

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 025**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02792325 .9**
96 Fecha de presentación: **04.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1454138**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2004**

54 Título: **Inmunocitocinas con selectividad modulada**

30 Prioridad:
04.12.2001 US 337113 P
12.04.2002 US 371966 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.05.2012

73 Titular/es:
MERCK PATENT GMBH
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE

72 Inventor/es:
GILLIES, Stephen, D.

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 381 025 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

Inmunocitocinas con selectividad modulada.

Campo de la invención

5 La presente invención hace referencia en general a proteínas de fusión que contienen una citocina, y métodos para incrementar la efectividad terapéutica de tales proteínas de fusión. Más específicamente, la presente invención hace referencia a proteínas de fusión de citocinas que exhiben una vida media de circulación más larga en el cuerpo de un paciente que la citocina que se presenta de manera natural y que tienen propiedades terapéuticas mejoradas. En particular, la invención hace referencia a la proteína de fusión IL2 con características terapéuticas mejoradas.

Antecedentes

10 La interleucina-2 (IL-2) es una citocina potente que actúa en el sistema inmune para generar principalmente una respuesta inmune mediada por células. Bajo las condiciones apropiadas, IL-2 se produce a nivel local a altas concentraciones cerca del sitio de un antígeno para suministrar las señales co-estimuladoras necesarias para generar una respuesta inmune al antígeno. Debido a su rol en el crecimiento y diferenciación de los linfocitos T, IL-2 ha sido candidata en enfoques inmunoterapéuticos para el tratamiento de tumores. Además de estimular los
15 linfocitos T, también se demostró que IL-2 estimula las células B, células NK, linfocitos agresores activados por linfocina (LAK, por sus siglas en inglés), monocitos, macrófagos y células dendríticas.

20 IL-2 es un agente terapéutico aprobado para el tratamiento de carcinoma renal metastásico y melanoma metastásico pero su utilización está restringida debido a los graves efectos secundarios tóxicos, que incluyen fiebre, náuseas, fuga vascular e hipotensión. Entre los diferentes efectos tóxicos observados con la administración de IL-2, el efecto tóxico menos deseable y el que se cree que interfiere de manera sustancial con la terapia de IL-2 es el síndrome de fuga vascular (VLS, por sus siglas en inglés) y las complicaciones asociadas con el mismo.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en el arte de mejorar más aún la utilidad terapéutica de las proteínas IL-2.

Resumen de la invención

25 La presente invención se basa, en parte, en la identificación de mutaciones en la fracción IL-2 de una proteína de fusión IL-2 para incrementar la dosis máxima tolerada de la proteína relativa a la dosis de máxima efectividad para esa proteína cuando se administra a un paciente. Las proteínas de fusión preferentes son capaces de unirse mediante interacciones diferentes a más de una especie de receptor expresado en la misma célula del cuerpo del paciente. Las proteínas de fusión de citocina preferentes incluyen una citocina que es capaz de unirse a más de un tipo de complejo receptor de citocina y a más de un tipo de célula. La invención también proporciona métodos para
30 identificar variantes de proteína de fusión de citocina particulares con propiedades útiles.

La presente invención proporciona proteínas de fusión que comprenden una fracción de dominio de anticuerpo fusionada a una fracción IL-2 mutante, donde la proteína de fusión exhibe una mayor selectividad que una proteína de referencia incluyendo la fracción que no es IL-2 fusionada a una fracción de dominio de anticuerpo, y donde la selectividad se mide como una relación de activación de células que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ con respecto a la
35 activación de células que expresan el receptor IL-2R $\beta\gamma$.

La fracción IL-2 mutante de las proteínas de fusión incluye una mutación en la proteína IL-2 humana madura. En una realización, las proteínas de fusión según la invención incluyen una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones de aminoácidos en la fracción IL-2. En otra realización, las proteínas de fusión de la invención incluyen modificaciones de uno o más aminoácidos en la fracción IL-2 de las proteínas de fusión.

40 Las mutaciones en las proteínas de fusión de la invención alteran la selectividad de las proteínas de fusión con respecto a una proteína de fusión de referencia, donde la selectividad se mide como una relación de activación de células que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ con respecto a la activación de células que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$. Las mutaciones en las proteínas de fusión también pueden resultar en un efecto diferencial en la afinidad de las proteínas de fusión por el receptor IL-2R $\beta\gamma$ con respecto a la afinidad de las proteínas de fusión por el receptor
45 IL-2R $\alpha\beta\gamma$. Las mutaciones o alteraciones preferentes reducen una activación de proteínas de fusión de células que expresan el receptor IL-2R $\beta\gamma$ con respecto a la activación de proteínas de fusión de células que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

Las proteínas de fusión preferentes de la invención generalmente exhiben un efecto diferencial que es mayor que aproximadamente el doble. En un aspecto, el efecto diferencial se mide mediante la respuesta proliferativa de
50 células o líneas celulares que dependen de IL-2 para el crecimiento. Esta respuesta a las proteínas de fusión se expresa como un valor ED50, que se obtiene mediante el trazado de una curva de respuesta a la dosis y mediante el cálculo de la concentración de proteína que resulta en una respuesta media máxima. La relación entre los valores ED50 obtenidos para las células que expresan el receptor IL-2R $\beta\gamma$ y las células que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$

para una proteína de fusión de la invención con respecto a la relación de valores ED50 para una proteína de fusión de referencia da una medida del efecto diferencial para la proteína de fusión.

5 La selectividad de las proteínas de fusión de la invención puede medirse frente una proteína de fusión de referencia que comprende la misma fracción de dominio de anticuerpo que en una proteína de fusión fusionada a una fracción de IL-2 no mutante. En una realización preferente, un efecto diferencial medido para las proteínas de fusión de la invención, como se describe con anterioridad, es de entre aproximadamente 5 y 10 veces. De manera preferente, el efecto diferencial que exhiben las proteínas de fusión de la invención se encuentra entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1000 veces.

10 En una realización preferente alternativa, la selectividad de la proteína de fusión se compara con la selectividad de una proteína de fusión de referencia que comprende la misma fracción que no es IL-2 que en la proteína de fusión fusionada con una fracción IL-2 incluyendo IL-2 humana madura con una sustitución de aminoácido en la posición 88 con un cambio de una asparagina a una arginina (N88R). Las proteínas de fusión de la invención que tienen un índice terapéutico mejorado incluyen proteínas de fusión que tienen una selectividad cercana a la de N88R pero entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 100% de la selectividad de una proteína de fusión de referencia con la sustitución de aminoácido N88R. En otra realización, las proteínas de fusión de la invención tienen una selectividad entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 30% de la selectividad de una proteína de fusión de referencia con la sustitución de aminoácido N88R en la fracción IL-2. Las proteínas de fusión de la invención también incluyen proteínas de fusión que tienen una selectividad de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 20% de la selectividad de la proteína de fusión de referencia con la sustitución de aminoácido N88R en la fracción IL-2. La selectividad de las proteínas de fusión de la invención también puede ser de entre aproximadamente 2% y aproximadamente 10% de la selectividad de la proteína de fusión de referencia que incluye la sustitución de aminoácido N88R en la fracción IL-2 humana madura.

25 Las proteínas de fusión de la invención tienen una vida media en suero que es mayor que la vida media en suero de la proteína IL-2 humana madura. La larga vida media en suero de las proteínas de fusión de la invención puede atribuirse a la fracción de dominio del anticuerpo de la proteína de fusión. En una realización, la fracción de dominio de anticuerpo de una proteína de fusión de la invención incluye, por ejemplo, variantes del dominio de anticuerpo KS-1/4, variantes del dominio de anticuerpo NHS76 y variantes del dominio del anticuerpo 14.18. El dominio del anticuerpo también puede seleccionarse a partir de una variedad de otros anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos contra diversos tumores y antígenos virales.

30 En una realización preferente, un efecto diferencial medido para las proteínas de fusión de la invención, como se describe con anterioridad, es de entre aproximadamente 5 y 10 veces. De manera preferente, el efecto diferencial que exhiben las proteínas de fusión de la invención se encuentra entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1000 veces.

35 Es útil mutar aminoácidos en la fracción IL-2 de proteínas de fusión de la invención que resultan en un efecto diferencial que es el doble o más. Mutaciones de diferentes aminoácidos en la fracción IL-2 dan como resultado un efecto diferencial mayor que el doble, entre 5 y 10 veces mayor, o preferentemente entre 10 y 1000 veces mayor.

40 En la realización preferente de la invención, la mutación de aminoácidos es una sustitución del ácido aspártico correspondiente a la posición 20 de la fracción IL-2 humana madura con una treonina (D20T). En otra realización preferente es útil mutar más de una posición de aminoácido en la fracción IL-2. Otras mutaciones apropiadas según la invención hacen referencia a aminoácidos en las posiciones K8, Q13, E15, H16, L19, Q22, M23, N26, H79, L80, R81, D84, N88, I92 y E95 de la proteína IL-2 humana madura. Otras posiciones de aminoácidos útiles que pueden mutarse son L25, N31, L40, M46, K48, K49, D109, E110, A112, T113, V115, E116, N119, R120, I122, T123, Q126, S127, S130 y T131 de la proteína IL-2 humana madura. Las posiciones de aminoácidos preferentes que son mutadas en las proteínas de fusión de la invención incluyen D20, N88 y Q126. Si N88 y Q126 son mutados adicionalmente, el aminoácido asparagina en la posición 88 es sustituido con una arginina (N88R), y el aminoácido glutamina en la posición 126 es sustituido por un ácido aspártico (Q126D).

50 Las sustituciones de diversos aminoácidos dan como resultado una selectividad en la actividad de proteínas de fusión de la invención para células que exhiben el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ con respecto a células que exhiben el receptor IL-2R $\beta\gamma$, lo que puede reflejarse en la afinidad de las proteínas de fusión para un receptor IL-2R $\beta\gamma$ con respecto a la afinidad de las proteínas de fusión para un receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ anterior que tiene un efecto diferencial que es mayor que aproximadamente el doble. Preferentemente, el efecto diferencial es de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 veces, y más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1000 veces.

Se describen proteínas de fusión con mutaciones en una o más posiciones de aminoácidos.

55 Además de los aminoácidos mutantes en la fracción IL-2, los aminoácidos en la fracción que no es IL-2 también pueden mutarse. En una realización preferente, la fracción que no es IL-2 es un dominio de anticuerpo. El dominio de anticuerpo puede seleccionarse de una variedad de diferentes anticuerpos de inmunoglobulina (Ig), preferentemente anticuerpos IgG, incluyendo por ejemplo, dominios de anticuerpos de IgG gamma 1, IgG gamma 2 y IgG gamma 4 o cualquier combinación de estos dominios de anticuerpos. Como se utilizan en la presente, los

términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" hacen referencia a (i) un anticuerpo intacto (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal), (ii) partes de unión a antígeno del mismo, incluyendo, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento (Fab')₂, un fragmento Fv, un sitio de unión a anticuerpo de cadena simple, un sFv, (iii) anticuerpos bi-específicos y partes de unión a antígenos de los mismos, y (iv) anticuerpos multi-específicos y partes de unión a antígenos de los mismos. En las proteínas de la invención, una región Fc de inmunoglobulina puede incluir al menos una región pesada constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio 2 (CH₂) de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, un dominio 3 (CH₃) de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina y, en función del tipo de inmunoglobulina utilizada para generar la región Fc, opcionalmente un dominio 4 (CH₄) de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, o una combinación de los mismos. En realizaciones particulares, la región Fc de inmunoglobulina puede carecer de un dominio 1 (CH₁) de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina. Aunque las regiones Fc de inmunoglobulina pueden estar basadas en cualquier tipo de inmunoglobulina, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, se prefieren las regiones Fc de inmunoglobulina basadas en IgG. Una fracción de anticuerpo incluida en una proteína de fusión de la invención es preferentemente humana, pero puede derivarse de un anticuerpo murino, o cualquier otra inmunoglobulina de mamíferos o no mamíferos. Se contempla que una región Fc utilizada en una proteína de fusión de la invención puede adaptarse a la aplicación específica de la molécula. En una realización, la región Fc se deriva de un isotopo γ 1 de inmunoglobulina o una variante del mismo. En otra realización, la región Fc se deriva de un isotopo γ 2 de inmunoglobulina o una variante del mismo. En otra realización, la región Fc puede derivarse de un isotopo γ 3 de inmunoglobulina o una variante del mismo. La región Fc puede comprender una región bisagra que se deriva de un isotopo de inmunoglobulina diferente de la región Fc. Por ejemplo, la región Fc puede derivarse de un isotopo γ 2 de inmunoglobulina e incluir una región bisagra derivada de un isotopo γ 1 de inmunoglobulina o una variante del mismo. En otra realización preferente de la invención, la región Fc se deriva de un isotopo γ 4 de inmunoglobulina. Se prefieren particularmente los isotopos γ 4 de inmunoglobulina que se han modificado para contener una región bisagra derivada de un isotopo γ 1 de inmunoglobulina o una variante del mismo.

En una realización, las proteínas de fusión de la invención comprenden mutaciones en la fracción de Ig. Una mutación útil es una mutación en la secuencia QYNSTYR (SEQ ID NO: 1) de IgG gamma 1, cambiando la N por Q; una mutación particularmente útil es una mutación en la secuencia QFNST (SEQ ID NO: 2) de gamma 2 ó 4, cambiando el motivo dipéptido FN por AQ.

La invención también incluye constructos de ADN que codifican diversas proteínas de fusión de la invención. Las proteínas de fusión de la invención son particularmente útiles para el tratamiento del cáncer, infecciones virales y trastornos inmunológicos.

Estos y otros objetos, junto con las ventajas y características de la invención revelada en el presente, serán evidentes a partir de la descripción, dibujos y reivindicaciones a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la fusión de una citocina con una segunda fracción de proteína que altera las características de unión natural de la citocina. La figura 1A muestra el socio de fusión a la IL-2 como una molécula dimérica, tal como un anticuerpo o la parte Fc de una proteína de fusión que contiene Fc, y por lo tanto dos moléculas de IL-2 son llevadas a la superficie celular cuando la fracción IL-2 de la proteína de fusión interactúa con su receptor. La figura 1B ilustra un segundo mecanismo que produce el mismo efecto.

La figura 2 muestra perfiles farmacocinéticos habituales de la proteína de fusión inmunocitocina huKS-IL2 (representada por triángulos) y dos variantes, huKS-ala-IL2 (representada por círculos) y huKS-ala-IL2(N88R) (representada por cruces).

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona métodos y composiciones que mejoran el índice terapéutico de las proteínas de fusión IL-2 y de las inmunocitocinas IL-2 en particular. Según la invención, el índice terapéutico de una molécula terapéutica es una medida de la relación de la dosis máxima tolerada de una molécula dividida por la dosis de máxima efectividad de dicha molécula. La invención incluye variantes mejoradas de inmunocitocinas IL-2 que exhiben una vida media en circulación considerablemente mayor en comparación con la IL-2 libre. La invención también proporciona proteínas de fusión IL-2, y en particular inmunocitocinas IL-2, que exhiben una respuesta de IL-2 selectiva, reflejada por la activación reducida de las células con diversas funciones efectoras de las proteínas de fusión de la invención, que es una causa principal de efectos tóxicos de la IL-2. Además, la invención proporciona proteínas de fusión IL-2 con actividad mejorada. Una proteína de fusión IL-2 de la invención incluye cambios en una o más posiciones de aminoácidos que alternan la afinidad relativa de la proteína de fusión IL-2 por diferentes receptores IL-2, lo cual da como resultado propiedades biológicas alteradas de la proteína de fusión IL-2. La invención es útil para reducir o minimizar cualquier toxicidad asociada con la terapia con IL-2. Independientemente del mecanismo subyacente de cualquier toxicidad de IL-2 dada, tal como el síndrome de fuga vascular, la toxicidad se produce parcialmente por el hecho de que la IL-2 es administrada por vía intravenosa y por lo tanto actúa de manera sistémica dentro del cuerpo, aunque el efecto de la IL-2 se desea en un lugar específico. Este problema se ve exacerbado por el hecho de que

una administración sistémica de IL-2 requiere una dosis mucho más alta que la ofrecida por una administración localizada, lo cual podría promover toxicidades que no se verían a dosis menores. La invención proporciona proteínas de fusión IL-2 con toxicidad reducida. La invención también proporciona métodos para elaborar proteínas de fusión IL-2 con toxicidad reducida.

- 5 En general, la invención es útil para proteínas de fusión incluyendo una fracción IL-2, fusionada con una fracción de dominio de anticuerpo. Según la invención, una fracción de dominio de anticuerpo puede ser una proteína sintética o natural o una parte o variante (incluyendo especies, variantes mutantes y alélicas) de la misma. Las fracciones de dominio de anticuerpo preferentes incluyen Fc. Según la invención, una fracción de IL-2 puede ser una molécula IL-2 natural o una parte o variante (incluyendo especies, variantes mutantes y alélicas) de la misma que retiene al menos una actividad o función de IL-2 (una fracción de IL-2 puede ser una IL-2 que es modificada para tener una afinidad de unión al receptor de IL-2 diferente según la invención).

15 Según la invención, las células responden a la IL-2 a través de receptores de superficie celular (IL-2R) específicos, que existen en dos formas. El receptor de alta afinidad es heterotrimérico, y consiste en subunidades α , β y γ ; el receptor de afinidad intermedia es heterodimérico, y consiste en subunidades α y γ . Las constantes de unión de IL-2 para estas dos formas de IL-2R difieren en dos órdenes de magnitud. La transducción de señales es mediada en el lado citoplásmico del receptor a través de interacciones dentro del complejo $\beta\gamma$. Diferentes tipos de células expresan las subunidades α , β y γ en diversas cantidades. Por ejemplo, los linfocitos T activados expresan todas las subunidades para formar IL-2R $\alpha\beta\gamma$ de alta afinidad, mientras que los linfocitos T restantes maduros y las células NK expresan las subunidades β y γ para dar IL-2R $\beta\gamma$ de afinidad intermedia. Por lo tanto, las células requieren diferentes niveles de exposición a IL-2 para estimulación, y en cambio, regulando la actividad IL-2 dentro de un contexto celular específico, la naturaleza de una respuesta inmune puede controlarse.

25 Los métodos y composiciones de la invención son particularmente útiles en el contexto de las proteínas de fusión IL-2 tal como inmunocitocinas que contienen IL-2. Según la invención, las inmunocitocinas que contienen IL-2 son moléculas sintéticas que han demostrado incrementar de manera considerable la eficacia de la terapia IL-2 seleccionando como diana directamente a la IL-2 en un microambiente tumoral. Las inmunocitocinas son proteínas de fusión que consisten en una fracción de anticuerpo y una fracción de citocina, tal como una fracción IL-2. Según la invención, una fracción de anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o inmunoglobulina o una parte o variante (incluyendo especies, variantes mutantes y alélicas) del mismo que tiene una función biológica tal como una afinidad de unión específica a antígeno. De manera similar, una fracción de citocina de la invención puede ser una citocina natural o una parte o variante (incluyendo especies, variantes mutantes y alélicas) de la misma que retiene al menos parte de la actividad de citocina. Los beneficios de la terapia de inmunocitocina son evidentes fácilmente. Por ejemplo, una fracción de anticuerpo de una inmunocitocina reconoce un epítipo específico a tumor y esto resulta en que la molécula de inmunocitocina selecciona como diana al sitio del tumor. Por lo tanto, las altas concentraciones de IL-2 pueden suministrarse al microambiente del tumor, lo cual resulta en la activación y proliferación de una variedad de células efectoras inmunes antes mencionadas, utilizando una dosis mucho más baja de la inmunocitocina que la que se requeriría para IL-2 libre. Además, la vida media en circulación incrementada de una inmunocitocina comparada con la IL-2 libre contribuye a la eficacia de la inmunocitocina. Y finalmente, las funciones efectoras naturales de un anticuerpo también pueden explotarse, por ejemplo activando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en células NK que contienen Fc γ RIII.

40 Una inmunocitocina IL-2 tiene mayor eficacia que la IL-2 libre. Sin embargo, algunas características de inmunocitocinas IL-2 pueden agravar los efectos secundarios potenciales de la molécula de IL-2. Debido a la vida media en circulación significativamente más larga de las inmunocitocinas IL-2 en el torrente sanguíneo con respecto a la IL-2 libre, se incrementa la probabilidad de que la IL-2 u otras partes de la molécula de proteína de fusión activen componentes generalmente presentes en la vasculatura. La misma preocupación se aplica a otras proteínas de fusión que contienen la IL-2 fusionada con otra fracción tal como Fc o albúmina, lo cual resulta en una mayor vida media de la IL-2 en circulación.

50 La invención proporciona proteínas de fusión IL-2 alteradas, tal como IL-2 fusionada a un anticuerpo intacto o a una parte de un anticuerpo, o a albúmina, con toxicidad reducida en comparación con formas inalteradas de tales proteínas de fusión. La invención también proporciona proteínas de fusión con una o más alteraciones en las fracciones IL-2 y/o no IL-2 que alteran la actividad relativa de la proteína de fusión en células que expresan las subunidades α , β y γ del receptor de IL-2 comparada con células que expresan las subunidades β y γ del receptor de IL-2. La invención también proporciona proteínas de fusión que contienen IL-2 que exhiben una afinidad alterada hacia la subunidad α , β y γ del receptor de IL-2 en comparación con formas inalteradas de tales proteínas de fusión.

55 Un número de proteínas de fusión de anticuerpo que contienen IL-2 exhiben actividad IL-2 que se altera de manera cuantitativa con respecto a la IL-2 libre pero no es óptima en sentido cualitativo para aplicaciones terapéuticas. La invención proporciona formas modificadas de proteínas de fusión IL-2 anticuerpo en las cuales IL-2 o el anticuerpo, o ambas fracciones, son alteradas para mejorar de manera cualitativa la actividad IL-2 para una aplicación dada.

La invención también proporciona estrategias para determinar los tipos de modificaciones que son particularmente útiles en el diseño de proteínas de fusión modificadas para el tratamiento de enfermedades.

La figura 1 ilustra mecanismos posibles mediante los cuales una proteína de fusión puede unirse a una superficie celular, de modo tal que se alteran las propiedades de unión al receptor de una fracción dentro de la proteína de fusión. Por ejemplo, la figura 1A muestra el socio de fusión a IL-2 como molécula dimérica. Esto incrementa la probabilidad de que la segunda molécula IL-2 interactúe con su receptor, por ejemplo reduciendo la constante de disociación, que lleva a un incremento neto en la unión. La figura 1B ilustra un segundo mecanismo que produce el mismo efecto. En las células que contienen tanto un receptor para IL-2 como un receptor para el socio de fusión IL-2 de la proteína de fusión (por ejemplo, un receptor Fc para la parte Fc de una fracción Ig), el receptor para el socio de fusión (por ejemplo, el receptor Fc) puede conectar la proteína de fusión y enlazarla en la superficie celular donde ahora tiene una probabilidad incrementada de unión a un receptor de IL-2.

Un ensayo de fase I/II de una proteína de fusión anticuerpo-citocina, llamada huKS-IL2, se completó recientemente. huKS-IL2 es una proteína de fusión que consisten en el anticuerpo KS-1/4 fusionado a la citocina, interleucina-2. KS-1/4 reconoce el antígeno de superficie celular tumoral (EpCAM) (molécula de adhesión celular epitelial) y tiene el efecto de concentrar IL-2 al sitio del tumor. En el curso de este ensayo, se midieron las respuestas de pacientes al tratamiento. Un paciente que mostraba una respuesta significativa a la terapia experimentó una respuesta clínica parcial seguida por estabilización de la enfermedad y reducción de la utilización de medicamentos para el dolor. El paciente ya había recibido tratamientos estándares anteriores que fallaron. La vida del paciente se extendió de manera significativa más allá de lo esperado en la ausencia de tal tratamiento.

De manera sorprendente, como resultado de quimioterapia anterior, esta población de linfocitos T del paciente fue esencialmente destruida. Este paciente tenía un conteo de linfocitos T mucho menor que todos los otros pacientes en el ensayo. Dado que se sabe que la IL-2 activa los linfocitos T y, por ejemplo, se sabe que mejora la citotoxicidad de linfocitos T CD8(+) hacia células tumorales, la respuesta potente de este paciente que aparentemente carecía de linfocitos T fue particularmente inesperada. Esta observación impulsó más estudios de nuevas proteínas de fusión anticuerpo-IL-2 en las cuales la fracción IL-2 puede exhibir especificidad celular alterada, lo cual resulta en un mejoramiento del índice terapéutico de las proteínas de fusión IL-2.

A partir de la estructura cristalina de IL-2, las comparaciones de secuencia con citocinas relacionadas, y los estudios de mutagénesis dirigidos a sitios, se ha progresado mucho en elucidar los aminoácidos en IL-2 que entran en contacto con diferentes subunidades de receptor de IL-2 y su consecuencia en la actividad biológica. Por ejemplo, el residuo D20, conservado en IL-2 en las especies de mamíferos, es un residuo fundamental para la unión de la subunidad β del receptor de IL-2 y diversas sustituciones en esta posición tienen efectos diferentes. Por ejemplo, la variante IL-2(D20K) no se une a ningún complejo IL-2R y generalmente está inactiva, mientras que las variantes IL-2(D20E) o IL-2(D20T) retienen su actividad biológica. Las posiciones de aminoácidos R38 y F42 son fundamentales para la unión de la subunidad α , y mientras las mutaciones en estos sitios reducen la interacción de IL-2 con el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ de alta afinidad, se sigue uniendo al receptor IL-2R $\beta\gamma$ de afinidad intermedia y por lo tanto retiene un poco de bioactividad. N88 es otro residuo que participa en interacciones de mediación con la subunidad β , y mientras la variante IL-2 (N88R) tiene una afinidad sumamente reducida por el receptor de afinidad intermedia, su afinidad por el receptor de alta afinidad esencialmente no se modifica. Por lo tanto, el mutante N88R de IL-2 aún puede activar los linfocitos T.

La afinidad de unión de las proteínas de fusión de la invención para diferentes receptores puede determinarse mediante una serie de métodos conocidos en el arte que incluyen, por ejemplo, un radioinmunoensayo.

Por lo tanto, es posible perturbar la estructura IL-2 de modo tal que muestre mayor afinidad hacia un complejo receptor de IL-2 comparado con otro complejo receptor de IL-2 mutando un aminoácido específico que entra en contacto con una de las subunidades del receptor, o alterando una combinación de residuos de aminoácidos. En consecuencia, la molécula muestra mayor actividad en un tipo de célula a diferencia de otros. Según la invención, es posible manipular la estructura de IL-2 en el contexto de una proteína de fusión Ig-IL2 para obtener el efecto deseado. Además, en algunos casos, la proteína de fusión Ig-IL variante tiene diferentes características biológicas en comparación con la proteína mutante IL-2 libre correspondiente.

Además, es posible, según la invención, manipular la fracción IL-3 en una proteína de fusión de modo tal que muestre una afinidad alterada hacia una o más de las subunidades de receptor de IL-2 (α , β , o γ) y resulte en un descenso general en la bioactividad de la proteína de fusión. Tales variantes pueden activar las células que responden a IL-2, pero requieren una mayor concentración que la IL-2 libre. Por lo tanto, cuando las proteínas de fusión IL-2 están concentradas en un sitio diana deseado, por ejemplo en una fracción diana, estas variantes tienen un índice terapéutico mejorado.

La subunidad α del receptor IL-2R parece cumplir una función de enlace: este receptor de baja afinidad se une a IL-2 y mantiene la IL-2 cerca de la superficie celular, de modo tal que se incrementa la concentración efectiva en las cercanías de las subunidades del receptor IL-2R β and IL-2R γ de superficie celular. Además, la subunidad α y las subunidades $\beta\gamma$ del receptor de IL-2 crean el complejo IL-2R de alta afinidad. La invención se basa, en parte, en el reconocimiento de que las proteínas de fusión IL-2 pueden participar en múltiples interacciones diferentes con

receptores en la superficie celular. Por ejemplo, en el caso de proteínas de fusión que contienen una fracción de anticuerpo, la fracción de anticuerpo en sí misma puede promover la unión de la proteína de fusión a la superficie celular y además, IL-2 puede estar presente en múltiples copias en la proteína de fusión. Como resultado, IL-2 puede enlazarse a una célula que expresa sólo subunidades β y γ de IL-2R, y tiene una capacidad mejorada para activar tal célula.

Por ejemplo, una inmunoglobulina (Ig) dimérica fusionada con IL-2 tiene dos copias de IL-2, de modo tal que la unión de una fracción IL-2 a su receptor mejora la probabilidad de una interacción de la segunda fracción IL-2 con una molécula receptora en la misma superficie celular. El diagrama que se muestra en la figura 1A representa una configuración posible de una proteína de fusión Ig-IL2 en una superficie celular. La invención proporciona proteínas de fusión Ig-IL2 en las cuales la fracción IL-2 se altera para reducir la unión a un receptor IL-2R $\beta\gamma$.

Un segundo mecanismo mediante el cual las proteínas de fusión Ig-IL2 pueden ver alterada su unión a la superficie de ciertas células inmunes es que el receptor Fc en una superficie celular puede unirse a la parte Fc de una fracción Ig y por lo tanto enlazar la IL-2 a la superficie de células que poseen un receptor Fc y un receptor de IL-2 (Figura 1B). Tales células incluyen células NK, células B y macrófagos. La invención proporciona proteínas de fusión Ig-IL2 en las cuales la fracción Ig se altera para reducir la unión a un receptor Fc. La invención también proporciona proteínas de fusión Ig-IL2 en las cuales tanto la fracción Ig como la fracción IL-2 incorporan alteraciones de la naturaleza antes descrita.

Otra característica de la invención es que las variantes de la proteína de fusión IL-2, tales como las fusiones Ig-IL2 o las fusiones IL-2 que contienen Fc, con perfiles de toxicidad superior. Por ejemplo, una proteína de fusión Ig-IL2 que contiene la mutación D20T muestra toxicidad reducida en animales tales como ratones en comparación con proteínas de fusión Ig-IL2 correspondientes con D en la posición 20. En otro ejemplo, una proteína de fusión Ig-IL2 que contiene la mutación N88R o la combinación de mutaciones L85T, I86T, N88R en la fracción IL-2 muestran toxicidad reducida en animales tales como ratones en comparación con las proteínas de fusión Ig-IL2 con N en la posición 88. Además, una proteína de fusión anticuerpo-IL2 que contiene la mutación D20T o la mutación N88R en la fracción IL-2 muestra potencia comparable a la proteína de fusión anticuerpo-IL2 original correspondiente cuando se utiliza para tratar un tumor que expresa un antígeno diana del anticuerpo.

Las propiedades de la variante D20T de las proteínas de fusión Ig-IL2 es particularmente sorprendente a la luz de las propiedades reportadas de la mutación D20T en la proteína IL-2 libre. Específicamente, la mutación D20T en la proteína IL-2 libre no muestra una diferencia con respecto a la proteína IL-2 tipo salvaje en su actividad hacia células que contienen IL-2R $\alpha\beta\gamma$ o células que contienen IL2R- $\beta\gamma$ (Shanafelt et al., PCT WO99/60128). Sin embargo, una proteína de fusión Ig-IL2 que contiene la mutación D20T tiene una potencia drásticamente reducida en la activación de células que contienen IL2R- $\beta\gamma$, pero tiene una potencia esencialmente normal en la activación de células que contienen IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

Por lo tanto, la mutación de diversos aminoácidos dentro de la fracción IL-2 de una proteína de fusión Ig-IL2 lleva a una toxicidad reducida mientras tienen un efecto relativamente pequeño en la potencia de la proteína de fusión en el tratamiento de diversas enfermedades. Por ejemplo, el grado hasta el cual puede alterarse la afinidad de una variante de proteína de fusión IL-2 para sus receptores es una función de qué tanto se concentra la proteína de fusión en particular en su sitio diana deseado. Es particularmente útil mutar uno o más de los siguientes aminoácidos dentro de la fracción IL-2: Lys8, Gln13, Glu15, His16, Leu19, Asp20, Gln22, Met23, Asn26, Arg38, Phe42, Lys43, Thr51, His79, Leu80, Arg81, Asp84, Asn 88, Val 91, Ile92 y Glu95. También es útil mutar uno o más de los siguientes aminoácidos dentro de la fracción IL-2: Leu25, Asn31, Leu40, Met46, Lys48, Lys49, Asp109, Glu110, Ala112, Thr113, Val115, Glu116, Asn119, Arg120, Ile122, Thr123, Gln 126, Ser127, Ser130 y Thr131.

Esta invención revela formas de una fracción Ig fusionada con IL-2, por ejemplo fusiones anticuerpo-IL2 tales como huKSIL2 o dI-NHS76-IL2, en las cuales los cambios en la fracción Ig fusionada a IL-2 afectan las propiedades de unión al complejo IL-2R de la proteína de fusión. Estos cambios puede ser sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, o modificaciones químicas. Las sustituciones de aminoácidos útiles incluyen aquellas que afectan la glicosilación de proteínas de fusión o que afectan de manera directa la interacción con un receptor Fc. Una sustitución particularmente útil puede ser una que inhibe la glicosilación normalmente encontrada en la posición N297 (nomenclatura de la UE) de la cadena pesada de IgG. Las modificaciones químicas y bioquímicas incluyen pegilación de la molécula o tratamiento con N-glicanasa para eliminar las cadenas glicosil N-ligadas. Sin ninguna intención de limitarse a una teoría, es posible divisar que cambios específicos en la parte de anticuerpo de la molécula pueden afectar la conformación de IL-2, por ejemplo, alterando la rigidez de la molécula de anticuerpo. En el caso de huKSIL2, estas alteraciones pueden llevar a una molécula KS-IL2 que ahora muestra una selectividad incrementada hacia los linfocitos T en un bioensayo basado en células.

Para las proteínas de fusión IL-2 a menudo es útil seleccionar una fracción Ig que confiere otras propiedades deseadas a la molécula. Por ejemplo, una fracción IgG de la subclase gamma 1 puede ser preferente para mantener las funciones efectoras inmunológicas tales como ADCC. De manera alternativa, puede preferirse una fracción IgG de las subclases gamma 2 o gamma 4, por ejemplo para reducir interacciones de receptor FcR. Al utilizar las

fracciones IgG de subclases gamma o gamma 4, se prefiere particularmente la inclusión de una región bisagra derivada de gamma 1.

A menudo es útil utilizar las mutaciones y modificaciones químicas o bioquímicas de proteínas de fusión Ig-IL2 en combinación con otras mutaciones que tienen propiedades útiles diferentes, tales como la mutación de la lisina en el terminal C de ciertas regiones Fc por una alanina u otro residuo hidrofóbico. Por ejemplo, es particularmente útil aplicar las modificaciones de la invención a la proteína de fusión de anticuerpo huKS-ala-IL2 o dl-NHS(76)-ala-IL2. También es preferente introducir otras mutaciones en la molécula que eliminen los epítomos de linfocitos T potenciales. Es particularmente preferente que estas mutaciones no alteren de manera sustancial las propiedades deseadas de la molécula.

Esta invención revela formas de una fracción Ig fusionada con IL-2, por ejemplo una fusión anticuerpo-IL2 tal como huKSIL2, en las cuales una alteración específica en la secuencia de aminoácidos de IL-2, por ejemplo IL2(D20T) o IL2(N88R), cambia las propiedades de unión de la proteína de fusión al complejo IL-2R. La secuencia de aminoácidos de la proteína IL-2 humana madura se muestra en la secuencia ID NO: 3. Los cambios en las propiedades de unión se reflejan en una selectividad aumentada hacia los linfocitos T en un bioensayo basado en células. La mutación particular influencia el grado de selectividad hacia los linfocitos T. Además, estos cambios resultan en una molécula de fusión, por ejemplo huKS-ala-IL2(D20T) o huKS-ala-IL2(N88R), con menos efectos secundarios tóxicos cuando se administran a ratones en forma sistemática que, por ejemplo, huKS-ala-IL2. Además, estos cambios llevan a una proteína de fusión, por ejemplo, huKS-ala-IL2(N88R), que es al menos tan eficaz como la huKS-IL2 o huKS-ala-IL2 normal en la terapia tumoral en una serie de modelos de tumores de ratones.

Debido a que las respuestas inmunológicas requeridas para atacar un tumor son diversas y también varían de tipo de tumor a tipo de tumor, puede no ser deseable eliminar completamente una funcionalidad de la molécula cuando se utiliza una molécula con toxicidad reducida. Por ejemplo, en un modelo de ratón donde se indujo la metástasis pulmonaria de carcinoma de colon, se demostró que huKS-IL2 trata de manera efectiva el cáncer mediante un mecanismo mediado por linfocitos T, que no requiere células NK, mientras que en un modelo de ratón para neuroblastoma, se demostró que la eliminación del tumor mediante huKS-IL2 requiere células NK pero no linfocitos T. Por lo tanto, hay casos donde el perfil de selectividad puede ser modulado de manera más apropiada para permitir una respuesta mediada por NK. En una realización de la invención, un enfoque más deseable es alterar sutilmente el perfil de selectividad de la molécula de manera tal que aún se logre una respuesta que involucre múltiples tipos de receptores, más preferentemente en los sitios donde se concentra la molécula. Por ejemplo, la invención proporciona alteraciones de una proteína de fusión Ig-IL2 en la cual la selectividad para IL-2R $\alpha\beta\gamma$, con respecto a IL-2R $\beta\gamma$, es mejorada de 2 a 10 veces, de 10 a 100 veces, de 100 a 1000 veces, o más de 1000 veces, con respecto a una proteína de fusión Ig-IL2 no modificada correspondiente.

Las moléculas de la presente invención son útiles para el tratamiento de malignidades y tumores, en particular para el tratamiento de tumores sólidos. Los ejemplos de tumores que pueden ser tratados según la invención son tumores de origen epitelial, tales como aquellos presentes en, pero no limitados a, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cabeza y cuello. De igual modo, según la invención, las malignidades y tumores de origen neuroectodérmico son candidatos adecuados para el tratamiento, tal como, pero sin limitarse a, melanoma, carcinoma de pulmón de células pequeñas, sarcomas de tejido blando y neuroblastomas.

Según la invención, es útil que el agente terapéutico tenga como diana el sitio del tumor o el sitio de malignidad o metástasis. Las proteínas de fusión Ig que contienen anticuerpos dirigidos hacia antígenos presentados de manera preferente por tumores o células malignas son particularmente útiles. Por ejemplo, son particularmente útiles las proteínas de fusión que contienen una fracción de anticuerpo con especificidad para EpCAM (por ejemplo KS1/4), o Fibronectina embrionaria (por ejemplo BC1), o CEA, o complejos cromatina (por ejemplo NHS76), o GD2 (por ejemplo 14.18), o CD19, o CD20, o CD52, o HER2/neu/c-erbB-2, o MUC-1, o PSMA. Además, los anticuerpos dirigidos a diversos antígenos virales son particularmente útiles.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de genes de fusión Ig-IL2 con sustituciones de codones en la secuencia de codificación IL-2 o en la secuencia de codificación de anticuerpo:

Se describió un vector de expresión para las inmunocitocinas en Gillies et al., (1998) J. Immunol. 160:6195-6203. Diversas modificaciones en la secuencia de nucleótidos permitieron la adición de secuencias de codificación al extremo 3' del gen γ -1 humano. En el gen γ -1 humano que codifica la cadena pesada, el sitio de restricción XmaI ubicado en el 280 bp aguas arriba del codón finalizador de traslación se destruyó mediante la introducción de una mutación silenciosa (de TCC a TCA). Otra mutación silenciosa (de TCT a TCC) se introdujo al codón Ser tres residuos aguas arriba de la lisina C-terminal de la cadena pesada para crear la secuencia TCC CCG GGT AAA (SEQ ID NO. 4), que contiene un nuevo sitio XmaI [Lo et al., (1998) Protein Engineering 11:495-500].

La IL-2 ADNc se construyó mediante síntesis química y contiene un sitio de restricción PvuII nuevo y único [Gillies et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:1428-1432]. Tanto el sitio XmaI como el PvuII son únicos en el vector de expresión, y facilitaron la construcción de las variantes de anticuerpo-IL2, incluyendo las siguientes.

1) huKS-ala-IL2. La construcción de huKS-ala-IL2 se ha descrito con anterioridad (por ejemplo, WO01/58957). La proteína resultante contiene una sustitución de aminoácidos en la unión entre la región constante de cadena pesada de Ig y la huL-2 madura. La unión usualmente tiene la secuencia SPGK-APT (SEQ ID NO: 5) en la cual -SPGK- es el extremo C-terminal de la cadena pesada y -APT- el extremo N-terminal de la proteína IL-2 madura. En la huKS-ala-IL2 se introdujo una sustitución de K por A (denominada como posición K[-1] y la unión ahora tiene la secuencia SPGA-APT (SEQ ID NO: 6). En consecuencia, se mejora la vida media en suero de esta proteína (véase el Ejemplo 5).

2) dl-KS-ala-IL2. Esta proteína de fusión KS-IL2 contiene sustituciones en la KS-ala-IL2 para generar una versión de la proteína de fusión en la cual los epítomos de linfocitos T potenciales han sido eliminados (descritos en las solicitudes de patentes pendientes de aprobación U.S.S.N. 10/112582 y 10/138727, cuya divulgación completa se incorpora en este documento a modo de referencia).

La región constante de la porción Ig de las proteínas de fusión de la invención puede seleccionarse a partir de la región constante usualmente asociada con la región variable, o una región constante diferente que da como resultado una proteína de fusión con la porción Ig que incluye las regiones constantes y variables a partir de diferentes subclases de moléculas de IgG o diferentes especies. Por ejemplo; la región constante gama 4 de la IgG (SEQ ID NO: 7) puede utilizarse en lugar de la región constante gama 1 (SEQ ID NO: 8). La alteración tiene la ventaja de que la cadena gama 4 puede dar como resultado una vida media en suero más larga. Por consiguiente, la región constante de la IgG gama 2 SEQ ID NO: 9) también puede utilizarse en lugar de la región constante gama 1 (SEQ ID NO: 8). Además, la región bisagra derivada a partir de la IgG gama 1 (SEQ ID NO: 10) puede remplazar a la región bisagra usualmente presente en la IgG gama 2 (SEQ ID NO: 11) o la región constante de la IgG gama 4 (SEQ ID NO: 12). El componente Ig de la proteína de fusión también puede incluir mutaciones en la región constante de manera que la IgG ha reducido la afinidad de unión para al menos uno de FcγRI, FcγRII o FcγRIII. Las proteínas de fusión de la invención pueden incluir las mutaciones en las regiones constantes de IgG para eliminar sitios de glicosilación y epítomos de linfocitos T potenciales. Por ejemplo, las diversas regiones constantes pueden incluir alteraciones en la parte C-terminal de las regiones constantes para eliminar los epítomos de linfocitos T potenciales. Por ejemplo, los epítomos de linfocitos T potenciales en la parte C-terminal de las diversas regiones constantes de las moléculas de IgG se eliminan mediante el cambio de la secuencia de aminoácidos KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13) en las regiones constantes IgG gama 1 e IgG gama 2 y la secuencia de aminoácidos KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 14) en la región constante IgG gama 4 por la secuencia de aminoácidos KSATATPGA (SEQ ID NO: 15).

3) huKS-ala-IL2(N88R). Esta variante de la huKS-IL2 contiene la misma sustitución de amino ácidos en la unión entre la región constante de la cadena pesada de la Ig y la huL-2 madura como se describe más arriba (K[-1]A, creada por el cambio de codón de AAA a GCC), y además contiene una sustitución en la posición N88 en la secuencia de huL-2 madura a favor de R (creada por el cambio de codón de aAT a aGG). Se introdujo una alteración adicional dentro de la secuencia de nucleótidos de la huL-2 para eliminar un sitio de restricción existente para Bam HI mediante la introducción de una mutación silenciosa (posición de aminoácidos G98, se cambió el codón de ggA tcc a ggC tcc).

Se utilizó una estrategia de mutagénesis en base a PCR en la construcción de la huKS-ala-IL2(N88R). Se generaron dos fragmentos de PCR superpuestos que abarcan la secuencia de codificación de la huL2 madura utilizando como plantilla la huL2 en un vector Bluescript (Stratagene). El fragmento de PCR aguas arriba contenía los cambios de nucleótido que codifican K[-1]A y N88R mediante la incorporación de estas mutaciones dentro de los cebadores homoseno y antiseno respectivamente. Estos cambios se indican mediante los nucleótidos en **negrita** en las secuencias del cebador. La secuencia del cebador homoseno fue:

5'CCCCGGGT**GCCG**CCCCAACTTCAAGTTCTACA3'(SEQ ID NO: 16); la secuencia del cebador antiseno fue: 5' AGCCCTTTAGTTCCAGAACTATTACGTTGAT**CCTG**CTGATTAAGTCCCTAGGT3' (SEQ ID NO: 17). El nucleótido subrayado representa un cambio que destruye el sitio Bam HI. El segundo, el fragmento de PCR aguas abajo contenía una región de superposición de 20 nucleótidos con el fragmento de PCR aguas arriba y la secuencia de la IL2 restante. El cebador homoseno utilizado en esta reacción fue 5' AGTTCTGGAAGTAAAGGGCTCCGAAACAACATTCATGTGT (SEQ ID NO: 18). Una vez más, el nucleótido subrayado denota la mutación silenciosa que destruye el sitio Bam HI. El cebador antiseno utilizado fue el cebador antiseno M13 estándar que se apareja a una secuencia en el vector pBluecript. Estos fragmentos de PCR superpuestos se utilizaron en una reacción con el cebador en la SEQ ID 16 y un cebador antiseno M13 para generar el producto PCR final, que se insertó con posterioridad dentro de un vector TA (Invitrogen).

Se verificó la secuencia del fragmento insertado, y se utilizó un fragmento 442 bp Xma I/Xho I que contenía la secuencia de IL2 modificada (a partir del plásmido de TA-IL2(N88R)) para remplazar la secuencia huL-2 tipo salvaje en el plásmido de expresión de inmunocitocina original (que codifica huKS-IL2). Se verificó el plásmido de expresión de inmunocitocina resultante que codifica la huKSala-IL2(N88R) mediante el mapeo y secuenciación de restricción.

4) huKS M1-IL2(TTSR (SEQ ID NO: 19)). Se construyó la variante de inmunocitocina huKS M1-IL2 mediante técnicas de ADN recombinante estándares (y descritas por ejemplo en la solicitud de patente pendiente de aprobación U.S.S.N. 10/112,582, cuya divulgación completa se incorpora a este documento a modo de referencia). Contiene sustituciones de aminoácidos múltiples en la región de unión anticuerpo-IL-2 de la proteína de fusión, que

elimina epítomos de linfocitos T potenciales y da como resultado una proteína menos inmunogénica. La secuencia se cambió de KSLSLSPGA-APT (SEQ ID NO: 20) a KSATATPGA-APT (SEQ ID NO: 21) (el guión denota el sitio de unión Ig/IL-2 y los aminoácidos sustituidos están subrayados) y se denota como "M1". También se incorpora en esta variante el cambio de K a A en el último aminoácido antes de la unión que se ha demostrado que incrementa la vida media en suero de la inmunocitocina.

huKS M1-IL2(TTSR) contiene sustituciones de aminoácidos adicionales ubicadas en la parte IL-2 de la inmunocitocina. Para eliminar epítomos de linfocitos T potenciales creados por la sustitución de N88R descrita más arriba, la secuencia se cambió de -DLISINI-(SEQ ID NO: 22) de la huIL-2 natural a -DTTSRI- (SEQ ID NO: 23).

Se utilizó un enfoque de mutagénesis en base a PCR para introducir los cambios dentro de la secuencia de nucleótidos del gen huIL-2, mediante la incorporación de mutaciones dentro del cebador homocentido. Se creó la secuencia TTxR mediante cambios de codones ACC, ACC y AGG respectivamente. Se generó un fragmento de PCR mutagenizado 197 bp que abarca el extremo 3' de la secuencia hu IL-2 a partir de la plantilla de plásmido de expresión de inmunocitocina que codifica huKS-ala-IL2(N88R) utilizando un cebador homocentido de la secuencia

5'ACTTAAGACCTAGGGAC**ACC**ACCAGCAGGATCAACGTAATAGT3' (SEQ ID NO: 24)

y un cebador antisentido de la secuencia 5'ATCATGTCTGGATCCCTC3' (SEQ ID NO: 25). Se clonó el fragmento de PCR en un vector TA y se verificó la secuencia. Para generar la secuencia IL-2 completa se ligó este fragmento como un proceso de digestión con enzimas de restricción Afl II/Xho a un fragmento 2 kb Hind III/Afl II obtenido a partir del plásmido de expresión de inmunocitocina que codifica huKS-ala-IL2(N88R) e insertado dentro de un vector pBluescript restringido con Hind III/Xho. Se intercambió después el gen mutagenizado IL-2 en lugar de la secuencia huIL-2 natural en un plásmido de expresión de inmunocitocina que codifica para KS M1-IL2 en una ligadura de tres vías.

5) huKS(N a Q)-IL2. Se construyó un plásmido de expresión de inmunocitocina que codifica huKS(N a Q)-IL2 utilizando técnicas estándares de ADN recombinante. La huKS(N a Q)-IL2 contiene una sustitución de aminoácidos en el dominio CH2 de la región constante del anticuerpo Fc gama 1 que elimina la glicosilación N-ligada. La secuencia de aminoácidos se cambia de QYNSTYR (SEQ ID NO: 1) a QYQSTYR (SEQ ID NO: 26), con el aminoácido sustituido indicado en negrita. De manera similar, se construyeron las proteínas de fusión incluyendo las regiones constantes gama 2 y gama 4 que contienen mutaciones que cambian la secuencia de aminoácidos QFNST (SEQ ID NO: 2) a QAQST (SEQ ID NO: 27), de ese modo eliminando además un epítomo de linfocito T potencial.

Ejemplo 2: Modificaciones químicas o enzimáticas de una proteína de fusión Ig-IL2 que conducen a especificidad de receptor modificada:

Este ejemplo describe las manipulaciones bioquímicas de la inmunocitocina utilizadas para generar una huKS-IL2 pegilada o a una huKS-IL2 desglucosilada, y las variantes de las mismas. Los mismos métodos se pueden aplicar a otras proteínas de fusión IL-2, tales como la inmunocitocina 14.18-IL2 o las fusiones albúmina-citocina. Estas variantes se utilizaron en un ejemplo posterior para investigar sus efectos en la respuesta proliferativa de varias líneas celulares en un bioensayo en base a células (Tabla 1) o sobre las propiedades farmacocinéticas de la molécula.

Pegilación de huKS-IL2. Se unió de forma covalente PEG (20,000) a la proteína mediante grupos aminos presentes en la proteína. Para ello se empleó un derivado reactivo de PEG que contiene un vinculador succinimida (mPEG-Propionato de Succinimidilo, llamado "SPA-PEG" con posterioridad). La huKS-IL2 se dializó ampliamente en un tampón libre de aminos compuesto por 50 mM Fosfato de Sodio (pH 7,5), Tween 80 al 0,05%, y se concentró. El exceso de SPA-PEG se combinó con huKS-IL2 a una proporción molar de 5:1 o bien de 10:1. Inmediatamente antes de su utilización, se preparó una solución madre SPA-PEG de 5mM en agua desionizada. Se combinó un volumen apropiado de solución SPA-PEG con huKS-IL2 y la reacción se incubó sobre una plataforma oscilante por 30 a 40 minutos a temperatura ambiente. Se agregó un exceso molar de 5 a 10 de glicina para enfriar la reacción, y los productos de la reacción se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños. Se cargó una columna Superdex 200, equilibrada en 50 mM HEPES y 150 mM NaCl, con la muestra de la reacción y se combinaron y concentraron las fracciones de elución que contienen la proteína pegilada.

Tratamiento con N-Glicanasa de la huKS-IL2. Se incubó la huKS-IL2 (1,5 mg) con 30 mU PNGaseF (New England Biolabs) durante la noche a 37°C. El producto de la reacción se purificó mediante el paso sobre una columna de Proteína A Sefarosa y la elución de la unión huKS-IL2 a un pH de 3. Se neutralizó el eluido y se concentró en una columna de centrifugado en un tampón de PBS y Tween80 al 0,05%. Se verificó la desglucosilación de huKS-IL2 mediante cromatografía de exclusión por tamaños y sobre un gel de urea.

Ejemplo 3: Expresión y purificación de Ig-IL2 y variantes de Ig-IL2

Los procedimientos generales descritos en este documento para huKS-ala-IL2(N88R) se pueden utilizar para una amplia variedad de proteínas de fusión Ig-citocina, incluyendo las fusiones Ig a citocinas mutantes. Para obtener clones transfectados de forma estable que expresen huKS-ala-IL2(N88R), se introdujo ADN del plásmido de expresión de inmunocitocina que codifica huKS-ala-IL2(N88R) dentro de las células de mieloma de ratón NS/O

mediante electroporación. Se cultivaron las células NS/0 en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 2 mM glutamina y penicilina/estreptomicina. Se lavaron una vez aproximadamente 5×10^6 células con PBS y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS. Se incubaron después 10 μ g de ADN plasmídico linearizado con las células en una Cubeta para Gene Pulser (separación de electrodos de 0,4 cm, BioRad) sobre hielo por 10 minutos. Se realizó la electroporación utilizando un Gene Pulser (BioRad, Hércules, CA) con configuraciones a 0,25 V y 500 μ F. Se permitió que las células se recuperaran por 10 minutos sobre hielo, después de lo cual se resuspendieron en medio de cultivo y se colocaron en dos placas de 96 pozos. Se seleccionaron clones transfectados de forma estable mediante el crecimiento en presencia de 100 nM metotrexato (MTX), que se agregó al medio de cultivo dos días después de la transfección. Las células se alimentaron cada 3 días dos o tres veces más, y los clones resistentes a MTX aparecieron en 2 a 3 semanas. Se analizaron los sobrenadantes a partir de los clones mediante ELISA anti-Fc para identificar los mayores productores. Se aislaron los clones con mayor producción y se propagaron en medio de crecimiento que contenía 100 nM MTX.

Se purificó la inmunocitocina del sobrenadante de cultivo tisular mediante cromatografía en columnas de afinidad de Proteína A. Para huKS-ala-IL2(N88R), se pre-equilibró una columna de Proteína A recombinante (rPA) Agarosa con diez volúmenes de tampón de corrida, tales como 100 mM Arginina, 5 mM Citrato, 0,01 % Tween 80 pH 5,6, y se cargó la columna con sobrenadantes de cultivo celular filtrado conteniendo huKS-ala-IL2(N88R) a 16 ml/minuto a una unión de aproximadamente 40 mg/ml de resina de rPA. Se lavó exhaustivamente la columna con el mismo tampón y por último se elucionó la inmunocitocina en 50 mM glicina en pH3. Se recolectaron las fracciones pico y se ajustó el pH a neutro con 1 N NaOH.

Ejemplo 4: Actividad de las variantes Ig-IL2 en bioensayos.

Para los ensayos en base a células, se utilizaron líneas celulares que dependen de IL-2 para el crecimiento y se analizó la actividad de las proteínas de fusión Ig, por ejemplo huKS-IL2 y huKS-IL2, mediante la proliferación de estas células. Por ejemplo, se utilizó CTLL-2 (ATCC# TIB-214; Matesanz y Alcina, 1996) y TF-1 β (Farner et al., [1995] Blood 86:4568-4578) para seguir la respuesta de un linfocito T y una respuesta tipo célula NK, respectivamente. CTLL-2 es una línea celular linfoblasto T murina que expresa la IL-2R $\alpha\beta\gamma$ de afinidad alta, y TF-1 β es una línea celular humana derivada a partir de células eritroides precursoras inmaduras que expresan IL-2R $\beta\gamma$ de afinidad intermedia. Otra línea celular útil para estos ensayos es, por ejemplo, la línea celular derivada a partir del Kit-225 (K6) linfoma de linfocito T de humano adulto (Uchida et al., [1987] Blood 70:1069-1072). Cuando se aparean con la línea celular TF-1 β , se evalúa la actividad de las proteínas de fusión en una pareja de líneas celulares que albergan receptores de la misma especie de mamíferos. Estos ensayos también se pueden realizar con las poblaciones celulares derivadas a partir de PBMCs (Células Mononucleadas de Sangre Periférica), para aislar células NK, que contienen IL-2R $\beta\gamma$, o bien para producir linfocitos T activados, que expresan IL-2R $\beta\gamma$. Las técnicas para aislar estas poblaciones de células a partir de hu-PBMCs son conocidas por los expertos en el arte. Por ejemplo, las linfocitos T, o blastos PHA, se obtienen mediante la incubación de PBMCs por tres días en 10 microgramos/ml de fitohemaglutina (PHA-P; L9017, Sigma, St. Louis). Las células NK en reposo se obtienen comúnmente mediante un protocolo de selección negativa, por ejemplo utilizando un kit de aislamiento de células NK (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) para células humanas. Para correlacionar la actividad de estas proteínas de fusión con resultados obtenidos a partir de modelos de tumor de ratón, también es útil realizar estos ensayos en poblaciones celulares obtenidas a partir del ratón que expresa uno o el otro complejo receptor de IL-2. Por ejemplo, una población de células NK puede obtenerse a partir del bazo de ratones Balb/C recombinantes deficientes (SCID) utilizando un kit de enriquecimiento de células NK murinas SPINSEP™ (Stemcell Technologies Inc, Vancouver, BC, Canadá). La pureza de cualquiera de estas poblaciones enriquecidas puede evaluarse mediante un análisis FACS.

Brevemente, las células lavadas se colocaron en placas en una densidad de 10.000 células/pozo en una placa de microtitulación de 96 pozos y se incubaron en medio celular suplementado con, por ejemplo, variantes purificadas huKS-IL2 o huKS-IL2. Además, se evaluó la proteína huIL-2 del tipo salvaje, obtenida a partir de los Sistemas R&D (Minneapolis, MN) como un estándar. Se preparó la proteína agregada como una serie de dilución que abarca aproximadamente un rango de concentración de 1000 veces entre 0,45 ng/ml y 420 ng/ml (normalizado con respecto a los equivalentes molares de IL2). Después de 32 horas, se agregó 0,3 PCi de [metil-3H]timidina (Dupont-NEN-027) a cada pozo y se incubaron células por otras 16 horas. Después se cosecharon las células y se lisaron en filtros de vidrio. Se midió la 3H-timidina incorporada dentro del ADN en un contador de escintilación.

Se obtuvo un valor ED50 para cada variante de la proteína huKS-IL2 con respecto a la proliferación celular a partir del trazado de una curva de respuesta a la dosis y la identificación de la concentración de proteína que dio como resultado una respuesta media máxima. La selectividad de la respuesta se expresó como una proporción de valores ED50 por ejemplo, ED50 [TF1- β] / ED50 [CTLL-2]. Por lo tanto, una proporción ED50 alta indicó que se requirió una dosis de proteína relativamente más alta para elicitación de una respuesta de célula TF-1 β en comparación con una respuesta de célula CTLL-2. La proporción de los valores ED50 de las variantes huKS-IL2 se comparó con las proteínas huIL-2 libre y la huKS-IL2 original. Este valor normalizado es una medida del efecto diferencial. Un valor mayor que el obtenido para la proteína de referencia indicó un cambio en la selectividad hacia las células CTLL-2. En algunos casos puede ser preferible obtener proporciones ED50 con líneas celulares que se originen a partir de las mismas especies, de modo que las actividades IL-2 no sean influenciadas además por las diferencias entre especies en su interacción con los receptores. El siguiente ejemplo utiliza células CTLL-2 murinas y TF-1 β humanas

para calcular proporciones ED50 con proteínas de fusión Ig-IL2 e IL-2 libres, y los resultados representativos a partir de tal experimento se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Proteína	Proporción ED50
IL-2	0,81
HuKS-IL2	0,11
HuKS-ala-IL2	0,17
KS(NaQ)-IL2	0,72
HuKS-ala-IL2(N88R)	2300
KS-IL2(TTSR)	>6
HuKS-IL2 pegilada	1,99
HuKS-IL2 + Glicanasa	0,45
14.18-IL2	0,07
14.18-IL2 pegilada	1,34
14.18-IL2 + glicanasa	0,21

5 En este ejemplo, comparado con la proporción ED50 obtenida con IL-2 libre (0,81), se obtuvo una proporción ED50 aproximadamente 5 veces menor con huKS-IL2 (0,17). Esto indicó que la proteína de fusión cambió en su perfil de selectividad, mostrando una mayor selectividad hacia las células TF-1 β . Una combinación anticuerpo/IL-2 diferente, 14.18-IL2, también fue más selectiva para la TF1- β que para la IL-2 sola (proporción ED50 de 0,07), indicando que este efecto no estaba limitado a un anticuerpo específico contenido en la proteína de fusión anticuerpo-IL2, y la actividad reducida de las proteínas de fusión Ig-IL2 humanas hacia las células que llevan receptores murinos de alta afinidad con respecto a huIL-2 puede reflejar una característica general de las proteínas de fusión Ig-IL2.

10 Otras variantes tuvieron una proporción ED50 alterada tal que se favoreció una respuesta de célula CTLL-2. Se vio un efecto dramático con la huKS-ala-IL2(N88R), para la cual la proporción ED50 fue mayor a 2000, reflejando que la proliferación de célula TF-1 β , mediada en esas células por el receptor de afinidad intermedia, fue escasamente detectable. De este modo, mientras que la huKS-ala-IL2 activó la señalización de células con IL-2R $\alpha\beta\gamma$, no activó significativamente células con IL-2R $\beta\gamma$. La actividad de huKS-ala-IL2 (N88R) también se pudo evaluar sobre células NK murinas purificadas expresando el complejo IL-2R $\beta\gamma$ murino; en contraposición a lo que se reportó para la proteína IL2(N88R) humana libre – que indicó que la selectividad se perdió virtualmente cuando se examinaron las linfocitos T y NK de ratón (véase Wetzel et al., Resumen de la Reunión Anual ASCO 2001) – la proporción ED50 para la huKS-ala-IL2 (N88R) en las células NK de ratón fue similar a la observada con las células TF-1 β .

15 Se observaron cambios sutiles en la selectividad de la respuesta hacia las células CTLL-2 en las variantes Ig-IL2 con alteraciones que afectan la glicosilación de la parte de anticuerpo de la proteína de fusión. Específicamente, la KS(NaQ)-IL2, a la que le falta un sitio de glicosilación en la porción Fc del anticuerpo, mostró un triple aumento en la Proporción ED50 (0,72) con respecto a la huKSIL2, mientras que la huKS-IL2 tratada con N-Glicanasa mostró un doble aumento (proporción ED50 de 0,45) en relación a la huKS-IL2. Asimismo, el tratamiento N-Glicanasa de IL-2 fusionado a una molécula de anticuerpo diferente da lugar a un resultado similar; por ejemplo, la 14.18-IL2 tratada con Nglicanasa proporcionó un triple aumento en la proporción ED50 comparada con la 14.18-IL2 sin tratar. Estos resultados indicaron que ciertas alteraciones en la porción de anticuerpo de la propia molécula afecta las propiedades de unión y activación de una molécula IL-2 fusionada a la misma.

20 La pegilación de la proteína de fusión también alteró su perfil de selectividad. De nuevo, se observó un cambio hacia la actividad estimuladora de la CTLL-2. Para la huKS-IL2, una variante pegilada dio como resultado un aumento de 9 veces en la selectividad a favor de las células CTLL-2 (proporción ED50 de 1,99), y para la 14.18-IL2 se indujo un aumento de 20 veces mediante pegilación (proporción ED50 de 1,34).

25 En algunos casos, estos cambios en la selectividad para una proteína dada también pueden reflejar la combinación particular de los tipos celulares empleados en los ensayos, como se ilustra en los resultados representativos que se muestran en la Tabla 2. Por ejemplo, cuando se comparó KS-IL2, KS-ala-IL2 y IL-2 utilizando el Kit 225 de línea

celular que contiene IL-2R $\alpha\beta\gamma$ humana en lugar de la CTLL-2 murina, no se mantuvieron los patrones de cambio en la selectividad. Particularmente con relación a las células del Kit 225, estas tres proteínas mostraron una actividad esencialmente idéntica. Fundamentalmente, sin embargo, se descubrió que las tendencias en la respuesta de selectividad de las variantes de Ig-IL2 entre las células TF-1 β y las células del Kit-225 eran similares a las establecidas con células TF-1 β y células CTLL-2, incluyendo el efecto de desglicosilación de la fracción Fc de una proteína de fusión Ig-IL2 (véanse resultados representativos en la Tabla 2 a continuación y en el Ejemplo 10).

Tabla 2

Proteína	Proporción ED50
	TF-1 β /Kit-225
IL-2	2,8
HuKS-IL2	4
HuKS-ala-IL2	10,4
KS-ala-IL2(N88R)	52.000

Además, se descubrió que las células del Kit-225 eran más sensibles a la IL-2 y a las proteínas de fusión IL-2 y las variantes de las mismas que las células CTLL-2. Por ejemplo, el valor ED50 para la huKS-ala-IL2 fue 0,08 en las células del Kit-225 y 5,0 en las células CTLL-2, y para la KS-ala-IL2(N88R) fue de 0,13 en las células del Kit-225 y 3 en las células CTLL-2, lo que indica un aumento de 10-50 veces aproximadamente en la sensibilidad de las células del Kit-225 en estos ensayos. De este modo, el valor de la proporción ED50 para una proteína dada depende de la combinación particular del tipo de células empleados.

15 **Ejemplo 5: Farmacocinética de las proteínas de fusión IL-2 con características de unión al receptor modificadas**

Se comparó el perfil farmacocinético (PK) de la huKS-ala-IL2(N88R) con el perfil de la huKS-ala-IL2 y huKS-IL2. Para cada proteína, se utilizaron tres ratones de 6-8 semanas de vida. Se inyectaron veinticinco μg de las proteínas de fusión, diluidas a 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS, en la vena de la cola de los ratones, y se obtuvieron 50 μl de muestras de sangre mediante sangrado retro-orbital inmediatamente después de la inyección (0 horas) y 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la inyección. Se recolectaron las muestras de sangre en tubos recubiertos de heparina para evitar la coagulación de la sangre, se midieron los niveles de inmunocitocina en el sobrenadante de plasma poscelular en un ensayo ELISA. El procedimiento del ensayo ELISA utilizado para los estudios farmacocinéticos se ha descrito con anterioridad (WO01/58957). Este ensayo midió la presencia de una inmunocitocina intacta. La captura de la inmunocitocina a partir del plasma se llevó a cabo en placas cubiertas de EpCAM y se realizó la detección con un anticuerpo conjugado con HRP dirigido contra la IL-2. Se ha demostrado con anterioridad que la variante huKS-IL2 con una sustitución de K a A en la unión, huKS-ala-IL2, producía una mejora dramática en la vida media en circulación comparada con la huKS-IL2 (WO01/58957). De hecho, se descubrió que la vida media circulatoria de la huKS-ala-IL2(N88R) se mejoraba en forma similar, indicando que la alteración N88R en la porción IL-2 de la molécula no tenía un efecto sustancial en la farmacocinética. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Figura 2. La Figura 2 ilustra la concentración de la inmunocitocina presente en el suero a lo largo del tiempo (expresada como un porcentaje de la concentración de proteína que permanece en el suero en relación a la concentración inicial presente inmediatamente después de la administración intravenosa) a lo largo de 24 horas. Las concentraciones de proteína se determinan en un ensayo ELISA en el cual se captura la inmunocitocina mediante su fracción de anticuerpo y se detecta mediante su fracción de citocina.

Eje X = tiempo t en horas; Eje Y = log(% de concentración de proteína restante).

15 **Ejemplo 6: Toxicidad de las proteínas de fusión Ig-IL2 con características de unión al receptor modificadas en un mamífero**

Se examinó la toxicidad relativa de las variantes huKS-IL2, huKS-ala-IL2, y huKS-ala-IL2(N88R) de KS-IL2 en ratones. Como se mostró en el Ejemplo 5, la huKS-ala-IL2 y la huKS-ala-IL(N88R) han aumentado sustancialmente el PK en comparación con la huKS-IL2. Sin embargo, para fines comparativos, se utilizó un esquema de dosificación idéntico para las diferentes moléculas a pesar de la diferencia en PK. Mientras que es probable que una vida media en suero más larga aumente la eficiencia terapéutica también puede conducir a un incremento en la toxicidad. Sin embargo, este ejemplo muestra que, mientras que la huKS-ala-IL2 ha incrementado la toxicidad en comparación con la huKS-IL2 (debido a una vida media en circulación más larga), la huKS-ala-IL2 ha disminuido la toxicidad en comparación con la huKSIL2 a pesar de una vida media en circulación más larga.

Se dio a los ratones Balb/C (3 animales por condición experimental) inyecciones intravenosas diarias de una de tres proteínas por cinco días consecutivos. Las proteínas de fusión se diluyeron en 200µl de PBS y se administraron mediante la siguiente dosificación: la huKS-IL2 y la huKS-ala-IL2 a 25, 50, ó 75µg por ratón, y la huKS-ala-IL2(N88R) a 50, 75, ó 100µg por ratón. Un grupo de control recibió inyecciones intravenosas de PBS. La supervivencia de los ratones se monitoreó diariamente y se examinó el efecto sobre la supervivencia de los ratones. Los ratones sobrevivieron la administración de todas las dosis de la huKS-IL2. La huKS-ala-IL2, sin embargo, fue más tóxica. Mientras que los ratones toleraron una dosis de 25µg de huKS-ala-IL2, los 3 ratones murieron en el día 6 a una dosis de 50µg, y a una dosis de 75µg, dos ratones habían muerto el día 4,5, y el tercer ratón el día 5. La huKS-ala-IL2(N88R), por el otro lado, fue bien tolerada en todas las dosis, incluyendo 100µg. Efectivamente, también se administró la huKS-ala-IL2 a una dosis de 200µg por ratón, y los ratones sobrevivieron. Por lo tanto, la huKS-ala-IL2(N88R) fue significativamente menos tóxica que la huKS-ala-IL2.

Se disecaron los ratones que habían muerto durante el curso del tratamiento con la huKS-ala-IL2 y se evaluaron sus órganos. Todos los órganos, incluyendo los pulmones, el bazo, el hígado, el estómago, y los riñones estaban sumamente distendidos, lo que indica una filtración vascular considerable. También se evaluaron los órganos de los animales tratados con la variante huKS-ala-IL2(N88R). Los ratones fueron tratados como se describió más arriba, y se descubrió que el peso de los órganos de los animales tratados con huKS-ala-IL2 en general era similar al de los órganos de los animales de control, particularmente para los pulmones y el hígado. Sin ánimo de estar limitado a una teoría, se cree que el incremento en el peso del bazo se debe más a un incremento en la celularidad causada por una respuesta inmune del anticuerpo contra esta proteína humana que a una filtración vascular. Se infiere que la huKS-ala-IL2(N88R) produce menos filtraciones vasculares severas que la huKS-ala-IL2. La Tabla 3 proporciona un ejemplo de valores aproximados para el incremento de x-veces en el peso de los órganos con respecto a los órganos de un ratón de control:

Tabla 3

ÓRGANO	INCREMENTO EN PESO (x veces)	
	HuKS-ala-IL2 (20 µg/ratón)	huKS-ala-IL2(N88R) (100 µg/ratón)
Pulmón	4	1,7
Bazo	3	3
Hígado	1,5	1
Riñón	1	1

Se evaluó el efecto de las diferentes procedencias de las cepas de ratón, con alteraciones conocidas en la estructura de su sistema inmunológico, con respecto a la toxicidad de estas proteínas de fusión Ig-IL2. Se utilizaron las cepas de ratón DBA/2, Balb/C, B6.CB17-Prkdcscid/SzJ (SCID), beige, y SCID/beige. Se administraron las proteínas de fusión como se indicó más arriba a una dosis de 25µg y 50µg por ratón para la huKS-ala-IL2 y a una dosis de 200µg por ratón para la huKS-ala-IL2(N88R), y se evaluó la supervivencia y el peso de los ratones a lo largo de un período de dos semanas.

En el caso de la huKS-ala-IL2, la mayoría de las cepas de ratón dieron resultados similares a los vistos con los ratones Balb/C que se indican con anterioridad: la dosis de 50µg condujo a la muerte de los animales el día 5, mientras que a una dosis más baja los animales sobrevivieron y su peso se recuperó hasta alcanzar aproximadamente su peso inicial pero no alcanzaron el incremento de peso de los animales de control tratados con placebo. Cabe notar que los ratones beige, deficientes en las células NK funcionales, fueron más capaces de tolerar la dosis alta de 50µg; dos animales habían muerto para el día 9, pero uno, mientras que inicialmente sufrió una considerable pérdida de peso (aproximadamente 25% para el día 7), se recuperó, y para el día 15 había alcanzado el peso corporal de los animales tratados con placebo y el peso de aquellos tratados con una dosis más baja. Los ratones DBA/2 fueron más sensibles a la huKS-ala-IL2; aún a la dosis más baja, los animales DBA/2 murieron el día 5 y el día 9.

Con la huKS-ala-IL2(N88R), también fue evidente la mayor susceptibilidad de los ratones DBA/2 a las proteínas de fusión Ig-IL2: para el día 8, todos los animales habían muerto, e incluso a la mitad de la dosis (100µg) los animales habían muerto para el día 9. Una vez más, la proteína de fusión fue mejor tolerada en los ratones beige, mientras que los ratones SCID/beige perdieron peso significativamente (permanecieron estables a aproximadamente 80% del control tratado con placebo para el día 10).

Ejemplo 7: Eficacia de la proteína de fusión Ig-IL2 con características de unión al receptor modificadas en el tratamiento de diversos tumores en un mamífero

5 a) Tratamiento de un tumor subcutáneo CT26/KSA en ratones Balb/C. Se utilizaron las células de carcinoma de colon CT26, transducidas con el gen que codifica el antígeno KS humano (KSA) para inducir un tumor subcutáneo. Se suspendieron 2x10E6 células viables en 100µl de PBS y se inyectaron por vía subcutánea en la parte dorsal de ratones Balb/C de 6 semanas de vida. Cuando el tamaño del tumor alcanzó los 100 - 200mm³, se sometieron a grupos de 8 ratones a una de tres condiciones de tratamiento: se administraron inyecciones intravenosas durante cinco días consecutivos de 15µg de huKS-ala-IL2 o de huKS-ala-IL2(N88R) diluidas en 200µl de PBS, o PBS sólo. Se evaluó la progresión de la enfermedad midiendo el volumen del tumor dos veces por semana durante 50 días. En los animales de control, el volumen del tumor aumentó en forma estable, y llegó a alcanzar un tamaño de entre aproximadamente 3500 y 6000mm³ al momento del sacrificio, que fue alrededor del día 32. En cambio, los volúmenes de tumores de ambos grupos experimentales permanecieron esencialmente constantes hasta 50 días, lo cual indica que huKS-ala-IL2(N88R) fue tan efectiva como huKS-ala-IL2 en la prevención del crecimiento del tumor.

15 b) Tratamiento de un tumor subcutáneo LLC/KSA en ratones C57BL/6. En un segundo tumor modelo, se indujo un tumor subcutáneo utilizando células de carcinoma de pulmón Lewis transducidas con el gen que codifica el antígeno KS. Se suspendieron 1x10E6 células LLC viables que expresaban EpCAM en 100µl de PBS y se inyectaron por vía subcutánea en la parte dorsal de ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de vida. Cuando el tamaño del tumor alcanzó los 100 - 150mm³, se sometieron a grupos de ocho ratones al tratamiento y se evaluaron como se indica con anterioridad, con la salvedad de que la dosis administrada se incrementó a 20µg por inyección. En los animales de control, el volumen del tumor se incrementó rápidamente, excediendo los 6500mm³ en 20 días; el crecimiento del tumor para ambas condiciones experimentales se retardó en el mismo nivel, alcanzando los 4000mm³ en el mismo período de tiempo, lo cual indica una vez más que no hay diferencia en la eficacia entre el tratamiento con huKS-ala-IL2(N88R) y con huKS-ala-IL2 a la misma dosis.

25 c) Tratamiento de un tumor subcutáneo LLC/KSA en ratones B6.CB17-Prkdcscid/SzJ. Las proteínas de fusión de la invención también pueden ser efectivas en células que no sean linfocitos T maduros. Por ejemplo, en un experimento, las proteínas de fusión de la invención llevaron a un retardo en el crecimiento del tumor incluso en ratones que carecían de linfocitos T maduros. Estos resultados sugieren que las proteínas de fusión de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de tumores en, por ejemplo, pacientes inmunocomprometidos.

30 Se evaluó un modelo de tumor subcutáneo LLC/KSA en ratones B6.CB17-Prkdcscid/SzJ de 11 semanas de vida, con respuesta inmune mediada por linfocitos T y células B comprometida. Se siguió el mismo protocolo de tratamiento que se describe con anterioridad. Los tumores en los animales de control crecieron rápidamente, a 3500mm³ en 15 días. Ambas huKS-ala-IL2 y huKS-ala-IL2(N88R) fueron efectivas en grado similar en retardar el crecimiento del tumor a menos de la mitad del tamaño durante el mismo período de tiempo. Además, las diferencias en las tasas de crecimiento de tumores entre los ratones C57BL/6, que tienen un sistema inmune intacto, y los ratones B6.CB 17-Prkdcscid/SzJ, que carecen de linfocitos T y células B, fueron mínimas.

35 Además, el hecho de que KS-ala-IL2 llevó al tratamiento del tumor de manera tan óptima como en ratones con el sistema inmune intacto y en ratones que carecían de linfocitos T, indicó que en este modelo de tumor la respuesta inmunológica operó a través de un mecanismo no mediado por linfocitos T. Por lo tanto, es valioso mantener en una molécula terapéutica la opción de estimular una respuesta inmune a través de una variedad de células efectoras. En el caso de KS-ala-IL2(N88R), que fue tan efectiva como KS-ala-IL2 en cualquiera de los ratones tratados, las actividades de células efectoras que actúan en forma independiente de los linfocitos T fue aparentemente preservada.

40 d) Tratamiento de metástasis LLC/KSA en los pulmones de ratones C57BL/6. También se utilizaron células LLC/KSA en un modelo de metástasis de pulmón. Se suspendieron 1x10E6 células viables en 200µl de PBS y se inyectaron por vía intravenosa en ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de vida. El día 4, se sometieron grupos de ocho ratones a una de las siguientes condiciones de tratamiento: se administraron inyecciones por vía intravenosa durante cinco días consecutivos con 200µg de PBS, o con 20µl de KS-ala-IL2 o KS-ala-IL2(N88R), diluidos en 200µl de PBS. Los animales se sacrificaron aproximadamente el día 27 y los pulmones se disecaron y fijaron en solución de Bouin. El grado de metástasis en los pulmones se evaluó mediante la clasificación del porcentaje de superficie cubierta por metástasis y por peso del pulmón.

45 Los pulmones del grupo de control tenían más del 96% de su superficie cubierta con metástasis, y un incremento de aproximadamente cinco veces en el peso del pulmón (0,75g) con respecto a un pulmón normal. En cambio, los pulmones de ratones tratados con huKS-ala-IL2 apenas estaban cubiertos con metástasis (5,6%), y los de ratones tratados con huKS-ala-IL2(N88R) virtualmente no presentaban metástasis (0%). Los pulmones de animales tratados con huKS-ala-IL2 y huKS-ala-IL2(N88R) tenían un peso normal. Por lo tanto, huKS-ala-IL2(N88R) demostró ser tan eficaz como huKS-ala-IL2 en el tratamiento de metástasis de pulmón a una dosis mucho menor que el umbral que afectaría su supervivencia.

Ejemplo 8: Variantes de KS-IL2 en terapia combinada.

Se investigó el efecto de administración de una variante de KS-IL2 de baja toxicidad, tal como huKS-ala-IL2(N88R), junto con un segundo agente inmuno-modulador para el tratamiento de tumores, empleando el modelo de tumor subcutáneo LLC/KSA en ratones como se describe en el ejemplo 7b.

5 a) Variantes de huKS-ala-IL2 y ciclofosfamida. Para la terapia combinada, la ciclofosfamida se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 75mg/kg el día 0, cuando los tumores promediaban 90mm³, y se continuó con una administración diaria de la proteína de fusión durante cinco días (del día 1 hasta el día 5). huKS-ala-IL2(N88R) se administró a una dosis de 20µg o 100µg. Las condiciones de control incluyeron animales tratados con placebo y animales tratados con huKS-ala-IL2 sola a una dosis de 20µg, o con huKS-ala-IL2(N88R) sola a una dosis de 20µg o a una dosis de 100µg. Los tumores en los animales tratados con placebo habían progresado a aproximadamente 5000mm³ para el día 19, mientras que los tumores de ratones tratados con huKS-ala-IL2 tenían aproximadamente 2200mm³, y los de los ratones tratados con 20µg o 100µg de huKS-ala-IL2(N88R) tenían aproximadamente 2600mm³ y 1700 mm³, respectivamente. La co-administración de ciclofosfamida dio como resultado un tumor de 1700mm³ a la dosis de 20µg de huKS-ala-IL2(N88R) y de 1250mm³ a la dosis mayor, lo cual es significativamente menor que el tratamiento sólo con huKS-ala-IL2.

b) Variantes de huKS-ala-IL2 e indometacina. Para la terapia combinada, se administró indometacina por vía oral a una dosis de 35µg/ratón/día junto con una administración diaria de la proteína de fusión por cinco días (del día 1 al día 5). Los tumores inicialmente promediaron 90mm³. huKS-ala-IL2(N88R) se administró en una dosis de 20µg. Las condiciones de control incluyeron animales tratados con placebo y animales tratados con huKS-ala-IL2 sola a una dosis de 20µg, o con huKS-ala-IL2(N88R) sola a una dosis de 20µg. Los tumores en los animales tratados con placebo habían progresado a aproximadamente 5000mm³ para el día 19, mientras que los tumores de ratones tratados con huKS-ala-IL2 tenían aproximadamente 2200mm³, y los de los ratones tratados con 20µg de huKS-ala-IL2(N88R) tenían aproximadamente 2600mm³ y 1700 mm³, respectivamente. La co-administración de indometacina dio como resultado una reducción del tamaño del tumor a 850mm³ a la dosis de 20µg de huKS-ala-IL2(N88R), lo cual es significativamente menor que el resultado obtenido con el tratamiento sólo con huKS-ala-IL2.

Ejemplo 9: Variantes de KS-IL2 con un índice terapéutico mejorado.

Las variantes de KS-IL2 se construyen con mutaciones en posiciones particulares en la secuencia IL-2. Por ejemplo, las sustituciones son creadas en posiciones que probablemente se conecten con la subunidad α del receptor de IL-2. Un residuo apropiado es, por ejemplo, F42 en la secuencia madura de huIL-2. Se cree que la estructura anular aromática de este aminoácido estabiliza la conformación local en IL-2 (Mott et al, JMB 1995, 247:979), y se encontró que las sustituciones en esta posición con por ejemplo, Y, A o K en la inmunocitocina llevan a una molécula con progresivamente menor afinidad con el receptor de IL-2 y bioactividad. Estas moléculas se probaron en animales y se encontró que se logra un incremento en el índice terapéutico en el tratamiento de tumores en comparación con la forma inalterada de la inmunocitocina. Otras sustituciones que son efectivas son en las posiciones R38 y K43.

35 Otras sustituciones en la parte IL-2 de la inmunocitocina se encuentran en una región que es probable que se conecte con la subunidad β , por ejemplo, en la posición E15 o L19 de la hu IL-2 madura. Se descubrió que, cuando estos residuos mutan a, por ejemplo, A o R en la inmunocitocina, las inmunocitocinas variantes tienen menor afinidad para la subunidad β del receptor de IL-2 que la forma inalterada de la inmunocitocina. Generalmente se encontró que los efectos con sustituciones a R son más graves que con sustituciones a A, lo cual puede estar asociado al volumen de la cadena lateral de R. Estas moléculas se prueban en animales y se encontró que se logró un aumento en el índice terapéutico en el tratamiento de tumores en comparación con la forma inalterada de la inmunocitocina. Otras sustituciones se introducen en las posiciones D84 y V91 y se mostró que también son efectivas para aumentar el índice terapéutico.

45 Una sustitución en la parte IL-2 de la inmunocitocina que es probable que afecte una región de la molécula que se conecta con la subunidad γ del receptor de IL-2 se introduce en la posición N119 de la hu IL-2 madura. Una variante de inmunocitocina más sutil se crea con una mutación a A y una mutación más radical se crea con una mutación a R. El efecto de estas variantes se evalúa en animales que tienen tumores y se encontró que estas inmunocitocinas variantes tienen un índice terapéutico mejorado en comparación con la forma inalterada de la inmunocitocina.

50 También se encontró que puede lograrse un incremento en el índice terapéutico generando múltiples mutaciones en la inmunocitocina IL-2, en particular para moléculas donde mutaciones en una sola posición en la inmunocitocina demostraron tener sólo un incremento marginal o insignificante en el índice terapéutico. Por ejemplo, se encontró que una inmunocitocina que contiene la combinación F42A con L19A, o L19A con N119A, es tan efectiva como cualquiera de las variantes de inmunocitocinas solas. Para una aplicación que incluye múltiples mutaciones, es particularmente útil utilizar mutaciones que reducen el tamaño de una cadena lateral de aminoácidos. Otra sustitución introducida en la parte IL-2 de la inmunocitocina se encuentra en T51 de la huIL-2 madura. Mientras que una mutación a A no muestra una mejora en el índice terapéutico, la mutación a P crea una inmunocitocina con índice terapéutico mejorado en comparación con la forma inalterada de la inmunocitocina en el tratamiento de tumores.

Ejemplo 10: Variante de la proteína de fusión Ig-IL2 huKS-ala-IL2(D20T) y derivados de la misma.

Se generaron las variantes basadas en Ig-IL2(D20T), que contienen la sustitución de un aspartato por treonina en la posición 20 de la huL-2 madura. Estas variantes contienen sustituciones adicionales en el dominio Ig, tales como en la parte Fc o en los dominios diana de anticuerpos. Para generar constructos de ADN que codifican estas moléculas, se siguieron procedimientos esencialmente como se describen en el Ejemplo 1, utilizando un enfoque PCR con cebadores específicos para constructos para introducir la mutación y estrategias de clonación apropiadas, que son familiares para los expertos en el arte.

a) huKS-ala-IL2(D20T). Para introducir la mutación D20T, se utilizó un enfoque de mutagénesis con el conjunto de cebador 5'-

10 CAGCTGCAACTGGAGCATCTCCTGCTG**ACCCTCCAGATGATTCTGAAT** -3' (los nucleótidos en negrita indican el codón sustituido) (SEQ ID NO: 28) y cebador T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA -3') (SEQ ID NO: 29), el fragmento de ADN se amplió de ADN huL-2 tipo salvaje en un plásmido pBS y se insertó en un vector TA (Invitrogen) para generar TA-IL2(D20T). La mutagénesis se verificó mediante secuenciación. Para sustituir la secuencia IL-2 original en la huKS-ala-IL2, se clonó un fragmento 385 bp PvuII/XhoI de TA-IL2(D20T) en el plásmido de inmunocitocina original en una reacción de triple ligadura. La proteína de fusión se expresó y purificó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3. Las secuencias de aminoácidos correspondientes a las regiones variables de cadena liviana y cadena pesada hu-KS se muestran en la SEQ. ID NO: 30 y 31 respectivamente.

Se generaron otras variantes de huKS-ala-IL2(D20T), incorporando el mismo fragmento derivado de PCR en dos estructuras principales de plásmidos diferentes.

20 b) dI-KS-ala-IL2(D20T). Con anterioridad se describió una versión de KS-ala-IL2 con una alteración que elimina un epítipo de linfocito T potencial. La proteína de fusión se expresó y purificó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3. La secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo dI-KS fusionado a la variante IL2(D20T) se muestra en la SEQ ID NO: 32. SEQ ID NO: 33 y 34 corresponden a las regiones variables de cadena liviana y cadena pesada dI-KS respectivamente.

25 c) dI-KS-ala-IL2(D20T) desglucosilada. Se realizó desglucosilación enzimática utilizando N-Glicanasa en la proteína dI-KS-ala-IL2(D20T) esencialmente como se describe en el Ejemplo 2.

30 d) dI-KS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T). La fracción Ig para esta proteína de fusión IL-2(D20T) se derivó de la región constante de una subclase γ 4 de IgG (SEQ ID NO: 7), que además conservó características de la bisagra γ 1 de IgG (SEQ ID NO: 10). Además, se introdujeron mutaciones que eliminan epítopos de linfocitos T potenciales. Aún más, esta proteína de fusión contiene la sustitución de asparagina por glutamina, que elimina el sitio de N-glicosilación en Fc (véase el Ejemplo 4). La sustitución concomitante de una fenilalanina por alanina elimina el epítipo de linfocito T potencial. La proteína de fusión se expresó y purificó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3.

35 e) dI-NHS76(γ 2h)-ala-IL2(D20T). La fracción Ig para esta proteína de fusión IL-2(D20T) se derivó de la región constante de una subclase γ 2 de IgG, que además retuvo las características de la bisagra γ 1 de IgG. En NHS76, las regiones variables Ig se dirigen contra epítopos contenidos en complejos ADN-histona y especialmente reconocen centros necróticos de tumores (Williams et al, PCT WO 00/01822). Además, se introdujo una mutación que elimina un epítipo de linfocito T potencial en la región variable de la cadena liviana. Este residuo, leucina 104, yace en la unión CDR3 V-J, y fue sustituido por valina. La proteína de fusión se expresó y purificó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3.

40 f) dI-NHS76(γ 2h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T). Esta proteína, basada en la proteína del Ejemplo 10e, contiene adicionalmente las mutaciones que eliminan la glicosilación N-ligada en Fc y un epítipo de linfocito T potencial, como se describe en el Ejemplo 10d. La proteína de fusión se expresó y purificó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3. En una realización, las proteínas de fusión de la invención incluyen la secuencia de cadena pesada de NHS76(γ 2h)(FN>AQ) molécula fusionada a la variante IL2(D20T), como se muestra en la SEQ ID NO: 35 y la secuencia de región constante y variable de cadena liviana correspondiente a la SEQ ID NO: 36. Sin embargo, la región de cadena pesada de la SEQ ID NO: 35 puede utilizarse en combinación con cualquier región constante o variable de cadena liviana de IgG.

45 g) dI-NHS76(γ 4h)-ala-IL2(D20T). Esta proteína es similar a la descrita en el Ejemplo 10e, pero contiene una cadena pesada derivada de la subclase de IgG γ 4 en lugar de γ 2. La proteína de fusión se expresó y purificó esencialmente tal como se ha descrito en el Ejemplo 3.

50 h) dI-NHS76(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T). Esta proteína, basada en la proteína del Ejemplo 10g, contiene de manera adicional las mutaciones que eliminan la glicosilación N-ligada en Fc y un epítipo de linfocito T potencial, tal como se ha descrito en el Ejemplo 10d. La proteína de fusión se expresó y purificó de manera esencial tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. En un modo de realización, las proteínas de fusión de la invención incluyen la secuencia de cadena pesada de la molécula dI-NHS76(γ 4h)(FN>AQ) fusionada a la variante de IL-2(D20T) representada en la SEQ ID NO: 37, y en la secuencia de la región de cadena liviana variable y constante correspondiente a la SEQ ID

NO: 36. Sin embargo, la región de cadena pesada de la SEQ ID NO: 37 puede utilizarse en combinación con cualquier región constante o variable de cadena liviana de IgG.

La fracción Ig de una proteína de fusión de la invención puede incluir dominios de regiones constantes de cadena pesada derivados de cualquier subclase de IgG, incluyendo combinaciones que contienen dominios de moléculas de IgG derivados de diferentes especies. Por lo tanto, las proteínas de fusión de la invención pueden incluir regiones de bisagra derivadas de cualquier subclase de IgG, por ejemplo, una región de bisagra derivada de IgG gamma 1 (SEQ ID NO: 10), gamma 2 (SEQ ID 11) o gamma 4 (SEQ ID NO: 12).

Actividad de las variantes de Ig-IL2(D20T) en bioensayos: las proteínas de fusión Ig-IL2(D20T) fueron evaluadas en bioensayos que miden la habilidad de células dependientes de IL-2 para que proliferen el crecimiento, lo que fue expresado como un valor de ED50 (ver el Ejemplo 4). Los ensayos se realizaron en células CTLL-2 murinas o en un kit-225 de células humanas (que expresan IL-2R $\alpha\beta\gamma$), y células humanas TF-1 β o células murinas NK (que expresan IL-2R $\beta\gamma$).

Por ejemplo, en un experimento representativo se encontró que, en comparación con huKS-ala-IL2, el valor ED50 para dl-KS-ala-IL2(D20T) en IL-2R $\alpha\beta\gamma$ con células CTLL-2 no sufrió cambios, mientras que en IL-2R $\beta\gamma$ con células TF-1 β resultó aproximadamente 900 veces más elevado. La proporción de ED50, tal como se ha definido en el Ejemplo 4, resultó, por tanto, de alrededor de 150, revelando un cambio de aproximadamente 750 veces en la selectividad hacia IL-2R $\alpha\beta\gamma$ con células CTLL-2 en comparación con huKS-ala-IL2. En comparación con el cambio en la selectividad de aproximadamente 20.000 veces (en relación a KS-ala-IL2), observado con huKS-ala-IL2(N88R) en esta par de líneas celulares, la selectividad se redujo aproximadamente de 10 a 20 veces para dl-KS-ala-IL2(D20T), lo que reflejó la respuesta proliferativa medible que se obtuvo de las células que expresan IL-2R $\beta\gamma$. Esta tendencia resultó también evidente cuando se utilizaron kits de 225 células humanas. Tal como se descubrió con otras proteínas de fusión de Ig que contienen el anticuerpo KS, la desglucosilación de la parte del anticuerpo presentaba un pequeño pero consistente efecto en la reducción de actividad de la proteína de fusión de las células que expresan IL-2R $\beta\gamma$.

La proliferación celular dependiente de IL-2 también se midió en las variantes de Ig-IL(D20T) que contienen una fracción diferente del anticuerpo. Se descubrió que, en comparación con dl-NHS76(γ 2)-ala-IL2, el valor ED50 para dl-NHS76(γ 2)-ala-IL2(D20T) en IL-2R $\alpha\beta\gamma$ con el Kit-225 se incrementó 3 veces, mientras que en IL-2R $\beta\gamma$ con células TF-1 β se incrementó aproximadamente 230 veces. La proporción resultante de ED50 de 350 se encontraba en el mismo rango que se observó con dl-KS(γ 4)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) y al menos 10 veces menos selectivo que huKS-ala-IL2(N88R). Se muestran resultados representativos en la Tabla 4.

Tabla 4

Proteína	Proporción de ED50	Proporción de ED50
	TF-1 β /CTLL-2	TF-1 β /Kit-225
dl-KS-ala-IL2(D20T)	150	3000
dl-KS(γ 4) (FN>AQ)-ala-IL2(D20T)		5600*
dl-NHS76(γ 2)-ala-IL2(D20T)		350

*= media de diferentes lotes

Farmacocinética de las variantes de Ig-IL2(D20T): para valorar la interacción de las variantes de Ig-IL2 con los receptores de la superficie celular de Fc, la unión de las proteínas de fusión de Ig-IL2 a los receptores Fc γ R se ensayó en ELISA basado en células, utilizando U937 células. Las proteínas de fusión (huKS-ala-IL2, dl-huKS-ala-IL2, dl-KS-ala-IL2(D20T), and dl-KS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)) fueron diluidas 2 veces en un rango desde 100 μ g/ml hasta 780 ng/ml, incubadas con las células y la unión fue detectada utilizando IgG Fc Ab F(ab') antihumano conjugado con FITC, (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). La concentración de la unión media máxima de huKS-ala-IL2 y dl-KS-ala-IL2 para estas células fue de alrededor de 5 μ g/ml, y de manera interesante, se incrementó dos veces con la proteína dl-KS-ala-IL2(D20T). Aunque la introducción de la mutación que evita la glicosilación de la fracción de Ig (dl-KS(γ h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)) redujo la unión de esta proteína a las células U973 de 5 a 10 veces, la unión no fue suprimida del todo.

Se investigaron las propiedades farmacocinéticas de las variantes de Ig-IL2(D20T) en ratones, esencialmente tal como se describieron en el Ejemplo 5. De manera sorprendente, en comparación con dl-KS-ala-IL2, la vida media de dl-KS-ala-IL2(D20T) se redujo drásticamente. El análisis del perfil de OPK indicó que el efecto fue particularmente espectacular durante la fase α : mientras que el 50% de dl-KS-ala-IL2 estaba aún disponible tras 1 hora, solo aproximadamente el 5% de dl-KS-ala-IL2(D20T) estaba aún presente. Las pendientes de la fase β del perfil de PK para estas proteínas eran similares. Se obtuvo un perfil de PK esencialmente idéntico al que fue observado con dl-

KS-ala-IL2(D20T) con la proteína de fusión dl-NHS76(y2h)-ala-IL2(D20T), la cual contiene una subclase de IgG γ 2, que normalmente muestra la menor afinidad con FcR. Por tanto, el efecto de la fracción de la proteína IL(D20T) en la proteína de fusión no estaba limitada al anticuerpo dl-KS.

5 Se observó que la desglicosilación de una proteína de fusión de Ig, en general, tiene un efecto de aumentar la fase α de un perfil de PK. El efecto de la desglicosilación enzimática de dl-KS-ala-IL2(D20T) sobre el perfil de PK fue por lo tanto investigado. De hecho, la fase α del perfil de PK fue esencialmente restaurada a lo que se había observado con dl-KS-ala-IL2. El mismo efecto se alcanzó cuando la glicosilación se suprimió mediante mutagénesis, al igual que en la proteína de fusión dl-KS(y4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T). Es por lo tanto probable que el efecto sobre el perfil de PK sea debido a la unión reducida de FcR.

10 Toxicidad de las variantes de Ig-IL2(D20T): la toxicidad de la variante KS(y4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) de Ig-IL2(D20T) se comparó con la de dl-KS-ala-IL2 en ratones Balb/C, tal como se ha descrito en el Ejemplo 6.

15 Ambas proteínas de fusión tuvieron una vida media de serum similar en ratones. Se administró dl-(y4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) en cinco dosis diarias de o bien 100 μ g/ratón, 200 μ g/ratón o bien 400 μ g/ratón, mientras que se administró dl-KS-ala-IL2 en cinco dosis diarias de 40 μ g/ratón. Se descubrió que los ratones sobrevivieron incluso a una dosis de 400 μ g/ratón de dl-KS(y4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T), mientras que los ratones de control, que recibieron una décima parte de la dosis de dl-KS-ala-IL2, habían muerto por el día 6. El peso de los cuerpos de los ratones tratados con dl-KS(y4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) se vio ligeramente afectado, cayendo de forma transitoria hasta el 97% de su peso inicial en el día 7. Una diferencia de más de 10 veces en la dosis tolerada puede indicar una mejora sustancial en el índice terapéutico.

20 Eficacia de las variantes de Ig-IL(D20T) para el tratamiento de tumores: la eficacia de las variantes de Ig-IL(D20T) se evaluó en ratones Balb/C con tumores subcutáneos derivados de células CT26/KSA, tal como se ha descrito en el Ejemplo 7a.

25 La proteína de fusión dl-KS(y4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) se administró en dosis de 15 μ g/ratón y 30 μ g/ratón. Los tumores comenzaron en un tamaño medio de 126 mm³ y alcanzaron tamaños de entre 1800 mm³ y 5000 mm³ al llegar el día 28. Los tumores en los ratones tratados con 15 μ g/ratón de dl-KS-ala-IL2 habían crecido hasta un tamaño medio de 355 mm³, mientras que los tumores en ratones tratados con 15 μ g/ratón de dl-KS-ala-IL2(D20T) habían alcanzado un tamaño medio de 2250 mm³. Este hecho se dio muy probablemente debido al pobre PK de la molécula. Los tumores en ratones tratados con dl-KS(y4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) en la dosis baja de 15 μ g/ratón habían crecido hasta cierto punto, hasta un tamaño medio de 1450 mm³; sin embargo, mientras que en la dosis de 30 μ g/ratón los tumores alcanzaron un tamaño medio de 950 mm³, de manera significativa, en más de la mitad de ratones los tumores no habían crecido de forma apreciable. Por tanto, en dosis aumentadas dl-KS(y4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) tenía un efecto significativo sobre la inhibición del crecimiento tumoral. De hecho, la dosis utilizada en este experimento fue al menos 12 veces más baja que una dosis máxima tolerada para esta molécula y por lo tanto es susceptible de presentar un índice terapéutico mejorado sobre el huKS-ala-IL2, el cual fue administrado, en comparación, en un tercio y hasta una mitad de la dosis máxima tolerada.

Ejemplo 11: Afinidades relativas de proteínas de fusión IL-2 mutantes y de tipo salvaje para diferentes receptores de IL-2.

La diferencia en la afinidad de las diferentes proteínas de fusión de la invención por un receptor IL-2R $\beta\gamma$ con respecto a un receptor de IL-2R $\alpha\beta\gamma$ puede medirse mediante un ensayo tal como un radioinmunoensayo. Se introduce la misma cantidad de células que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ o de células que expresan el receptor IL-2R $\beta\gamma$ en placas de plástico. Se realiza una serie de dilución con una cantidad de proteínas de fusión IL-2 mutante o de tipo salvaje igual a la cantidad de células que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ o de células que expresan el receptor IL-2R $\beta\gamma$ para obtener una curva estándar. Las proteínas de fusión no enlazadas se lavan y se detecta la cantidad de proteína de fusión enlazada a cada tipo de célula mediante un ligando radiomarcado. En el caso de una proteína de fusión Fc-IL-2, el ligando puede ser una molécula tal como una proteína A estafilocócica que se une a la parte Fc de una IgG. El ligando también puede ser otro anticuerpo que reconoce una parte de una subclase particular de molécula de IgG, por ejemplo, anticuerpos de regiones constantes de IgG gamma 1, IgG gamma 2 o IgG gamma 4. El ligando no enlazado se lava y se mide la radioactividad de la placa que contiene ya sea células que expresan IL-2R $\alpha\beta\gamma$ unidas con la proteína de fusión IL-2 de tipo salvaje; células que expresan IL-2 $\alpha\beta\gamma$ unidas con la proteína de fusión IL-2 mutante; células que expresan IL-2R $\beta\gamma$ unidas con la proteína de fusión IL-2 tipo salvaje o células que expresan IL-2R $\beta\gamma$ unidas con la proteína de fusión mutante en un contador gamma. Los datos obtenidos a partir del ensayo de unión son normalizados para determinar la cantidad de células y receptores expresados en las células.

55 En otro ensayo, se marcaron las proteínas de fusión, ya sea en forma radioactiva, o no radioactiva, utilizando una variedad de técnicas conocidas en el arte. De manera similar al ensayo descrito con anterioridad para un ligando marcado, ya sea la proteína de fusión mutante o de tipo salvaje se agregó a igual número de células en placas y se mide la cantidad de proteína de fusión marcada.

La afinidad de unión de una proteína de fusión para un receptor particular se mide mediante la proporción de concentración del ligando enlazado o proteína de fusión enlazada, como se describe con anterioridad, y el producto de la concentración del ligando no enlazado o la proteína de fusión no enlazada y la concentración total de la proteína de fusión añadida a cada reacción. En comparación con una proteína de fusión IL-2 tipo salvaje, ciertas mutaciones en la fracción IL-2 alteran la afinidad relativa de la proteína de fusión hacia un receptor IL-2R $\beta\gamma$ y un receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Gillies, Stephen
- <120> Inmunocitocinas con selectividad modulada
- 10 <130> LEX-020PC
- <150> 60/337,113
- <151> 04/12/2001
- <150> 60/371,966
- <151> 12/04/2002
- 15 <160> 37
- <170> Patente en versión 3.1
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia IgG gamma 1
- <400> 1

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
1 5

- 25 <210> 2
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Secuencia Ig Gamma 2 ó 4
- <400> 2

Gln Phe Asn Ser Thr
1 5

- <210> 3
- <211> 133
- 35 <212> PRT

ES 2 381 025 T3

<213> Homosapiens

<400> 3

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

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

5 <210> 4

<211> 12

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Sitio Xma I creado en el gen de cadena pesada gamma 1 humano

<400> 4

tccccgggta aa 12

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión huKS-ala-IL2 tipo salvaje

5 <400> 5

.
Ser Pro Gly Lys Ala Pro Thr
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión huKS-ala-IL2 mutante

<400> 6

Ser Gly Pro Ala Ala Pro Thr
1 5

15 <210> 7

<211> 327

<212> PRT

<213> Homosapiens

<220>

20 <221> varios

<222> (1)..(327)

<223> Región constante 4 gamma humana

<400> 7

ES 2 381 025 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

ES 2 381 025 T3

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 8

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Homosapiens

<220>

<221> varios

ES 2 381 025 T3

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

ES 2 381 025 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 9

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Homosapiens

<220>

<221> varios

<222> (1)..(326)

<223> Región constante 2 gamma humana

10 <400> 9

ES 2 381 025 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

ES 2 381 025 T3

	100		105		110														
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp				
		115					120					125							
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp				
	130					135					140								
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly				
145					150					155					160				
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn				
				165					170						175				
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp				
			180					185						190					
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro				
		195					200					205							
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu				
	210					215					220								
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn				
225					230					235					240				
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile				
				245					250						255				
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr				
		260					265						270						
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys				
	275						280					285							
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys				
290						295					300								
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu				
305					310					315					320				
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys														
				325															

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Región bisagra IgG gamma 1 humana

<400> 10

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10

<210> 11

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región bisagra IgG gamma 2 humana

15 <400> 11

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región bisagra IgG gamma 4 humana

<400> 12

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

25 <210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Terminal C de regiones IgG gamma 1 y gamma 2

<400> 13

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Terminal C de región constante de IgG gamma 4

<400> 14

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
1 5

10 <210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Terminal C mutada de regiones constantes de IgG gamma

<400> 15

Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala
1 5

<210> 16

<211> 32

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador homosentido para generar la proteína de fusión huKS-ala-IL2 (N88R)

<400> 16

25 ccccggtgc cgcccaact tcaagttcta ca 32

<210> 17

<211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador antisentido para generar la proteína de fusión huKS-ala-IL2(N88R)

<400> 17

agccctttag ttccagaact attacgtga tcctgctgat taagtccta ggt 53

<210> 18

<211> 40

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> segundo cebador homosentido

<400> 18

agttctggaa ctaaagggt ccgaaacaac attcatgtgt 40

10 <210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia mutante en la variante huKS M1 IL-2

<400> 19

Thr Thr Ser Arg
i

<210> 20

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de unión anticuerpo-IL-2

<400> 20

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Thr
1 5 10

25

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de unión anticuerpo-IL-2 mutante

<400> 21

Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala Pro Thr
1 5 10

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia en la variante huKS M1-IL2

<400> 22

Asp Leu Ile Ser Asn Ile
1 5

10 <210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia en la variante huKS M1-IL2 mutante

<400> 23

Asp Thr Thr Ser Arg Ile
1 5

<210> 24

<211> 43

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador homosenrido para generar la mutación N88R

<400> 24

25 acttaagacc tagggacacc accagcagga tcaacgtaat agt 43

<210> 25

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> cebador antisentido para generar la mutación N88R

<400> 25

atcatgtctg gatccctc 18

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mutación N a Q en el dominio CH2 de la región Fc constante gamma 1

<400> 26

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg
1 5

10 <210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Mutación FN a AQ en la parte Fc de las regiones constantes gamma 2 ó 4

<400> 27

Gln Ala Gln Ser Thr

<210> 28

<211> 48

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador homosentido para la mutación D20T

<400> 28

25 cagctgcaac tggagcatct cctgctgacc ctccagatga ttctgaat 48

<210> 29

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> cebador antisentido para la mutación D20T

<400> 29

attaaccctc actaaagga 20

ES 2 381 025 T3

<210> 30

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> región variable de cadena pesada hu-KS

<400> 30

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Thr Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Arg Phe Ile Ser Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 31

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> región variable de cadena liviana hu-KS

<400> 31

ES 2 381 025 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 32

<211> 579

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada dl-KS-ala IL2 (D20T) fusionada a la variante IL-2

<400> 32

10 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

ES 2 381 025 T3

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Ala Glu Thr Ser Thr Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Arg Phe Ile Ser Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

ES 2 381 025 T3

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala Pro
 435 440 445

Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
 450 455 460

Leu Thr Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro
 465 470 475 480

Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala
 485 490 495

ES 2 381 025 T3

Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
500 505 510

Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
515 520 525

Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
530 535 540

Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile
545 550 555 560

Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser
565 570 575

Thr Leu Thr

<210> 33

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada dl-KS

<400> 33

ES 2 381 025 T3

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Ala Glu Thr Ser Thr Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Arg Phe Ile Ser Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena liviana dl-KS

<400> 34

ES 2 381 025 T3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30

Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 35

<211> 580

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada dl-NHS76(gamma2h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) fusionada a la variante IL2

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

ES 2 381 025 T3

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Lys Trp Ser Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

ES 2 381 025 T3

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ala Gln Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala
 435 440 445

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 450 455 460

Leu Leu Thr Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 465 470 475 480

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 485 490 495

ES 2 381 025 T3

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
500 505 510

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
515 520 525

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
530 535 540

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
545 550 555 560

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
565 570 575

Ser Thr Leu Thr
580

<210> 36

<211> 229

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> región de cadena liviana variable dl-NHS76(gamma4th)(FN>AQ)-ala-IL2 (D20T)

<400> 36

ES 2 381 025 T3

	100		105		110										
Asp	Ser	Asp	Pro	Leu	Pro	Leu	Ile	His	Pro	Ala	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala
		115					120					125			
Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala
	130					135					140				
Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala
145					150					155					160
Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val
				165					170						175
Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser
			180					185						190	
Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Lys	Ser	Tyr
		195					200					205			
Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	Ala
	210					215					220				

Pro Thr Glu Cys Ser
225

<210> 37

<211> 580

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada dl-NHS76(gamma4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) fusionada a la variante IL-2

<400> 37

ES 2 381 025 T3

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 .
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Lys Trp Ser Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 .
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 .
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ala Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

ES 2 381 025 T3

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala
 435 440 445

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 450 455 460

Leu Leu Thr Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 465 470 475 480

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 485 490 495

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 500 505 510

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 515 520 525

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 530 535 540

ES 2 381 025 T3

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
545 550 555 560

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
565 570 575

Ser Thr Leu Thr
580

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína de fusión que comprende una fracción de dominio de anticuerpo fusionada a una fracción IL-2 mutante en donde la fracción IL-2 mutante comprende una sustitución de aminoácido que cambia un ácido aspártico a una treonina en una posición correspondiente a la posición 20 (D20T) de la secuencia de aminoácidos de la proteína IL-2 humana madura establecida en la secuencia ID NO: 3, en donde la proteína de fusión exhibe mayor selectividad que una proteína de referencia hacia células que expresan un receptor de alta afinidad, en donde dicha proteína de referencia comprende la fracción de dominio de anticuerpo fusionada a una fracción IL-2 no mutante, y en donde dicha selectividad se mide como una relación de activación de células que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ con respecto a la activación de células que expresan el receptor IL-2R $\beta\gamma$.
- 10 2. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde dicha selectividad hacia las células que expresan un receptor de alta afinidad se encuentra entre el 0,1% y el 100% de selectividad de una proteína de fusión de referencia que comprende la fracción de dominio de anticuerpo fusionada a una fracción IL-2 humana mutante que comprende una sustitución de aminoácido asparagina por arginina en una posición correspondiente a la posición 88 (N88R) de la secuencia de aminoácidos de proteína IL-2 humana madura establecida en la secuencia ID NO:3.
- 15 3. Proteína de fusión según la reivindicación 2, en donde dicha selectividad es de entre 0,1% y 30% de la selectividad de dicha proteína de fusión de referencia.
4. Proteína de fusión según la reivindicación 2, en donde dicha selectividad es de entre 1% y 20 % de la selectividad de dicha proteína de fusión de referencia.
- 20 5. Proteína de fusión según la reivindicación 2, en donde dicha selectividad es de entre 2% y 20 % de la selectividad de dicha proteína de fusión de referencia.
6. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde las células, que expresan el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$, se seleccionan del grupo que consiste en CTLL-2, Kit 225 y linfocitos T maduros.
7. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde las células, que expresan el receptor IL-2R $\beta\gamma$, se seleccionan del grupo que consiste en células TF-1 β y células NK.
- 25 8. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde se muta más de una posición de aminoácidos en la fracción IL-2.
9. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde se muta dicho dominio de anticuerpo.
10. Proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 9, en donde el dominio de anticuerpo se selecciona del grupo de anticuerpos que consiste en KS-1/4, dI-KS, dI-KS(γ 4h)(FN>AQ), huKS, huKS(N a Q), dI-NHS76(γ 2h), dI-NHS(γ 4h) dI-NHS76(γ 2h)(FN>AQ), dI-NHS76(γ 4h)(FN>AQ), y 14.18.
- 30 11. Proteína de fusión anticuerpo-IL2 según la reivindicación 10 seleccionada del grupo que consiste en
 KS-ala-IL2(D20T)
 KS (γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)
 NHS76(γ 2h)-ala-IL2(D20T)
 NHS76(γ 2h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)
 NHS76(γ 2)-ala-IL2(D20T).
- 35 12. Utilización de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de tumores.
- 40 13. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su utilización en el tratamiento de tumores.

Figure 1A

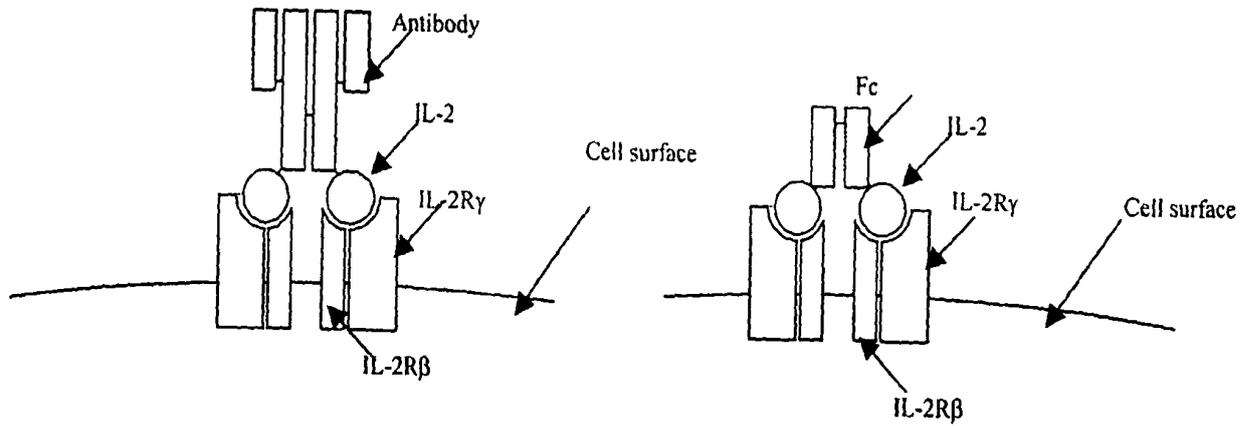


Figure 1B

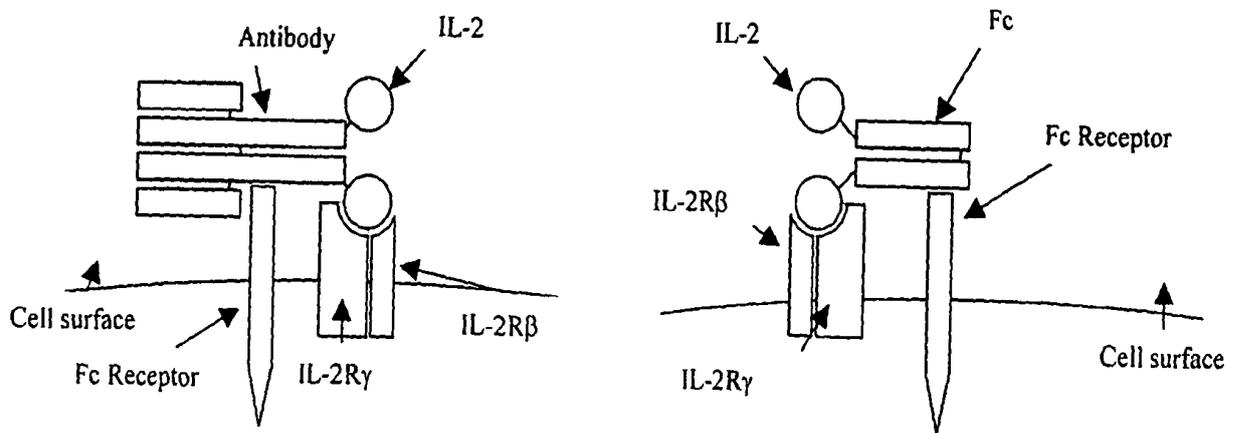


Figura 2

