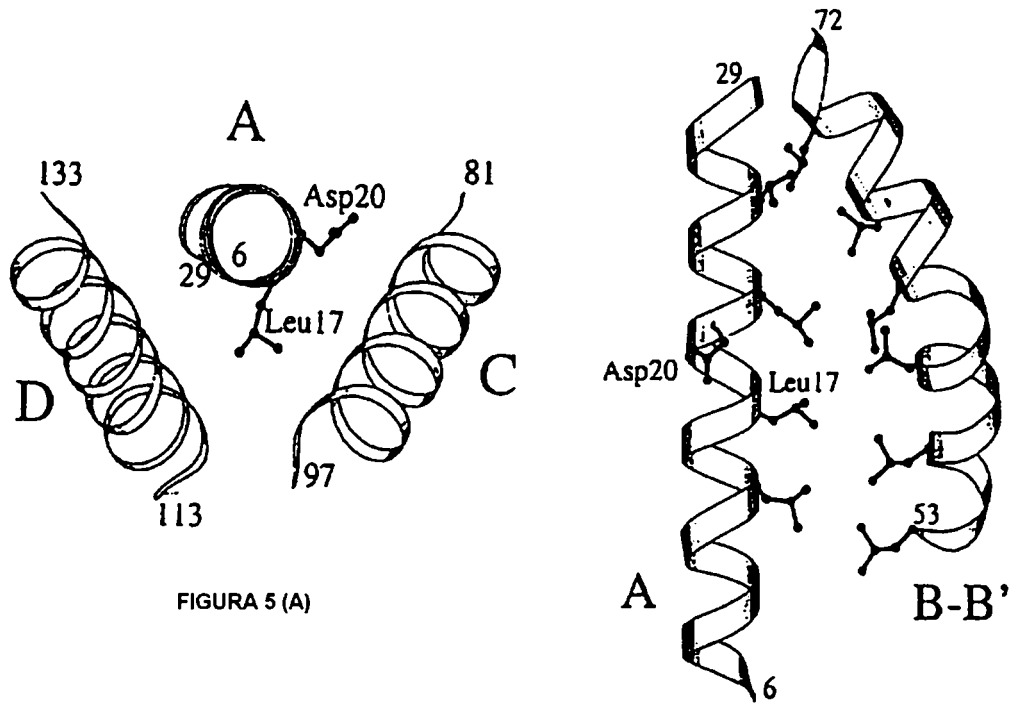


FIGURA 5 (A)

FIGURA 5 (B)

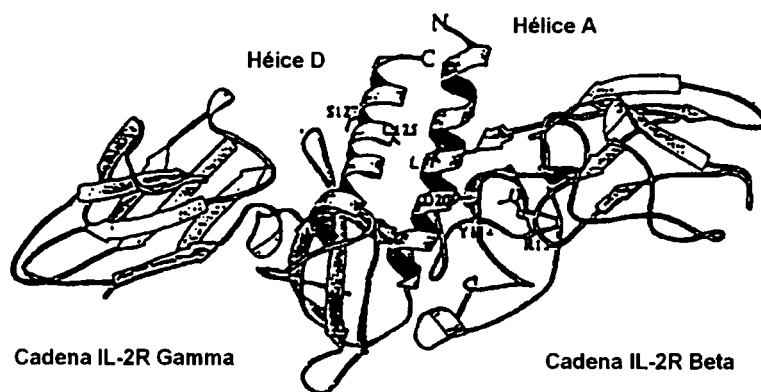
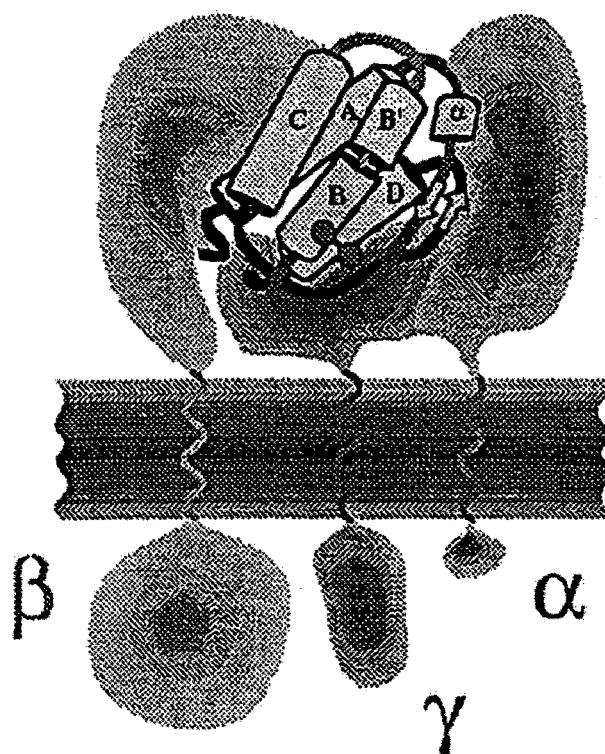


FIGURA 5 (C)

receptor de interleucina-2



SECUENCIA DE IL-2 E IP130 (HÉLICES α ENCUADRADAS)

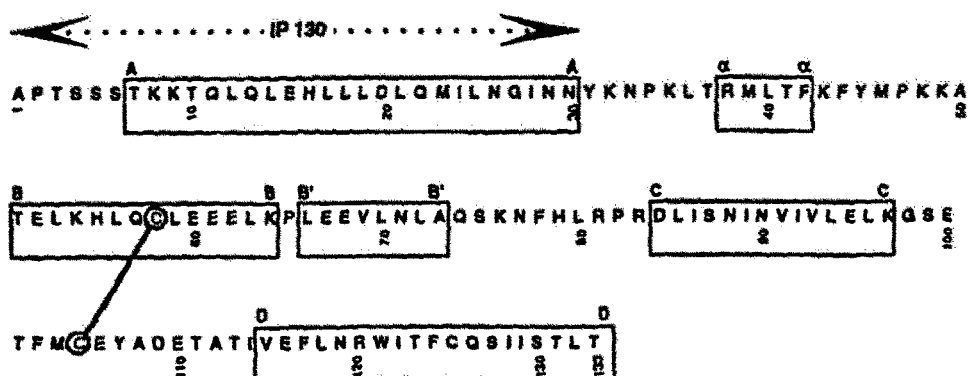


FIGURA 6

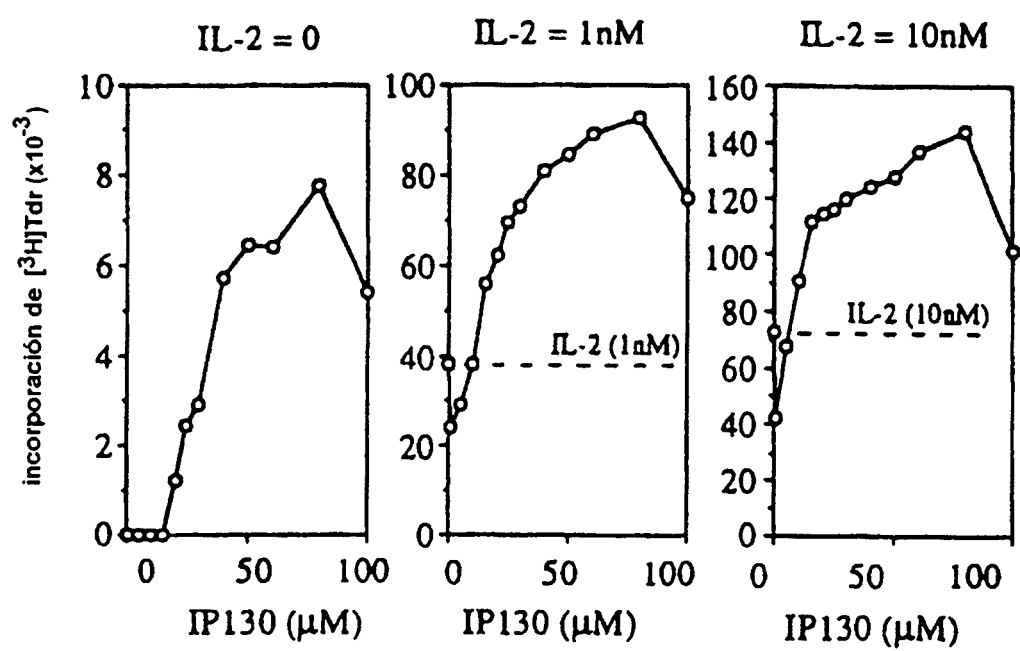


FIGURA 7

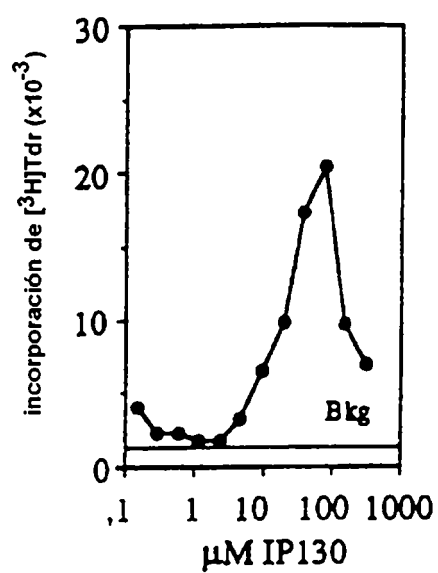


FIGURA 8A

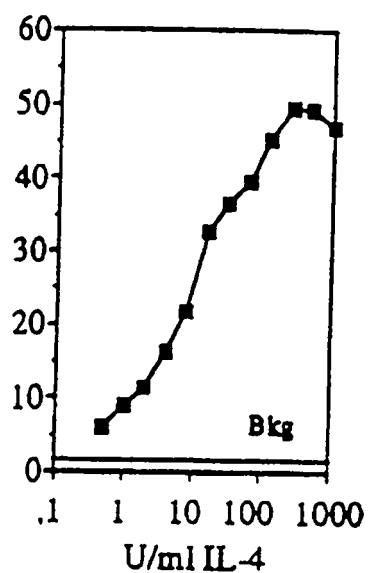


FIGURA 8B

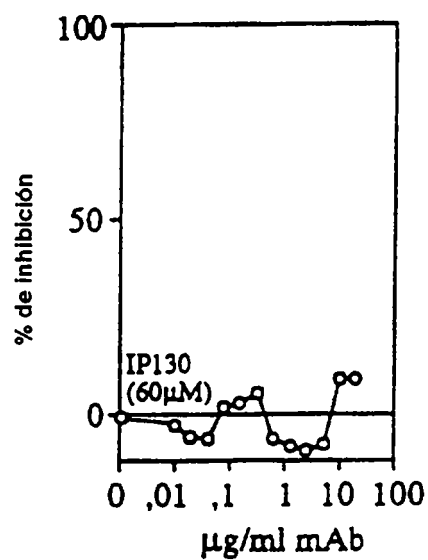


FIGURA 8C

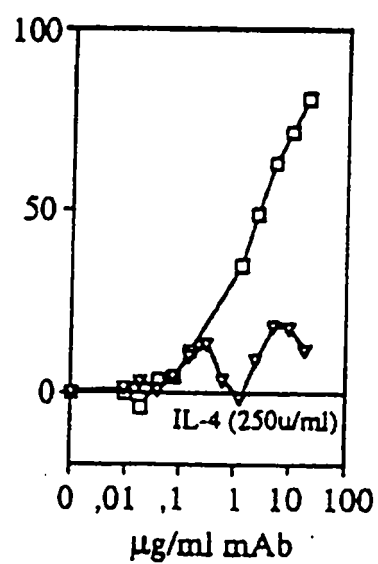


FIGURA 8D

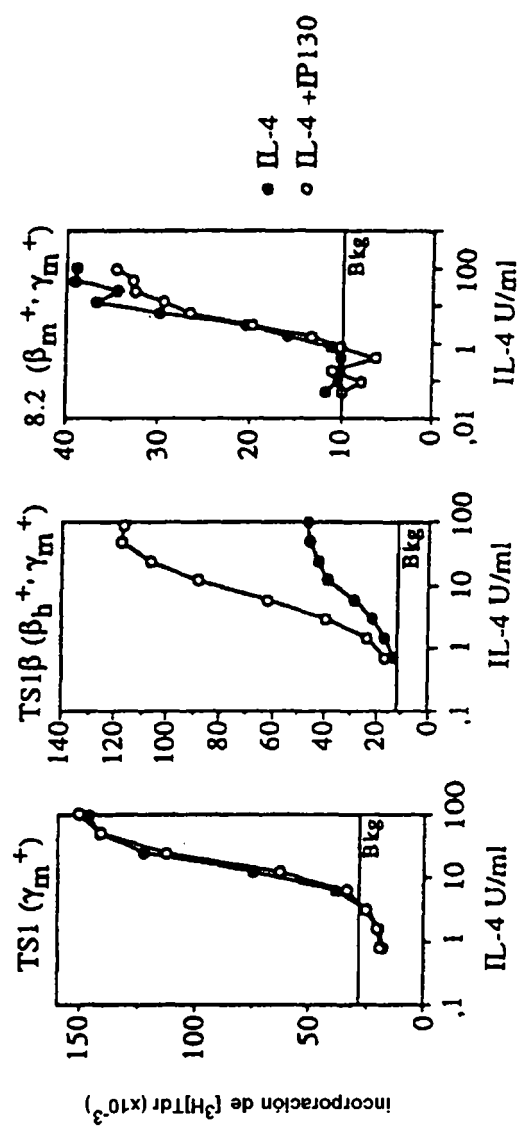


FIGURA 9A

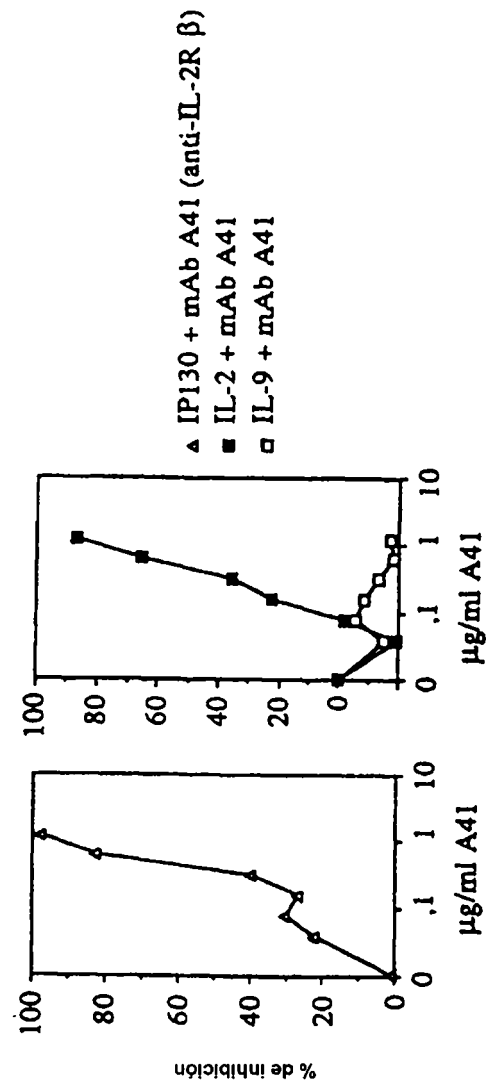
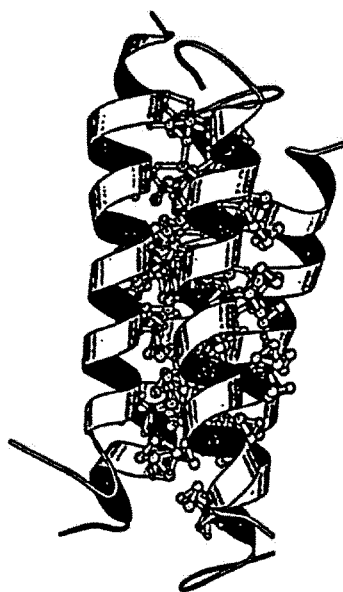


FIGURA 9B

1 10 20 30 A P T T S S T K K T Q L Q L E H I L L D L Q M I L N G I N N		% de hélice (dicroísmo circular)	Especie molecular principal	Actividad
1 30		50% (150 a 30µM) 35% (4µM)	Tetrámero (4M-8M, Kd=30-100µM) /Octámero	++
10 30		22% (150 a 30µM)	Dímero (1M-2M, Kd=0,2µM) /Tretámero (2M-4M, Kd=10µM)	++
1 22		<2%		
1 10		0%	Dímero (1M-2M, Kd=50µM) (2M-4M, Kd=1,4µM)	-
5 15		0%	Dímero (1M-2m, Kd=113µM)	-
10 20		0%	Monómero	ND
20 30		<5%	Monómero	+

FIGURA 10



IP130

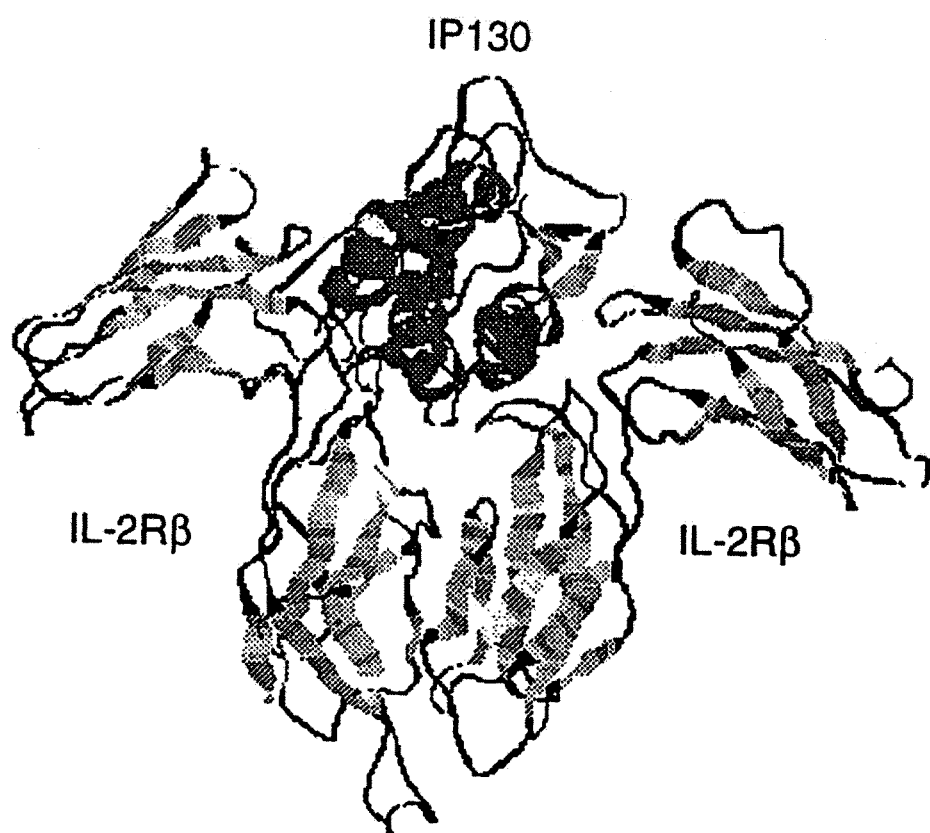
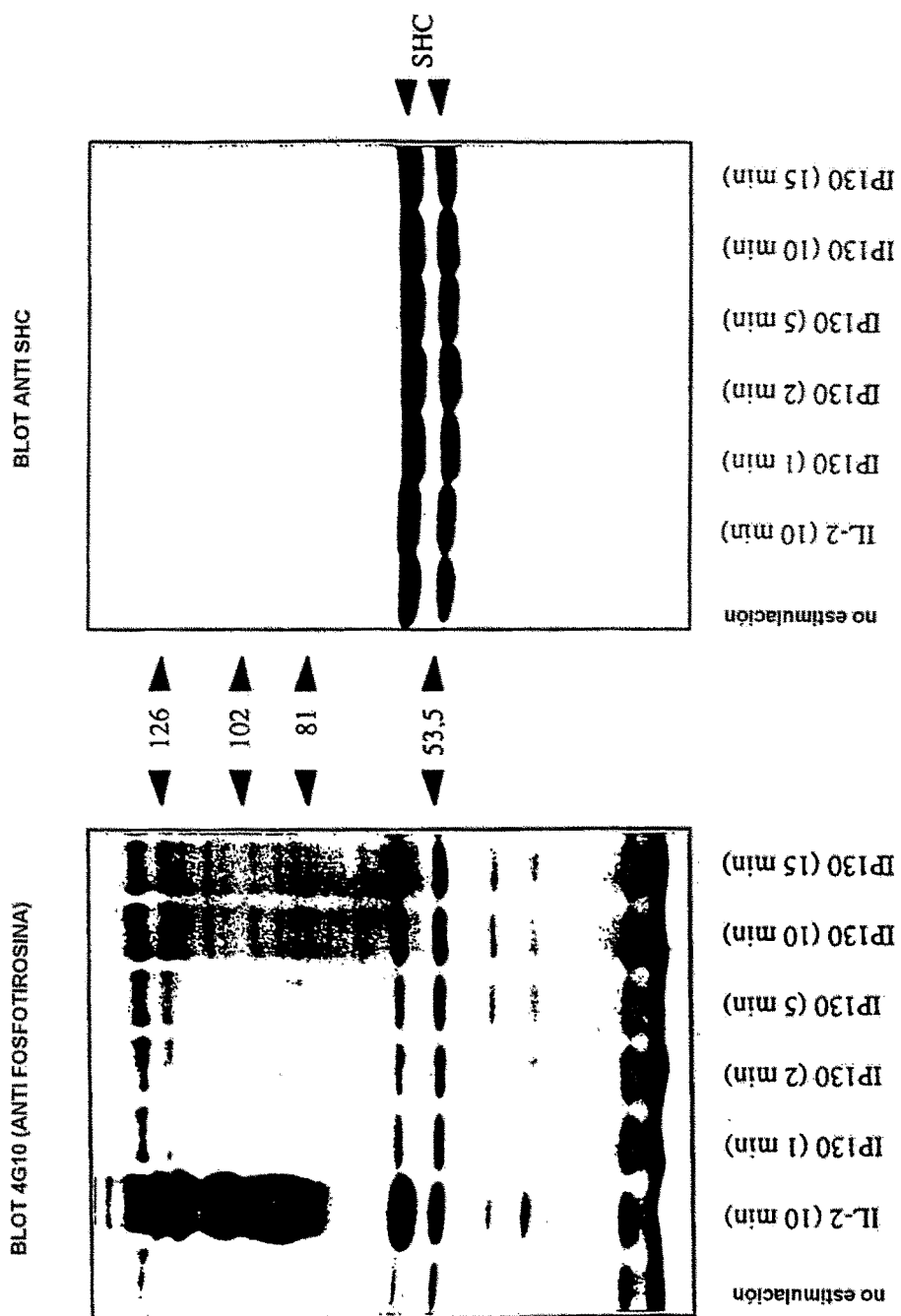


FIGURA 11



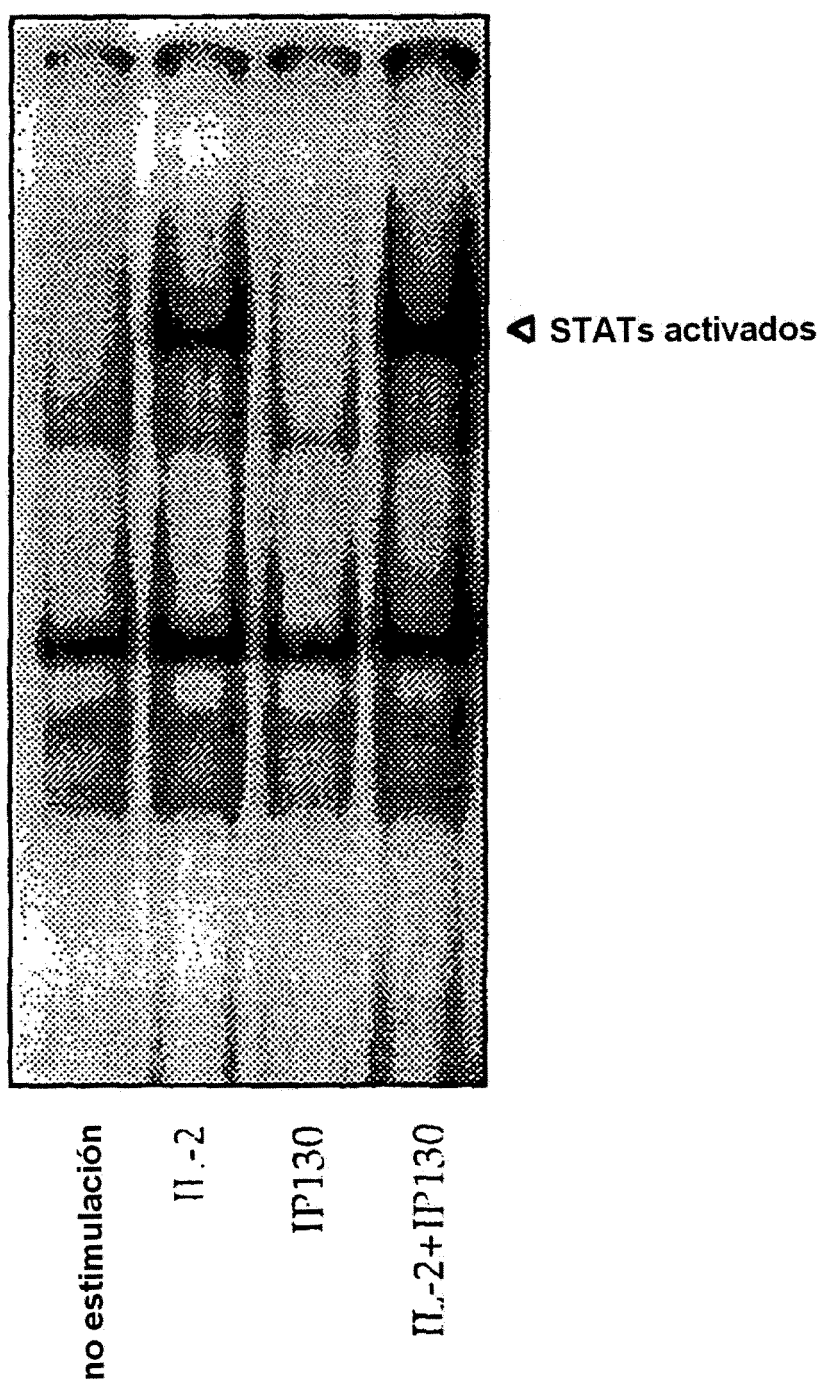
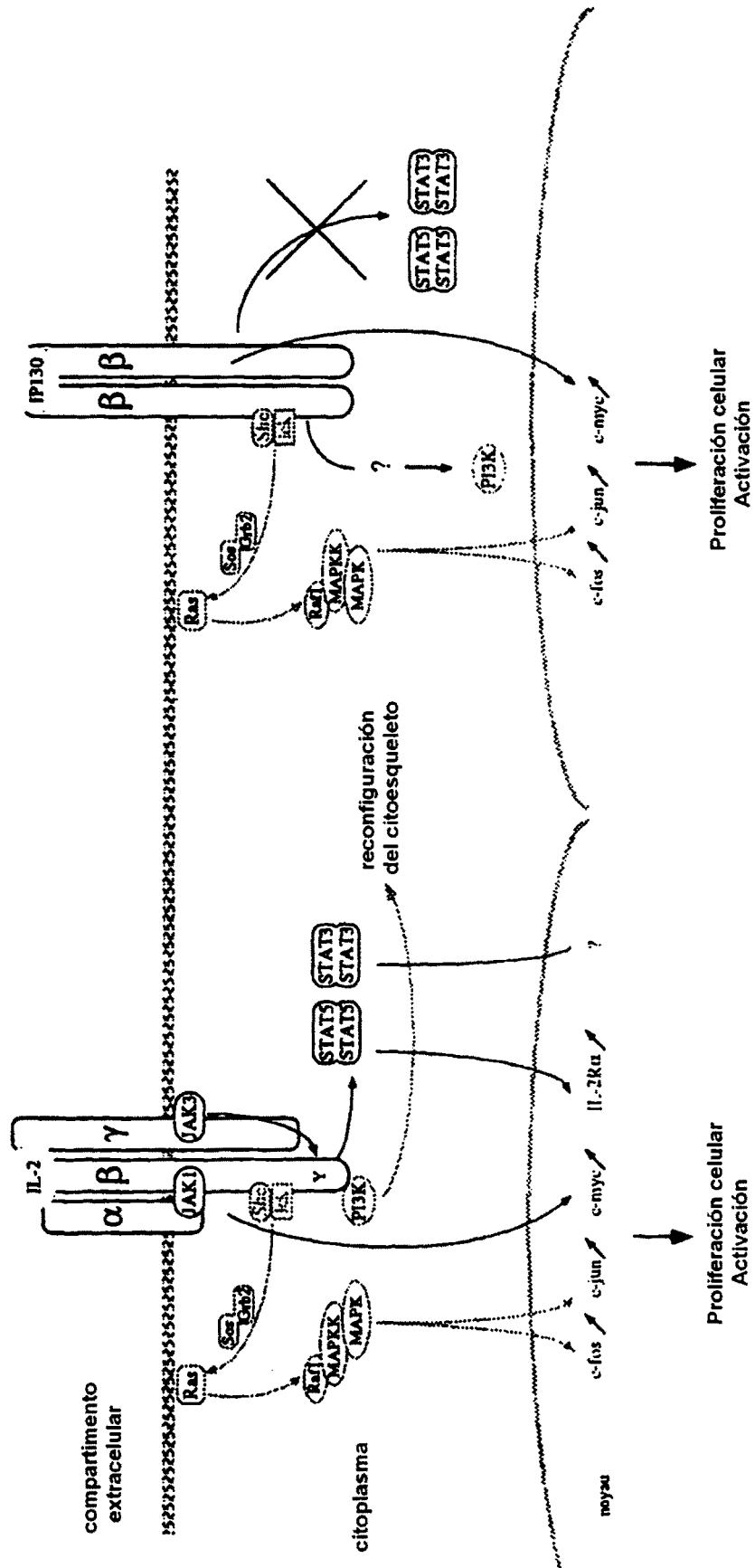


FIGURA 13



Receptor de IL-2 y su principal vía de transducción de señal

Modelo de vía de transducción inducida por IP130

FIGURA 14

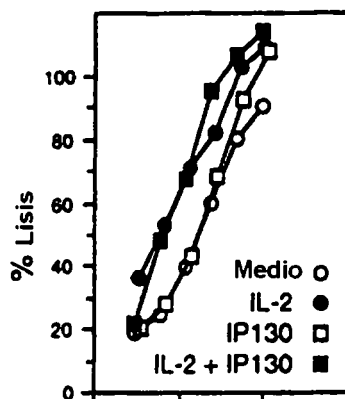
Células NK (CD56-) que entran en las fases S+G2/M tras la estimulación de IP130
(sinergia con IL-2)

Tratamiento			J31	J32	J33
IL-2 50 nM			14	12	14
	IP130	60µM	0	17	≤5
	IP130	120µM	0	14	<5
IL-2 50 nM +	IP130	60µM	26	21	7
IL-2 50 nM +	IP130	120µM	28	28	28

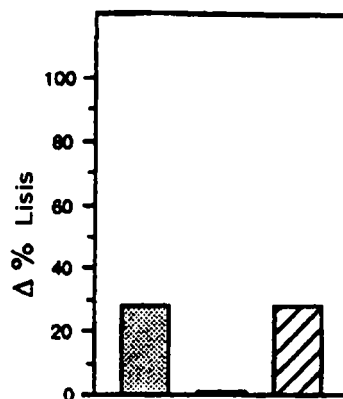
FIGURA 15

Estimulación

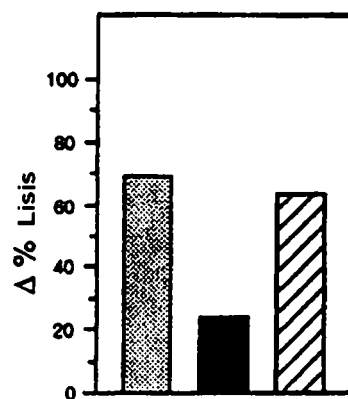
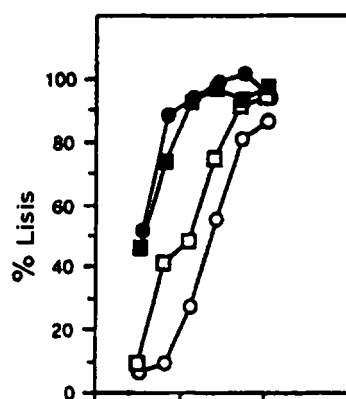
3 días



Efector / diana = 10



6 días



9 días

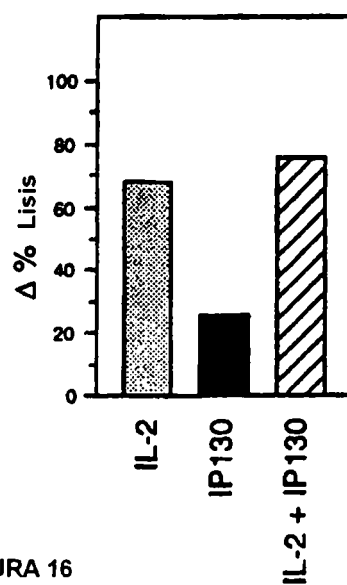
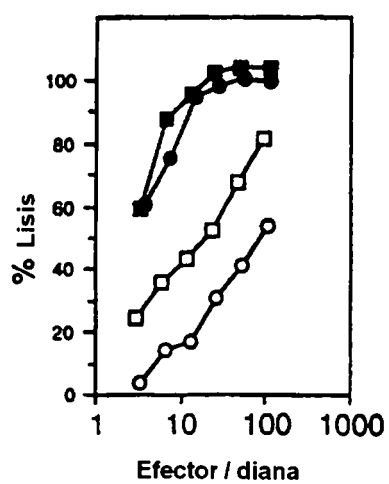


FIGURA 16

ES 2 308 845 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO PASTEUR
THEZE, Jacques
5 ECKENBERG, Ralph
MOREAU, Jean-Louis
GOLDBERG, Michel
ROSE, Thierry
ALZARI, Pedro
10 MAZIE, Jean-Claude

<120> NUEVOS PÉPTIDOS DE IL-2 Y DERIVADOS DE LOS MISMOS Y SU UTILIZACIÓN COMO AGENTES
TERAPÉUTICOS

15 <130> BLOcb226/79PCT
<140>
<141>
<150> 09/116,594
20 <151> 1999-07-16
<160> 4
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
25 <211> 93
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 1

atggctccga cgagcagctc caccaagaaa acccagctcc agctcgaaca cctgctgctg 60
35 **gacctgcaga tgatcctgaa cggtatcaac aac 93**

<210> 2
<211> 31
40 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2
45

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn
50 **20 25 30**

<210> 3
55 <211> 90
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 3

gctccgacga gcagctccac caagaaaacc cagctccagc tcgaacacct gctgctggac 60
ctgcagatga tcctgaacgg tatcaacaac 90

65 <210> 4
<211> 30

ES 2 308 845 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 4

	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
	1				5					10					15	
10	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn		
				20					25					30		

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65