



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 981**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 14/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03757652 .7**  
96 Fecha de presentación : **08.10.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1550457**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Composición de vacuna que comprende interleucina-15 (IL-15).**

30 Prioridad: **09.10.2002 CU 218/02**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.05.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.05.2009**

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

72 Inventor/es: **Santos Savio, Alicia;**  
**Silva Rodríguez, Ricardo;**  
**Morera Díaz, Yanelis;**  
**Rodríguez Alfonso, Armando, Alexei;**  
**Martínez Castillo, José, Rafael;**  
**Gerónimo Pérez, Haydee;**  
**Moro Soria, Alejandro y**  
**Perea Rodríguez, Silvio, Ernesto**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 319 981 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).

## ES 2 319 981 T3

### DESCRIPCIÓN

Composición de vacuna que comprende interleucina-15 (IL-15).

5 Esta invención se refiere a la rama de la inmunología, en particular a una nueva IL-15 para inmunización activa y al tratamiento de enfermedades relacionadas con la hiperexpresión de IL-15.

10 Esta citocina conocida como IL-15 es una glicoproteína de 14-15 KDa que fue descrita simultáneamente por dos grupos como un factor de crecimiento que activa células T (Grabstein, K.H. y otros, Science 1994, 264, 965; Burton, J.D. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 4935). El ARNm de IL-15 ARNm está ampliamente presente en células y tejidos, aunque es difícil encontrar la proteína en estos tejidos o en el material sobrenadante de las células debido a un fuerte control postranscripcional de su expresión al nivel translacional y el tráfico intracelular (Bamford RN y otros, J. Immunol 1998, 160: 4418-4426), (Kury G. y otros, J. Biol. Chem. 2000, 275: 30653-30659).

15 Los efectos biológicos de IL-15 se median a través de su unión a un receptor de membrana celular compuesto por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . IL-15R $\alpha$  es una subunidad específica para esta citosina a la que está unida con una afinidad muy alta, Kd  $10^{-11}$ ; la subunidad  $\beta$  es compartida con IL-2 y la subunidad  $\gamma$  es un receptor común para varias citocinas, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 (Bamford RN y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 4935). (Giri JG y otros, EMBO J, 1995, 14; 3654-3663).

20 La IL-15 es una citocina inmunoestimuladora que promueve la proliferación y la actividad funcional de células T, B y NK (Giri, J.G., EMBO J. 1994, 13, 2822-2830), activa neutrófilos y modifica la secreción de monocinas (Girard, D., 1996, Blood, 88, 3176; Alleva D.G., 1997, J. Immunol., 159, 2941). Esta citocina media diferentes efectos en varias etapas de la respuesta inmune, induce la proliferación de células CD56 NK y actúa, junto con la IL-12, induciendo IFN $\gamma$  TNF $\alpha$  (Ross ME, 1997, Blood 89, 910-918; Fehniger TA 1999, Transplant Proc. 31, 1476-1478).

30 La unión del ligando al receptor de células T induce la expresión de IL-15R $\alpha$  y la expresión de varios antígenos de activación tales como CD69, CD25 y TNFR $\text{II}$ . También, IL-15 es un quimioatractivo para linfocitos T de sangre humana (Wilkinson 1995, J. Exp. Med. 181, 1255-1259). Todos estos datos sugieren que la IL-15 expresada por células que presentan antígenos podría ser importante en la activación precoz de células T en el sitio de la inflamación.

35 Se ha detectado IL-15 en el transcurso de diferentes enfermedades, incluidas la enfermedad de Crohn (Kirman I., 1996, Am. J. Gastroenterol. 91, 1789), psoriasis (Ruckert R., 2000, 165:2240-2250), leucemia (Yamada Y. 1999, Leukemia and Lymphoma 35(1-2): 37-45) y artritis reumatoide (AR) (McInnes I.B. 1998, Immunology Today, 19, 75-79).

40 Feldmann y otros, (1996, Annu Rv Immunol. 14:397-440) propusieron TNF $\alpha$  como la citocina principal en una cascada de citocinas que incluye IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF y varias citocinas inflamatorias como Mip 1 $\alpha$ , Mip 1 $\beta$  e IL-8, que están íntimamente relacionadas con el desarrollo y progresión de la artritis reumatoide (AR). McInnes y otros encontraron anomalías de expresión de IL-15 en esta enfermedad, una concentración alta de IL-15 en el fluido sinovial y su expresión en células de membranas sinoviales. Sugirieron que IL-15 precede a TNF $\alpha$  en la cascada de citocinas, proponiendo un mecanismo dependiente del contacto celular en el que células T activadas por IL-15 inducen la síntesis de TNF $\alpha$  por macrófagos. Además, se ha propuesto que IL-15 actúa como factor importante en la migración de células T al fluido sinovial (McInnes, 1997, Nat Med. 3:189-195).

45 Ziolkowska y otros han dado cuenta de que IL-15 induce la expresión de L-17 en articulaciones de pacientes de AR; se conoce ya que esta citosina estimula la liberación por sinoviocitos de varios mediadores inflamatorios tales como IL-6, IL-8, GM-CSF y prostaglandina E2, sugiriendo un papel importante para IL-15 en la patogénesis de AR (Ziolkowska y otros 2000, J. Immunol. 164:2832-2838).

50 El reclutamiento y la activación de células T se pueden producir como consecuencia de la síntesis local de IL-15 y tal activación no específica podría dar por resultado una inflamación interminable. Todo esto sugiere que la inhibición de IL-15 podría tener un potencial terapéutico en el tratamiento de la enfermedad.

55 El uso de moléculas antagonistas de IL-15 ha revelado ser eficaz en modelos animales. Ruchatz y otros generaron un fragmento soluble de la subunidad alfa del receptor de murino (IL-15 R $\alpha$ ) y han demostrado que este fragmento inhibía la artritis inducida en el colágeno cuando se administró a ratones DBA/1 (Ruchatz H, 1998, J. Immunol. 160:5654-5660).

60 El documento WO 00/02582 describe el uso de antagonistas de IL-15 para tratar enfermedades inflamatorias del intestino tales como la enfermedad celiaca.

65 Se han patentado otras moléculas antagonistas de IL-15, incluida IL-15 mutada en uno o varios restos de aminoácido y anticuerpos monoclonales capaces de unir IL-15 madura y prevenir transducción de señales a través de su receptor (Patentes U.S. n.º. 6001973, n.º. 6177079, n.º. 6168783 y n.º. 6013480.). Aunque su uso se describe en la documentación de las patentes antes mencionadas, hay bastante pocos resultados publicados en revistas científicas que avalen su eficacia. En mayo de 2002, Genmab Company reveló estudios clínicos en fase I/II con un anticuerpo contra

## ES 2 319 981 T3

IL-15 patentado por Immunex, que debe corresponder a la patente U.S. n°. 6177079 a la que se ha hecho referencia antes, pero estos resultados todavía no han sido publicados.

5 Se han hecho otros estudios con la proteína quimérica MutIL 15-.Fc que se une a células que presentan el receptor de IL-15, que conduce a un número reducido de células inmunes activadas por debajo de un nivel crítico e induce tolerancia, por ejemplo, células T activadas autorreactivas con un papel clave en el rechazo alógeno son sensibles a IL-15 y se ha demostrado que pueden inhibirse usando proteína MutIL 15-Fc, que actúa como un antagonista de IL-15.

10 Hay unos pocos ejemplos en la bibliografía de vacunas para generar anticuerpos contra moléculas autólogas, por ejemplo, una vacuna contra EGF para el tratamiento de tumores EGF-dependientes (patente U.S. n°. 5894018); su eficacia ha sido demostrada en ensayos químicos por provocar anticuerpos que bloquean la actividad de EGF. La generación de anticuerpos neutralizantes contra proteínas autólogas es muy compleja debido a los mecanismos naturales para autolocalizarse.

15 En la presente invención, la inmunización activa con IL-15 en una formulación apropiada para generar autoanticuerpos neutralizantes contra IL-15 posibilita la neutralización de cantidades anómalas de esta citocina encontradas en pacientes con enfermedades autoinmunes y leucemia.

20 En la presente invención, se hace una inmunización activa que permite la generación de autoanticuerpos neutralizantes de IL-15, estando regulados los niveles de IL-15 mediante un esquema de inmunización.

### Descripción detallada de la invención

25 La esencia y la novedad de la presente invención están en la composición de la vacuna usando IL-15 humana recombinante producida en *E. coli* para inmunización activa con el fin de tratar enfermedades relacionadas con la hiperexpresión de IL-15.

30 Esta composición de vacuna se usará en seres humanos para provocar una respuesta neutralizante de anticuerpos contra IL-15 autóloga.

Esta invención incluye también IL-15 fusionada a una proteína portadora así como cualquier otra formulación que la comprenda.

35 La invención contempla también el uso de la vacuna sola o concurrentemente con fármacos antiinflamatorios u otros antagonistas de citocinas.

40 De acuerdo con la invención, IL-15 es una proteína recombinante obtenida en *E. coli*, por lo que su configuración de glicosilación es diferente de la de la IL-15 autóloga. En algunas realizaciones de la invención, IL-15 es una proteína activa con una actividad específica de  $(2-5) \times 10^6$  U/mg de acuerdo con el ensayo CTLL2.

El gen de IL-15 de la invención se aisló de monocitos activados por LPS y clonados en un vector de expresión de *E. coli* y purificados de esta fuente.

45 Se determinó la actividad biológica de la proteína por inducción de la proliferación de células T en el ensayo CTLL2.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de esta invención, se obtuvo la proteína de fusión p64kIL-15 diseñando oligonucleótidos que permiten la amplificación por PCR e inserción de este gen que codifica la proteína p64k en un vector de expresión de *E. coli* que contiene el gen que codifica la proteína p64k. La proteína de IL-15 se fusionó a la región C-terminal de la proteína portadora p64k y se purificó de esta fuente. La actividad biológica de la proteína se determinó por inducción de la proliferación de células T en el ensayo CTLL2.

55 El concepto probatorio mostrado en esta invención se demostró usando monos *macacus irus* como modelo; su IL-15 tiene una homología de 96,4% con la IL-15 humana.

60 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan resultados que demuestran que una inmunización activa con IL-15 o la proteína de fusión p64kIL-15 generaba una respuesta de anticuerpo específica para IL-15 y anticuerpos neutralizantes en suero de animales inmunizados.

La vacuna descrita se puede administrar concurrentemente con agentes antiinflamatorios o inmunosupresores u otros antagonistas de citocinas usadas para tratar AR.

### Breve descripción de los dibujos

65 Figura 1: Pureza de IL-15.

Figura 2: Pureza de la proteína de fusión.

## ES 2 319 981 T3

Figura 3: Resultados de un ensayo ELISA que revela niveles de anticuerpos anti-IL-15 en monos.

Figura 4: Determinación de anticuerpos neutralizantes de IL-15 en suero de monos.

5 Los ejemplos siguientes se presentan para ilustrar realizaciones de la presente invención.

### Ejemplo 1

#### *Obtención de IL-15 recombinante*

10 Se aisló ADN de IL-15 humano por RT-PCR de monocitos LPS-activados y clonados en un vector de expresión de *E. coli*.

15 Se extrajo IL-15 recombinante expresada en *E. coli* a partir de pélet celular con urea 8M y se purificó por cromatografía en TSK G4000SW (Merck) y seguidamente por cromatografía en RP-C4 (J.T. Baker) en agua/acetonitrilo, sistema tampón de TFA. La actividad biológica se midió por estimulación de la proliferación de la línea de células CTLL-2 usando tinción mitocondrial con MTT (Cosman y otros, 1984, Nature, 312:768-771). La actividad específica de IL-15 es de  $2 \times 10^6$  U/mg (Fig. 1).

#### *Obtención de la proteína de fusión recombinante p64k-IL 15*

20 La proteína de fusión p64k-IL 15 se obtuvo diseñando cebadores de oligonucleótidos que amplificaran genes de IL-15 por PCR e insertándolos en el término p64k c en un vector de expresión de *E. coli*. (Fig. 2).

25 La proteína es soluble después de rotura celular en una prensa French.

30 Se añade sulfato de estreptomycin hasta 0,8% al material sobrenadante de la rotura, que se mantiene a 4°C durante 1 hora, se centrifuga a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. Se realizan dos etapas de precipitación con sulfato amónico y el pelet se pone en suspensión en Tris 20 mM, EDTA 6 mM, urea 2 M, 0,5 mg/ml de pefabloc y se purifica por cromatografía de intercambio iónico en TSK DEAE PW y filtración en gel en Superdex 200.

### Ejemplo 2

#### *Modelo de evaluación en monos macacus irus*

35 Se evaluaron tres grupos en un esquema de inmunización de monos, inmunizados con IL-15, inmunizados con la proteína de fusión y placebo. Las proteínas se administraron en cantidades de 100  $\mu$ g por inoculación en coadyuvante de Freund. La primera inmunización se hizo con coadyuvante de Freund y coadyuvante de Freund completo, la segunda inmunización con coadyuvante de Freund incompleto un mes más tarde y la tercera inmunización con coadyuvante de Freund incompleto dos meses después. Una semana después de la segunda y tercera inmunización se extrajo sangre para evaluar el nivel de anticuerpos de IL-15 en el suero de los monos. Los datos se presentan en la Fig. 3

### Ejemplo 3

#### *Determinación de anticuerpos neutralizantes en suero de monos*

45 La línea celular CTLL-2 citocina-dependiente prolifera en presencia de IL-15. Moléculas unidas a IL-15 alterando la transducción de señal que depende del receptor inhibirían la proliferación de esta línea.

50 Para evaluar la capacidad neutralizante de anticuerpos presentes en suero de mono, se hicieron diluciones seriales en placas de 96 pocillos (Costar, USA) en un volumen de 50  $\mu$ l de medio RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco). A cada pocillo se añadió una cantidad subóptima de IL-15 (30 pg) y células CTLL-2 previamente lavadas se añadieron a razón de  $5 \times 10^3$  células/pocillo. La placa se incubó durante 48 horas en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Para medir la proliferación se usó tinción mitocondrial con MTT (Cosman y otros, 1984, Nature, 312:768-771).

55 En los resultados de la Fig. 3 se observa que la inhibición de IL-15 mediada por anticuerpos indujo proliferación.

### **Ventajas de la invención**

60 - Los niveles de anticuerpos generados son más estables en el transcurso del tiempo que los anticuerpos obtenidos por una inmunización pasiva.

- Menor frecuencia de administración de las dosis a los pacientes en comparación con la inmunización pasiva.

65 - La cantidad de proteína y la cantidad de dosis requeridas son totalmente inferiores a las del tratamiento con moléculas antagonistas de IL-15, lo que implica menores costes de producción.

# ES 2 319 981 T3

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende IL-15 humana recombinante producida en *E. coli* como antígeno.

5 2. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la IL-15 humana está fusionada a una proteína portadora.

3. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la proteína portadora es p64k.

10 4. Uso de IL-15 humana recombinante producida en *E. coli* para la fabricación de una composición de vacuna para generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra IL-15 autóloga.

15 5. Uso de IL-15 humana recombinante producida en *E. coli* para la fabricación de una composición de vacuna para el tratamiento de una enfermedad relacionada con la hiperexpresión de IL-15.

6. Uso de IL-15 humana recombinante producida en *E. coli* para la fabricación de una composición de vacuna para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

20 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, enfermedad de Crohn o psoriasis.

8. Uso de IL-15 humana recombinante producida en *E. coli* para la fabricación de una composición de vacuna para el tratamiento de leucemia relacionada con IL-15 como factor de crecimiento.

25 9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en el que se usa IL-15 humana recombinante producida en *E. coli* concurrentemente con fármacos antiinflamatorios o antagonistas de otras citocinas.

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig 1

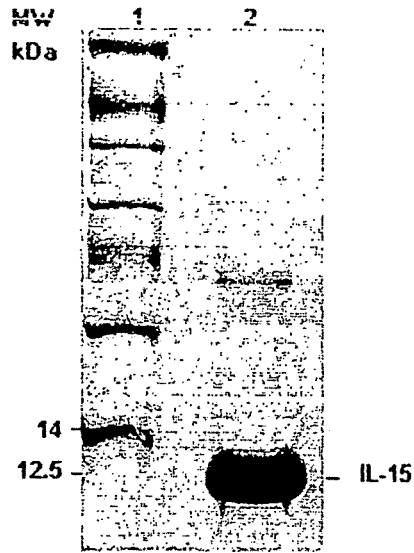


Fig 2

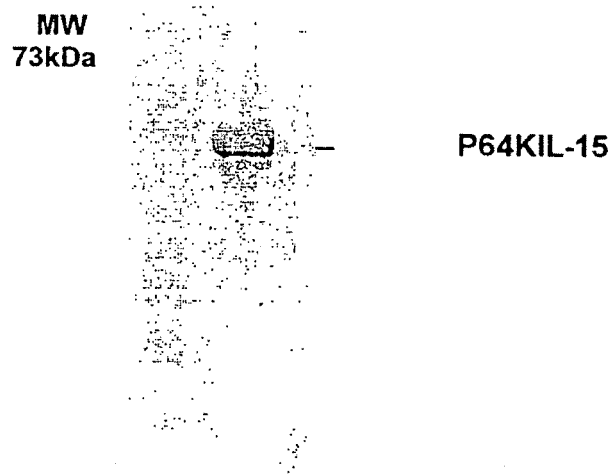


Fig 3

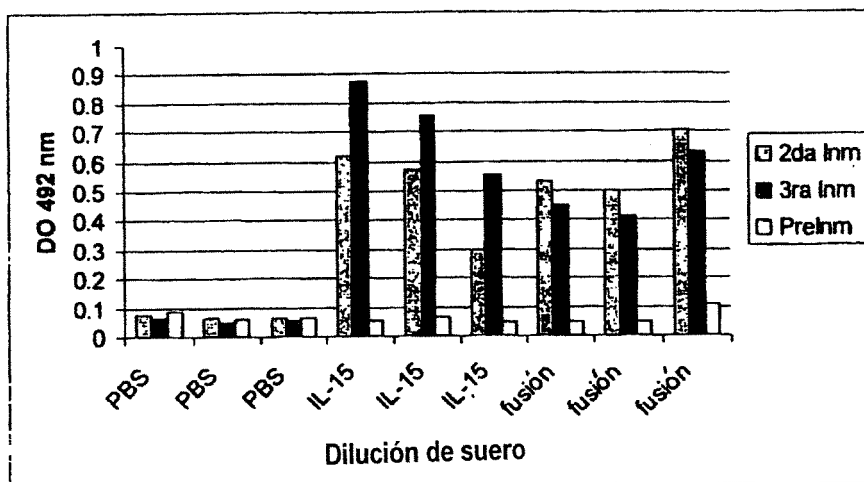


Fig 4

