

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 046**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/21** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 37/08** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2016 PCT/GB2016/052841**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046583**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2016 E 16770972 (4)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2024 EP 3349783**

54 Título: **Composiciones y métodos relacionados con el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

**15.09.2015 GB 201516303**  
**16.09.2015 GB 201516437**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.06.2024**

73 Titular/es:

**ILC THERAPEUTICS LTD (100.0%)**  
**Biocity Scotland, Bo'ness Road**  
**Newhouse, Lanarkshire ML1 5UH, GB**

72 Inventor/es:

**STIMSON, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 971 046 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

Composiciones y métodos relacionados con el tratamiento de enfermedades

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para promover la inducción de una respuesta inmunitaria mediada por células (tal como la mediada por células Th1) y la supresión de una respuesta inmunitaria humoral o alérgica (tal como la mediada por células Th2 y Th17). En particular, la invención se refiere a composiciones y métodos para prevenir o tratar la alergia, tal como alergia alimentaria, y enfermedades alérgicas asociadas, y condiciones donde una respuesta exagerada de Th17 juega un papel nocivo, tal como respuestas inflamatorias y enfermedades autoinmunes. La invención se extiende además al uso de las composiciones de la invención en el tratamiento y/o  
10 profilaxis de alergia y enfermedades alérgicas asociadas y también del cáncer.

**Antecedentes de la invención**

Se hipotetiza que en ciertas circunstancias, la respuesta de Th1 o la respuesta de Th2/Th17 puede provocar enfermedad. Una respuesta de Th1 exagerada puede generar una enfermedad autoinmune específica de un órgano tal como artritis, esclerosis múltiple, o diabetes tipo I, mientras que una respuesta exagerada de Th2/Th17 puede ser  
15 la base de alergia y atrofia. Actualmente se cree que las células Th17 juegan un papel principal en la defensa del huésped frente a patógenos y una respuesta exagerada de Th17 puede llevar a respuestas inflamatorias graves y enfermedades autoinmunes – enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), específicamente, colitis ulcerosa (UC) y enfermedad de Crohn (CD), son procesos inflamatorios crónicos del tracto gastrointestinal. En estas enfermedades una respuesta inmunitaria afectada y exagerada, principalmente hacia la microflora endógena, juega un papel principal. La expresión de IL-17 está aumentada tanto en UC como en CD. Los IFN tipo I se han estudiado en ensayos clínicos en pacientes con UC y han demostrado eficacia en estudios seleccionados. Como citoquinas antivirales, se sabe ahora que los IFN tipo I pueden regular el desarrollo de las células Th17.

Se sabe que diferentes patógenos inducen diferentes subtipos de IFN- $\alpha$  *in vitro* y que los subtipos de IFN- $\alpha$  tienen diferentes actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. La infección por medio de una variedad de  
25 rutas, que incluye oralmente, se ha mostrado que induce diferentes perfiles de subtipo. Los subtipos de IFN- $\alpha$  se unen al mismo receptor, activan rutas de señalización comunes y se espera que tengan las mismas funciones biológicas. Todos los subtipos de IFN- $\alpha$  tienen actividades antivirales, por definición, aunque su eficacia absoluta en este contexto puede variar considerablemente. Además, se han descrito muchas otras propiedades biológicas, pero con potencias variables, que incluyen actividades inmunomoduladoras y antiproliferativas. Los efectos pleiotrópicos parecen ser debidos a interacción diferencial con las cadenas receptoras y la señalización a través de diferentes rutas intracelulares a una variedad de moléculas efectoras. El receptor de IFN tipo I consiste en dos cadenas, IFNR1 e IFNR2. Hay un intervalo de afinidades de unión para cada uno de los 12 subtipos de IFN- $\alpha$  con las diferentes cadenas receptoras.

Los IFN- $\alpha$  pueden tener un papel clave en la regulación de la respuesta de Th1. Se ha mostrado que el tratamiento con IFN- $\alpha$  promueve la diferenciación de las células Th1 indirectamente (principalmente por medio de IFN- $\gamma$ ), pero también parece suprimir el desarrollo de las células Th2 a través de la supresión de la expresión génica de IL-4 e IL-13. Por lo tanto IFN- $\alpha$  es capaz de reestablecer un equilibrio de población de Th1/Th2 en enfermedades e infecciones que promueven un desequilibrio de células Th2. En años recientes, se hizo evidente que aparte de sus efectos antivirales, se ejercen varias funciones inmunomoduladoras mediante IFN- $\alpha$ . IFN- $\alpha$  puede impactar en la diferenciación de células dendríticas y controla la expresión de diversas citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-8 o IL-18 e induce  
40 diversos mediadores antiinflamatorios tales como el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), receptor de TNF soluble p55, proteína de unión IL-10 e IL-18. Sin embargo, los mecanismos de acción de IFN- $\alpha$ , y en particular de los subtipos IFN- $\alpha$  individuales, todavía se entienden solo parcialmente.

En pacientes con alergia o enfermedad alérgica, se genera una respuesta inmunitaria predominante de Th2. Las células Th2 secretan IL-4 e IL-13 que llevan a las células B a producir anticuerpos de inmunoglobulina E (IgE) específicos para un alérgeno. Un alérgeno es un antígeno capaz de estimular una reacción de hipersensibilidad de tipo I en individuos atópicos principalmente a través de respuestas mediadas por inmunoglobulina E (IgE). Después de esto, la IgE se une a su receptor de alta afinidad en mastocitos, células de la piel y tejidos mucosos. Tras la exposición al alérgeno, los mastocitos liberan sus contenidos, que incluyen histamina, leucotrienos y prostaglandinas. Esto provoca síntomas alérgicos que incluyen, pero no se limitan a, ojos rojos, picor, moqueo de nariz, eczema,  
50 urticaria, angioedema, falta de aliento, sibilancia, tos y ataque de asma, dolor abdominal, vómitos, diarrea o incluso anafilaxis.

Las enfermedades alérgicas están entre las formas más comunes de enfermedad crónica. La organización mundial de la salud estima que más del 20 por ciento de la población mundial está afectada y Europa sola tiene más de 80 millones de enfermos (Red europea de asma y alergia global, 2008). Una reacción alérgica está provocada  
55 normalmente por hipersensibilidad del sistema inmunitario a un alérgeno, provocando una respuesta inmunitaria mal dirigida. Las alergias suaves, tal como la fiebre del heno, son muy comunes en la población humana. Las alergias graves pueden estar provocadas por alérgenos dietéticos, tales como alimentos, por alérgenos ambientales, tal como el veneno de los insectos que pican, por medicación o pueden estar determinados genéticamente.

La alergia alimentaria es un problema de salud principal, que se estima que afecta a aproximadamente el 6 % de los niños pequeños y al 3-4 % de los adultos en las sociedades occidentales. Se hipotetiza que la alergia alimentaria resulta de una ruptura en la tolerancia oral a antígenos o alérgenos ingeridos. Las alergias alimentarias y las enfermedades alérgicas asociadas incluyen, pero no se limitan a, alergia a los lácteos (leche), que incluyen el síndrome de Heiner, alergia al huevo, alergia a la soja, alergia al pescado (marisco), alergia al cacahuete y a los frutos de cáscara, alergia al sésamo y otras semillas, alergia al gluten (trigo) y granos, alergia a la fruta y los vegetales, alergia a la cafeína, síndrome de alergia oral, alergia al alcohol, síndrome de alergia alimentaria al polen, gastroenteritis eosinófila, alergia alimentaria gastrointestinal mediada por IgE y deficiencia de esterasa C1.

La gestión y el tratamiento de la enfermedad alérgica es normalmente por medio de tres enfoques generales: (i) evitación del alérgeno, (ii) medicaciones que se dirigen a los síntomas de la enfermedad y (iii) inmunoterapia convencional, conocida como desensibilización, que ayuda a mejorar la respuesta a Th1 en la enfermedad establecida. Sin embargo, estos enfoques están lejos de lo ideal. La evitación de los alérgenos no siempre es posible, las medicaciones que se dirigen a los síntomas de la enfermedad, tal como antihistaminas, proporcionan solo alivio a corto plazo y la desensibilización implica el uso de alérgeno real, que puede dar como resultado efectos secundarios dañinos potencialmente frecuentes. La posibilidad de anafilaxis nunca está completamente eliminada en pacientes que padecen enfermedades alérgicas y esto provoca una gran cantidad de estrés al paciente y sus familias.

Los subtipos de interferón IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 e híbridos de los mismos se tratan en la Publicación PCT número WO2014/037717 y la solicitud PCT número PCT/GB2015/050717. En particular se describen híbridos de IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 que contienen secuencias características de los sitios de unión del subtipo IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 basados en una secuencia estructural de consenso de los 12 alfa-interferones, por ejemplo

CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCCLKDRHDFRIPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEM  
 MQQTFNLFSTENSSAAWEQTLLEKFSIELFQQMNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAV  
 RKYFQRITLYLIERKYSPEAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD (SEQ ID NO:3).

Sería ventajoso proporcionar híbridos alternativos y composiciones y métodos adicionales que proporcionen enfoques inmunoterapéuticos alternativos.

El presente inventor sugiere que sería deseable desarrollar un enfoque inmunoterapéutico mejorado que implique el uso más seguro de un alérgeno, ya que pueden usarse dosis más pequeñas, y proporciona protección a más largo plazo frente a la reacción alérgica. Como la alergia resulta de la sobrereactividad de las células Th2/Th17 y una correspondiente falta de actividad de la respuesta de Th1, una medicación que sea capaz de modificar y equilibrar una respuesta mal dirigida de Th2/Th17 sería beneficiosa en la prevención de la reacción alérgica. Dicha medicación sería además adecuada para tratar enfermedades y condiciones donde una respuesta exagerada de Th17 juega un papel, tal como las enfermedades inflamatorias intestinales. Adicionalmente, el inventor considera que la capacidad de mejorar una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y suprimir una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17 sería útil en la provisión de composiciones que medien la respuesta inmunitaria en sujetos con cáncer.

La patente internacional WO2015/136287 describe un subtipo de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) específico seleccionado de IFN-alfa 10, IFN-alfa 14, un híbrido de los mismos o la promoción de la inducción de una respuesta inmunitaria mediada por una célula (tal como la mediada por células Th1) y la supresión de una respuesta inmunitaria humoral o alérgica (tal como la mediada por células Th2 y Th17).

La patente internacional WO2007/044083 describe polipéptidos de interferón alfa, que incluyen variantes de los mismos y proteínas de fusión que comprenden dichos polipéptidos que muestran actividad antiviral.

La patente internacional WO2011/017160 describe interferones, interferones mutantes y fragmentos biológicamente activos de los interferones para tratar a un sujeto infectado con un virus.

**Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a la acción de las citoquinas que promueven la inducción de una respuesta inmunitaria mediada por células (tal como la mediada por células Th1) y citoquinas que suprimen una respuesta inmunitaria humoral o alérgica (tal como la mediada por células Th2 y Th17). La presente invención se refiere a híbridos de subtipos de interferón (IFN) específicos, y en particular a híbridos de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14.

Después de experimentación extensiva, el presente inventor ha hecho el sorprendente descubrimiento de que la administración de un subtipo específico de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) que es un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, preferiblemente en donde el híbrido incluye los sitios primarios de unión al receptor del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 como parte de una composición para modular el sistema inmunitario, tal como una vacuna, que comprende por ejemplo un alérgeno, puede dar por resultado la activación mejorada de la respuesta inmunitaria de Th1 y la supresión de la respuesta inmunitaria de Th2/Th17. En particular, el inventor ha desarrollado híbridos de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 que contienen sitios de unión de mayor afinidad derivados de cada uno de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 para los receptores de

interferón IFNR1 e IFNR2. En particular, el inventor demuestra que es ventajoso proporcionar híbridos de IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 con sitios de unión de alta afinidad derivados de subtipos de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 que no están basados en una secuencia de consenso de los 12 subtipos de IFN- $\alpha$  que proporcionan SEQ ID NO:3. Los híbridos de la presente invención no están basados en una secuencia estructural de consenso de los 12 interferones-alfa. En lugar de eso, derivan de las características de la secuencia de los subtipos IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 sin las características de secuencia de los otros 10 subtipos de interferón-alfa.

En particular, el inventor ha descubierto que la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 que comprende o consiste en al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 (numeración como se usa en la Figura 16), en particular 94, 109 o 144 o combinaciones de las mismas, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o en particular SEQ ID NO:1 dan por resultado una unión de mayor afinidad de los receptores del interferón IFNR1 e IFNR2. En las realizaciones, la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 puede ser SEQ ID NO:3 que comprende además la(s) mutación(ones) tratada(s) anteriormente. Estas secuencias híbridas pueden usarse en todos los aspectos y realizaciones de la invención.

El inventor ha descubierto sorprendentemente que la administración de los nuevos híbridos IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 da por resultado una mayor reducción de IL-17 en comparación con los híbridos IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 anteriores. El inventor ha descubierto que la administración de los nuevos híbridos IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 da por resultado un 10 %, preferiblemente un 20 %, preferiblemente un 30 %, preferiblemente un 40 % y más preferiblemente un 50 % más de reducción de IL-17 en comparación con los híbridos IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 anteriores.

Esto ha llevado a la identificación por el inventor de composiciones terapéuticas mejoradas que tienen utilidad en el tratamiento y/o profilaxis de la alergia y enfermedades alérgicas y enfermedades y condiciones donde una respuesta exagerada de Th17 juega un papel y también en el cáncer. En particular, el inventor ha identificado que la administración de al menos un alérgeno alimentario que es capaz de mediar una respuesta inmunitaria de Th2/Th17 con un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 preferiblemente en donde el híbrido incluye los sitios primarios de unión al receptor del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 puede usarse en el tratamiento de la alergia alimentaria y enfermedades alérgicas asociadas.

Además, el inventor ha identificado que la administración de un antígeno tumoral, o un antígeno asociado al tumor o un antígeno específico del tumor, en combinación con un subtipo específico de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) que es un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, preferiblemente en donde el híbrido incluye los sitios primarios de unión al receptor del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 como parte de una composición para modular el sistema inmunitario, tal como una vacuna, puede usarse en el tratamiento del cáncer. De forma adecuada, el cáncer puede ser cáncer hepático, cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de piel, melanoma o cáncer genitourinario. De forma adecuada, el antígeno asociado al tumor puede seleccionarse de un tumor de próstata, un tumor de células renales y un tumor de vejiga.

Sin desear estar atado por la teoría, el inventor cree que las proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de IFN- $\alpha$ 10 tienen una mayor afinidad al receptor de interferón 2 (IFNR2) y las proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de IFN- $\alpha$ 14 tienen mayor afinidad al receptor de interferón 1 (IFNR1). Por consiguiente, se considera que la sustitución de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de IFN- $\alpha$ 10 con aminoácidos de IFN- $\alpha$ 14 que permiten la unión al receptor de interferón 1 o la sustitución de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de IFN- $\alpha$ 14 con aminoácidos de IFN- $\alpha$ 10 que permiten la unión al receptor de interferón 2, proporciona una proteína híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 que debería tener una afinidad de unión más fuerte a ambos receptores de interferón 1 y 2 que IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 solos. Al incluir los sitios primarios de unión al receptor de interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 se pretende que el híbrido comprenda los aminoácidos seleccionados de IFN- $\alpha$ 10 y se sustituyan en una secuencia de aminoácidos IFN- $\alpha$ 14 para mejorar la capacidad del subtipo IFN- $\alpha$ 14 de unirse a un receptor de interferón 2 y/o que el híbrido comprenda aminoácidos seleccionados de IFN- $\alpha$ 14 y se sustituyan en una secuencia de aminoácidos IFN- $\alpha$ 10 para mejorar la capacidad de un subtipo IFN- $\alpha$ 10 para unirse a un receptor de interferón 1.

De manera adecuada, varias sustituciones de aminoácidos de proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de IFN- $\alpha$ 10 con aminoácidos de IFN- $\alpha$ 14 determinados por estar implicados en la unión al receptor de interferón 1 pueden mejorar la unión de la proteína al receptor de interferón 1. De manera adecuada, una sustitución de aminoácidos de proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de IFN- $\alpha$ 14 con aminoácidos de IFN- $\alpha$ 10 determinados para estar implicados en la unión al receptor de interferón 2 puede mejorar la unión de la proteína al receptor de interferón 2.

La presente invención se define por las reivindicaciones anexas.

El híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 puede tener sustancialmente la secuencia de aminoácidos de IFN- $\alpha$ 10, pero estar modificada en una región entre residuos de aminoácidos 80 a 150, o adecuadamente entre residuos de aminoácidos

84 a 144, o adecuadamente residuos de aminoácidos 92 a 115 o adecuadamente entre residuos de aminoácidos 90 a 110, (usando la numeración de la secuencia de IFN- $\alpha$ 10 proporcionada en la Figura 16) para proporcionar los aminoácidos proporcionados por la secuencia de IFN- $\alpha$ 14. Se considera que los residuos de aminoácidos en estas regiones o partes de estas regiones proporcionan la unión de IFN- $\alpha$ 14 al receptor de interferón 1.

5 Se describen, pero no son parte de la invención, las secuencias híbridas, que pueden incluir al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o al menos 11 modificaciones de la secuencia de IFN- $\alpha$ 10 para proporcionar los residuos correspondientes de la secuencia de IFN- $\alpha$ 14 (los residuos sustituidos adecuadamente se anotan en negrita en la Figura 9) o una mutación conservada de la misma. Se proporcionan once modificaciones como se indica por los aminoácidos anotados en negrita en la Figura 9. La secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 puede incluir al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144. De manera alternativa, puede utilizarse el IFN- $\alpha$ 14 como una estructura principal del híbrido y los residuos que difieren entre las secuencias IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 en las regiones terminales de N y C de las secuencias pueden proporcionarse en la secuencia híbrida como los presentes en la secuencia de IFN- $\alpha$ 10. De manera adecuada al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o al menos 11 sustituciones de la secuencia N-terminal de IFN- $\alpha$ 14 pueden hacerse para proporcionar la secuencia híbrida para proporcionar residuos de IFN- $\alpha$ 10 en esas posiciones de aminoácido en donde los aminoácidos no están compartidos/son comunes entre IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14. De manera adecuada, al menos 1, al menos 2, o 3 sustituciones se proporcionan a la secuencia C-terminal de IFN- $\alpha$ 14 para proporcionar residuos de IFN- $\alpha$ 10 a la secuencia híbrida en esas posiciones de aminoácidos que no están compartidos/son comunes entre IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14. Al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o al menos 11 sustituciones de la secuencia N-terminal y al menos 1, al menos 2, o 3 sustituciones de la secuencia C-terminal del IFN- $\alpha$ 14 están hechas para proporcionar residuos de IFN- $\alpha$ 10 al híbrido en esas posiciones de aminoácidos que tienen aminoácidos que no están compartidos/son comunes entre IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14.

El híbrido de la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.

30 Se describe además una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de vacuna para el tratamiento o profilaxis de una condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17.

35 Por funcionalmente activo se entiende un péptido híbrido de IL- $\alpha$ 10 IL- $\alpha$ 14 que comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 en donde la administración del péptido a un sujeto o expresión de péptido en un sujeto promueve la mejora de la respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17. Además, la actividad funcional puede estar indicada por la capacidad de un péptido híbrido para mejorar una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y suprimir una respuesta mediada por Th2/Th17.

40 Un fragmento puede comprender al menos 50, preferiblemente 100 y más preferiblemente 150 o más aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:1 y que está funcionalmente activo. Adecuadamente, un fragmento puede determinarse usando, por ejemplo, la supresión de la serie C-terminal de ADNc tal como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3. Dichos constructos de supresión pueden clonarse entonces en plásmidos adecuados. La actividad de estos mutantes de supresión puede entonces probarse para la actividad biológica como se describe en la presente memoria.

45 Por variante se entiende una secuencia de aminoácidos que es homóloga al menos al 70 % a la SEQ ID NO:1, más preferiblemente homóloga al menos al 80 % a la SEQ ID NO:1, más preferiblemente homóloga al menos al 90 % a la SEQ ID NO:1, incluso más preferiblemente homóloga al menos al 95 % a la SEQ ID NO:1, incluso más preferiblemente homóloga al menos al 96 % a la SEQ ID NO:1, incluso más preferiblemente homólogo al menos al 97 % a la SEQ ID NO:1 y lo más preferiblemente con homología al menos al 98 % a la SEQ ID NO:1. Una variante abarca una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:1 que incluye la sustitución de aminoácidos, especialmente una(s) sustitución(ones) que se conoce(n) por tener una alta probabilidad de no llevar a ninguna modificación significativa de la actividad biológica o configuración, o plegado, de la proteína. Estas sustituciones, conocidas típicamente como sustituciones conservadas, se conocen en la técnica. Por ejemplo el grupo de arginina, lisina e histidina son aminoácidos básicos intercambiables conocidos. Adecuadamente, en las realizaciones los aminoácidos de la misma carga, tamaño o hidrofobicidad pueden sustituirse entre sí. Adecuadamente, cualquier sustitución puede seleccionarse en base al análisis de los alineamientos de la secuencia de aminoácidos de subtipos de interferón alfa para proporcionar sustituciones de aminoácidos a aminoácidos que están presentes en otros subtipos alfa en posiciones similares o idénticas cuando se alinean las secuencias. Los híbridos, y variantes y fragmentos de los mismos pueden generarse usando métodos de biología molecular adecuados como se conocen en la técnica.

60 La composición de la vacuna comprende al menos un antígeno. Alternativamente, la composición de vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar una respuesta inmunitaria de Th2/Th17, por ejemplo, un alérgeno alimentario.

El antígeno puede ser un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno específico del tumor o un antígeno asociado al tumor, en particular un antígeno tumoral puede ser de un carcinoma hepático, cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de piel, melanoma o de un cáncer genitourinario. En particular un antígeno de un cáncer genitourinario puede incluir un antígeno de un cáncer de próstata, carcinoma de células renales, o cáncer de vejiga. Adecuadamente, un antígeno puede ser un antígeno específico de tumor o antígeno asociado al tumor proporcionado en una vacuna de cáncer existente en uso o desarrollo que se beneficiaría de un adyuvante que mejora la inmunidad de las células T, en particular que mejora una respuesta de Th1 o proporciona una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17. Adecuadamente un antígeno específico del tumor o asociado al tumor puede obtenerse de un tumor de un sujeto a tratar. En las realizaciones solo puede usarse un antígeno asociado al tumor.

Alternativamente, un antígeno tumoral, en particular un antígeno asociado puede ser un antígeno para un antígeno de cáncer de próstata, en particular antígeno específico de la próstata. Adecuadamente un método para proporcionar un antígeno específico de próstata o un antígeno de cáncer de próstata con los subtipos de interferón alfa de la invención pueden usarse para tratar el cáncer de próstata, específicamente el cáncer de próstata resistente a la castración.

Como se apreciará por un médico, los sujetos que se beneficiarán más de dichos tratamientos pueden ser aquellos con enfermedad mínima, ya que puede haber menor oportunidad de aumentar la supresión tumoral del sistema inmunitario, adicional o alternativamente dichos tratamientos pueden beneficiar a sujetos con enfermedad avanzada que puede tener una significativa supresión inmunitaria tumoral y puede beneficiarse más del uso de las vacunas en combinación con otras formas de tratamiento. Adecuadamente el uso de vacunas que incluyen antígenos tumorales, en particular antígenos asociados con el tumor puede estar en combinación con otras formas de inmunoterapia, por ejemplo, Sunitinib (Sutent de Pfizer) un inhibidor de tirosina quinasa.

Alternativamente, los antígenos tumorales, en particular antígenos asociados con tumor pueden seleccionarse de los antígenos utilizados en las vacunas de cáncer de próstata TroVax y Prostavac.

Alternativamente, un antígeno tumoral, en particular un antígeno asociado al tumor puede seleccionarse de carcinoma de células renales. Adecuadamente un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno asociado con el tumor para el carcinoma de células renales pueden seleccionarse de una proteína de choque térmico o proteínas de lisatos de células del tumor renal, en particular el antígeno usado en la vacuna potencial MVA-5T4.

Adecuadamente un antígeno tumoral puede ser MUC1 de melanoma.

Alternativamente, un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno asociado al tumor puede seleccionarse de cáncer de vejiga. Adecuadamente puede seleccionarse un antígeno asociado al tumor de la vacuna del bacilo de Calmette-Guerin (BCG), péptidos de epítipo restringido A\*2402 de antígeno de leucocito humano, factor estimulante de la colonia de gonadotropina coriónica humana de péptido de inmucina (una vacuna sintética de 21mero compuesta del péptido de señal entero de la proteína MUCI), o gonadotropina-beta coriónica humana.

Típicamente, el sujeto es un mamífero, en particular un ser humano. En ciertas realizaciones, el sujeto puede estar padeciendo una condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un subtipo de interferón alfa que comprende la secuencia de aminoácidos presentada por SEQ ID NO:1. Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona al menos un subtipo de interferón alfa que es un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, y SEQ ID NO: 1, para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de una condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17.

También se describe una composición que comprende:

(i) una vacuna para el tratamiento o profilaxis de una condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17; y

(ii) al menos un subtipo de interferón alfa que es un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en donde el híbrido comprende SEQ ID NO:1. Se describe además, pero no son parte de la invención, composiciones que comprenden híbridos en donde la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, en particular en donde el híbrido puede ser SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento, como se describe en la presente memoria.

La vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar una respuesta inmunitaria de Th2/Th17, por ejemplo, un alérgeno alimentario o un antígeno tumoral, en particular un antígeno asociado a un tumor.

5 También se describe una composición farmacéutica para la mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17, en donde la composición comprende una vacuna para el tratamiento o profilaxis de una condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17 y al menos un subtipo de interferón alfa que es un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en donde el híbrido comprende SEQ ID NO:1 junto con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen además, pero no son parte de la invención, composiciones en donde la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, en particular en donde el híbrido puede ser SEQ ID NO:1 o un fragmento o variante del mismo junto con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar una respuesta inmunitaria de Th2/Th17, por ejemplo, un alérgeno alimentario o antígeno tumoral, en particular un antígeno asociado a un tumor.

20 También se describen mejoras en la eficacia de las vacunas, por ejemplo, vacunas antialérgicas o enfermedad alérgica o vacunas tumorales o de cáncer, en particular vacunas del cáncer genitourinario, por ejemplo cáncer de próstata, cáncer renal y o cáncer de vejiga. Una composición que comprende una vacuna para el tratamiento o profilaxis de una condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17, tal como al menos un alérgeno capaz de mediar una respuesta inmunitaria de Th2/Th17, y al menos un subtipo de interferón alfa que es un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 en particular en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular en donde la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de los aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de los aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de los aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, en particular SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento de la misma, se ha identificado sorprendentemente por el inventor como que proporcionan una composición inesperadamente eficaz para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades, tales como alergia o enfermedades alérgicas asociadas.

También se describe una composición de vacuna que comprende;

(i) una vacuna para el tratamiento o profilaxis de una condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17; y

40 (ii) al menos un subtipo de interferón alfa que es un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 en particular en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en donde el híbrido comprende SEQ ID NO:1. Se describen además, pero no son parte de la invención, composiciones de vacuna en donde la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de los aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, en particular puede ser SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento de la misma.

50 La vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar una respuesta inmunitaria de Th2/Th17, por ejemplo, un alérgeno alimentario o un antígeno tumoral, en particular un antígeno asociado a un tumor.

También se describe una composición de vacuna para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de alergia o cáncer, en particular cáncer genitourinario, por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer renal o cáncer de vejiga, donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17, comprendiendo dicha composición de vacuna;

55 (i) al menos un alérgeno capaz de mediar una respuesta inmunitaria de Th2/Th17; y

(ii) al menos un subtipo de interferón alfa que es un híbrido del subtipo IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en donde el híbrido comprende SEQ ID NO:1. Se describen además, pero no son parte de la invención, composiciones de vacuna en donde la

secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de los aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, en particular en donde el híbrido puede ser SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento, como se describe en la presente memoria.

También se describe al menos un subtipo de interferón alfa que comprende o consiste en un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 en particular en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en donde el híbrido comprende SEQ ID NO:1 para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de una condición mediada por la expresión mejorada de IL-17. Se describe además, pero no es parte de la invención, al menos un subtipo de interferón alfa en donde la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, en particular SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento de la misma para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de una condición mediada por la expresión mejorada de IL-17.

El híbrido de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

De manera adecuada, la administración o uso de al menos un subtipo de interferón alfa que comprende o consiste en un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 en particular en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular en donde la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, en particular SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento de la misma da por resultado la inhibición total o parcial de IL-17 y/o la activación total o parcial de IFN- $\gamma$ .

También se describe al menos un híbrido del subtipo de interferón alfa IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en donde el híbrido comprende SEQ ID NO:1 para el uso en la modulación de una respuesta inmunitaria. Se describen además, pero no son parte de la invención, híbridos en donde la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, y en particular puede ser SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento de la misma para el uso en la modulación de una respuesta inmunitaria.

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención descrita anteriormente, el al menos un subtipo de interferón alfa se proporciona con una vacuna para el uso en el tratamiento o profilaxis de la condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17, por ejemplo, una vacuna para el tratamiento o profilaxis de una condición mediada por la expresión mejorada de IL-17, p. ej., una enfermedad o condición inflamatoria o una enfermedad autoinmune, tal como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD), cáncer, adecuadamente cáncer hepático, cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de piel, melanoma o cáncer genitourinario, en particular cáncer genitourinario, por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer renal o cáncer de vejiga. En ciertas realizaciones, la composición de vacuna comprende al menos un antígeno. En ciertas realizaciones, la vacuna comprende al menos un alérgeno capaz de mediar una respuesta inmunitaria de Th2/Th17 ahí frente a, por ejemplo, un alérgeno alimentario.

En ciertas realizaciones el antígeno puede ser un antígeno tumoral, en particular un antígeno específico de un tumor y/o asociado a un tumor.

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención descrita anteriormente, el al menos un subtipo de IFN- $\alpha$  comprende, consiste en o es un híbrido IFN- $\alpha$ 10 IFN- $\alpha$ 14 tal como una proteína de fusión, o proteína recombinante o similar que incluye los sitios primarios de unión al receptor de interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1. En las realizaciones el híbrido IFN- $\alpha$ 10 IFN- $\alpha$ 14 puede estar glicosilado. Adecuadamente el híbrido IFN- $\alpha$ 10 IFN- $\alpha$ 14 puede estar glicosilado de manera similar a IFN- $\alpha$ 14.

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención descrita anteriormente, el al menos un alérgeno es al menos un alérgeno alimentario o un alérgeno específico de un tumor o asociado a un tumor, por ejemplo un alérgeno de cáncer de próstata, un alérgeno de cáncer renal y o un alérgeno de cáncer de vejiga. En ciertas realizaciones, el al menos un alérgeno es un alérgeno dietético tal como alimentos, un alérgeno ambiental tal como el veneno de las insectos que pican, o un medicamento.

Se proporciona además un polipéptido recombinante que comprende o consiste en SEQ ID NO:1. Las secuencias de ácido nucleico derivadas de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 se proporcionan como SEQ ID NO:2.

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención descrita anteriormente, el al menos un alérgeno alimentario se selecciona del grupo que consiste en, pero no se limita a, maíz, ajo, avena, café, chocolate, pepinillo, trigo o gluten y sus productos o derivados que incluyen trigo candeal, espelta (*triticum spelta*), trigo de Jorasán (*triticum polonicum*), cuscús, salvado, salvado de trigo, germen de trigo, gluten de trigo, harina, harina, biscote, sémola, sémola de trigo candeal, harina, harina de trigo completo, harina de trigo, almidón de trigo, almidón, almidón modificado, almidón hidrolizado, almidón alimentario, almidón comestible, almidón vegetal, resina vegetal, proteína vegetal, relleno de cereal, aglutinante de cereal, proteína de cereal; frutos de cáscara (que incluyen almendras, anacardos, nuez de macadamia, nuez y nueces de Brasil); semillas, que incluyen semillas de sésamo, girasol y amapola; antígenos derivados de lácteos, tales como leche o derivados de la leche, que incluyen queso y yogur; pescado o marisco o sus derivados, que incluyen del filo molusco (clase gasterópodos: caracoles y orejas de mar; clase bivalvos: almeja, mejillón y ostra; clase cefalópodos: pulpo, calamar y vieira), filo artrópodos (familia de los crustáceos: cangrejo, langosta, gamba, langostino y cangrejo de río) o filo cordado (familia de los cartilagosos: raya y tiburón; peces óseos: bacalao, salmón y atún); huevos o derivados del huevo; glutamato monosódico (MSG); sulfitos o dióxido de azufre; alergias a las legumbres a la familia de las leguminosas, que incluye cacahuete, soja (habas de soja o derivados de soja), alubias, guisantes, judías verdes, lentejas, algarroba y regaliz; alergias a otros vegetales tales como patata; alergias a la fruta de la familia rosácea, que incluye manzana, pera, cereza, melocotón y ciruela; alergias a la fruta de la familia cucurbitácea, que incluye pepino, melón, sandía, calabacín y calabaza; y otras alergias a las frutas tales como las desarrolladas contra el kiwi, plátano, aguacate, tomates, fresas y frambuesas.

La vacuna o composición de vacuna puede ser una composición de vacuna para el uso en el tratamiento o profilaxis de una condición mediada por la expresión mejorada de IL-17, p. ej., una enfermedad o condición inflamatoria o una enfermedad autoinmune, tal como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD), o cáncer, adecuadamente cáncer hepático, cáncer de pulmón, cáncer de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de piel, melanoma o cáncer genitourinario, en particular cáncer genitourinario, por ejemplo cáncer de próstata, cáncer renal o cáncer de vejiga. En ciertas realizaciones, la vacuna o composición de vacuna puede ser una composición de vacuna para el uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o condición inflamatoria o una enfermedad autoinmune, tal como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD).

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención descrita anteriormente, la condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17 puede ser una condición mediada por la expresión mejorada de IL-17, p. ej., una enfermedad o condición inflamatoria o una enfermedad autoinmune, tal como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD).

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención descritos anteriormente, la condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17 puede ser una enfermedad inflamatoria, en particular una enfermedad inflamatoria que está mediada por una respuesta inmunitaria de Th17 exagerada o hiperactiva. En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención descrita anteriormente, la condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17 puede ser una enfermedad autoinmune, en particular una enfermedad autoinmune que está mediada por una respuesta inmunitaria Th17 exagerada o hiperactiva. Por ejemplo, en ciertas realizaciones la condición puede ser enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), tal como colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD). En ciertas realizaciones, la condición puede seleccionarse del grupo que consiste en asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica y alergia alimentaria. En ciertas realizaciones, la condición es cáncer, en particular un cáncer genitourinario, en particular cáncer de próstata, cáncer de vejiga o cáncer renal.

En ciertas realizaciones de los aspectos de la invención descrita anteriormente, la condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17 es una alergia o enfermedades y condiciones alérgicas asociadas así, o cáncer en donde se desea una respuesta inmunitaria contra un antígeno asociado con un tumor, en particular un antígeno asociado con un tumor de cáncer de próstata, cáncer renal o cáncer de vejiga. En particular, en ciertas realizaciones la condición es una alergia alimentaria que incluye alergias asociadas o derivadas a los alimentos y enfermedades y condiciones alérgicas asociadas provocadas así.

En ciertas realizaciones, las enfermedades o condiciones alérgicas asociadas con alergia alimentaria incluyen, pero no se limitan a, alergia a la leche/lácteos, incluyendo el síndrome de Heiner, alergia al huevo, alergia a la soja, alergia al pescado (marisco), alergia al cacahuete y a los frutos de cáscara, alergia al sésamo y a otras semillas, alergia al

trigo y a los granos, alergia a la fruta y a los vegetales, alergia a la cafeína, síndrome de alergia oral, alergia al alcohol, síndrome de alergia al polen alimentario, gastroenteritis eosinófila, alergia alimentaria gastrointestinal mediada por IgE y deficiencia de esterasa C1.

5 El método de administración puede ser la administración oral. En ciertas realizaciones, el método de administración es administración sublingual o bucal. En ciertas realizaciones, el método de administración implica poner una pastilla para chupar bajo la lengua del paciente. En ciertas realizaciones, la ruta de administración es ocular o por medio de la introducción en la cavidad nasal, por medio de administración nasal. También puede introducirse mediante administración oral (tragado) de una cápsula o dispositivo similar en el intestino delgado/duodeno de manera que la cápsula no se disuelve en el estómago, sino que lo evita y administra/libera el subtipo de interferón alfa solo en el  
10 intestino delgado/duodeno.

### Descripción detallada de la invención

El inventor de la presente invención ha descubierto sorprendentemente que la administración de un subtipo de IFN- $\alpha$  que es un híbrido de los subtipos de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, por ejemplo SEQ ID NO:1, como se describe en la presente memoria da por resultado la mejora de una respuesta inmunitaria mediada por células T Th1 y la supresión de una  
15 respuesta inmunitaria mediada por células T Th2/Th17 y pueden por lo tanto desviar la respuesta inmunitaria hacia una ruta mediada por células (Th1), mientras que suprime simultáneamente la respuesta alérgica (Th2/Th17). Sorprendentemente, este efecto se mejora cuando el subtipo de IFN- $\alpha$  se administra oralmente.

En particular, el inventor descubrió que los híbridos IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 que contiene secuencias características de los sitios de unión del subtipo IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 que no están basados en una secuencia de consenso de los 12 subtipos de IFN- $\alpha$  dieron por resultado una proteína con sitios de unión de mayor afinidad para los dos receptores de interferón, IFNR1 e IFNR2. Este descubrimiento puede aplicarse para proporcionar un método mejorado y una composición adyuvante mejorada para tratar y/o prevenir las condiciones donde se desean la mejora de una respuesta inmunitaria mediada por células T Th1 y/o la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por células T Th2/Th17, por ejemplo, condiciones inflamatorias, autoinmunes o de alergia, o cáncer (que incluye condiciones malignas), en particular  
20 cánceres genitourinarios, en particular cáncer de próstata, cáncer renal o cáncer de vejiga. En particular, el híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular en donde la secuencia híbrida de IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, y en particular SEQ ID NO:1 o un fragmento o variante de la misma puede usarse como un adyuvante en vacunas para estimular la respuestas inmunitaria a los antígenos y dirige la respuesta inmunitaria hacia una respuesta inmunitaria de Th1.

35 El inventor también ha descubierto que una combinación de una composición de vacuna o un alérgeno de antígeno alimentario o específico de un tumor o asociado con un tumor que es capaz de mediar una respuesta inmunitaria de Th2/Th17 y un subtipo de IFN- $\alpha$  que es un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular un híbrido que comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular en donde la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, y en particular SEQ ID NO:1 o un fragmento o variante de la misma puede dar por resultado la activación de una  
40 respuesta inmunitaria mediada con células T Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por células T Th2/Th17.

La progresión tumoral en sujetos inmunocompetentes normales puede reflejar un fallo del sistema inmunitario para reconocer los antígenos tumorales o una subversión de la respuesta inmunitaria antitumoral a través de la inducción y activación de células T reguladoras. En sujetos con coriocarcinoma hepático (HCC), los estudios de células IL-17  $\alpha$  han sugerido un papel protumoral potencial para IL-17. La densidad de células que producen IL-17 aumentada dentro de los tumores de pacientes con HCC se correlaciona tanto con densidad de microvasos como con un mal pronóstico. Además, en sujetos con cáncer de pulmón de células no pequeñas y de ovario, mayores niveles de IL-17 dentro del tumor se correlacionan con mayor densidad de vasos sanguíneos y menor supervivencia. Adicionalmente, se ha sugerido que IL-17 tiene papeles proangiogénicos y esto no se ha restringido a poblaciones celulares particulares.  
55 Además, se ha mostrado que IL-17A o las células que producen IL-17A están elevadas en el entorno de tumores de mama y se correlacionan con mal pronóstico.

El aislamiento de linfocitos que se infiltran en el tumor (TILS) a partir de biopsias de cáncer de mama revelaron que estas células secretaron cantidades significativas de IL-17A, y que IL-17A emplea la ruta MAPK sobrerregulando ERK 1/2 fosforilado en las líneas humanas de cáncer de mama promoviendo así la proliferación y resistencia a los agentes quimioterapéuticos convencionales tal como Docetaxel. También se ha indicado IL-17A para estimular la migración y  
60

la invasión de células de cáncer de mama. De manera importante los anticuerpos que neutralizan IL-17A anularon estos efectos, demostrando el papel patofisiológico de IL-17A como un potencial objetivo terapéutico para el cáncer de mama. El inventor ha descubierto sorprendentemente que la administración del nuevo híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 da por resultado una mayor reducción de IL-17 en comparación con el híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 anterior. El inventor ha descubierto que la administración del nuevo híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 da por resultado un 10 %, preferiblemente un 20 %, preferiblemente un 30 %, preferiblemente un 40 % y más preferiblemente un 50 % más de reducción de IL-17 en comparación con el híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 anterior. La determinación por el inventor o los medios para activar así una respuesta inmunitaria mediada por células T Th1 y suprimir una respuesta inmunitaria mediada por células T Th2/Th17 es por lo tanto significativa y de utilidad en el cáncer. Por consiguiente, la presente invención puede usarse para el tratamiento y la profilaxis de cualquier condición cancerosa o maligna conocida.

Además, el inventor ha descubierto que la administración o uso de al menos un subtipo de interferón alfa que comprende o consiste en un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 en particular en donde el híbrido comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular en donde la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, en particular SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento de la misma da por resultado la inhibición total o parcial de IL-17 y/o la activación total o parcial de IFN- $\gamma$ .

Además, el inventor ha descubierto sorprendentemente que administrar oralmente el antígeno y el subtipo de IFN- $\alpha$  que es un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 en particular un híbrido que comprende los sitios primarios de unión del interferón de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, en particular en donde la secuencia híbrida IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 comprende al menos una mutación seleccionada de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, y en particular SEQ ID NO:1 o un fragmento o variante de la misma en combinación como se trata en la presente memoria puede dar por resultado la activación de una respuesta inmunitaria mediada por células T Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por células T Th2/Th17. Una vacuna de la gripe estándar se mezcló con una baja dosis de interferón alfa derivado de leucocito (LDA1) y se administró oralmente a ratones. El inventor notó que sin el interferón, se grabó una pequeña respuesta del anticuerpo anti-gripe en los ratones, que fue aproximadamente 50 veces menor que con una vacuna inyectada. Con el interferón-alfa, la respuesta de la vacuna administrada oralmente fue exactamente igual que la vacuna inyectada. Una serie de inmunizaciones bucales que usan un antígeno de proteína estándar y dos interferones, LDA1 y un subtipo de IFN- $\alpha$ 14 aislado, sorprendentemente dieron por resultado una inmunización oral de los ratones a los que se administró la composición. Sin embargo, el inventor notó sorprendentemente que mientras que LDA1 dio una respuesta equilibrada, IFN- $\alpha$ 14 medió solo una respuesta humoral significativa. La producción de IgG1 es indicativa de una respuesta de Th2 (inmunidad humoral) y la producción de IgG2a es indicativa de una respuesta de Th1 (inmunidad mediada por células).

El inventor, aunque sin desear estar atado por la teoría, ha identificado que la administración oral de un alérgeno alimentario capaz de mediar una respuesta inmunitaria de Th2/Th17 y un subtipo de interferón alfa que es un híbrido de IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 puede desviar la respuesta inmunitaria hacia un camino mediado por células (Th1), mientras que suprime simultáneamente la respuesta alérgica (Th2/Th17). Por consiguiente, el inventor ha mostrado sorprendentemente que la coadministración de un alérgeno tal como un antígeno derivado de un alimento que es causante de alergia o enfermedades alérgicas asociadas en un sujeto con ciertos subtipos de interferón modula la respuesta inmunitaria resultante y la desvía lejos de la respuesta de Th2/Th17 que se habría esperado que se desarrollara al alérgeno o antígeno. Este sorprendente descubrimiento proporciona un enfoque inesperado para tratar o prevenir las respuestas alérgicas o enfermedades que se dan en sujetos como resultado de alérgenos tales como alérgenos derivados de alimentos o antígenos asociados a tumores.

## Definiciones

### Sujeto

Como se define en la presente memoria, un "sujeto" incluye y abarca mamíferos tales como seres humanos, primates y animales de granja (p. ej., ovejas, cerdos, ganado vacuno, caballos, burros); animales de prueba de laboratorio tales como ratones, conejos, ratas y cobayas; y animales de compañía tales como perros y gatos.

### Tratamiento/terapia

El término "tratamiento" se usa en la presente memoria para referirse a cualquier régimen que pueda beneficiar a un ser humano o animal no humano. El tratamiento puede ser respecto a cualquier condición inflamatoria, autoinmune, alérgica o asociada con alergia existente y el tratamiento puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). Tratamiento

puede incluir efectos curativos o calmantes. La referencia en la presente memoria a tratamiento "terapéutico" y "profiláctico" se va a considerar en su más amplio contexto. El término "terapéutico" no implica necesariamente que un sujeto se trate hasta su total recuperación. De manera similar, "profiláctico" no significa necesariamente que el sujeto no contraerá eventualmente una condición de enfermedad. Por consiguiente, tratamiento terapéutico y/o profiláctico incluye la mejora de los síntomas de una condición alérgica particular o la prevención o la reducción de otra forma del riesgo de desarrollar una condición alérgica particular. El término "profiláctico" puede considerarse como reductor de la gravedad o el comienzo de una condición particular. "Terapéutico" puede reducir también la gravedad de una condición existente.

#### Administración

Los ingredientes activos usados en la presente invención (p. ej., vacuna o alérgeno e IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 o un híbrido de los mismos) en particular un híbrido de subtipos IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14, por ejemplo SEQ ID NO:1, como se describe en la presente memoria, pueden administrarse de forma separada al mismo sujeto, opcionalmente de forma secuencial, o pueden coadministrarse simultáneamente como una composición farmacéutica, inmunogénica o vacuna. En ciertas realizaciones, la vacuna o alérgeno se coadministra con el subtipo de interferón alfa. La composición farmacéutica comprenderá generalmente un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado dependiendo de la ruta de administración prevista.

Los ingredientes activos pueden administrarse a un paciente que necesita tratamiento por medio de cualquier ruta adecuada. La dosis precisa dependerá de un número de factores, como se trata a continuación en más detalle.

Una ruta de administración adecuada es parenteralmente (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa, por medio de, por ejemplo un parche de dosificación). Otras rutas de administración adecuadas incluyen (pero no se limitan a) oral, ocular, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), infusión, intradérmica o administración por vía oral o inhalación nasal, por medio de, por ejemplo, un nebulizador o inhalador, o mediante un implante. Las rutas de administración preferibles incluyen (pero no se limitan a) oral, bucal y sublingual. Las composiciones de la invención pueden administrarse también de tal manera que estén dirigidas a, o se liberen en, áreas específicas del tracto intestinal (tal como el intestino delgado/duodeno). Normalmente dicha liberación ocurrirá después del paso a través del estómago, pudiéndose conseguir esta liberación dirigida mediante el uso de recubrimientos y similares.

Para la inyección intravenosa, el ingrediente activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos expertos en la técnica serán capaces de preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactada. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se necesite.

Las composiciones de la presente invención para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar, polvo o líquido. La administración oral puede implicar el poner una pastilla para chupar debajo de la lengua del paciente. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse también por medio de microesferas, liposomas, otros sistemas de distribución en micropartículas o formulaciones de liberación sostenida puestos en ciertos tejidos que incluyen la sangre. Ejemplos adecuados de vehículos de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos compartidos, p. ej., supositorios o microcápsulas. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente y otras técnicas y protocolos que pueden usarse de acuerdo con la invención pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Gennaro, A. R., Lippincott Williams & Wilkins; 20ª edición (15 de diciembre de 2000) ISBN 0-912734-04-3 y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems; Ansel, H. C. et al. 7ª edición ISBN 0-683305-72-7.

#### Composiciones farmacéuticas

Como se describe anteriormente, la presente invención se extiende a una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y alergia tal como alergia alimentaria y enfermedades alérgicas asociadas y, en particular para la inducción de una respuesta inmunitaria de Th1 y la supresión o inhibición de una respuesta inmunitaria de Th2/Th17.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para el uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además de un ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón estabilizante u otros materiales, farmacéuticamente aceptables, bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales deberían ser no tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser, por ejemplo, oral, intravenosa, intranasal o por vía oral o inhalación nasal. La formulación puede ser un líquido, por ejemplo, una disolución de sal fisiológica que contiene tampón no fosfato a pH 6,8-7,6, o un polvo liofilizado o seco por congelación.

Dosis

La composición se administra preferiblemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad deseada", siendo esta suficiente para mostrar beneficio al individuo. Como se define en la presente memoria, el término una "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria para obtener al menos parcialmente la respuesta deseada, o retrasar el inicio o inhibir la progresión o para totalmente el inicio o progresión de una condición particular a tratar. La cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del sujeto a tratar, el grupo taxonómico del sujeto a tratar, el grado de protección deseado, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio, que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. La prescripción del tratamiento, p. ej., decisiones en la dosificación etc., es en última instancia la responsabilidad y a la discreción de los médicos de familia, doctores u otros médicos, y normalmente tiene en cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. La dosis óptima puede determinarse por los médicos en base a un número de parámetros que incluyen, por ejemplo, edad, sexo, peso, gravedad de la condición a tratar, el ingrediente activo que se administra y la ruta de administración. Un amplio intervalo de dosis puede ser aplicable. Considerando la administración oral a un paciente humano, por ejemplo, puede administrarse de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 1000 µg de agente por dosis humana, opcionalmente para 3 a 4 dosis. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima y reducir los efectos secundarios. Por ejemplo, se pueden administrar diversas dosis divididas diariamente, semanalmente, mensualmente u en otros intervalos temporales adecuados o la dosis puede reducirse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el significado normalmente entendido por una persona que es experta en la técnica en el campo de la presente invención.

Enfermedad autoinmune

El término "enfermedad autoinmune" como se usa en la presente memoria se entiende que significa cualquier enfermedad o condición que está provocada por unos tejidos corporales que están atacados por su propio sistema inmunitario.

A lo largo de la memoria, a menos que el contexto demande otra cosa, los términos "comprender" o "incluir", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", "incluye" o "que incluye" se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

La presente invención se ejemplificará ahora con referencia a las siguientes figuras no limitantes y ejemplos que se proporcionan con el propósito de ilustración y no se pretende que se interpreten como limitantes en la presente invención. Otras realizaciones serán evidentes para los expertos en la técnica en vista de esta descripción.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra un gráfico de la producción del subtipo de IgG (IgG1 e IgG2a) en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y diferentes subtipos de IFN-α.

La Figura 2 muestra un gráfico del porcentaje del subtipo de IgG (IgG1 e IgG2a) producido en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y diferentes subtipos de IFN-α.

La Figura 3 muestra un gráfico de la producción de IgG2a en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y MULTIFERON™, IFN-α14 glicosilado e IFN-α14 no glicosilado administrados por medio de inyección intraperitoneal.

La Figura 4 muestra un gráfico de la producción de IgG1 en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y MULTIFERON™, IFN-α14 glicosilado e IFN-α14 no glicosilado administrados por medio de inyección intraperitoneal.

La Figura 5 muestra un gráfico de producción de IgG2a en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y MULTIFERON™, IFN-α14 glicosilado e IFN-α14 no glicosilado administrados oralmente.

La Figura 6 muestra un gráfico de producción de IgG1 en ratones BALB-c inmunizados con ovoalbúmina y MULTIFERON™, IFN-α14 glicosilado e IFN-α14 no glicosilado administrados oralmente.

La Figura 7 muestra la inhibición de la secreción de interleuquina-17 (IL-17) de PBMC humanas con lipopolisacárido (LPS) solo y con LPS y concentraciones crecientes de IFN-α2a (negro), IFN-α10 (blanco) o IFN-14 (gris).

La Figura 8 muestra la inhibición del desarrollo de células Th2 CD4+ inducidas por interleuquina-4 (IL4) usando concentraciones crecientes de IFN-α2a (negro), IFN-α10 (blanco) o IFN-14 (gris).

La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos del híbrido de IFN-α10 e IFN-α14 que contiene los 2 sitios de unión al receptor del interferón (IFNαR1 e IFNαR2).

En base a la secuencia de proteína SEQ ID NO:1 usando servicios web en línea (por ejemplo [http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_backtranseq/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/)), se puede obtener una secuencia de ácido nucleico. La Figura 10 proporciona la traducción inversa de la secuencia de proteína SEQ ID NO:1 cuando se usa una tabla de uso del codón de *E. coli*.

- 5 La Figura 11 muestra el alineamiento de una secuencia de aminoácidos híbrida de IFN $\alpha$ 10 e IFN $\alpha$ 14 descrita anteriormente con la secuencia de aminoácidos híbrida de IFN $\alpha$ 10 e IFN $\alpha$ 14 como se reivindica actualmente.

La Figura 12 indica el efecto provocado por rIFN- $\alpha$ 14 en la producción de IL-17 en sangre humana completa incubada con un microgramo de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* durante 48 horas. El  $\alpha$ -14 dio una supresión significativa de secreción de IL-17. IL- $\alpha$ -2 y  $\alpha$ -10 no mostraron una supresión significativa.

- 10 La Figura 13 muestra el efecto provocado por rIFN- $\alpha$ 14 en la producción de IL-17 a partir de células mononucleares de la sangre periférica humana incubadas con 10 microgramos de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* durante 48 horas. El  $\alpha$ -14 provocó una supresión significativa de secreción de IL-17 con y sin activación de LPS. IL- $\alpha$ -2 y  $\alpha$ -10 no mostraron cambios significativos en las concentraciones de IL-17 (resultados no mostrados).

- 15 La Figura 14 muestra el efecto provocado por rIFN- $\alpha$ 10, rIFN- $\alpha$ 14 y rIFN- $\alpha$ 2 en la producción de IL-17 mediante sangre humana completa incubada con PHA durante 5 días. El  $\alpha$ -14 es un inhibidor extremadamente potente ( $P < 0,001$  a 1.000 IU/ml) de IL-17 en comparación con el  $\alpha$ -2 disponible normalmente; el  $\alpha$ -10 es más de 20x menos activo en este contexto.

- 20 La Figura 15 muestra el efecto provocado por rIFN- $\alpha$ 10, rIFN- $\alpha$ 14 y rIFN- $\alpha$ 2 en la producción de IFN-gamma mediante sangre humana completa incubada con PHA durante 5 días. El  $\alpha$ -10 es el interferón-alfa más potente en este contexto provocando la secreción de IFN-gamma – crítico tanto para la inmunidad innata como adaptativa frente a virus, infecciones bacterianas intracelulares y en el control/eliminación de tumores.

La Figura 16 ilustra un alineamiento de secuencia de secuencias de aminoácidos de IFN-alfa10 (SEQ ID NO:4) e IFN-alfa14 (SEQ ID NO:5) y la secuencia híbrida SEQ ID NO:1 tratada en la presente memoria.

- 25 La Figura 17 muestra el efecto provocado por rIFN- $\alpha$ 14 y rIFN- $\alpha$ 2 en la producción de IL-17 mediante sangre humana completa incubada con PHA durante 5 días. El  $\alpha$ -14 es un inhibidor extremadamente potente de IL-17 en comparación con el IFN- $\alpha$ 2 disponible normalmente (las EC<sub>50</sub> para los dos subtipos son 100 y 10.000 IU/ml).

- 30 La Figura 18 muestra la inducción de interferón-gamma mediante los subtipos de interferón-alfa y en particular demuestra el efecto provocado por IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 14 e IFN- $\alpha$ 2 en la producción de IFN-gamma mediante sangre humana completa incubada con PHA durante 5 días. El  $\alpha$ -10 es el interferón-alfa más potente en este contexto provocando la secreción aumentada de IFN-gamma.

La Figura 19 muestra el efecto del híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 de la presente invención (SEQ ID NO:1) en la producción de IL-17 a partir de sangre humana completa en comparación con el efecto en IL-17 de un híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 descrito anteriormente. El híbrido de la presente invención demuestra una mayor reducción en IL-17.

Ejemplo 1- Identificación de los subtipos de interferón-alfa que son adyuvantes inmunológicos

- 35 Se administraron 50  $\mu$ g de ovoalbúmina y 10<sup>5</sup> IU de subtipos de interferón IFN- $\alpha$ 14, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\alpha$ 21, IFN- $\alpha$ 10, una "mezcla" de IFN (que incluye IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\alpha$ 8, IFN- $\alpha$ 21 y posiblemente IFN- $\alpha$ 17), IFN- $\alpha$ 8, Intrón A, MULTIFERON™ e IFN- $\alpha$ 1 en 50  $\mu$ l por medio de inyección intraperitoneal tres veces por semana a ratones BALB-c hembra, en grupos de 10.

- 40 Las concentraciones en suero de IgG1 en mg/ml (respuesta de Th2 - inmunidad humoral al antígeno de ovoalbúmina) e IgG2a en mg/ml (respuesta de Th1 – inmunidad mediada por células al antígeno de ovoalbúmina) se midieron por ELISA.

- 45 Las Figuras 1 y 2 muestran la producción del subtipo de IgG antiovoalbúmina en ratones BALB-c tratados con IFN- $\alpha$ 14, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\alpha$ 21, IFN- $\alpha$ 10, una "mezcla" de IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\alpha$ 8, IFN- $\alpha$ 21 y posiblemente IFN- $\alpha$ 17), IFN- $\alpha$ 8, Intrón A, MULTIFERON™, ovoalbúmina sola, ovoalbúmina más albúmina sérica humana (usada como un vehículo en los preparados de interferón) e IFN- $\alpha$ 1.

El inventor demostró que IFN- $\alpha$ 10 e IFN- $\alpha$ 14 mejoraron la producción de anticuerpos IgG2a significativamente lo que es indicativo de una respuesta inmunitaria de Th1 mejorada. El inventor también demostró que IFN- $\alpha$ 10 en particular mostró baja producción de anticuerpo IgG1 que es indicativo de la supresión de respuesta inmunitaria de Th2/Th17.

- 50 Ejemplo 2 – Identificación de la respuesta del anticuerpo en ratones BALB-c después de la administración de una composición que comprende una vacuna de la gripe y una dosis baja de interferón-alfa derivado de leucocitos (LDA1).

La vacuna de la gripe estándar se mezcló con una dosis baja (10<sup>5</sup> IU) de interferón alfa derivado de leucocitos (LDA1). Sin el interferón, se grabó una pequeña respuesta de anticuerpos antigripe en los ratones, aproximadamente 50 veces menor que con una inyección. Con el interferón-alfa, la respuesta de la vacuna administrada oralmente fue

exactamente la misma que con la vacuna inyectada. Se llevó a cabo una serie de inmunizaciones bucales usando un antígeno de proteína estándar (ovoalbúmina). Se compararon dos interferones, específicamente, el LDA1 y un subtipo aislado, IFN- $\alpha$ 14. Ambos produjeron una notable inmunización oral de los ratones, pero mientras el LDA1 dio una respuesta equilibrada, el IFN- $\alpha$ 14 dio solo una respuesta humoral significativa. La producción de IgG1 es indicativa de una respuesta de Th2/Th17 (inmunidad humoral) y la producción de IgG2a es indicativa de una respuesta de Th1 (inmunidad mediada por células).

Ejemplo 3 – La identificación de IFN-alfa como un adyuvante inmunológico oral

Se administraron 50  $\mu$ g de ovoalbúmina y  $10^5$  IU de subtipos de interferón, específicamente MULTIFERON™, IFN- $\alpha$ 14 glicosilado e IFN- $\alpha$ 14 no glicosilado, en dosis de 50  $\mu$ l, tres veces por semana a ratones BALB-c hembra por vía oral (bucal) y administración por inyección intraperitoneal.

Los controles usados fueron antígeno solo y Titermax – Titermax es una mezcla de compuestos usados en la generación de anticuerpos y vacunación para estimular el sistema inmunitario para reconocer un antígeno dado junto con la mezcla. Titermax es un adyuvante inmunitario desarrollado recientemente considerado como seguro en animales.

Las concentraciones en suero (mg/ml) de anticuerpos antiovoalbúmina IgG1 (indicativo de una respuesta de Th2/Th17) e IgG2a (indicativo de una respuesta de Th1) se cuantificaron por ELISA.

Se comparó la producción de anticuerpos IgG2a e IgG1 cuando se administró MULTIFERON™, IFN- $\alpha$ 14 glicosilado e IFN- $\alpha$ 14 no glicosilado (derivados de células CHO) tanto oralmente como por inyección (véanse las Figuras 3, 4, 5 y 6).

El inventor demostró que IFN- $\alpha$ 14 mostró una actividad adyuvante inmunológica pronunciada tanto oralmente como por inyección. No se vio una diferencia significativa entre los preparados glicosilados y no glicosilados.

El inventor también demostró que IFN- $\alpha$ 14 solo mejoró la producción de IgG2a asociada con las respuestas de Th1 mediante la ruta de administración oral. Por tanto IFN- $\alpha$ 14 es un activador de la inmunidad mediada por células cuando se administra oralmente.

MULTIFERON™ potenció las respuestas tanto de IgG1 como de IgG2a cuando se administraron tanto oralmente como por inyección, es decir, indujo las respuestas tanto de Th1 como de Th2 significativamente.

Ejemplo 4 – Determinación *in vitro* de la inhibición de la inmunidad humoral (Th2/Th17) mediante los subtipos de interferón-alfa – Análisis de linfocitos Th17 e interleuquina 17

Se estimuló un total de  $2 \times 10^6$  PBMC humanas con lipopolisacárido (LPS) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de alfa-IFN humano recombinante. Los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas y las concentraciones de IL-17 se midieron por ELISA.

Cultivo de células humanas

Se recogió sangre periférica humana de voluntarios sanos y se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de gradiente Lymphoprep (Pierce). Para los experimentos de PBMC, se sembraron  $2 \times 10^6$  PBMC por ml en placas de 24 pocillos y se estimularon con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma) o se sembraron  $2 \times 10^6$  PBMC por ml en placas de 24 pocillos y se estimularon con 5 mg/ml de anti-CD3 unido a la placa (clon: UCHT1) y 2,5 mg/ml de anti-CD28 (clon CD28.2). Se obtuvieron células T vírgenes (CD4+CD45RA) marcando magnéticamente y con disminución de células T no auxiliares y células T de memoria realizado según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Un total de  $1 \times 10^5$  células T vírgenes se estimularon en placas de fondo plano de 96 pocillos con anticuerpos anti-CD3 (clon UCHT1, 2,5 mg/ml) y con anti-CD28 (clon CD28.2, 2,5 mg/ml). Después de 48 h de cultivo, se añadieron 20 IU/ml de IL-2 humana recombinante (Peprotech) al cultivo.

Para la diferenciación de Th17 humanas, las células se suplementaron con anticuerpos anti-IL-4 y anti-IFN $\gamma$  neutralizantes (ambos de Peprotech) y con 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  recombinante y 50 ng/ml de IL-6 recombinante (ambos de Peprotech). Cuando fue necesario, se añadió IFN $\alpha$ 10/14 humano recombinante al cultivo. Después de 5 días de cultivo, las células se lavaron, se transfirieron en nuevas placas y se expandieron hasta el día 12 en presencia de 20 IU/ml de IL-2 recombinante.

ELISA y tinción de citoquina intracelular

La capacidad de producir IL-17 de las células Th17 estimuladas se evaluó mediante estimulación con 0,1 ng/ml de LPS o alternativamente puede evaluarse mediante la estimulación de células humanas con 1 mg/ml de anti-CD3 soluble (clon: OKT3) y forbol-12-13-dibutirato (PdBu). Las concentraciones de IL-17 humano en los sobrenadantes del cultivo celular se determinaron usando pares de anticuerpos y estándares de proteína disponibles comercialmente (R&D Systems). La absorción se determinó usando un lector de ELISA a 450 nm. Para la tinción intracelular de IFN $\gamma$  e IL-17 de ratón, las células T se estimulan con PMA e ionomicina durante 5 horas. Se añade Brefeldina A para las 3 h finales de cultivo. La tinción intracelular puede realizarse con un kit Cytotfix/Cytoperm de BD según las instrucciones

del fabricante. Las células se incuban con anti-IFN $\gamma$  marcado con isotiocianato de fluoresceína (clon: XMG1.2, BD Pharmingen) e IL-17A anti-ratón marcado con Alexa Fluor 647 (clon: eBio17B7, eBioscience). Después del lavado, las células se analizan inmediatamente usando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Resultados

- 5 Como se muestra por la Figura 7, se encontró que la inhibición de IL-17 ocurre en el orden IFN $\alpha$ 10>IFN $\alpha$ 14>IFN $\alpha$ 2a. P< 0,05 (Figura 7).

Ejemplo 5 – Determinación *in vitro* de la inhibición de la inmunidad humoral (Th2/Th17) mediante subtipos de interferón-alfa - Análisis de células Th2 y citoquinas asociadas

Antecedentes de CRTH2

- 10 CRTH2 (molécula homóloga del receptor quimioatrayente expresado en células Th2) es un receptor acoplado a proteínas G expresado por los linfocitos Th2, eosinófilos y basófilos. El receptor media la activación y quimiotaxis de estos tipos de células en respuesta a la prostaglandina D2 (PGD2), el principal prostanoides producido por los mastocitos. PGD2 se libera mediante la desgranulación de los mastocitos en la fase inicial de las reacciones mediadas por IgE. Se cree que este proceso también ocurre en el sitio de inflamación, tal como la mucosa nasal y bronquial.
- 15 Mediante la interacción con CRTH2, se cree que PGD2 media la captación y activación de tipos de células que llevan CRTH2 al sitio de la reacción alérgica, amplificando y manteniendo por tanto la inflamación alérgica. En la mucosa nasal y bronquial, se cree que esta cascada proinflamatoria comienza durante la denominada respuesta alérgica tardía que se da de 3 a 9 horas después del desafío del alérgeno. La interacción entre PGD2 y CRTH2 contribuiría, por tanto, a la denominada "polarización de Th2", con la consecuente producción de citoquinas de Th2 y las típicas características eosinófilas y basófilas de la inflamación.
- 20

IFN $\alpha$  inhibe el desarrollo de Th2 CD4+ humanas

Las células CD4+/CD45RA+ humanas purificadas se activaron con anti-CD3/anti-CD28 unidos a la placa en condiciones de citoquinas definidas. La inducción de la expresión de CRTH2 se evaluó por citometría de flujo. Todas tuvieron P>0,05, por encima de 100 IU de IFN en comparación con IL-4 solo.

- 25 Sujetos humanos

Se recogió sangre periférica de donantes adultos sanos y las células se purificaron como se indica a continuación.

Cultivos de células T y análisis

- 30 Se obtuvo sangre periférica de donantes adultos hombres sanos y las células T CD4+/CD45RA+ vírgenes se purificaron (>92 %) a partir de las capas leucocitarias mediante separación con perlas magnéticas (BD Biosciences, EE.UU.). Las células CD4+ se activaron con anti-CD3/anti-CD28 unidos a la placa e IL-2 (50 U/ml) en medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía FCS al 10 %, en presencia de IL-4 recombinante humano recombinante (R&D Systems, EE.UU.), a una concentración de 20 ng/ml durante 7 días. El análisis por citometría de flujo se realizó con hCD294 (molécula homóloga del receptor quimioatrayente expresada en células Th2 [CRTH2])-Alexa 647 (BD Biosciences).

- 35 Resultados

- 40 En seres humanos, el receptor de PGD2, CRTH2, se expresa de forma selectiva en células Th2 y se induce por IL-4 durante el desarrollo de Th2. IL-4 promovió el desarrollo de células que expresaban CRTH2. Sin embargo, como se muestra en la Figura 8 todos los IFN-alfa bloquearon notablemente la expresión de CRTH2 dirigida por IL-4, de una manera dependiente de la dosis en el orden IFN $\alpha$ 10>IFN $\alpha$ 14>IFN $\alpha$ 2a, apoyando así el concepto de que estas citoquinas reprimen la inmunidad de Th2 (humoral), pero son reconocidas como potentes activadores de la inmunidad asociada a Th1.

Como se muestra en la Figura 12, se probó el efecto de rIFN- $\alpha$ 14 en la producción de IL-17 en sangre humana incubada con LPS durante 48 h.

- 45 Se incubó sangre humana completa sin (columnas abiertas) o con 1  $\mu$ g/ml de LPS (columnas con líneas entrecruzadas) en ausencia y presencia de un intervalo de concentraciones de rIFN- $\alpha$ 14 (0-1.000 IU/ml) durante 48 h a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire, en una incubadora humidificada. El plasma se recogió por centrifugación y los niveles de IL-17 se determinaron por ELISA.

La Figura 12 indicó una respuesta a la dosis a IFN- $\alpha$ 14 en donde 1 mg = 10<sup>-8</sup> IU.

- 50 Como se muestra en la Figura 13, se probó el efecto de rIFN- $\alpha$ 14 en la producción de IL-17 en las PBMC humanas incubadas con LPS durante 48 h.

- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas, un componente crítico en el sistema inmunitario, se aislaron de la sangre humana completa mediante centrifugación en gradiente de densidad. Se incubaron  $2 \times 10^6$  PBMC sin (columnas abiertas) o con 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS (columnas con líneas entrecruzadas) en ausencia y presencia de un intervalo de concentraciones de rIFN- $\alpha$ 14 (0-1.000 IU/ml) durante 48 h a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire, en una incubadora humidificada. Los niveles de IL-17 en el sobrenadante se determinaron por ELISA.
- 5 Como se indica por la Figura 13, se encontró que las concentraciones crecientes de rIFN- $\alpha$ 14 reducen la IL-17 en células tanto no tratadas como tratadas con LPS.
- Como se muestra en la Figura 14, se probó el efecto de rIFN $\alpha$ 10, rIFN $\alpha$ 14 y rIFN2 en la producción de IL-17 mediante sangre completa incubada con fitohemaglutinina (PHA) durante 5 días.
- 10 Se diluyó sangre humana completa 1/10 con medio de cultivo RPMI 1640 y se incubó sin o con 100  $\mu\text{g/ml}$  de PHA en ausencia y presencia de un intervalo de concentraciones de rIFN- $\alpha$ 14, rIFN- $\alpha$ 10 y rIFN- $\alpha$ 2 durante 5 días a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire, en una incubadora humidificada. Al final de este periodo, los sobrenadantes se aspiraron y los niveles de IL-17 en los sobrenadantes se midieron por ELISA. Los valores representan la media  $\pm$  eem, para n = 3 incubaciones. El análisis estadístico y los valores de IC50 se determinaron usando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., California, EE.UU.).
- 15 Como se indica en la Figura 14 el suministro de rIFN- $\alpha$ 14 a mayores concentraciones (100-1000 IU/ml) provocó una mayor disminución en IL-17 que el suministro de IFN- $\alpha$ 2 o IFN- $\alpha$ 10. Se considera que rIFN- $\alpha$ 14 es el interferón más potente probado en la reducción de los niveles de IL-17.
- 20 Se lograron resultados similares como se muestra en la Figura 17. Aquí el efecto de rIFN $\alpha$ 14 y rIFN2 en la producción de IL-17 mediante sangre completa incubada con fitohemaglutinina (PHA) durante 5 días se probó usando la misma metodología. Como se indica en la Figura 17 el suministro de rIFN- $\alpha$ 14 a mayores concentraciones (100-1000 IU/ml) provocó una mayor disminución en IL-17 que el suministro de IFN- $\alpha$ 2. Se considera que rIFN- $\alpha$ 14 es el interferón más potente probado en la reducción de los niveles de IL-17.
- 25 Como se muestra en la Figura 15, el efecto de rIFN $\alpha$ 10, rIFN $\alpha$ 14 y rIFN $\alpha$ 2 en la producción de IFN-gamma mediante sangre completa incubada con PHA durante 5 días.
- 30 La sangre humana completa se diluyó 1/10 con medio de cultivo RPMI 1640 y se incubó sin o con 100  $\mu\text{g/ml}$  de PHA en ausencia y presencia de un intervalo de concentraciones de rIFN- $\alpha$ 10, rIFN- $\alpha$ 14 y rIFN- $\alpha$ 2 durante 5 días a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire, en una incubadora humidificada. Al final de este periodo los sobrenadantes se aspiraron y los niveles de IFN-gamma en los sobrenadantes se midieron por ELISA. Los valores representan la media  $\pm$  eem, para n = 3 incubaciones, el plasma se recogió por centrifugación y los niveles de IFN-gamma se determinaron por ELISA. Los valores representan la media  $\pm$  eem, para n = 3 incubaciones.
- 35 Se determinó que rIFN- $\alpha$ 10 fue el más eficaz de los interferones probados a niveles de promoción de IFN-gamma. Se ha sugerido anteriormente que IFN-gamma es importante para proporcionar un efecto anticancerígeno.
- Se lograron resultados similares como se muestra en la Figura 18. Aquí el efecto de rIFN $\alpha$ 14 y rIFN2 en la producción de IFN-gamma mediante sangre completa incubada con fitohemaglutinina (PHA) durante 5 días se probó usando la misma metodología. Como se indica en la Figura 18, el suministro de rIFN- $\alpha$ 10 provocó un mayor aumento en el IFN-gamma que el suministro de IFN- $\alpha$ 2. Se considera que rIFN- $\alpha$ 10 es el interferón más potente probado en el aumento de los niveles de IFN-gamma.
- 40 Como se muestra en la Figura 19, el efecto del híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 de la presente invención (SEQ ID NO:1) en la producción de IL-17 a partir de sangre humana completa se comparó con el efecto en IL-17 del híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 descrito en la patente internacional PCT/GB2015/050717.
- 45 Se diluyó sangre humana completa 1/10 con medio de cultivo RPMI 1640 y se incubó con PHA (100  $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia de un intervalo de concentraciones del híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 de la presente invención (IFN alfa-híbrido 1) o el híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 descrito en la patente internacional PCT/GB2015/050717 (IFN alfa-híbrido 2) durante 5 días a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire en una incubadora humidificada. Al final de este periodo se recogieron los sobrenadantes y los niveles de IL-17 se midieron por ELISA. Los valores representan media  $\pm$  eem, para n = 3 incubaciones. P < 0,05 para todos los puntos de los datos entre los dos híbridos excepto 100 IU/ml, que no fue significativo. Los diamantes rojos indican híbrido 1 IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 y los círculos azules indican el híbrido 2 IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14.
- 50 Se determinó que el híbrido IFN- $\alpha$ 10-IFN- $\alpha$ 14 de la presente invención demuestra una mayor reducción en IL-17.
- Ejemplo 6 – Efectos de los interferones alfa-14 y alfa-10 humanos en leucocitos mononucleares humanos no estimulados y activados procedentes de sujetos normales.

## ES 2 971 046 T3

Tabla 1: Sinopsis de estimaciones\* de 400 interleuquinas, quimioquinas y marcador de proteína después de tratamiento con IFN- $\alpha$ 10/14 de células mononucleares humanas

Analito	Número de veces de células no estimuladas/tratadas con alfa-IFN		Número de veces de células estimuladas con PHA/tratadas con alfa-IFN estimuladas con PHA	
	Alfa-14	Alfa-10	Alfa-14	Alfa-10
Citoquinas				
IL-1a	0	+23	1	+2
IL-1b	0	+70	-2	1
IL-1 (F5 a F10)	0	0	0	0
IL-2	0	0	+7	+4
IL-3	0	0	-11	x
IL-4	0	0	1	-3
IL-5	0	0	-420	1
IL-6	-19	+1000	1	1
IL-7	0	0	0	0
IL-8	1	+100	1	1
IL-9	0	0	0	0
IL-10	0	+5	+2	+2
IL-11	0	0	0	0
IL-12 p40	0	+350	0	+1
IL-12 p70	0	0	+11	0
IL-13	0	0	-5	1
IL-15	0	0	0	0
IL-16	1	1	1	1
IL-17	0	0	-43	-5
IL-18	0	0	0	0
IL-20	0	0	0	0
IL-21	0	x	0	x
IL-23	+4	+3	+6	1
IL-24	0	0	0	0
IL-27	0	1	0	1
IL-28	0	0	0	0
IL-29	0	0	0	0
IL-31	0	0	0	0
IL-33	0	0	0	0
IL-34	0	0	0	0
IFN-gamma	0	0	+600	+3000
G-CSF	-1500	+20	1	1

## ES 2 971 046 T3

Analito	Número de veces de células no estimuladas/tratadas con alfa-IFN		Número de veces de células estimuladas con PHA/tratadas con alfa-IFN estimuladas con PHA	
GM-CSF	0	0	0	1
MARCADORES DE CD				
CD14	+2	+2	+2	+2
CD23	-22	1	-850	-3
CD30	0	0	0	0
CD40	+2	+2	1	1
CD97	-2	1	-5	-5
CD152 (CTLA-4)	1	0	-2	0
CD154	1	x	+2	x
CD163	-2	1	-2	1
CD200	1	1	-1	1
CD223 (LAG3)	0	0	-3	+3
QUIMIOQUINAS Y PROTEÍNAS SELECCIONADAS				
CXCL1 (GROa)	-7600	-12	-3400	1
CXCL5 (ENA-78)	-6	+16	-32	-3
CXCL10 (IP10)	+460	+10	+1	1
CCL1 (I-309)	0	1	-24	1
CCL7 (MCP-3)	-2	-200	-149	1
CCL16 (HCC-4)	0	1	-100	1
CCL20 (MIP-3a)	-69	+40	-2	1
MMP-2 (colagenasa)	+600	+200	+450	+500
MMP-10 (proteoglicanasa)	-121	1	-2	-2
ACE-2	+12	0	+6	0
PDGF Ralfa	-4	-7	-1	-3
Tie-1	-170	-200	-8	-280
ICAM-1	-1	+2	-3	1
TREM-1	+5	-2	+2	-5
E-SELECTINA	1	-7	1	-2

0 = analito no detectado

1 = analito presente pero sin efecto de alfa-10/14

x = no determinado

El efecto positivo de alfa-10/14 se denota por un +

5 El efecto negativo de interferón alfa-10/14 se denota por un –

\* El sistema de ensayo usado fue RayBio Quantibody Human Cytokine Array 9000 (QAH-CAA-9000 proporcionado por Insight Bio Ltd.). Este es un ELISA múltiple, que mide las concentraciones de 400 proteínas en un único proceso de ensayo, incluyendo marcadores pro-y anti-inflamatorios, interleuquinas, marcadores de cáncer, quimioquinas, factores de crecimiento y moléculas relacionadas. Los leucocitos mononucleares de sangre periférica humana (donantes de sangre normales) se trataron con 10 ng/ml de IFN- $\alpha$ 14/10 durante 4 horas antes de un ensayo. Las pruebas se realizaron en 2 grupos de células

a) no activadas y

b) activadas con PHA (fitohemaglutinina) para inducir un alto nivel de estimulación.

Efectos de alfa-14 en células inmunitarias activadas

Se cuantificaron más de 30 interleuquinas pero solo 6 mostraron cambios significativos en las células activadas, indicando la naturaleza dirigida y muy específica de la interacción del alfa-14 con la respuesta inmunitaria humana.

La interleuquina 2 aumentó en 7 veces, IL-12p70 +11 veces y el interferón- $\gamma$  +600 veces, indicando una fuerte proliferación de la respuesta de Th1 (mediada por células) mientras que un aumento de 6 veces en IL-23 es acorde con su papel en la inmunidad mediada por células y su asociación con IL-12.

Se observaron disminuciones muy grandes con IL-3 e IL-5 de 11 y 420 veces respectivamente. Estas moléculas están asociadas con la producción de células mieloides y la producción de inmunoglobulina (inmunidad humoral). IL13 también disminuyó en 5 veces, lo que es importante ya que esta interleuquina está implicada en la secreción de IgE, el anticuerpo de la alergia. También fue crucial la disminución de 43 veces en IL-17. Esta citoquina reguladora está aumentada en las enfermedades autoinmunes, la inmunidad humoral (mediada por anticuerpos) y la estimulación de la inflamación mediante la atracción de neutrófilos.

CD23 o Fc $\epsilon$ RII es un receptor para el anticuerpo de la alergia, IgE, y se presenta ampliamente en diferentes tipos de leucocitos. La activación de CD23 controla la producción de IgE y se ven aumentos significativos en pacientes con trastornos alérgicos. Este importante marcador se disminuyó en 850 veces, en las células activadas, mediante alfa-14.

Efectos de IFN alfa-14 en células inmunitarias no activadas

IL-6 disminuyó 19 veces. Esta citoquina estimula la síntesis de proteína hepática en respuesta a los traumas, provoca aumentos en la temperatura corporal y está implicada en la contracción muscular. Sin embargo, su papel esencial es en la inmunidad mediada por anticuerpos que es importante en la alergia.

G-CSF también se disminuyó en más de 1000 veces. Esta molécula puede estimular la médula ósea para aumentar el número de neutrófilos que podrían estar implicados en la inflamación. Al mismo tiempo la secreción de la quimioquina CXCL1 se reprimió en 7.500 veces – esto evita que atraiga neutrófilos al sitio de una respuesta y que provoque inflamación. También la concentración de la quimioquina, CXCL10, se aumentó en 460 veces – su papel es atraer los linfocitos T a una respuesta inmunitaria en proceso.

Efectos de IFN alfa-10 en células inmunitarias activadas

Como con alfa-14, alfa-10 solo reguló un número pequeño de citoquinas de todos los números evaluados. Mención particular fueron los aumentos de IL-2 e interferón- $\gamma$  de 4 y 3000 veces respectivamente lo que indica un cambio a inmunidad mediada por células. Los niveles de IL-17 cayeron en 5 veces, confirmando este cambio en el equilibrio.

La gran reducción en CD23 no fue evidente con alfa-10 y sus efectos principales en las quimioquinas fueron en Tie-1 (tirosina quinasa crucial en el proceso de remodelación linfática) y TREM-1 (activación de neutrófilos) donde provocó reducciones de 280 y 5 veces respectivamente.

Efectos de alfa-10 en células inmunitarias no activadas

Alfa-10 mostró una actividad significativa en este contexto mejorando IL-1 $\alpha/\beta$  en hasta 70 veces e IL-6, 8, 10, 12 (p40) en 1000, 100, 5 y 350 veces acorde con un fuerte apoyo para la inmunidad mediada por células sobre la inmunidad humoral. G-CSF se mejoró también en 20 veces en contraste total con alfa-14.

Se grabaron pocos cambios con los marcadores de CD pero CXCL1 se redujo en 12 veces mientras que CXCL5 y 10 aumentaron en 16 y 10 veces y CCL20 se elevó en 40 veces. Sin embargo, CCL7 y Tie-1 cayeron 200 veces cada uno. Estos resultados son acordes con un movimiento significativo hacia la inmunidad mediada por células.

Resultado

Las bajas dosis de interferón-alfa 14 y 10 han modificado la síntesis de citoquinas para mejorar la inmunidad mediada por células a expensas de la inmunidad mediada por anticuerpos. Esto sería invaluable en la mejora de las actividades

de ciertas vacunas donde una respuesta inmunitaria humoral puede ser perjudicial p. ej., vacunas virales y para el cáncer.

Además los resultados son totalmente acordes con el conocimiento general de que la alergia puede aliviarse cambiando la respuesta inmunitaria a un alérgeno desplazando una respuesta de anticuerpos a una respuesta celular.

5 Dicho cambio sería parte de la inmunidad adquirida y por tanto, potencialmente, una solución a largo plazo para desarrollar tolerancia.

Además, el alfa-14 reprimió significativamente la capacidad de los leucocitos para hacer/utilizar IgE y por tanto inhibió los efectos inmediatos de una reacción alérgica, junto con la reducción de elementos inflamatorios de la inmunidad mientras potenciaba la implicación de más elementos de control.

**REIVINDICACIONES**

1. Un subtipo de interferón alfa que comprende la secuencia de aminoácidos descrita por SEQ ID NO:1.
- 5 2. El subtipo de interferón alfa según la reivindicación 1 para usar en el tratamiento y/o profilaxis de una condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17, en donde la condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17 se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, alergia o una condición alérgica asociada y cáncer.
- 10 3. El subtipo de interferón alfa para usar según la reivindicación 2 en donde la enfermedad inflamatoria es enfermedad inflamatoria intestinal; preferiblemente en donde la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
4. El subtipo de interferón alfa para usar según la reivindicación 2 en donde la condición donde se desean una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17 es alergia o una condición alérgica asociada; preferiblemente en donde la alergia es una alergia alimentaria o una condición alérgica asociada.
- 15 5. El subtipo de interferón alfa para usar según la reivindicación 2 en donde el cáncer es cáncer de células hepáticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de piel, melanoma, cáncer genitourinario, cáncer de próstata, cáncer de células renales o cáncer de vejiga.
6. El subtipo de interferón alfa para usar según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 en donde el al menos un subtipo de interferón alfa se proporciona oralmente para la administración.

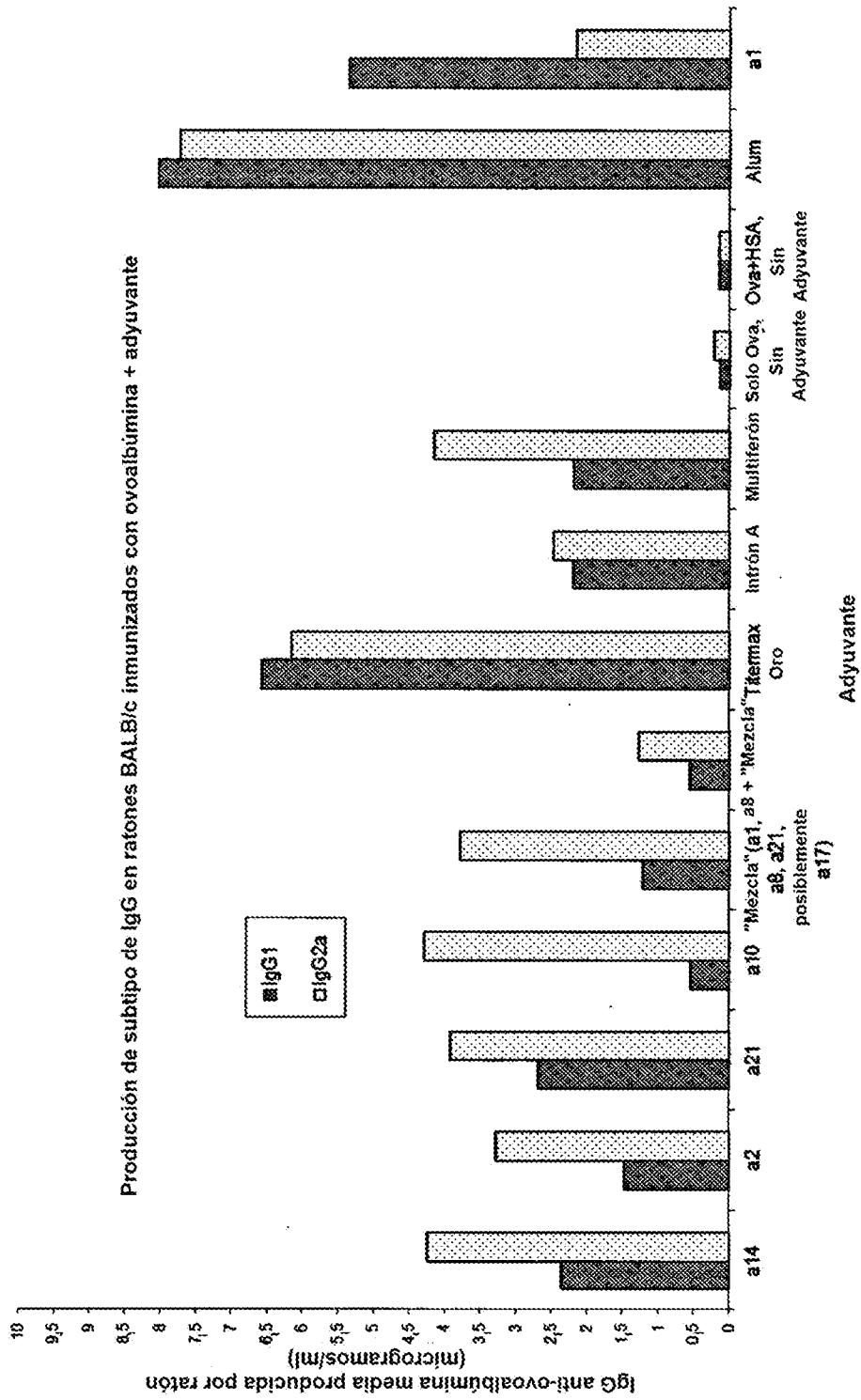


Figura 1

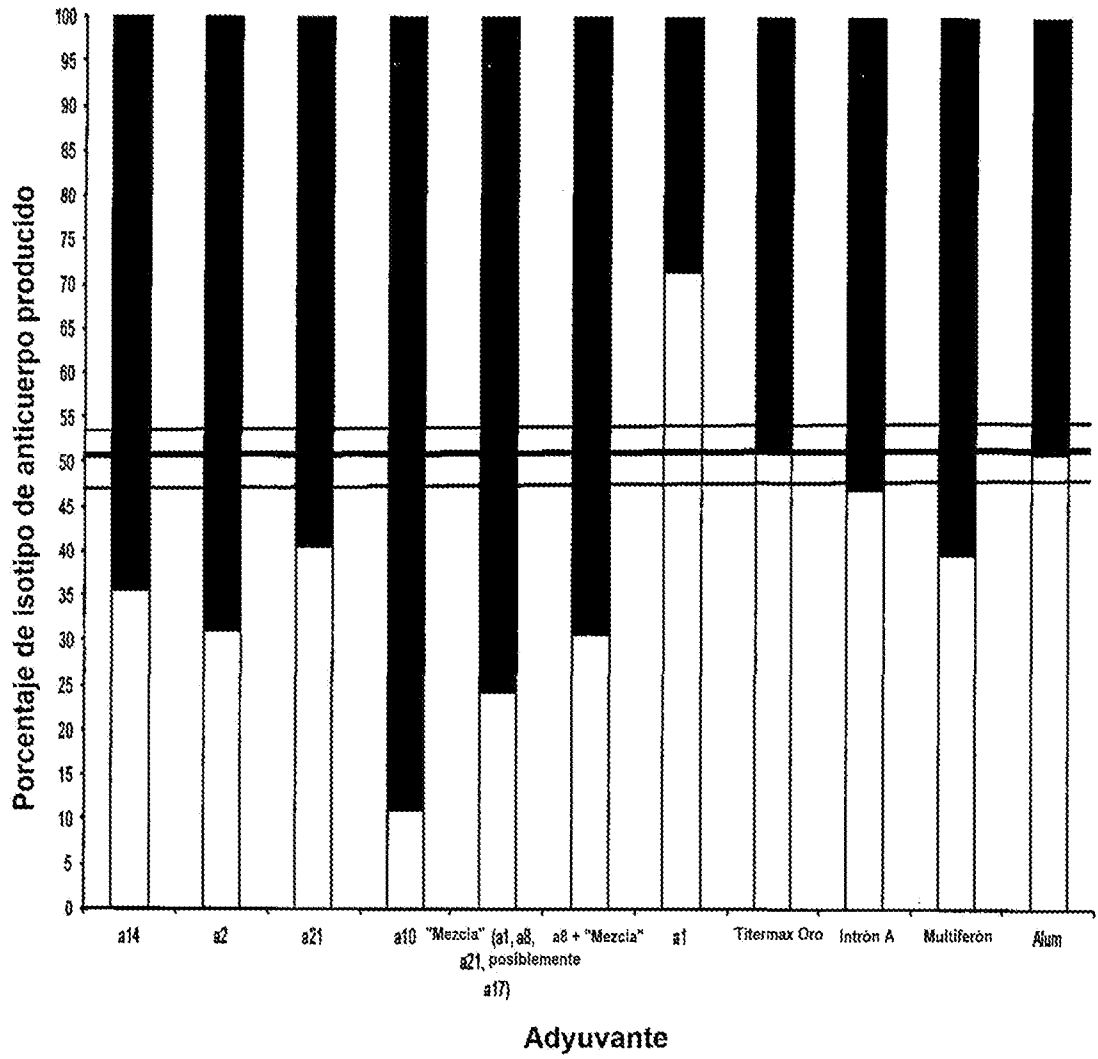


Figura 2

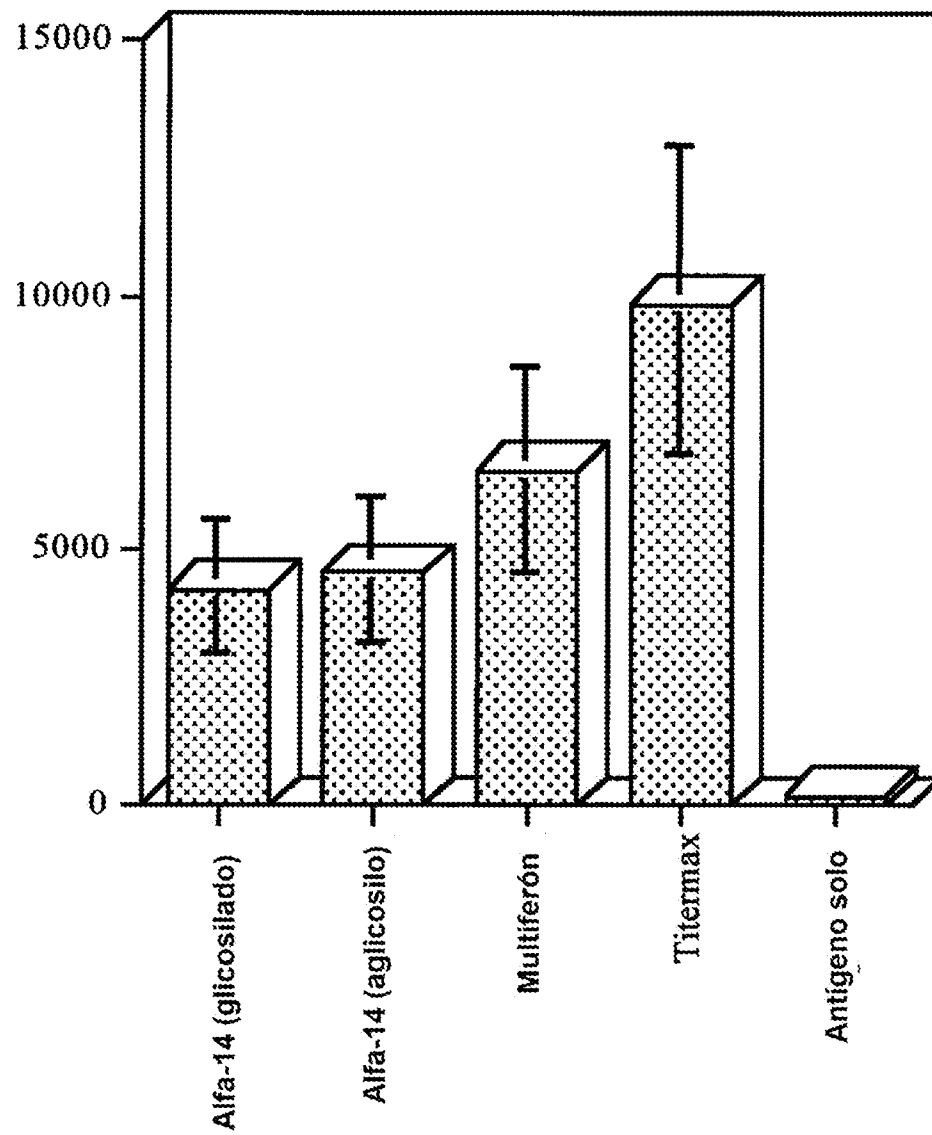


Figura 3

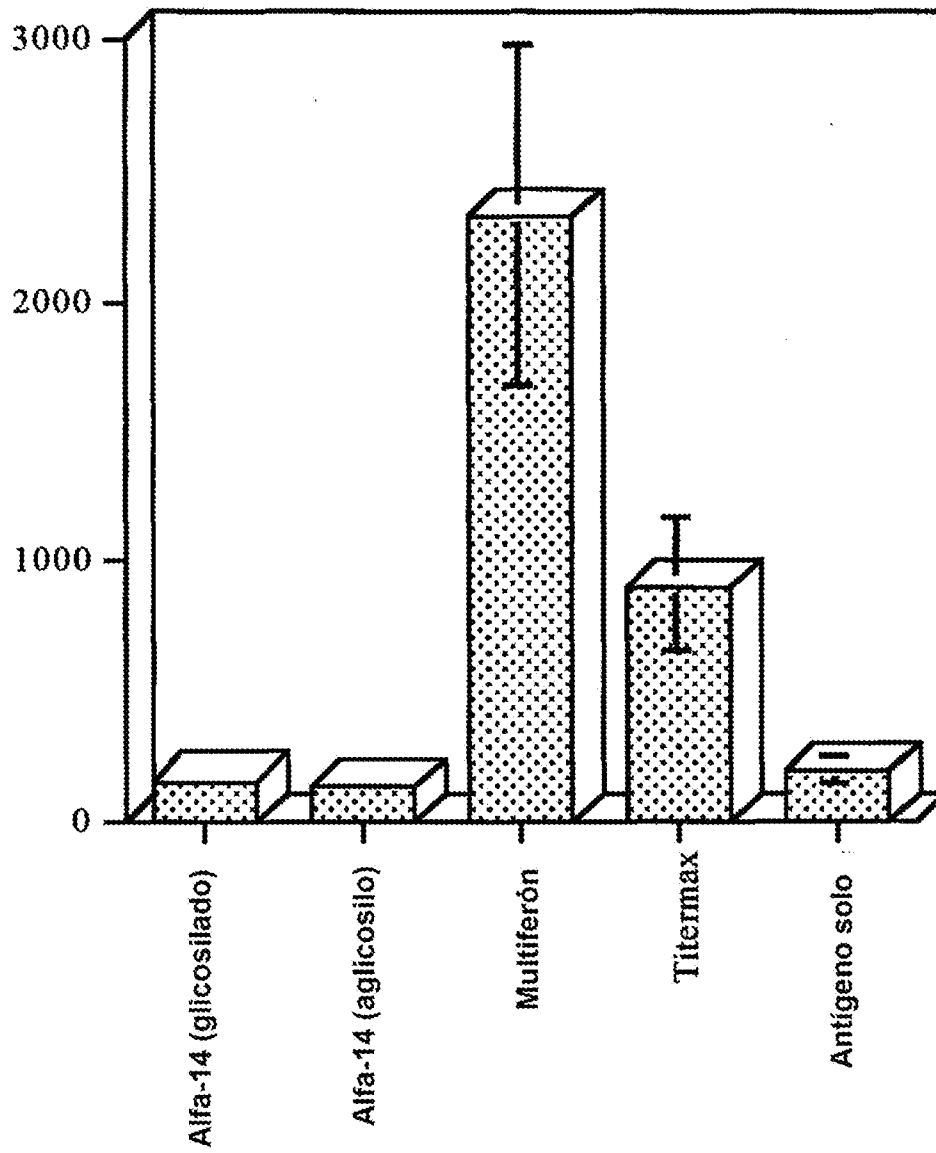


Figura 4

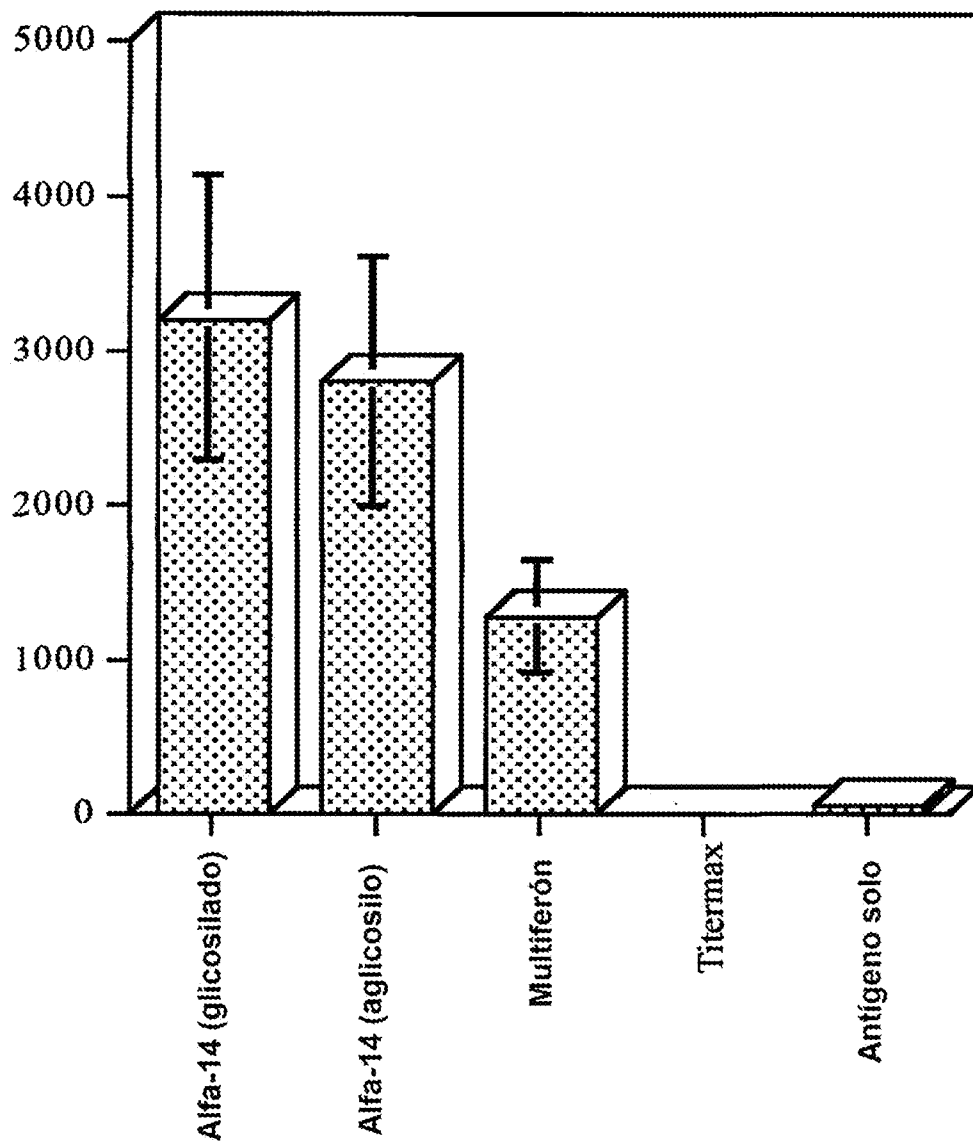


Figura 5

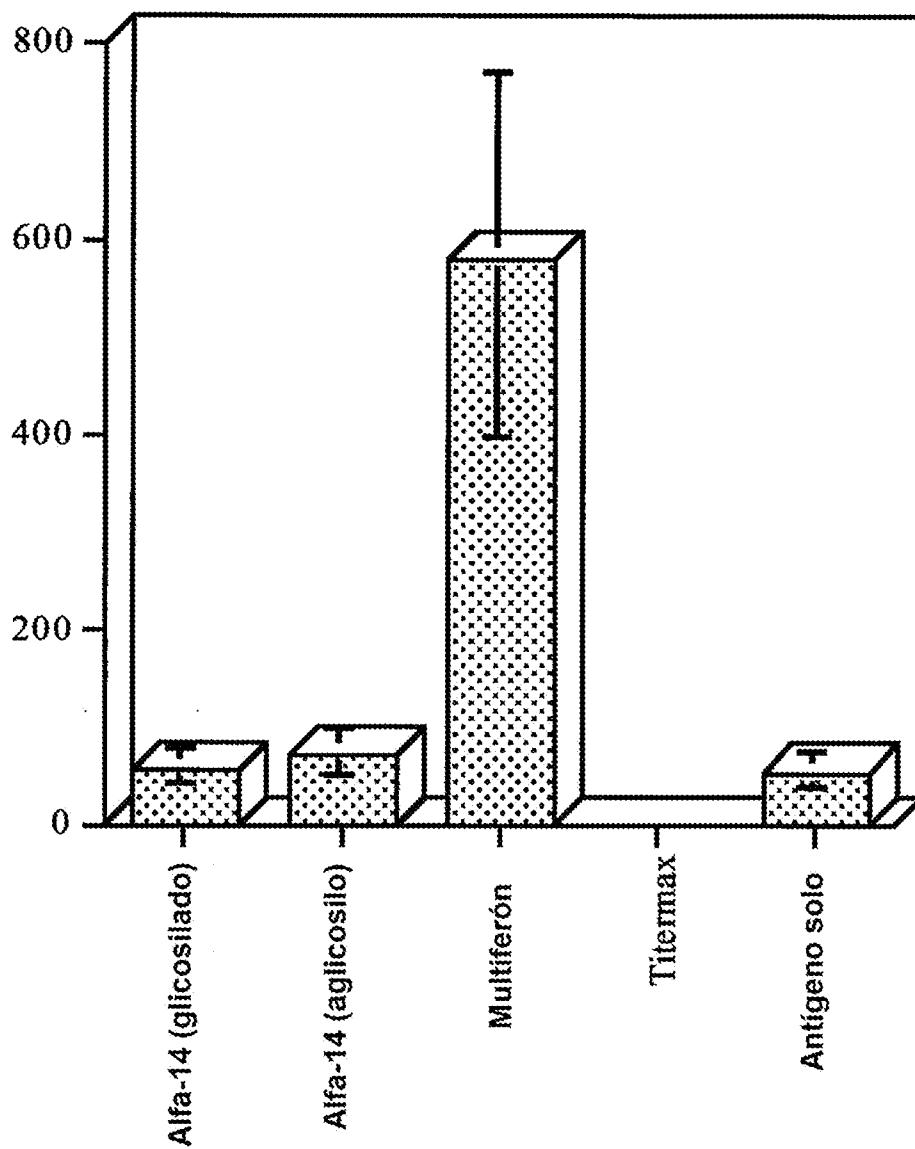


Figura 6

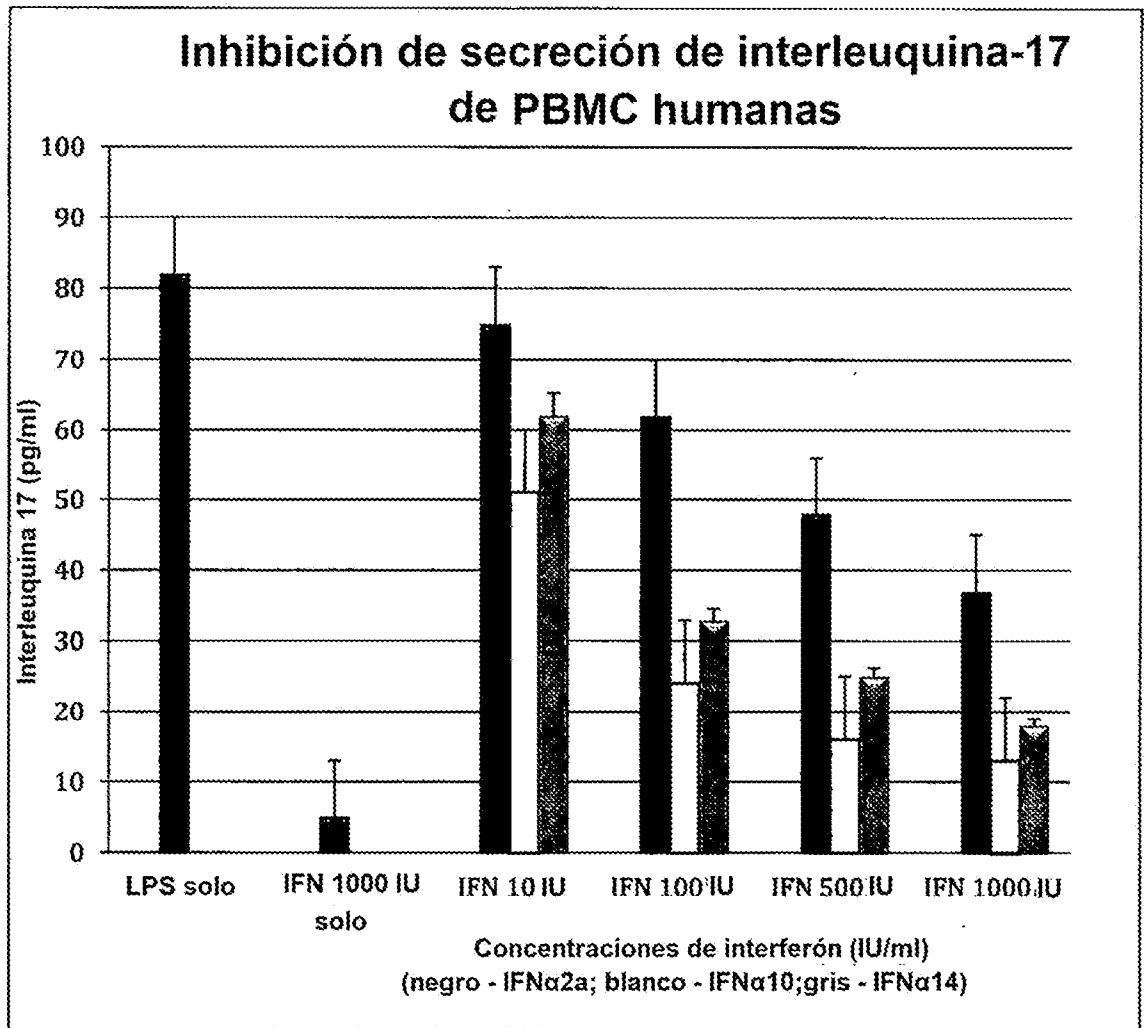


Figura 7

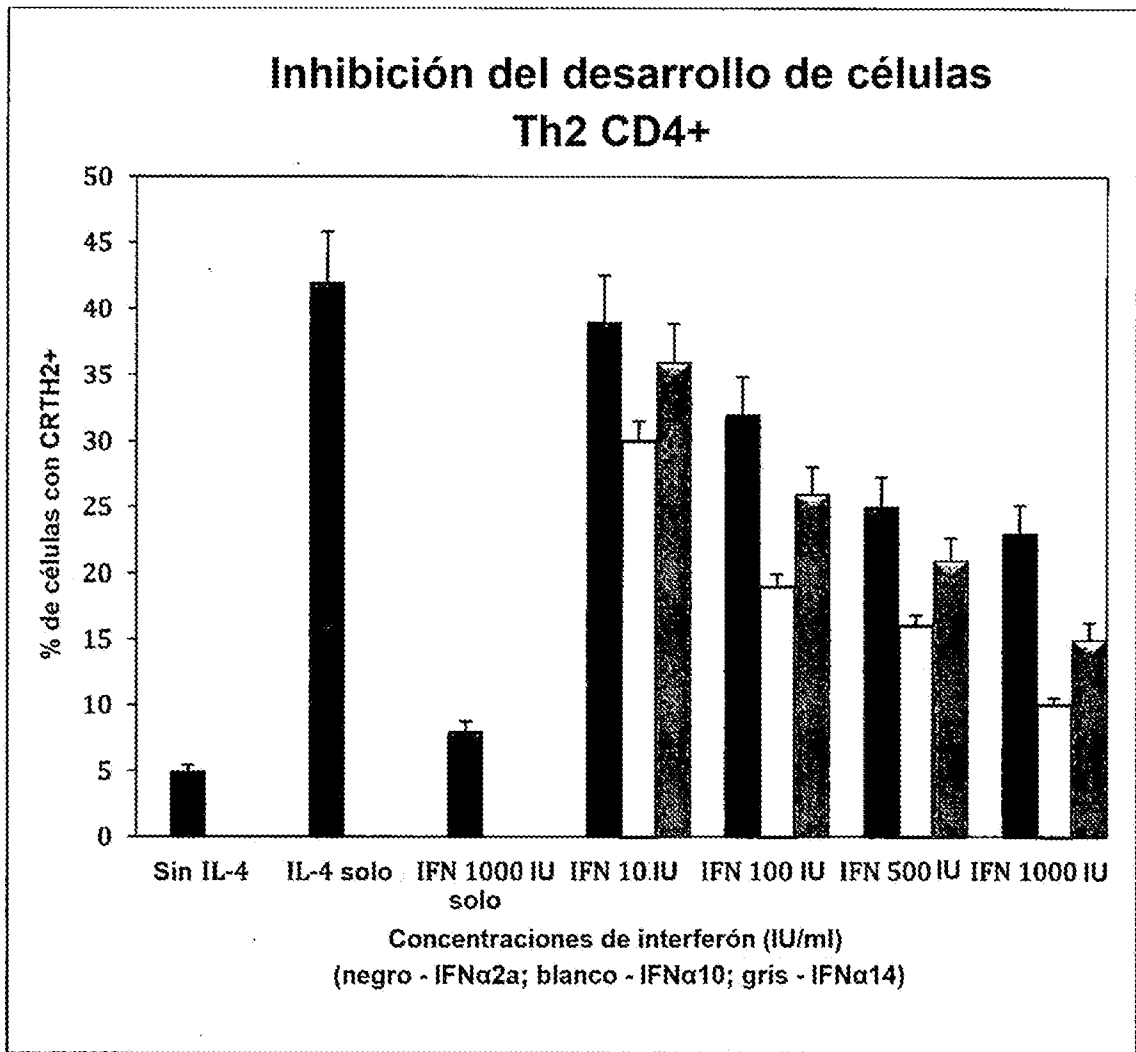


Figura 8

CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCCLKDRHDFRIPQEEFD  
GNQFQKAQAISVLHEM

MQQTFNLFSTKNSSAAWDETLLLEKFYIELFQQMNDLEACVIQEV  
GVEETPLMNEDSILAV

KKYFQRITLYLIERKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKRLRRK  
D

(SEQ ID NO: 1)

Figura 9

Traducción inversa de la secuencia de proteínas de SEQ ID NO:1 cuando se usa una tabla de uso del codón de E. coli

ATGTTGTGATCTGCCGACACCCATAGCCTGGGTAATCGTCGTGCACTGATTCTGCTGGGTCA  
GATGGGTTCGATTTAGCCCGTTTAGCTGTCTGAAAGATCGTCATGATTTTCGTATTCGCAAG  
AGGAATTTGATGGCAACCAGTTTCAGAAAGCACAGGCAATTAGCGTTCTGCATGAAATGATG  
CAGCAGACCTTTAACCTGTTTAGCACCAAAAATAGCAGCGCAGCATGGGATGAAACCCTGCT  
GGAAAATTCTATATCGAACTGTTTCAGCAGATGAACGATCTGGAAGCATGTGTTATTCAAG  
AAGTTGGCGTTGAAGAAACACCGCTGATGAATGAAGATAGCATTCTGGCAGTGAAAAAATAC  
TTTCAGCGCATTACCCTGTATCTGATCGAACGTAATATAGCCCGTGTGCATGGGAAGTTGT  
TCGTGCAGAAATTATGCGTAGCCTGAGCTTTAGCACCAATCTGCAAAAACGTCTGCGTCGCA  
AAGATTAATAA

(SEQ ID NO: 2)

Figura 10

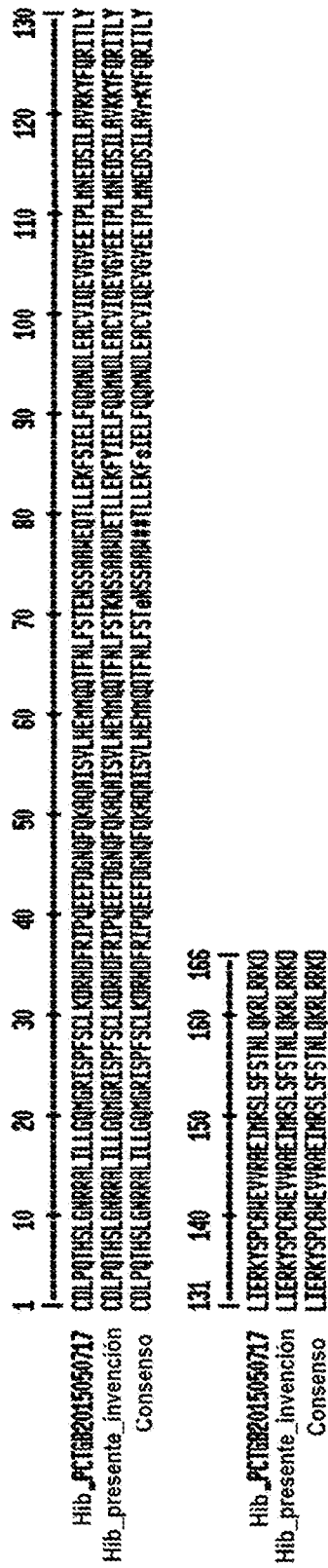


Figura 11

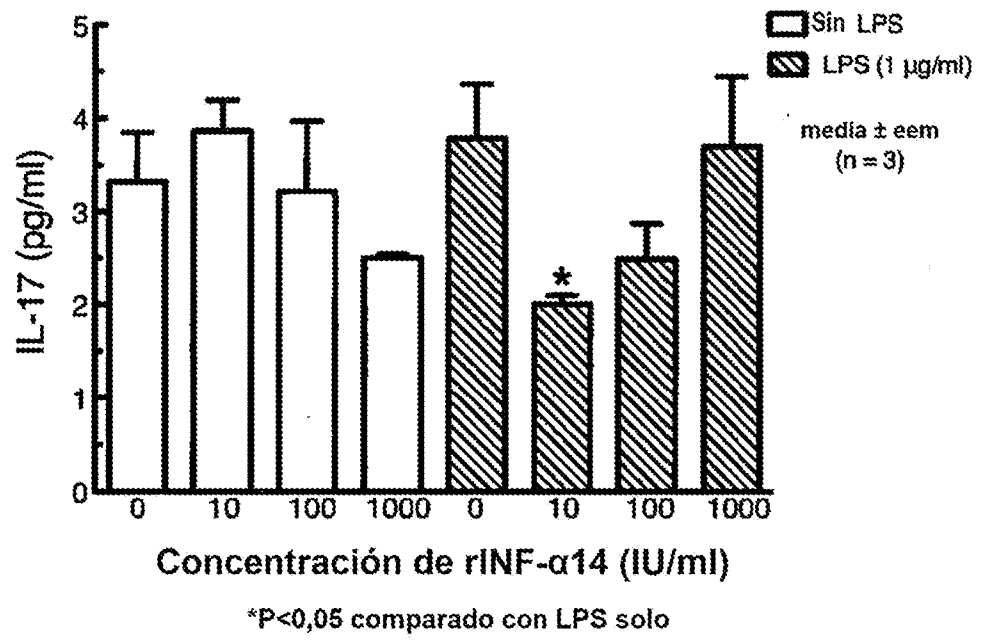


Figura 12.

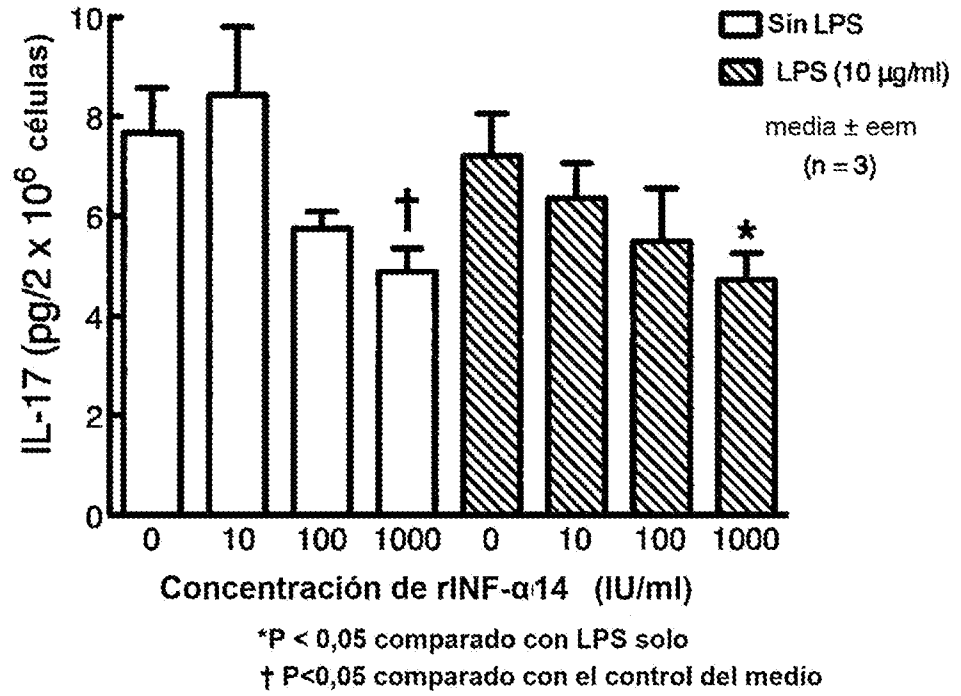


Figura 13

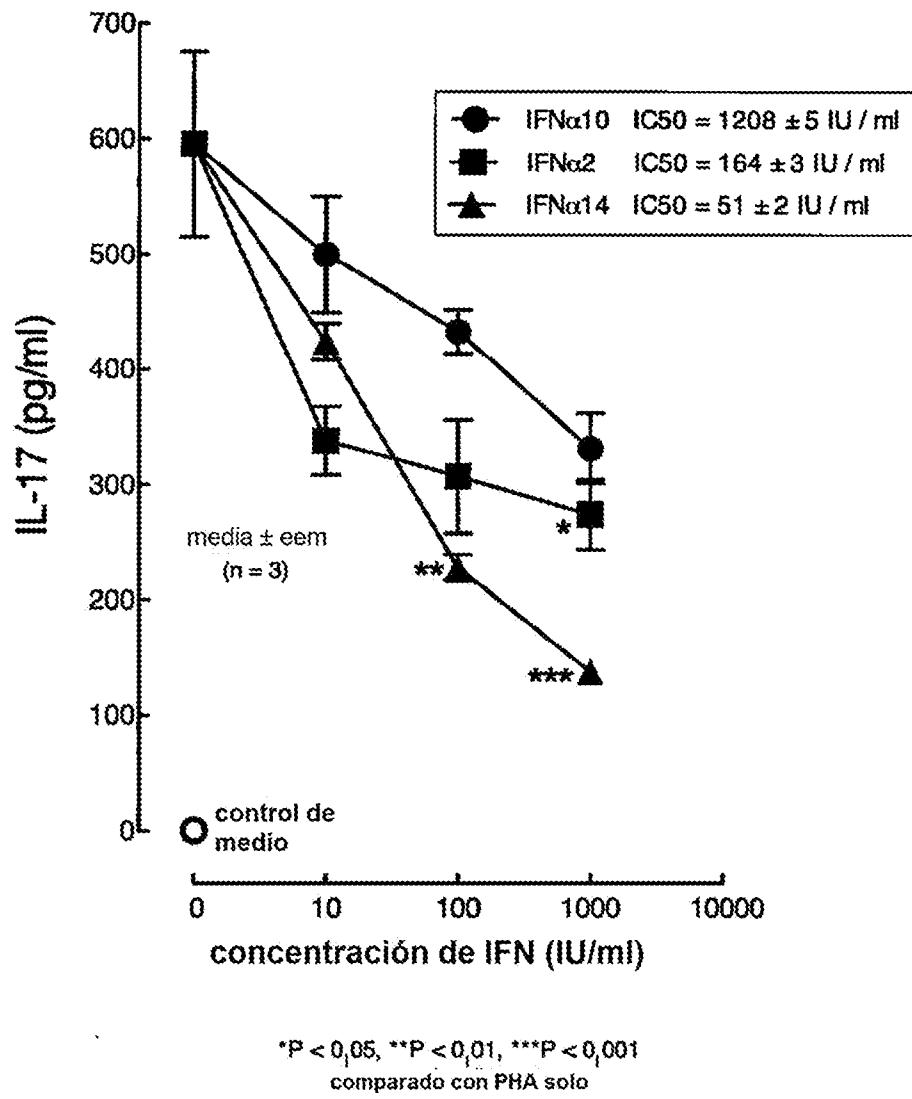


Figura 14

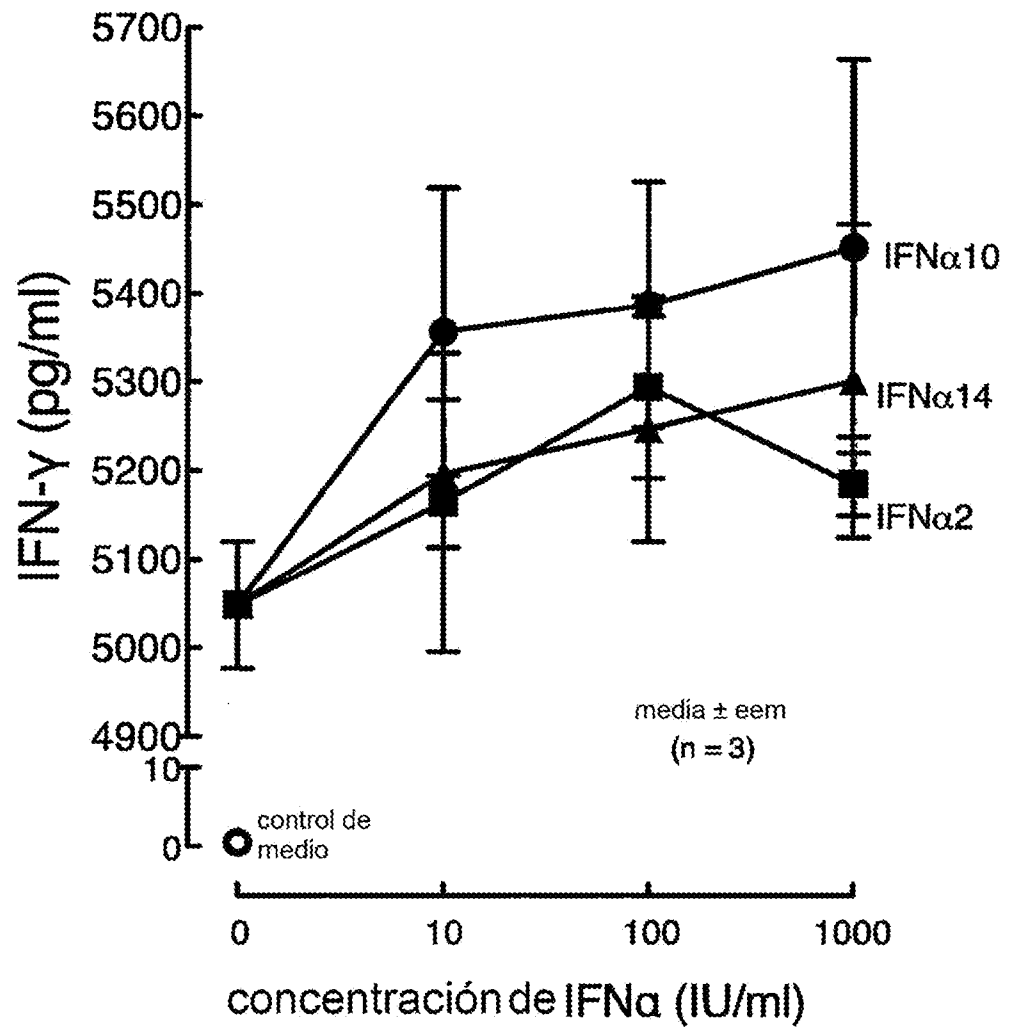


Figura 15

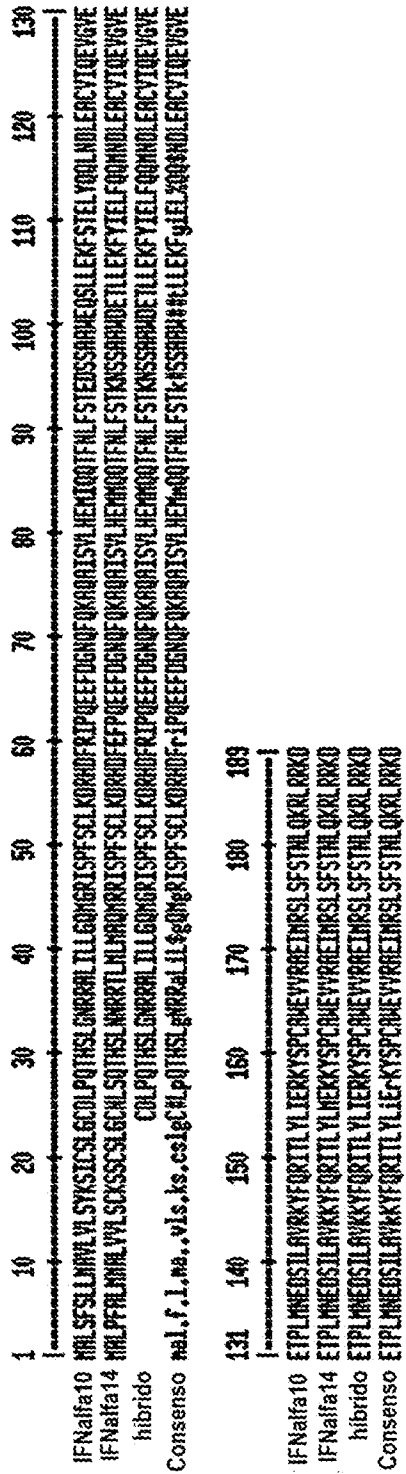


Figura 16

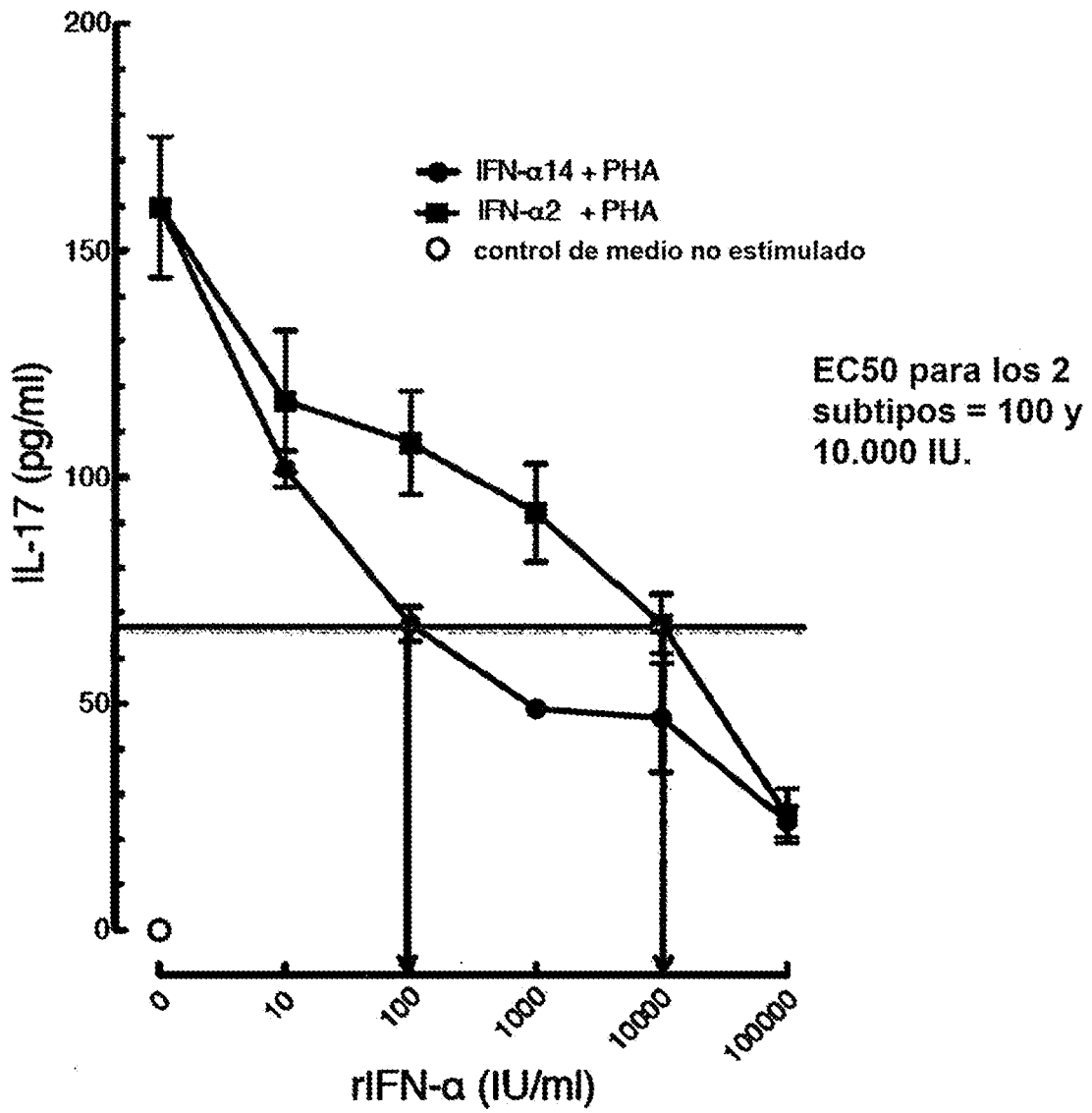


Figura 17

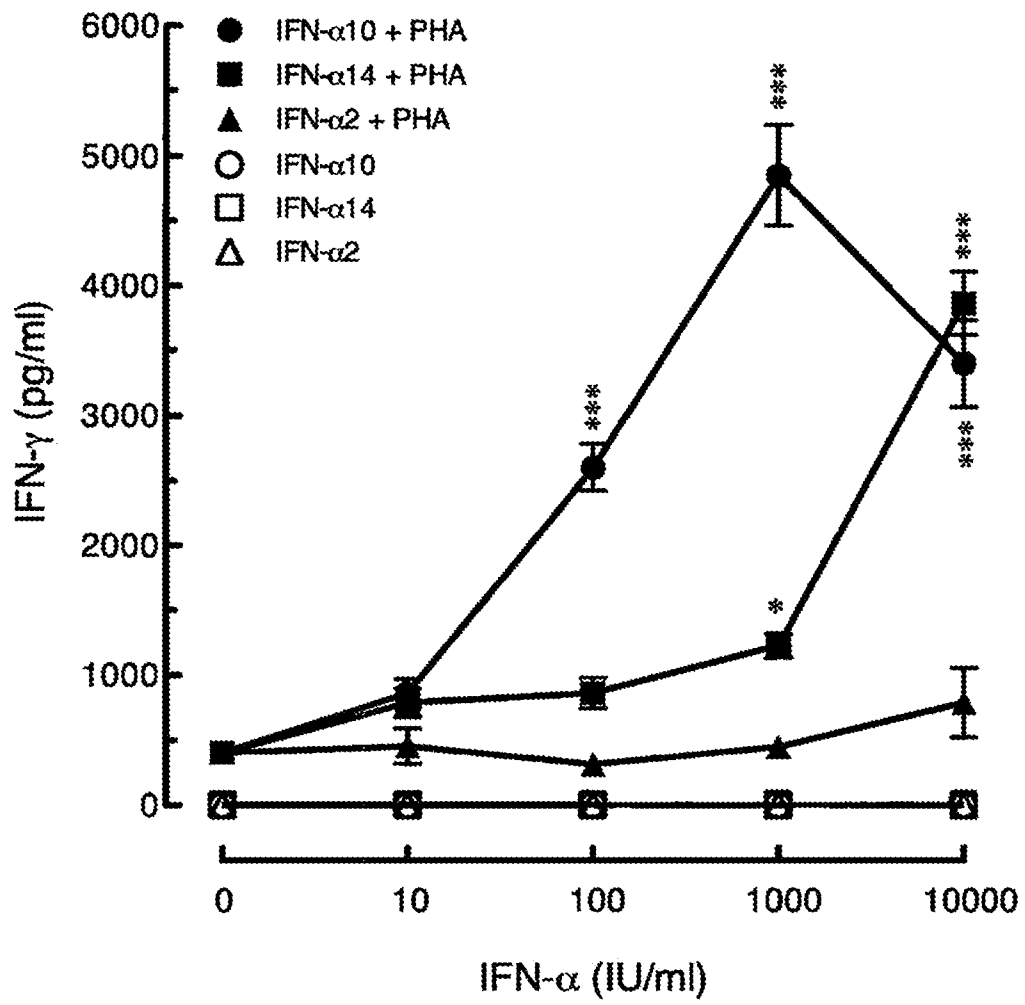


Figura 18

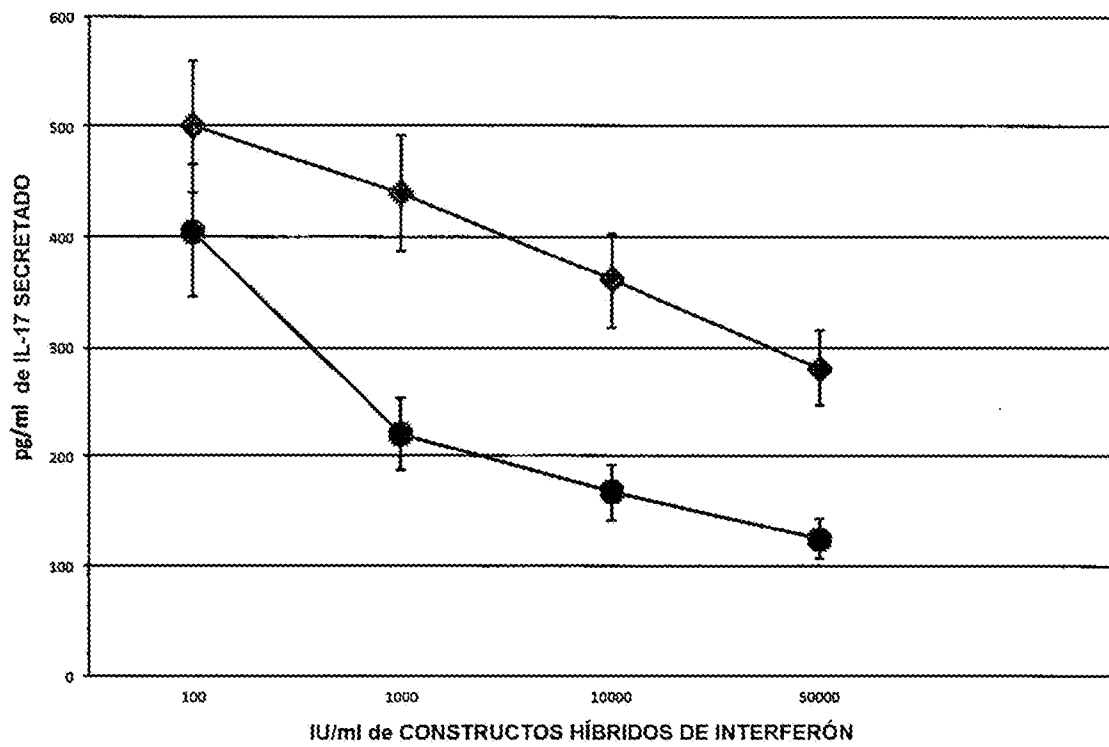


Figura 19