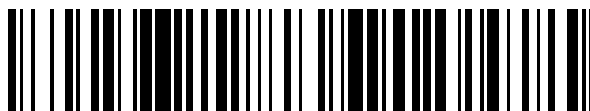


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 731**

51 Int. Cl.:

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2015 PCT/EP2015/052312**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15118016**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2015 E 15709419 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 3102595**

54 Título: **Proteínas de fusión de interleucina 2 y usos de las mismas**

30 Prioridad:

06.02.2014 US 201461936564 P

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

19.03.2019

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KLEIN, CHRISTIAN;
UMANA, PABLO;
MOESSNER, EKKEHARD;
HOSSE, RALF;
PETERSON, LAURENCE BERNARD y
WICKER, LINDA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 704 731 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

Proteínas de fusión de interleucina 2 y usos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a las proteínas de fusión de inmunoglobulinas e interleucina 2 (IL-2). Más en particular, la invención aborda proteínas de fusión de inmunoglobulinas e IL-2 mutante que presentan propiedades mejoradas para su uso como agentes terapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario. Además, la presente invención se refiere a los polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión y a los vectores y células huésped que comprenden dichos polinucleótidos. La invención se refiere además a los procedimientos para producir las proteínas de fusión de la invención y a los procedimientos de uso de las mismas en el tratamiento de la enfermedad.

15 **Antecedentes**

Los linfocitos T reguladores (Treg) representan subconjuntos específicos de linfocitos T que son cruciales para el mantenimiento de la autotolerancia. Estas células CD4⁺CD25^a con función supresora se pueden distinguir de los linfocitos T efectores mediante la expresión intracelular del factor de transcripción FOXP3, así como de otros marcadores celulares, tales como CD127^{baja}, CTLA-4⁺, LAP, CD39⁺, PD-1⁺, GARP, etc. FOXP3 es crítico para la diferenciación y la función de Treg, y la carencia y las mutaciones en el gen FOXP3, tanto en ratones Scurfy como en pacientes con regulación inmunitaria incorrecta, poliendocrinopatía, enteropatía y síndrome ligado al cromosoma X (IPEX), dan como resultado la destrucción de la autotolerancia y el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias debido a la carencia o falta de función de Treg.

Las respuestas autoinmunitarias en la diabetes de tipo 1, lupus eritematoso diseminado (LED), esclerosis múltiple y muchas otras se correlacionan con una carencia en los Treg o en las funciones de Treg. Los datos de modelos animales respaldan la hipótesis de que las respuestas autoinmunitarias se facilitan por un fallo de los Treg en el control de la respuesta inmunitaria destructora con respecto a sí mismos, en gran parte debido a los efectos de los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ autorreactivos. La diabetes de tipo 1 es una enfermedad autoinmunitaria que se produce después de la destrucción de la mayoría de las células β productoras de insulina en el páncreas. La frecuencia de la diabetes de tipo 1 es ~0,3 % de la población de los EE. UU. y su incidencia continúa incrementándose en los EE. UU., Europa y, en particular, en los países escandinavos (prácticamente un 1 %) y se espera que se duplique en los próximos veinte años.

La citocina IL-2 desempeña un papel principal en la activación y en la función tanto de los Treg como de los linfocitos T efectores (Tef). Una carencia en la producción de IL-2 o falta de reactividad da como resultado, preferentemente, una pérdida de la función de Treg y un incremento de la probabilidad de autoinmunidad. Puesto que los Treg expresan constitutivamente el receptor de IL-2 de afinidad alta en concentraciones más altas que Tef, las dosis bajas de IL-2 respaldan preferentemente el mantenimiento de los Treg en comparación con los linfocitos Tef.

Con el efecto preferente de IL-2 para activar los Treg *in vitro* e *in vivo*, el potencial del tratamiento con IL-2 de larga duración y a dosis bajas parece tener una alta probabilidad de éxito en las enfermedades autoinmunitarias. A finales de 2013, se establece el comienzo de un ensayo clínico comparativo con placebo con enmascaramiento doble sobre la diabetes de tipo 1 de 200 pacientes (Proleukin[®], IL-2 humana recombinante). Los recientes ensayos clínicos con Proleukin en dosis baja diaria mejoraron algunos de los signos y síntomas de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) crónica y vasculitis inducida por el virus de la hepatitis C (Koreth *et al.*, *New Engl J Med* 365, 2055-2066 (2011), Saadoun *et al.*, *New Engl J Med* 365, 2067-2077 (2011)). En ambos estudios, Proleukin[®] en dosis baja indujo Treg e incrementó la proporción Treg:Tef. Sin embargo, las propiedades PF deficientes de Proleukin[®] le hacen subóptimo para mantener concentraciones bajas y consistentes de IL-2 en el hombre. Otros procedimientos que se someten a prueba en ensayos clínicos son la expansión personalizada de Treg *ex vivo* seguido de reinfusión, pero este enfoque es menos que ideal y representa un arduo conjunto de problemas de control de calidad.

Por tanto, un enfoque terapéutico nuevo que restablece la tolerancia inmunitaria dominante natural mediada por los linfocitos T reguladores (Treg) y minimiza fuertemente cualquier efecto estimulador potencial sobre los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ potenciaría enormemente la capacidad para tratar pacientes con enfermedades autoinmunitarias, tales como diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso diseminado, enfermedad de Crohn, así como otras enfermedades autoinmunitarias y enfermedades proinflamatorias basadas en el sistema inmunitario, tales como enfermedad injerto contra huésped crónica, asma, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades cardiovasculares, tales como aterosclerosis y síndrome coronario agudo, y rechazo de trasplante, tanto de víscera maciza como de médula ósea.

El documento WO 2009/135615 describe el uso de una muteína de IL-2 conocida previamente (IL-2 N88R, BAY50-4798, descrita en el documento WO 1999/60128) para el tratamiento o profilaxis de la enfermedad autoinmunitaria. Se afirma que la muteína de IL-2 tiene una actividad incrementada en los linfocitos Treg en comparación con la IL-2 natural, mientras que su efecto sobre los linfocitos T CD8⁺ y los linfocitos NK es pequeño. No se describe ninguna

proteína de fusión de la muteína de IL-2.

El documento WO 2010/85495 describe variantes de IL-2 que promueven selectivamente la actividad en los linfocitos Treg sobre los linfocitos T no reguladores para el tratamiento de los trastornos inflamatorios. Las variantes de IL-2 descritas comprenden una combinación de ocho o más sustituciones de aminoácido que afectan a la unión a las diferentes subunidades del receptor de IL-2.

El documento WO 2012/178137 describe proteínas de fusión inmunoglobulina-citocina. Se divulga la IL-2 como un ejemplo de citocinas. La inmunoglobulina descrita se une a un antígeno de superficie celular asociado a cáncer, y la proteína de fusión puede ser adecuada para tratar el cáncer activando una respuesta inmunitaria.

El documento WO 03/048334 describe una proteína de fusión que comprende dos variantes de IL-2. Las proteínas de fusión descritas comprenden un resto de IL-2 mutante y un resto distinto a IL-2, y son útiles para tratar el cáncer y las infecciones por virus. Se usan anticuerpos frente a diversos antígenos tumorales y víricos como un resto distinto a IL-2.

El documento WO 2012/146628 describe inmunoconjugados de IL-2 útiles para tratar el cáncer. Los inmunoconjugados descritos comprenden un resto de IL-2 única, es decir, no más de una.

Las proteínas de fusión de IL-2 de la presente invención activan preferentemente los Treg humanos y no humanos con poco o ningún efecto sobre los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ humanos, inclinando la balanza hacia una proporción Treg:Tef más alta, y reducen la respuesta autoinmunitaria. Son de larga duración, lo que permite pautas de dosificación convenientes, y están desprovistas de funciones efectoras, lo que reduce los potenciales efectos secundarios y la disminución de la eficacia.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende (i) una molécula de inmunoglobulina que no se puede unir específicamente a un antígeno y (ii) dos moléculas de interleucina 2 (IL-2) mutante que comprenden una mutación de aminoácido que reduce afinidad de la molécula de IL-2 mutante con respecto al receptor de IL-2 de afinidad intermedia en comparación con una molécula de IL-2 natural, en la que las moléculas de IL-2 mutante comprenden las sustituciones de aminoácido T3A, N88D y C125A (SEQ ID NO: 58).

En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina es una molécula de inmunoglobulina de clase IgG, en particular, una molécula de inmunoglobulina de subclase IgG₁. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina es una molécula de inmunoglobulina humana. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina se puede unir específicamente a un antígeno. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada basada en la secuencia de estirpe germinal de Vh3-23 humana. En un modo de realización específico, dicha molécula de inmunoglobulina comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 9. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera basada en la secuencia de estirpe germinal de Vk3-20 humana. En un modo de realización específico, dicha molécula de inmunoglobulina comprende la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 11. En un modo de realización incluso más específico, dicha molécula de inmunoglobulina comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 11. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina no se puede unir específicamente a un antígeno, y comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada basada en la secuencia de estirpe germinal de Vh3-23 humana y una secuencia de la región variable de la cadena ligera basada en la secuencia de estirpe germinal de Vk3-20 humana.

En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprende una modificación que reduce la afinidad de unión de la molécula de inmunoglobulina con respecto a un receptor Fc en comparación con una molécula de inmunoglobulina correspondiente sin dicha modificación. En un modo de realización, dicho receptor Fc es un receptor Fcγ, en particular, un receptor Fcγ humano. En un modo de realización, dicho receptor Fc es un receptor Fc activador. En un modo de realización, dicho receptor Fc se selecciona del grupo de FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIIa (CD32) y FcαRI (CD89). En un modo de realización específico, dicho receptor Fc es FcγRIIIa, en particular, FcγRIIIa humano. En un modo de realización, dicha modificación reduce la función efectora de la molécula de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, dicha función efectora es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En un modo de realización, dicha modificación está en la región Fc, en particular, en la región CH₂, de dicha molécula de inmunoglobulina. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprende una sustitución de aminoácido en la posición 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, dicha sustitución de aminoácido es P329G. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprende sustituciones de aminoácido en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, dichas sustituciones de aminoácido son L234A y L235A (LALA). En un modo de realización, dicha

molécula de inmunoglobulina comprende sustituciones de aminoácido en las posiciones 234, 235 y 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización particular, dicha molécula de inmunoglobulina comprende las sustituciones de aminoácido L234A, L235A y P329G (numeración EU) en las cadenas pesadas de inmunoglobulina.

5 En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante comprenden una mutación de aminoácido en una posición correspondiente al residuo 88 de IL-2 humana (SEQ ID NO: 1); dicha mutación de aminoácido es una sustitución de aminoácido; y, dicha sustitución de aminoácido es N88D. En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 comprenden además una mutación de aminoácido que no altera la afinidad de unión de dichas moléculas de IL-2 con respecto a un receptor de IL-2 en comparación con la IL-2 natural. En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 comprenden una mutación de aminoácido en una posición correspondiente al residuo 125 de IL-2 humana; y dicha mutación de aminoácido es la sustitución de aminoácido C125A. En un modo de realización, dicha molécula de IL-2 mutante comprende además una mutación de aminoácido que elimina el sitio de O-glucosilación de IL-2 en una posición correspondiente al residuo 3 de IL-2 humana; y dicha mutación de aminoácido que elimina el sitio de O-glucosilación de IL-2 en una posición correspondiente al residuo 3 de IL-2 humana es T3A. En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante son moléculas de IL-2 humana. En un modo de realización específico, dichas moléculas de IL-2 mutante comprenden una secuencia de la SEQ ID NO: 58. En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante tienen una secuencia de la SEQ ID NO: 58. En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante se fusionan cada una en su aminoácido N terminal con el aminoácido C terminal de una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina de dicha molécula de inmunoglobulina, opcionalmente a través de un conector peptídico. En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante se fusionan cada una con dicha molécula de inmunoglobulina a través de un conector peptídico. En un modo de realización, dicho conector peptídico comprende al menos 10, en particular, al menos 15, aminoácidos. En un modo de realización, dicho conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66).

25 En un modo de realización específico, dicha proteína de fusión comprende las secuencias de polipéptido de la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 50. En un modo de realización específico, dicha proteína de fusión comprende una cadena ligera de inmunoglobulina de la SEQ ID NO: 19 y un polipéptido de fusión cadena pesada de inmunoglobulina-IL-2 de la SEQ ID NO: 50. En un modo de realización, dicha proteína de fusión consiste esencialmente en una molécula de inmunoglobulina, dos moléculas de interleucina 2 (IL-2) mutante que comprenden una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de la molécula de IL-2 mutante con respecto al receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con una molécula de IL-2 natural, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos. En un modo de realización, dicha proteína de fusión consiste esencialmente en dos cadenas ligeras de inmunoglobulina de la SEQ ID NO: 19 y dos polipéptidos de fusión cadena pesada de inmunoglobulina-IL-2 de la SEQ ID NO: 50.

35 En un modo de realización, dicha proteína de fusión activa selectivamente los linfocitos T reguladores. En un modo de realización, dicha proteína de fusión activa selectivamente los linfocitos T reguladores sobre los linfocitos T efectoras, en particular, sobre los linfocitos T CD4⁺ convencionales y los linfocitos T CD8⁺. En un modo de realización, dicha proteína de fusión activa selectivamente los linfocitos T reguladores sobre los linfocitos T de memoria CD4⁺ convencionales. En un modo de realización, dicha proteína de fusión activa los linfocitos T reguladores al menos 10 veces, al menos 100 veces o al menos 1000 veces más que los linfocitos T de memoria CD4⁺ convencionales. En un modo de realización, se determina dicha activación mediante la medición de los niveles de fosforilación de STAT intracelular, en particular, STAT5. En un modo de realización, dicha medición de los niveles de fosforilación de STAT intracelular se realiza mediante análisis por citometría de flujo.

40 La invención proporciona además un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención. Se proporciona además un vector, en particular, un vector de expresión, que comprende el polinucleótido de la invención. En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que comprende el polinucleótido o el vector de la invención. La invención también proporciona un procedimiento para producir una proteína de fusión de la invención, que comprende las etapas de (i) cultivar la célula huésped de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión e (ii) recuperar la proteína de fusión. También se proporciona una proteína de fusión que comprende (i) una molécula de inmunoglobulina que no se puede unir específicamente a un antígeno y (ii) dos moléculas de interleucina 2 (IL-2) que comprenden una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de la molécula de IL-2 mutante con respecto al receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con una molécula de IL-2 natural, en la que las moléculas de IL-2 mutante comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 58, producida mediante dicho procedimiento.

50 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se proporciona la proteína de fusión o la composición farmacéutica de la invención para su uso como un medicamento y para su uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria, específicamente diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso diseminado (LED), enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, lo más específicamente diabetes de tipo 1, o enfermedad injerto contra huésped o rechazo de trasplante. Se proporciona además el uso de la proteína de fusión de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite y un procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un

individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende la proteína de fusión de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En un modo de realización, dicha enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria. En un modo de realización más específico, dicha enfermedad autoinmunitaria es diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso diseminado (LED), enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. En un modo de realización incluso más específico, dicha enfermedad autoinmunitaria es diabetes de tipo 1. En otro modo de realización, dicha enfermedad es rechazo de trasplante o enfermedad injerto contra huésped. En un modo de realización, dicho individuo es un mamífero, en particular, un humano.

Se proporciona además la proteína de fusión de la invención para su uso en la activación selectiva de los linfocitos T reguladores *in vitro*. En un modo de realización, dicha activación comprende la inducción de la proliferación de los linfocitos T reguladores y/o la inducción de la señalización del receptor de IL-2, en particular, la fosforilación de STAT5, en los linfocitos T reguladores. En un modo de realización, dicho uso es *in vitro* y dicha proteína de fusión se usa a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml o menos, en particular, aproximadamente 1 ng/ml o menos.

La invención también proporciona un procedimiento para la activación selectiva de los linfocitos T reguladores *in vitro*, que comprende poner en contacto dichos linfocitos T reguladores con la proteína de fusión de la invención. En un modo de realización, dicha activación comprende la inducción de la proliferación de los linfocitos T reguladores y/o la inducción de la señalización del receptor de IL-2, en particular, la fosforilación de STAT5, en los linfocitos T reguladores. En un modo de realización, dicho procedimiento es *in vitro* y dicha proteína de fusión se usa a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml o menos, en particular, aproximadamente 1 ng/ml o menos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Purificación de la proteína de fusión IgG DP47GS-IL-2 (véanse las SEQ ID NO 13, 15, 19). (A) Perfil de elución de la etapa de cromatografía de afinidad con proteína A. (B) Perfil de elución de la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño. Rendimiento de 4 mg/l. (C) Electroforesis capilar analítica con SDS (Caliper) del producto final. Se observaron las siguientes bandas: no reducida - área de un 7,5 % a 111 kDa, área de un 92,5 % a 174 kDa; reducida - área de un 23,6 % a 29 kDa, área de un 23,5 % a 67 kDa, área de un 52,9 % a 82 kDa. El producto contiene aproximadamente un 7,5 % de la "mitad de IgG". (D) Cromatografía de exclusión por tamaño analítica del producto final en una columna TSKgel G3000 SW XL (contenido en monómero de un 91 %).

Figura 2. Purificación de la proteína de fusión IgG DP47GS-(IL-2)₂ (véanse las SEQ ID NO 17, 19). (A) Perfil de elución de la etapa de cromatografía de afinidad con proteína A. (B) Perfil de elución de la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño. Rendimiento de 13 mg/l. (C) Electroforesis capilar analítica con SDS (Caliper) del producto final. Se observaron las siguientes bandas: no reducida - área de un 2,3 % a 172,5 kDa, área de un 97,7 % a 185 kDa; reducida - área de un 18,3 % a 27,3 kDa, área de un 0,6 % a 29,2 kDa, área de un 81,1 % a 78,3 kDa. (D) Cromatografía de exclusión por tamaño analítica del producto final en una columna Superdex 200 (contenido en monómero de un 100 %).

Figura 3. Purificación de la proteína de fusión IgG DP47GS-IL-2 N88D (véanse las SEQ ID NO 15, 19, 48). (A) Perfil de elución de la etapa de cromatografía de afinidad con proteína A. (B) Perfil de elución de la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño. Rendimiento de 23,7 mg/l. Las fracciones obtenidas están dentro de un recuadro. (C) Electroforesis capilar analítica con SDS (Caliper) del producto final. Se observaron las siguientes bandas principales: no reducida - área de un 100 % a 167,0 kDa; no reducida - área de un 31,5 % a 28,6 kDa, área de un 31,7 % a 63,5 kDa, área de un 35,3 % a 77,5 kDa. (D) Cromatografía de exclusión por tamaño analítica del producto final en una columna TSKgel G3000 SW XL (contenido en monómero de un 97,3 %).

Figura 4. Purificación de la proteína de fusión IgG DP47GS-(IL-2 N88D)₂ (véanse las SEQ ID NO 19 y 50). (A) Perfil de elución de la etapa de cromatografía de afinidad con proteína A. (B) Perfil de elución de la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño. Rendimiento de 32,9 mg/l. Las fracciones obtenidas están dentro de un recuadro. (C) Electroforesis capilar analítica con SDS (Caliper) del producto final. Se observaron las siguientes bandas principales: no reducida - área de un 20,7 % a 180,4 kDa, área de un 78,0 % a 184,0 kDa; reducida - área de un 16,2 % a 27,3 kDa, área de un 82,7 % a 76,0 kDa. (D) Cromatografía de exclusión por tamaño analítica del producto final en una columna TSKgel G3000 SW XL (contenido en monómero de un 98,3 %).

Figura 5. Purificación de la proteína de fusión IgG DP47GS-(IL-2 E95A)₂ (véanse las SEQ ID NO 19 y 52). (A) Perfil de elución de la etapa de cromatografía de afinidad con proteína A. (B) Perfil de elución de la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño. Rendimiento de 8,0 mg/l. Las fracciones obtenidas están dentro de un recuadro. (C) Electroforesis capilar analítica con SDS (Caliper) del producto final. Se observaron las siguientes bandas principales: no reducida - área de un 10,3 % a 166,0 kDa, área de un 61,4 % a 175,5 kDa, área de un 28,2 % a 181,2 kDa; no reducida - área de un 16,0 % a 26,1 kDa, área de un 83,1 % a 75,0 kDa. (D) Cromatografía de exclusión por tamaño analítica del producto final en una columna TSKgel G3000 SW XL (contenido en monómero de un 100 %).

Figura 6. Expresión de CD25 (IL-2RA) y CD122 (IL-2RB) en subconjuntos de Treg CD4⁺, subconjuntos de linfocitos NK y linfocitos NKT. Se usaron marcadores de superficie de las células para definir subconjuntos de Treg CD4⁺,

linfocitos NKT y linfocitos NK. A fin de optimizar la tinción para CD25 y CD122, no se realizó ninguna tinción para FOXP3 intracelular. (A, B) Tres poblaciones de linfocitos T CD4⁺ reguladores (Treg): indiferenciados (CD45RA⁺, CD25⁺; línea de puntos), de memoria (CD45RA⁻, CD25⁺; línea continua) y activados (CD45RA⁻, CD25^a; línea discontinua). (C, D) NKT (línea de puntos), linfocitos NK CD56^{fuerte} (línea discontinua), linfocitos NK CD56^{intermedia} (línea continua). Gris: control de isotipo (CI).

Figura 7. Expresión de CD25 (IL-2RA) y CD122 (IL-2RB) en subconjuntos de linfocitos T convencionales CD4⁺ y CD8⁺. Se usaron marcadores de superficie de las células para definir linfocitos T CD4⁺ convencionales, indiferenciados (CD45RA⁺; línea de puntos) y de memoria (CD45RA⁻; línea continua) (A, B), linfocitos T CD8⁺ convencionales de memoria (CD45RA⁻; línea continua) y linfocitos T CD8⁺ CD45RA⁺ (una combinación de los subconjuntos indiferenciados y TEMRA; TEMRA se refiere a las células de memoria efectora que han vuelto a expresar CD45RA; línea de puntos) (C, D). Gris: control de isotipo (CI).

Figura 8. Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de células de sangre periférica humana en respuesta a IgG DP47GS-IL-2. Se evaluaron tres donantes humanos diferentes (C4 a C6) en tiempos separados para determinar los efectos de diversas dosis de IgG DP47GS-IL-2 sobre la inducción de la fosforilación de STAT5a. Los resultados se muestran para los subconjuntos de Treg CD4⁺: Treg activados, de memoria e indiferenciados; linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ convencionales; linfocitos NK CD56^{fuerte}; linfocitos T efectores de memoria CD8⁺; linfocitos T efectores indiferenciados CD4⁺; linfocitos NK; linfocitos NKT; y linfocitos T efectores indiferenciados CD8⁺ + de memoria CD45RA⁺.

Figura 9. Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de células de sangre periférica humana en respuesta a IgG DP47GS-(IL-2)₂. Se evaluaron cinco donantes humanos diferentes (N1, N2, C4-C6) en tiempos separados para determinar los efectos de diversas dosis del inmunocombinado IgG DP47GS-(IL-2)₂ sobre la inducción de la fosforilación de STAT5a. Los resultados se muestran para los subconjuntos de Treg CD4⁺: Treg activados, de memoria e indiferenciados; linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ convencionales; linfocitos NK CD56^{fuerte}; linfocitos T efectores de memoria CD8⁺; linfocitos T efectores indiferenciados CD4⁺; linfocitos NK; linfocitos NKT; y linfocitos T efectores indiferenciados CD8⁺ + de memoria CD45RA⁺.

Figura 10. Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de células de sangre periférica humana: comparación de IgG DP47GS-IL-2 e IgG DP47GS-(IL-2)₂. Los resultados para cada subconjunto de células se normalizaron al efecto máximo observado de cada subconjunto y las CE50 aproximadas para los Treg se presentan en la tabla 2. (A) Resultados normalizados para IgG DP47GS-IL-2, (B) resultados normalizados para IgG DP47GS-(IL-2)₂.

Figura 11. Examen detallado de la sensibilidad del subconjunto de Treg en tres donantes comparando IgG DP47GS-IL-2 e IgG DP47GS-(IL-2)₂. Los gráficos representan la media ± DE de la IMF de pSTAT5a para los tres donantes. (A) Treg CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ totales. (B) Treg activados. (C) Treg de memoria. (D) Treg indiferenciados.

Figura 12. Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de células de sangre periférica humana en respuesta a IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂. Se evaluaron tres donantes humanos diferentes (C4 a C6) en tiempos separados para determinar los efectos de diversas dosis de IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂ sobre la inducción de la fosforilación de STAT5a. Los resultados se muestran para los subconjuntos de Treg CD4⁺: Treg activados, de memoria e indiferenciados; linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ convencionales; linfocitos NK CD56^{fuerte}; linfocitos T efectores de memoria CD8⁺; linfocitos T efectores indiferenciados CD4⁺; linfocitos NK; linfocitos NKT; y linfocitos T efectores indiferenciados CD8⁺CD45RA⁺.

Figura 13. Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de células de sangre periférica humana en respuesta a IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. Se evaluaron cinco donantes humanos diferentes (C4, C5, C6, N1, N2) en tiempos separados para determinar los efectos de diversas dosis de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ sobre la inducción de la fosforilación de STAT5a. Los resultados se muestran para los subconjuntos de Treg CD4⁺: Treg activados, de memoria e indiferenciados; linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ convencionales; linfocitos NK CD56^{fuerte}; linfocitos T efectores de memoria CD8⁺; linfocitos T efectores indiferenciados CD4⁺; linfocitos NK; linfocitos NKT; y linfocitos T efectores indiferenciados CD8⁺CD45RA⁺.

Figura 14. Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de células de sangre periférica humana: comparación de IgG DP47GS-IL-2, IgG DP47GS-(IL-2)₂, IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂, IgG DP47GS-(IL-2 N88D)₂ e IgG DP47GS-IL-2N88D. Los resultados se muestran para subconjuntos de Treg CD4⁺ (A-C): Treg activados (A), de memoria (C) e indiferenciados (B); linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ convencionales (D); linfocitos NK CD56^{fuerte} (E).

Figura 15. Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de células de sangre periférica humana en respuesta tanto a IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ como a IgG DP47GS-(IL-2)₂. Se evaluaron diez donantes humanos diferentes en días separados para determinar los efectos de un amplio intervalo de dosis (≥6 log) de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ e IgG DP47GS-(IL-2)₂ sobre la inducción de la fosforilación de STAT5a. Los resultados se muestran para los siguientes subconjuntos de células: (A) Treg de memoria, (B) Treg indiferenciados, (C) linfocitos NK CD56^{fuerte}, (D) linfocitos NK totales, (E) linfocitos T CD4⁺ de memoria central, (F) linfocitos T CD4⁺ de memoria efectora, (G) linfocitos T CD4⁺ indiferenciados, (H) linfocitos T CD8⁺ de memoria central, (I) linfocitos T CD8⁺ de memoria efectora (J) linfocitos T

CD8⁺ indiferenciados, (K) linfocitos T CD8⁺ Temra [Tef de memoria RA⁺], (L) linfocitos NKT y (M) linfocitos T CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD56⁻. Todos los resultados se muestran como la media ± EEM (n=10 donantes).

5 Figura 16. Comparación de los efectos *in vitro* de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ e IgG DP47GS-(IL-2)₂ sobre los linfocitos NK y los linfocitos T CD8⁺ humanos. Se cultivaron PBMC de donantes humanos normales (n=10) a 5x10⁶ células/pocillo de fondo en U con 50 ng/ml de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ (símbolos abiertos) o IgG DP47GS-(IL-2)₂ (símbolos sombreados en gris) durante 6 días, momento en el que se cuantificaron números de células mediante citometría de flujo. Los efectos sobre los linfocitos NK se cuantificaron en linfocitos NK CD56^{débil} y CD56^{fuerte} (A). Los efectos sobre los linfocitos T CD8⁺ se muestran en (B). Los resultados se muestran como la mediana ± amplitud intercuartílica, las diferencias estadísticas se determinaron usando una prueba de la U de Mann-Whitney.

15 Figura 17. Comparación de los efectos *in vivo* de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ e IgG DP47GS-(IL-2)₂ sobre ratones humanizados con células madre CD34⁺. De diez a 12 semanas después del injerto de células madre CD34⁺, los ratones se trataron dos veces por semana con vehículo (IgG DP47GS, sin IL-2), IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ o IgG DP47GS-(IL-2)₂. Se observaron incrementos máximos de Treg y linfocitos NK humanos en la sangre después de 3 tratamientos y los resultados se muestran en (A) para los Treg y (B) para los linfocitos NK. Los resultados se muestran como la mediana ± amplitud intercuartílica; vehículo (n=21), IgG-(IL-2N88D)₂ (n=22) e IgG-(IL-2)₂ (n=24).

20 Figura 18. Comparación de los efectos *in vivo* de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ e IgG DP47GS-(IL-2)₂ sobre la supervivencia de ratones humanizados con células madre CD34⁺. De diez a 12 semanas después del injerto de células madre CD34⁺, los ratones se trataron dos veces por semana con vehículo (IgG DP47GS, sin IL-2), IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ o IgG DP47GS-(IL-2)₂ hasta que la gravedad de la respuesta del injerto contra huésped xenogénico humano alcanzó una etapa predeterminada (≥15 % de pérdida de peso), lo que requirió su retirada del estudio. Los resultados se representan como una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de GraphPad Prism para el vehículo (n=7), IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ (n=12) e IgG DP47GS-(IL-2)₂ (n=13).

30 Figura 19. Comparación de los efectos *in vivo* de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ e IgG DP47GS-(IL-2)₂ sobre los Treg, linfocitos NK y linfocitos T CD8⁺ en ratones humanizados con células madre CD34⁺. De diez a 12 semanas después del injerto de células madre CD34⁺, los ratones se trataron dos veces por semana con vehículo (IgG DP47GS, sin IL-2), IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ o bien IgG DP47GS-(IL-2)₂ hasta que la gravedad de la respuesta del injerto contra huésped xenogénico humano alcanzó una etapa predeterminada (≥15 % de pérdida de peso), lo que requirió su retirada del estudio, momento en el que se evaluó la sangre para determinar los subconjuntos de células humanas individuales. Se muestran los Treg humanos, los linfocitos NK y las células CD8⁺ en la sangre como el % de células CD45⁺ humanas. Se muestran los resultados como la media ± el EEM para vehículo (n=6), IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ (n=9) o IgG DP47GS-(IL-2)₂ (n=9).

40 Figura 20. Inducción de pSTAT5a en los Treg en la sangre de macaco cangrejero en respuesta a IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. Se evaluaron tres donantes sanos normales (C1-C3) al mismo tiempo para determinar los efectos de una dosis máxima (20 ng/ml) de IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ sobre la inducción de la fosforilación de STAT5a en los Treg. (A) La estrategia de selección de la citometría de flujo con FOXP3 (eje y) y CD45RA (eje x) usada para identificar los subconjuntos de Treg CD4⁺CD25⁺: Treg indiferenciados (CD45RA⁺FOXP3⁺), Treg de memoria (CD45RA⁻FOXP3⁺) y activados (CD45RA⁺FOXP3⁺). (B) La expresión de la tinción de la superficie de las células CD25⁺ en los subconjuntos de Treg antes de la estimulación. (C) Respuestas de pSTAT5a para los subconjuntos de Treg CD4⁺CD25⁺: activado, de memoria e indiferenciado para cada uno de los tres macacos cangrejeros (C1-C3).

50 Figura 21. Activación de pSTAT5a en linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ convencionales en la sangre de macaco cangrejero en respuesta a IgG DP47GS-(IL-2)₂ o IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. Usando las mismas muestras de sangre estimuladas con 20 ng/ml de los tres donantes mono descritos en la figura 11 se examinó la inducción de pSTAT5a en linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ convencionales. (A) La estrategia de selección de la citometría de flujo usada para identificar linfocitos T efectores de memoria CD4⁺FOXP3⁺CD45RA⁻ convencionales con CD45RA en el eje y y CD25 en el eje x. (B) Respuestas de pSTAT5a para linfocitos T efectores de memoria CD4⁺FOXP3⁺CD45RA⁻ totales. (C) Respuestas de pSTAT5a para linfocitos T efectores de memoria que también eran CD25⁻. (D) Respuestas de pSTAT5a para linfocitos T efectores de memoria que también eran CD25⁺.

60 Figura 22. Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de linfocitos T de sangre periférica de macaco cangrejero en respuesta a IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. Se evaluaron dos donantes adultos sanos para determinar los efectos de dosis variables (0,03-300 ng/ml) de IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ sobre la inducción de la fosforilación de STAT5a. Los resultados se muestran para los subconjuntos de Treg CD4⁺ (A-C): Treg activados (A), de memoria (C) e indiferenciados (B) y linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ convencionales (D). Se obtuvieron resultados similares para ambos monos y se mostraron los resultados de un donante para ilustrar los efectos de IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂.

65 Figura 23. En ratones, IgG DP47GS-IL-2 tiene propiedades farmacocinéticas (PF) superiores en comparación con IgG DP47GS-(IL-2)₂, mientras que IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ es intermedio. (A) A ratones NOD y NOD.*scid* se les inyectaron por vía intravenosa (i.v.) 0,3 mg/kg de IgG DP47GS-IL-2 o 0,3 mg/kg de IgG DP47GS-(IL-2)₂. (B) A

ratones *NOD.scid.IL2Rα^{-/-}* se les inyectaron i.v. 0,1 mg/kg de IgG DP47GS-IL-2, 0,3 mg/kg de IgG DP47GS-(IL-2)₂ o 0,1 mg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. Se evaluó la IL-2 humana en muestras de suero en los tiempos indicados mediante un ensayo de captura basado en mAb.

5 Figura 24. Tanto CD25 como FoxP3 se incrementan en los Treg murinos después del tratamiento con Proleukin[®], IgG DP47GS-IL-2, IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. Se trataron ratones BALB/c con Proleukin[®] (20.000 y 100.000 UI/ratón, n=3), IgG DP47GS-IL-2, IgG DP47GS-(IL-2)₂ o IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ (60, 300 o 1.500 UI/ratón, n=3), los ratones tratados con vehículo se incluyeron como controles sin estimular (n=4). Veinticuatro horas después del tratamiento, se evaluaron los Treg esplénicos para determinar las concentraciones de CD25 y FOXP3. (A) Se observaron cambios dependientes de la dosis en CD25 en la superficie de las células y (B) cambios dependientes de la dosis en FoxP3 intracelular para las cuatro moléculas de IL2. Los datos se representan como la media ± DE, las barras en negro representan la dosis más alta usada y las barras en gris claro la dosis más baja.

15 Figura 25. Se evaluaron las propiedades PF de IgG DP47GS-IL-2 e IgG DP47GS-(IL-2)₂ en macacos cangrejeros adultos sanos normales sin tratamiento previo con biofármaco. (A) Se inyectó por vía intravenosa (i.v.) IgG DP47GS-IL-2 como una corta inyección intravenosa rápida en dosis de 10, 25 y 100 µg/kg (n=2 por dosis). (B) Se inyectó i.v. IgG DP47GS-(IL-2)₂ como una corta inyección intravenosa rápida en dosis de 10 y 25 µg/kg (n=2 por dosis). Se evaluó la IL-2 humana en muestras de suero en los tiempos indicados mediante un ensayo de captura basado en mAb.

20 Figura 26. IgG DP47GS-IL2 tiene un efecto dependiente de la dosis en macacos cangrejeros, incrementando los linfocitos T reguladores. Los cambios en los linfocitos T reguladores (Treg) CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ en la sangre completa en el día 7 posterior al tratamiento se muestran como (A) el número de células absoluto de Treg por mm³ de sangre completa y (B) la tasa de cambio en los Treg. Todos los datos se representan como la media ± DE. Barras abiertas: IgG DP47GS-IL-2 (n=6); barras sombreadas: vehículo (n=3).

25 Figura 27. Efectos del tiempo y dosis bajas de IgG DP47GS-IL-2 sobre los Treg en macacos cangrejeros. (A) Cambios dependientes del tiempo en la tasa de incremento en los Treg tras la dosificación con 2 o 6 µg/kg de IgG DP47GS-IL-2 (n=4 y 6, respectivamente). (B) Cambios dependientes del tiempo en los recuentos absolutos de Treg en la sangre después de una dosificación con 2 o 6 µg/kg de IgG DP47GS-IL-2 (n=4 y 6, respectivamente). Todos los datos se muestran como la media ± DE.

30 Figura 28. Proleukin en dosis única estimula una respuesta Treg dependiente de la dosis transitoria en macacos cangrejeros. (A) Cambios en los números de Treg de sangre periférica después del tratamiento de dosis única con de 3x10⁴ a 3x10⁵ UI/kg de Proleukin. (B) Cambios en pSTAT5a en los Treg después del tratamiento de dosis única con de 3x10⁴ a 3x10⁵ UI/kg de Proleukin. Los datos se muestran como la media ± DE.

35 Figura 29. IgG DP47GS-IL-2 en dosis baja es más eficaz que Proleukin[®] en dosis alta en la inducción de Treg en macacos cangrejeros. Se trataron macacos cangrejeros sanos normales (grupos de n=5) con IgG DP47GS-IL-2 en dosis baja o Proleukin en dosis alta y se sometió a prueba el cambio en los linfocitos T reguladores el día 10. En los días 0 y 7, se administró s.c. IgG DP47GS-IL-2 a una dosis de 16.800 UI/kg (12 µg/kg). Se administró s.c. un tratamiento con Proleukin (200.000 UI/kg) 3 veces por semana (LMV) durante un total de 5 dosis. Se muestran los resultados como media ± DE para (A) el cambio en los Treg totales por mm³ de sangre, (B) la tasa de incremento en los Treg y (C) el cambio en la proporción de Treg con respecto a las células CD4⁺ FOXP3⁺ convencionales. Las barras abiertas representan el tratamiento con IL-2 y las barras sombreadas el control con vehículo.

40 Figura 30. STAT5 fosforilado de sangre completa *ex vivo* es un biomarcador sensible para la activación de los Treg con P47GS IgG-IL-2 *in vivo*. Uno y 3 días después de la administración *in vivo* de una dosis baja única de IgG DP47GS-IL-2 (12 µg/kg) a macacos cangrejeros sanos (n=5), se obtuvo sangre completa y se sometido a prueba inmediatamente sin estimulación para STAT5 fosforilado (pSTAT5a). Se extrajo sangre de cada mono en el día 0 antes del tratamiento y se midió la cantidad de pSTAT5a (barras sombreadas) y se usó individualmente para evaluar las tasas de cambio posteriores al tratamiento (barras abiertas). (A) Se muestra la tasa de cambio en pSTAT5a en los Treg en los días 1 y 3, (B) la tasa de cambio en pSTAT5a en los linfocitos T de memoria CD4⁺ CD45⁻ convencionales y (C) la tasa de cambio en pSTAT5a en los linfocitos T indiferenciados. Los datos se muestran como la media ± DE.

45 Figura 31. pSTAT5a de sangre completa *ex vivo* como biomarcador sensible para la activación *in vivo* de Treg con IgG DP47GS-IL-2 en dosis baja. De uno a siete días después de la administración *in vivo* de una dosis baja única de IgG DP47GS-IL-2 a macacos cangrejeros sanos, se obtuvo sangre completa y se sometió a prueba inmediatamente sin estimulación para pSTAT5a. Se obtuvo sangre de cada mono en el día 0 antes del tratamiento para determinar las concentraciones sin estimular de pSTAT5a y se compararon con los cambios en pSTAT5a posteriores al tratamiento. (A) pSTAT5a en los Treg antes y después del tratamiento con 2 µg/kg de IgG DP47GS-IL-2 (n=4). (B) pSTAT5a en los Treg antes y después del tratamiento con 6 µg/kg de IgG DP47GS-IL-2 (n=6). Los datos se muestran como la media ± DE.

50 Figura 32. La Ki-67 de sangre completa de macaco cangrejero *ex vivo* sirve como un marcador para la proliferación

de linfocitos T inducida por IgG DP47GS-IL-2 *in vivo*. Los macacos cangrejeros tratados con 2 y 6 µg/kg de IgG DP47GS-IL-2 como se describe en la figura 14 también se supervisaron *ex vivo* para determinar los cambios en el marcador intracelular Ki-67 para evaluar el grado de proliferación *in vivo*. Se cuantificó el porcentaje de estado estable normal de células en el ciclo celular (Ki-67⁺) en el día 0 antes del tratamiento y, entonces, se supervisó diariamente durante los siguientes de 7 a 11 días. (A) Se muestran el % de Ki-67⁺ para Treg, (B) el % de Ki-67⁺ para linfocitos T de memoria/efectores CD4⁺CD45⁻ convencionales y (C) el % de Ki-67⁺ para linfocitos T CD4⁺CD45RA⁺ indiferenciados. Los datos se muestran como la media ± DE.

Figura 33. Efectos del tiempo y dosis bajas de IgG DP47GS-(IL-2)₂ sobre los Treg en macacos cangrejeros sanos sin tratamiento previo. (A) Cambios dependientes del tiempo en los números absolutos de Treg después de 6 µg/kg de IgG DP47-(IL-2)₂. (B) Cambios dependientes del tiempo en pSTAT5a en los Treg después del tratamiento, (C) cambios dependientes del tiempo en la tasa de incremento en los Treg y (D) comparación de las tasas de cambio en los Treg de monos tratados con IgG DP47GS-IL-2 (barras abiertas, de 2 a 36 µg/kg) frente a los tratados con IgG DP47GS-(IL-2)₂ (barra sombreada, 6 µg/kg). Todos los datos se muestran como la media ± DE (n=4 a 6).

Figura 34. Efectos dependientes del tiempo y de la dosis de IgG DP47GS-(IL-2)₂ en dosis muy baja sobre los Treg en macacos cangrejeros sanos sin tratamiento previo. (A) Cambios dependientes del tiempo en las tasas de incremento de los Treg tras la administración de 0,7 y 2 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2)₂. (B) Cambios dependientes del tiempo en pSTAT5a en los Treg medidos en el día 0 antes del tratamiento y en los días 1-4 después del tratamiento, (C) cambios dependientes del tiempo en pSTAT5a en linfocitos Tef/de mem. Todos los datos se muestran como la media ± DE (n=3 a 0,7 µg/kg y n=8 a 2 µg/kg).

Figura 35. Comparación dependiente de la dosis de IgG DP47GS-IL-2 frente a IgG DP47GS-(IL-2)₂ y su capacidad para incrementar los Treg de macaco cangrejero en la sangre completa. Todos los datos se presentan como la media ± DE (n=3 a 6).

Figura 36. Se usó secuenciación de nueva generación (SNG) para analizar la desmetilación del ADN específica de subconjuntos de linfocitos T para el factor de transcripción FOXP3 y la molécula inmunodepresora CTLA-4. Se analizó la sangre de macacos cangrejeros adultos sin tratamiento previo con biofármaco antes y después del tratamiento con una dosis óptima de IgG DP47GS-IL-2 (25 µg/kg, n=4) e IgG DP47GS-(IL-2)₂ (6 µg/kg, n=4). Se clasificaron subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ con un BD FACSAria de PBMC de sangre completa y se usaron 100.000 células por subconjunto para la desmetilación del ADN específica de gen. Se observaron resultados similares con ambos tratamientos y los datos de los monos tratados con IgG DP47GS-(IL-2)₂ se muestran para FOXP3 en el panel superior y para CTLA-4 en el panel inferior (n=4, media ± DE).

Figura 37. Se evaluaron las propiedades PF de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en macacos cangrejeros sanos normales sin tratamiento previo con biofármaco. (A) Se inyectó por vía intravenosa (i.v.) IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en una corta inyección intravenosa rápida en dosis de 30 y 100 µg/kg (n=2 por dosis). (B) Se inyectó por vía subcutánea (s.c.) IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en 0,2 ml en el costado lateral en dosis de 30 y 100 µg/kg (n=2 por dosis). Se evaluó la IL-2 humana en muestras de plasma en los tiempos indicados con un ensayo de captura basado en anticuerpos monoclonales. (C) Como un biomarcador de la exposición a IL-2, se midió el CD25 soluble en plasma después de la inyección de IgG-(IL-2N88D)₂ en dosis de 30 y 100 µg/kg; se midió el sCD25 de macaco cangrejero en un ensayo de captura basado en mAAb para sCD25 humano que se sabe que reacciona de forma cruzada con sCD25 de macaco cangrejero. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n=4).

Figura 38. Efectos *in vivo* dependientes del tiempo y de la dosis de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ sobre los Treg en macacos cangrejeros sanos sin tratamiento previo. Cambios dependientes del tiempo en el número absoluto (x10⁶/ml de sangre) de Treg totales, Treg de memoria CD4⁺, Treg indiferenciados CD4⁺ y Treg CD8⁺FOXP3⁺ tras la inyección de (A) 100 µg/kg de IgG DP47-(IL-2N88D)₂ o (B) 30 µg/kg de IgG DP47-(IL-2N88D)₂. Cambios dependientes del tiempo en los Treg como el % de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ para Treg totales, Treg de memoria CD4⁺, Treg indiferenciados CD4⁺ y Treg CD8⁺FOXP3⁺ tras la inyección de 100 µg/kg de IgG DP47-(IL-2N88D)₂ (C) o 30 µg/kg de IgG DP47-(IL-2N88D)₂ (D). Los resultados se muestran como la media ± EEM (n=4).

Figura 39. Efectos *in vivo* dependientes del tiempo y de la dosis de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ sobre los linfocitos en macacos cangrejeros sanos sin tratamiento previo. Los cambios dependientes del tiempo en los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ se muestran como el % de linfocitos T CD4⁺ totales tras la inyección de 100 µg/kg de IgG DP47-(IL-2N88D)₂ o 30 µg/kg de IgG DP47-(IL-2N88D)₂ (A). Los cambios dependientes del tiempo en los linfocitos T de memoria CD4⁺CD25^a efectores se muestran como el % de linfocitos T de memoria CD4⁺ efectores tras la inyección de 100 µg/kg de IgG DP47-(IL-2N88D)₂ o 30 µg/kg de IgG DP47-(IL-2N88D)₂ (B). Los resultados se muestran como la media ± EEM (n=4).

Figura 40. El pSTAT5a de sangre completa *ex vivo* es un biomarcador sensible para la activación de IL-2 *in vivo*. De 1 a 11 días después de la administración *in vivo* de una dosis única de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ a macacos cangrejeros, se obtuvo sangre completa y se analizó inmediatamente sin estimulación para pSTAT5a. Se extrajo sangre de cada mono en el día 0 antes del tratamiento para determinar las concentraciones sin estimular de pSTAT5a y se compararon con los cambios en pSTAT5a posteriores al tratamiento. (A) pSTAT5a (IMF, intensidad

media de fluorescencia máxima) antes y después del tratamiento con 100 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, n=4. (B) pSTAT5a antes y después del tratamiento con 30 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, n=4. Los datos se muestran como la media ± EEM para los subconjuntos de células indicados.

5 Figura 41. La tinción para CD25 en la superficie de las células de sangre completa *ex vivo* es un biomarcador sensible para la activación de IL-2 *in vivo*. De 1 a 14 días después de la administración *in vivo* de dosis únicas de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ a macacos cangrejeros, se obtuvo sangre completa y se sometió a prueba inmediatamente sin estimulación para CD25 de superficie en los tipos de células indicados. Se obtuvo sangre de cada mono en el día 0 antes del tratamiento para determinar las concentraciones sin estimular de CD25 y se compararon con los cambios en CD25 posteriores al tratamiento. (A) Tinción para CD25 (IMF máxima, intensidad media de fluorescencia) antes y después del tratamiento con 100 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, n=4. (B) Tinción para CD25 antes y después del tratamiento con 30 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, n=4. Los datos se muestran como la media ± EEM para los subconjuntos de células indicados.

15 Figura 42. La tinción *in vivo* para Ki-67 intracelular de sangre completa es un biomarcador sensible para la proliferación celular después de la activación de IL-2 *in vivo*. De 1 a 14 días después de la administración *in vivo* de una dosis única de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ a macacos cangrejeros, se obtuvo sangre completa y se sometió a prueba inmediatamente sin estimulación para determinar la Ki-67 intracelular en los tipos de células indicados. Se obtuvo sangre de cada mono en el día 0 antes del tratamiento para determinar las concentraciones sin estimular de células Ki-67⁺ y se compararon con los cambios en el % de células Ki-67⁺ posteriores al tratamiento. (A) Tinción para Ki-67 (% de células Ki-67⁺) antes y después del tratamiento con 100 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, n=4. (B) Tinción para Ki-67 (% de células Ki-67⁺) antes y después del tratamiento con 30 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, n=4. Los resultados se muestran como la media ± EEM para los subconjuntos de células indicados.

25 Figura 43. Un resumen comparativo de los efectos *in vivo* de IL-2 sobre los Treg de macaco cangrejero. Se muestra el incremento máximo en los Treg totales como el % de linfocitos T CD4⁺ para Proleukin, IgG-IL-2, IgG-(IL-2)₂ e IgG-(IL-2N88D)₂; para la comparación, todas las dosis *in vivo* se convirtieron a pmol/kg. Se administró Proleukin 3 veces por semana (LMV) durante 2 semanas y se administraron las proteínas de fusión de IL-2 como una inyección única. Los resultados se muestran como la media ± EEM; Proleukin (n=5), IgG-IL-2 (n=6), IgG-(IL-2)₂ (n=6) e IgG-(IL-2N88D)₂ (n=4).

35 Figura 44. La IL-2 en dosis alta induce eosinofilia en macacos cangrejeros. Se supervisaron los cambios en los recuentos de eosinófilos en la sangre en todas las pruebas con Proleukin o los inmunocombinados de IL-2. Se detectó eosinofilia de 7 a 14 días después del tratamiento con Proleukin en dosis alta (2x10⁵ UI/kg 3 veces por semana durante 2 semanas) o las dosis más altas de IgG DP47GS-IL-2 pero no con IgG DP47GS-(IL-2)₂ o IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. Los recuentos de eosinófilos en el valor de referencia son los círculos abiertos mostrados como "0" para la dosis de IL-2 y se realizaron dos veces, una vez para las pruebas con la molécula de IL-2 natural y una vez para las pruebas con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. Los datos se muestran como la media ± DE.

40 Figura 45. El tratamiento *in vivo* con IgG DP47GS-IL-2 suprime la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) de los eritrocitos de carnero murinos. Todos los datos se muestran para ratones individuales tratados con vehículo (100 % de respuesta), IgG-IL-2 (4.000 UI/ratón) o CTLA-4-Ig de ratón como control positivo (200 µg/ratón). (A) Resultados de ratones NOD y (B) ratones C57BL/6. La magnitud de las respuestas de DTH del día cuatro se muestra como el cambio en el peso de la pata en comparación con los ratones no inmunizados (Δ peso de la pata). Los datos se muestran como la media ± DE.

50 Figura 46. El tratamiento *in vivo* con IgG DP47GS-IL-2 (4.000 UI/ratón) suprime las respuestas de anticuerpo IgG murina con respecto a KLH en (A) ratones C57BL/6 21 días después de la inmunización y (B) ratones NOD siete días después de la inmunización. Los datos se muestran como la media ± DE.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

55 Se usan los términos en el presente documento como se usa en general en la técnica, a menos que se defina de otro modo en lo que sigue.

60 Como se usa en el presente documento, el término "proteína de fusión" se refiere a una molécula de polipéptido de fusión que comprende una molécula de inmunoglobulina y una molécula de IL-2, en la que los componentes de la proteína de fusión se enlazan entre sí mediante enlaces peptídicos, directamente o bien a través de conectores peptídicos. Por claridad, las cadenas peptídicas individuales del componente de inmunoglobulina de la proteína de fusión se pueden enlazar no covalentemente, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro.

65 "Fusionados" se refiere a los componentes que se enlazan mediante enlaces peptídicos, directamente o bien por medio de uno o más conectores peptídicos.

Por “unión específica” se entiende que la unión es selectiva para el antígeno y se puede discriminar de interacciones no deseadas o no específicas. Se puede medir la capacidad de una inmunoglobulina para unirse a un antígeno específico a través de un ensayo de inmunoenzimología de adsorción (ELISA) o bien de otras técnicas consabidas para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (RPS) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En un modo de realización, el grado de unión de una inmunoglobulina a una proteína no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión de la inmunoglobulina al antígeno como se mide, por ejemplo, mediante RPS. En determinados modos de realización, una inmunoglobulina que se une al antígeno tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

“Afinidad” o “afinidad de unión” se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañera Y se puede representar en general mediante la constante de disociación (K_D), que es la proporción de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{dis} y k_{as} , respectivamente). Por tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la proporción de las constantes de velocidad permanezca igual. Se puede medir la afinidad mediante procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Un procedimiento particular para medir la afinidad es la resonancia de plasmón superficial (RPS).

“Unión reducida”, por ejemplo, unión reducida a un receptor Fc o a un receptor de IL-2, se refiere a una disminución de la afinidad por la interacción respectiva, como se mide, por ejemplo, mediante RPS. Por claridad, el término también incluye la reducción de la afinidad a cero (o por debajo del límite de detección del procedimiento analítico), es decir, la anulación completa de la interacción. Por el contrario, “unión incrementada” se refiere a un incremento de la afinidad de unión por la interacción respectiva.

Como se usa en el presente documento, el término “determinante antigénico” es sinónimo de “antígeno” y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional compuesta de diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un anticuerpo, formando un complejo antígeno-anticuerpo. Se pueden encontrar determinantes antigénicos útiles, por ejemplo, en las superficies de las células, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (MEC).

Como se usa en el presente documento, el término “monocatenaria” se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácido linealmente enlazados mediante enlaces peptídicos.

En el presente documento se usa el término “anticuerpo” en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de dominio único.

El término “molécula de inmunoglobulina” se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que se unen con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada de inmunoglobulina tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamados región constante de la cadena pesada. De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera de inmunoglobulina tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL), también llamado región constante de la cadena ligera. Se puede asignar la cadena pesada de una inmunoglobulina a una de cinco clases, llamadas α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunas de las cuales se pueden dividir además en subclases, por ejemplo, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). Se puede asignar la cadena ligera de una inmunoglobulina a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, enlazados por medio de la región bisagra de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, “fragmento Fab” se refiere a un fragmento de inmunoglobulina que comprende un dominio VL y un dominio constante de una cadena ligera (CL) y un dominio VH y un primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada.

La “clase” de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término “región variable” o “dominio variable” se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina o anticuerpo que, en general, está implicada en la unión de la inmunoglobulina o anticuerpo al antígeno. Sin embargo, la inmunoglobulina comprendida en la proteína de fusión de la presente invención puede comprender regiones variables que no confieren especificidad de unión a antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de una inmunoglobulina o anticuerpo, en general, tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt *et al.*, Kuby Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007). Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

El término “región hipervariable” o “HVR”, como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de inmunoglobulina o anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos (“bucles hipervariables”). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden, en general, residuos de aminoácido de los bucles hipervariables y/o de las “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Los bucles hipervariables ejemplares se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Se producen CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) ejemplares en los residuos de aminoácido 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3 (Rabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden, en general, los residuos de aminoácido que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden “residuos determinantes de la especificidad” o “SDR”, que son los residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos en regiones de las CDR, llamadas CDR abreviadas o a-CDR. Se producen a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) ejemplares en los residuos de aminoácido 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3 (véase Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13, 1619-1633 (2008)). A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Rabat *et al.*, *supra* (denominado “numeración de Kabat”).

“Región estructural” o “FR” se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en dominios de cuatro FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Una “inmunoglobulina humana” es una que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de una inmunoglobulina producida por un ser humano o una célula humana o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de inmunoglobulina humana u otras secuencias que codifican inmunoglobulina humana. Esta definición de una inmunoglobulina humana excluye específicamente una inmunoglobulina humanizada que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades insignificantes. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un determinante único en un antígeno. Por tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo por haberse obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, que incluyen, pero no se limitan al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana; estando descritos en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

En el presente documento se usa el término “dominio Fc” o “región Fc” para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Una región Fc de IgG comprende un dominio CH2 de IgG

y un dominio CH3 de IgG. El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana se extiende normalmente desde un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 231 hasta un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 340. En un modo de realización, una cadena glucídica se une al dominio CH2. El dominio CH2 en el presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia natural o un dominio CH2 variante. El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C terminales con respecto a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 341 hasta un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 447 de una IgG). La región CH3 en el presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia natural o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" ("botón") introducida en una cadena del mismo y una "cavidad" ("ojal") introducida correspondiente en la otra cadena del mismo; véase la patente de EE. UU. n.º 5.821.333). Se pueden usar dichos dominios CH3 variantes para promover la heterodimerización de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina no idénticas como se describe en el presente documento. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

El término "funciones efectoras" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de una inmunoglobulina, que varían con el isotipo de inmunoglobulina. Los ejemplos de funciones efectoras de inmunoglobulina incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión al receptor Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígenos mediada por complejos inmunitarios mediante células presentadoras de antígeno, regulación por disminución de receptores de superficie de las células (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Un "receptor Fc activador" es un receptor Fc que tras el acoplamiento por una región Fc de una inmunoglobulina provoca acontecimientos de señalización que estimulan que la célula que contiene el receptor realice funciones efectoras. Los receptores Fc activadores incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89). Un receptor Fc activador particular es FcγRIIIa humano (véase el n.º de acceso a UniProt P08637 (versión 141)).

El término "interleucina 2" o "IL-2" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier IL-2 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba IL-2 sin procesar, así como cualquier forma de IL-2 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de IL-2, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de una IL-2 humana ejemplar se muestra en la SEQ ID NO: 1. La IL-2 humana sin procesar comprende además un péptido señal de 20 aminoácidos N terminal, que está ausente en la molécula de IL-2 madura.

Por "IL-2 natural" se entiende una IL-2 natural. La secuencia de una molécula de IL-2 humana natural se muestra en la SEQ ID NO: 1. Para el propósito de la presente invención, el término natural también engloba formas de IL-2 que comprenden una o más mutaciones de aminoácido que no alteran la unión al receptor de IL-2 en comparación con la IL-2 natural, tal como, por ejemplo, una sustitución de cisteína en una posición correspondiente al residuo 125 de IL-2 humana con alanina. En algunos modos de realización, la IL-2 natural, para el propósito de la presente invención, comprende la sustitución de aminoácido C125A (véase la SEQ ID NO: 3).

El término "CD25" o "α del receptor de IL-2", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier CD25 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba CD25 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de CD25 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CD25, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. En determinados modos de realización, CD25 es CD25 humano. La secuencia de aminoácidos de un CD25 humano ejemplar (con la secuencia señal, marca Avi y marca His) se muestra en la SEQ ID NO: 25.

El término "receptor de IL-2 de afinidad alta" como se usa en el presente documento, se refiere a la forma heterotrimérica del receptor de IL-2, que consiste en la subunidad γ del receptor (también conocida como subunidad γ y del receptor de citocina común, γ_c, o CD132), la subunidad β del receptor (también conocida como CD122 o p70) y la subunidad α del receptor (también conocida como CD25 o p55). El término "receptor de IL-2 de afinidad intermedia" o "βγ del receptor de IL-2", en cambio, se refiere al receptor de IL-2 que incluye solo la subunidad γ y la subunidad β, sin la subunidad α (para una revisión, véase, por ejemplo, Olejniczak y Kasprzak, Med Sci Monit 14, RA179-189 (2008)). Las secuencias de aminoácidos de CD122 y CD132 humanos ejemplares (fusionadas a una región Fc con una marca His) se muestran en las SEQ ID NO 21 y 23, respectivamente.

Por "linfocito T regulador" o "linfocito Treg" se entiende un tipo especializado de linfocito T CD4⁺ que puede suprimir las respuestas de otros linfocitos T (linfocitos T efectoras). Los linfocitos Treg se caracterizan por la expresión de CD4, la subunidad α del receptor de IL-2 (CD25) y el factor de transcripción con dominio "forkhead" P3 (FOXP3)

(Sakaguchi, *Annu Rev Immunol* 22, 531-62 (2004)) y desempeñan un papel crítico en la inducción y el mantenimiento de la autotolerancia periférica a antígenos, incluyendo los expresados por tumores.

5 Por "linfocitos T CD4⁺ convencionales" se entiende linfocitos T CD4⁺ distintos de los linfocitos T reguladores. Los linfocitos T de memoria CD4⁺ convencionales se caracterizan por la expresión de CD4, CD3, pero no FOXP3. Los "linfocitos T de memoria CD4⁺ convencionales" son un subconjunto de linfocitos T CD4⁺ convencionales, caracterizados además por la falta de expresión de CD45RA, a diferencia de los "linfocitos T indiferenciados CD4⁺ convencionales" que sí expresan CD45RA.

10 Por "activación selectiva de linfocitos Treg" se entiende la activación de los linfocitos Treg esencialmente sin la activación simultánea de otros subconjuntos de linfocitos T (tales como linfocitos T cooperadores CD4⁺, linfocitos T citotóxicos CD8⁺, linfocitos T NK) o linfocitos citolíticos naturales (NK). Los procedimientos para identificar y distinguir estos tipos de células se describen en los ejemplos. La activación puede incluir la inducción de la señalización del receptor de IL-2 (como se mide, por ejemplo, mediante detección de STAT5a fosforilado), la inducción de la proliferación (como se mide, por ejemplo, mediante detección de Ki-67) y/o la regulación por incremento de la expresión de marcadores de activación (tales como, por ejemplo, CD25).

20 El término "conector peptídico" se refiere a un péptido que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos. Los conectores peptídicos se conocen en la técnica o se describen en el presente documento. Los péptidos de conector no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos (G₄S)_n, (SG₄)_n o G₄(SG₄)_n, "n" es, en general, un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4.

25 El término "modificación" se refiere a cualquier manipulación del esqueleto peptídico (por ejemplo, secuencia de aminoácidos) o a las modificaciones postraduccionales (por ejemplo, glucosilación) de un polipéptido.

30 Una "modificación botón en ojal" se refiere a una modificación en la interfase entre dos cadenas pesadas de inmunoglobulina en el dominio CH3, en la que i) en el dominio CH3 de una cadena pesada, se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia ("botón") en la interfase en el dominio CH3 de una cadena pesada que se puede posicionar en una cavidad ("ojal") en la interfase en el dominio CH3 de la otra cadena pesada y ii) en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad ("ojal") en la interfase en el segundo dominio CH3 en la que se puede posicionar una protuberancia ("botón") en la interfase en el primer dominio CH3. En un modo de realización, la "modificación botón en ojal" comprende la sustitución de aminoácido T366W y opcionalmente la sustitución de aminoácido S354C en una de las cadenas pesadas de anticuerpo y las sustituciones de aminoácido T366S, L368A, Y407V y opcionalmente Y349C en la otra de las cadenas pesadas de anticuerpo. La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, *Prot Eng* 9, 617-621 (1996) y Carter, *J Immunol Meth* 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfase de un segundo polipéptido, de tal manera que la protuberancia se pueda posicionar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). La introducción de dos residuos de cisteína en la posición S354 e Y349, respectivamente, da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos cadenas pesadas de anticuerpo en la región Fc, estabilizando además el dímero (Carter, *J Immunol Methods* 248, 7-15 (2001)).

50 Una "sustitución" de aminoácido se refiere al reemplazo en un polipéptido de un aminoácido por otro aminoácido. En un modo de realización, un aminoácido se reemplaza por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, por ejemplo, reemplazos de aminoácido conservadores. Se pueden realizar sustituciones de aminoácido "conservadoras", por ejemplo, en base a la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones no conservadoras conllevarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácido también pueden dar como resultado el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tenga diferentes propiedades estructurales y/o químicas, por ejemplo, reemplazando un aminoácido de un grupo (por ejemplo, polar) por otro aminoácido de un grupo diferente (por ejemplo, básico). Se pueden generar mutaciones de aminoácido usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida a sitio, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que también pueden ser útiles procedimientos de alteración del grupo de cadena lateral de un aminoácido mediante procedimientos distintos de genomaniplación, tales como modificación química. Se pueden usar diversas designaciones en el presente documento para indicar la

misma sustitución de aminoácido. Por ejemplo, se puede indicar una sustitución de prolina en la posición 329 de la cadena pesada de inmunoglobulina con glicina como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas maneras que se encuentran dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los propósitos en el presente documento, sin embargo, se generan los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington DC, 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían. En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácido puntuados como emparejamientos idénticos mediante el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente de otro modo, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa de ordenador ALIGN-2.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico”, como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, bases o nucleótidos modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Se puede interrumpir una secuencia de nucleótidos mediante componentes distintos a nucleótidos. Un polinucleótido puede comprender una modificación/modificaciones realizada(s) después de la síntesis, tales como su conjugación con un marcador.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, un 95 % “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto porque la secuencia de polinucleótido pueda incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se puede delecionar o sustituir con otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta un 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos en de la secuencia de referencia. Como una cuestión práctica, si cualquier secuencia de polinucleótido particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención, se puede determinar convencionalmente usando programas de ordenador conocidos, tales como los analizados anteriormente para los polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

El término “vector”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido.

Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede que no sea completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula original, pero puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar las proteínas de fusión de la presente invención. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo unas pocas, pero también células comprendidas en un animal transgénico, planta transgénica o tejido vegetal o animal cultivado.

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retarda, minimiza o previene los efectos adversos de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En particular, el individuo o sujeto es un ser humano.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administrará la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no sea tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural de una enfermedad en el individuo que se está tratando, y que se puede realizar por profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de las metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación de la enfermedad y remisión o pronóstico mejorado. En algunos modos de realización, se usan los anticuerpos de la invención para retardar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

"Enfermedad autoinmunitaria" se refiere a una enfermedad o trastorno no maligno que surge desde y se dirige frente a los tejidos de un individuo. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero no se limitan a, respuestas inflamatorias, tales como dermatosis inflamatorias, incluyendo psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); respuestas asociadas con una enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); dermatitis; afecciones alérgicas, tales como eccema y asma; artritis reumatoide; lupus eritematoso diseminado (LED) (incluyendo, pero sin limitarse a, nefritis lúpica, lupus cutáneo); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus de tipo 1 o diabetes mellitus insulino dependiente); esclerosis múltiple y diabetes juvenil.

Proteínas de fusión de la invención

La invención proporciona proteínas de fusión inmunoglobulina-IL-2 novedosas con propiedades, en particular, ventajosas para el uso en procedimientos terapéuticos como se describe en el presente documento.

En un primer aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende (i) una molécula de inmunoglobulina que no se puede unir específicamente a un antígeno y (ii) dos moléculas de interleucina 2 (IL-2) mutante que comprenden una mutación de aminoácido que reduce afinidad de la molécula de IL-2 mutante con respecto al receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con una molécula de IL-2 natural, en la que las moléculas de IL-2 mutante comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 58.

En un modo de realización, dicha proteína de fusión consiste esencialmente en una molécula de inmunoglobulina que no se puede unir específicamente a un antígeno, dos moléculas de interleucina 2 (IL-2) mutante que comprenden una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de la molécula de IL-2 mutante con respecto al receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con una molécula de IL-2 natural, en la que las moléculas de IL-2 mutante comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 58, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos.

Como se muestra en los ejemplos, una proteína de fusión que comprende dos moléculas de IL-2 proporciona sorprendentemente una eficacia y selectividad enormemente mejoradas en la activación de los linfocitos T reguladores en comparación con una proteína de fusión correspondiente que comprende una molécula de IL-2 única. Además, solo una proteína de fusión que comprende dos moléculas de IL-2 mutante (en lugar de solo una) con unión reducida al receptor de IL-2 de afinidad intermedia retiene una actividad estimuladora significativa en los linfocitos T reguladores.

En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina es una molécula de inmunoglobulina de clase IgG, en particular, una molécula de inmunoglobulina de subclase IgG₁. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina es una molécula de inmunoglobulina humana, es decir, comprende regiones variables y constantes completamente humanas. La secuencia de una región constante de IgG₁ humana ejemplar se muestra en la SEQ ID NO: 8. Una molécula de inmunoglobulina de clase IgG comprende (i) dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, comprendiendo cada una desde el extremo N al C un dominio variable de la cadena ligera (VL) y un dominio constante de la cadena ligera (CL) y (ii) dos cadenas pesadas de inmunoglobulina, comprendiendo cada una desde el extremo N al extremo C un dominio variable de la cadena pesada (VH), un dominio constante de la cadena pesada (CH)₁, una región bisagra de inmunoglobulina, un dominio CH₂ y un dominio CH₃. Los dos últimos dominios forman parte de la región Fc de la molécula de inmunoglobulina. Las dos cadenas pesadas se dimerizan en la región Fc.

En un modo de realización de la proteína de fusión de acuerdo con la invención, dichas dos moléculas de IL-2 mutante se fusionan cada una en su aminoácido N terminal con el aminoácido C terminal de una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina de dicha molécula de inmunoglobulina, opcionalmente a través de un conector peptídico. La fusión de dos moléculas de IL-2 (idénticas) con las cadenas pesadas de inmunoglobulina permite la producción simple de la proteína de fusión, evitando la formación de productos secundarios no deseados y obviando la necesidad de realizar modificaciones que promuevan la heterodimerización de cadenas pesadas no idénticas, tal como una modificación botón en ojal.

En determinados modos de realización de la proteína de fusión de acuerdo con la invención, dichas dos moléculas de IL-2 mutante se fusionan con dicha molécula de inmunoglobulina a través de un conector peptídico. En un modo de realización, dichas dos moléculas de IL-2 mutante se fusionan cada una con dicha molécula de inmunoglobulina a través de un conector peptídico. En un modo de realización, dichas dos moléculas de IL-2 mutante se fusionan cada una en su aminoácido N terminal con el aminoácido C terminal de una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina de dicha molécula de inmunoglobulina, a través de un conector peptídico. En un modo de realización, cada una de dichas moléculas de IL-2 mutante se fusiona con dicha molécula de inmunoglobulina a través de un conector peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica. En un modo de realización, dicho conector peptídico comprende al menos 10 aminoácidos. En un modo de realización particular, dicho conector peptídico comprende al menos 15 aminoácidos. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, un conector peptídico de esta longitud puede proporcionar la flexibilidad para la unión óptima de las moléculas de IL-2 mutante al receptor de IL-2, en particular, el receptor de IL-2 de afinidad alta (heterotrimérico). En un modo de realización específico, dicho conector peptídico comprende 15 aminoácidos. En un modo de realización incluso más específico, dicho conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66). En un modo de realización, dicho conector peptídico tiene una longitud de 15 aminoácidos. En un modo de realización, dicho conector peptídico tiene la secuencia de aminoácidos (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66). En un modo de realización, dicho conector peptídico consiste en 15 aminoácidos. En un modo de realización, dicho conector peptídico consiste en la secuencia de aminoácidos (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66).

La fusión de las moléculas de IL-2 con una molécula de inmunoglobulina proporciona propiedades farmacocinéticas favorables, incluyendo una larga semivida en suero (debido al reciclado a través de la unión a FcRn y estando el tamaño molecular muy por encima del umbral para la filtración renal) en comparación con la IL-2 libre (sin fusionar). Además, la presencia de una molécula de inmunoglobulina también posibilita la purificación simple de proteínas de fusión, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad con proteína A. De forma interesante, como se muestra en los ejemplos, una proteína de fusión que comprende dos moléculas de IL-2 mutante con unión reducida al receptor de IL-2 de afinidad intermedia tiene una semivida en suero más larga que una proteína de fusión correspondiente que comprende dos moléculas de IL-2 natural. La fusión con una molécula de inmunoglobulina, es decir, un tipo de molécula natural, también puede minimizar la toxicidad de la proteína de fusión a través de la formación de anticuerpos dirigidos frente a fármacos.

Mientras que la presencia de una molécula de inmunoglobulina, específicamente la región Fc de una molécula de inmunoglobulina, es favorable para las propiedades farmacocinéticas de la proteína de fusión, al mismo tiempo

puede dar lugar a un direccionamiento no deseable de la proteína de fusión hacia células que expresen receptores Fc en lugar de hacia las células que contienen el receptor de IL-2 preferentes. Además, el acoplamiento de los receptores Fc puede dar lugar a la liberación de citocinas (proinflamatorias) y la activación no deseada de diversas células inmunitarias distintas de los linfocitos T reguladores. Por lo tanto, en determinados modos de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprendida en la proteína de fusión de la invención comprende una modificación que reduce la afinidad de unión de la molécula de inmunoglobulina a un receptor Fc en comparación con una molécula de inmunoglobulina correspondiente sin dicha modificación. En un modo de realización específico, dicho receptor Fc es un receptor Fc γ , en particular, un receptor Fc γ humano. Se puede determinar fácilmente la afinidad de unión a los receptores Fc, por ejemplo, mediante ELISA, o mediante resonancia de plasmón superficial (RPS) usando instrumentación estándar, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y se pueden obtener receptores Fc, tales como, mediante expresión recombinante. En lo que sigue se describe un modo de realización ilustrativo y ejemplar específico para medir la afinidad de unión. De acuerdo con un modo de realización, la afinidad de unión a un receptor Fc se mide mediante resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C con ligando (receptor Fc) inmovilizado en chips CM5. En resumen, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El ligando recombinante se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 5,5, a 0,5-30 μ g/ml antes de su inyección a un caudal de 10 μ l/min para lograr aproximadamente 100-5000 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del ligando, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las medidas cinéticas, se inyectan diluciones en serie de tres a cinco veces del anticuerpo (intervalo entre ~0,01 nM a 300 nM) en HBS-EP+ (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensoactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 30-50 μ l/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{as}) y las velocidades de disociación (k_{dis}) usando un simple modelo de unión uno a uno de Langmuir (programa informático de evaluación de BIACORE® T100, versión 1.1.1) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la proporción k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen *et al*, J Mol Biol 293, 865-881 (1999). De forma alternativa, se pueden evaluar los anticuerpos con afinidad de unión con respecto a los receptores Fc usando líneas de células que se sabe que expresan receptores Fc particulares, tales como los linfocitos NK que expresan el receptor Fc γ IIIa.

En un modo de realización, la modificación comprende una o más mutaciones de aminoácido que reducen la afinidad de unión de la inmunoglobulina con respecto a un receptor Fc. En un modo de realización, la mutación de aminoácido es una sustitución de aminoácido. Típicamente, la misma o más mutaciones de aminoácido están presentes en cada una de las dos cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización, dicha mutación de aminoácido reduce la afinidad de unión de la inmunoglobulina con respecto al receptor Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En modos de realización donde existe más de una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de unión de la inmunoglobulina con respecto al receptor Fc, la combinación de estas mutaciones de aminoácido puede reducir la afinidad de unión de la inmunoglobulina con respecto al receptor Fc en al menos 10 veces, al menos 20 veces o incluso al menos 50 veces. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina presenta menos de un 20 %, en particular, menos de un 10 %, más en particular, menos de un 5 % de la afinidad de unión con respecto a un receptor Fc en comparación con una molécula de inmunoglobulina correspondiente sin dicha modificación.

En un modo de realización, dicho receptor Fc es un receptor Fc activador. En un modo de realización específico, dicho receptor Fc se selecciona del grupo de Fc γ RIIIa (CD16a), Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32) y Fc α RI (CD89). En un modo de realización específico, el receptor Fc es un receptor Fc γ , más específicamente un receptor Fc γ RIIIa, Fc γ RI o Fc γ RIIa. Preferentemente, se reduce la afinidad de unión con respecto a cada uno de estos receptores. En un modo de realización incluso más específico, dicho receptor Fc es Fc γ IIIa, en particular, Fc γ IIIa humano. En algunos modos de realización, también se reduce la afinidad de unión con respecto a un componente del complemento, específicamente la afinidad de unión con respecto a C1q. En un modo de realización, no se reduce la afinidad de unión con respecto al receptor Fc neonatal (FcRn). La unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, la preservación de la afinidad de unión de la molécula de inmunoglobulina con respecto a dicho receptor, se logra cuando la molécula de inmunoglobulina presenta más de aproximadamente un 70 % de la afinidad de unión de una forma sin modificar de la molécula de inmunoglobulina con respecto a FcRn. Las moléculas de inmunoglobulina comprendidas en las proteínas de fusión de la invención pueden presentar más de aproximadamente un 80 % e incluso más de aproximadamente un 90 % de dicha afinidad.

En un modo de realización, dicha modificación que reduce la afinidad de unión de la molécula de inmunoglobulina con respecto a un receptor Fc está en la región Fc, en particular, la región CH2, de la molécula de inmunoglobulina. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprende una sustitución de aminoácido en la posición 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización más específico, la sustitución de aminoácido es P329A o P329G, en particular, P329G. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprende sustituciones de aminoácido en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, dichas sustituciones de aminoácido son L234A y L235A (LALA). En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprende una sustitución de aminoácido en la posición 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de anticuerpo y otra sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de la posición 228, 233, 234, 235, 297 y 331 de las cadenas

pesadas de inmunoglobulina (numeración EU). En un modo de realización más específico, la otra sustitución de aminoácido es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En un modo de realización particular, dicha molécula de inmunoglobulina comprende sustituciones de aminoácido en las posiciones P329, L234 y L235 (numeración EU) de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. En un modo de realización más particular, dicha molécula de inmunoglobulina comprende las sustituciones de aminoácido L234A, L235A y P329G (LALA P329G; numeración EU) en las cadenas pesadas de inmunoglobulina. Esta combinación de sustituciones de aminoácido anula, en particular, eficientemente la unión al receptor Fc γ de una inmunoglobulina de clase IgG humana, como se describe en la publicación PCT n.º WO 2012/130831. La publicación PCT n.º WO 2012/130831 también describe procedimientos de preparación de dicha inmunoglobulina modificada y procedimientos para determinar sus propiedades, tales como la unión al receptor Fc o las funciones efectoras.

Se pueden preparar inmunoglobulinas que comprenden modificaciones en las cadenas pesadas de inmunoglobulina mediante delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácido usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios de nucleótido correctos se pueden verificar, por ejemplo, mediante secuenciación.

Las inmunoglobulinas o anticuerpos que comprenden modificaciones que reducen la unión al receptor Fc tienen, en general, funciones efectoras reducidas, en particular, ADCC reducida en comparación con las inmunoglobulinas o anticuerpos sin modificar correspondientes. De ahí que en un modo de realización dicha modificación que reduce la afinidad de unión de la molécula de inmunoglobulina con respecto a un receptor Fc reduzca la función efectora de la molécula de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, dicha función efectora es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En un modo de realización, se reduce la ADCC a menos de un 20 % de la ADCC inducida por una molécula de inmunoglobulina correspondiente sin dicha modificación. La función efectora de una inmunoglobulina o anticuerpo se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362; Hellstrom *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); la patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT1TM para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96[®] (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad de ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998). En algunos modos de realización, también se reduce la unión de la molécula de inmunoglobulina a un componente del complemento, específicamente a C1q. En consecuencia, también se puede reducir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si la inmunoglobulina se puede unir a C1q y, de ahí, que tenga actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Además de las moléculas de inmunoglobulina descritas anteriormente en el presente documento y en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, las inmunoglobulinas con unión al receptor Fc y/o función efectora reducidas también incluyen aquellas con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con la sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

Las inmunoglobulinas de subclase IgG₄ presentan una afinidad de unión reducida con respecto a los receptores Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con las inmunoglobulinas IgG₁. De ahí que en algunos modos de realización dicha molécula de inmunoglobulina comprendida en la proteína de fusión de la invención sea una inmunoglobulina de subclase IgG₄, en particular, una inmunoglobulina de subclase IgG₄ humana. En un modo de realización, dicha inmunoglobulina de subclase IgG₄ comprende sustituciones de aminoácido en la región Fc en la posición S228 (numeración EU), específicamente la sustitución de aminoácido S228P. Para reducir además su afinidad de unión con respecto a un receptor Fc y/o su función efectora, en un modo de realización, dicha inmunoglobulina de subclase IgG₄ comprende una sustitución de aminoácido en la posición L235, específicamente la sustitución de aminoácido L235E (numeración EU). En otro modo de realización, dicha inmunoglobulina de subclase IgG₄ comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329, específicamente la sustitución de aminoácido P329G (numeración EU). En un modo de realización particular, dicha inmunoglobulina de subclase IgG₄ comprende las sustituciones de aminoácido en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente las sustituciones de aminoácido S228P, L235E y P329G (numeración EU). Dichas inmunoglobulinas de subclase IgG₄ modificadas y sus propiedades de unión al receptor Fc γ se describen en la publicación PCT n.º WO 2012/130831.

En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina se puede unir específicamente a un antígeno. En un

modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina no se puede unir específicamente a un antígeno, en particular, no se puede unir específicamente a un antígeno humano. La ausencia de unión específica de dicha molécula de inmunoglobulina a un antígeno (es decir, la ausencia de cualquier unión que se pueda discriminar de una interacción no específica) se puede determinar, por ejemplo, mediante ELISA o resonancia de plasmón superficial como se describe en el presente documento. Dicha molécula de inmunoglobulina es, en particular, útil, por ejemplo, para potenciar la semivida en suero de la proteína de fusión, cuando no se desea el direccionamiento hacia un tejido particular.

En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada basada en la secuencia de estirpe germinal de Vh3-23 humana. En un modo de realización específico, dicha molécula de inmunoglobulina comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 9. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera basada en la secuencia de estirpe germinal de Vk3-20 humana. En un modo de realización específico, dicha molécula de inmunoglobulina comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 11. En un modo de realización incluso más específico, dicha molécula de inmunoglobulina comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 11. Las moléculas de inmunoglobulina que comprenden estas secuencias de la región variable no se pueden unir específicamente a un antígeno, en particular, a un antígeno humano. Les falta la unión a tejidos normales, así como a PBMC, no tienen polirreactividad y no muestran ninguna acumulación no específica *in vivo* mediante formación de imágenes (datos no mostrados). Las secuencias de la región variable se basan totalmente en secuencias de estirpe germinal humana, con la excepción de la CDR3 de la cadena pesada, en la que se ha introducido una secuencia GSG para generar una inmunoglobulina que no se una.

En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante comprenden una mutación de aminoácido en una posición correspondiente al residuo 88 de IL-2 humana (SEQ ID NO: 1); dicha mutación de aminoácido es una sustitución de aminoácido; y, dicha sustitución de aminoácido es N88D. En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante son moléculas de IL-2 humana. En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante comprenden solo una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de la molécula de IL-2 mutante con respecto al receptor de IL-2 de afinidad intermedia en comparación con una molécula de IL-2 natural. En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante no comprenden una mutación de aminoácido que altera la afinidad de la molécula de IL-2 mutante con respecto al receptor de IL-2 de afinidad alta en comparación con una molécula de IL-2 natural. En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante comprenden solo una mutación de aminoácido única que altera la afinidad de la molécula de IL-2 mutante con respecto a un receptor de IL-2 en comparación con una molécula de IL-2 natural.

En un modo de realización, dichas moléculas de IL-2 mutante comprenden además una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente al residuo 125 de IL-2 humana; dicha sustitución de aminoácido es C125A.

Las moléculas de IL-2 mutante comprendidas en la proteína de fusión de la invención también pueden ser moléculas de IL-2 sin glucosilar. Por ejemplo, la eliminación del sitio de O-glucosilación de la molécula de IL-2 da como resultado un producto más homogéneo cuando la proteína de fusión se expresa en células de mamífero, tales como células CHO o HEK. Por tanto, en determinados modos de realización, las moléculas de IL-2 mutante comprenden además una modificación que elimina el sitio de O-glucosilación de IL-2 en una posición correspondiente al residuo 3 de IL-2 humana; siendo dicha modificación que elimina el sitio de O-glucosilación de IL-2 en una posición correspondiente al residuo 3 de IL-2 humana una sustitución de aminoácido; y, siendo dicha sustitución de aminoácido T3A.

En un modo de realización particular, las moléculas de IL-2 mutante comprenden las sustituciones de aminoácido T3A, N88D y C125A. En un modo de realización específico, dichas moléculas de IL-2 mutante comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 58 (IL-2 T3A N88D C125A).

En un modo de realización, la unión de la proteína de fusión de la invención al receptor de IL-2 $\beta\gamma$ está al menos 1,5 veces, preferentemente al menos 2 veces o al menos 3 veces reducida en comparación con la unión de una proteína de fusión correspondiente que comprende dos moléculas de IL-2 natural al receptor de IL-2 $\beta\gamma$. En un modo de realización, la proteína de fusión de la invención se une al receptor de IL-2 $\beta\gamma$ con una constante de afinidad (K_D) al menos 2 veces más alta que la K_D de una proteína de fusión correspondiente que comprende dos moléculas de IL-2 natural, cuando se mide mediante RPS a 25 °C. En un modo de realización específico, dicho receptor de IL-2 $\beta\gamma$ es el receptor de IL-2 $\beta\gamma$ humano. En un modo de realización, la unión de la proteína de fusión de la invención al receptor de IL-2 α es aproximadamente igual a la unión de una proteína de fusión correspondiente que comprende dos moléculas de IL-2 natural al receptor de IL-2 α . En un modo de realización, la proteína de fusión de la invención se une al receptor de IL-2 α con una constante de afinidad (K_D) aproximadamente igual a la K_D de una proteína de fusión correspondiente que comprende dos moléculas de IL-2 natural, cuando se mide mediante RPS a 25 °C. En un modo de realización específico, dicho receptor de IL-2 α es el receptor de IL-2 α humano. En el presente documento se describe un procedimiento para medir la afinidad de unión con respecto al receptor de IL-2 $\beta\gamma$ o IL-2 α mediante

RPS. De acuerdo con un modo de realización, se mide la afinidad de unión (K_D) mediante resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIACORE® T200 (GE Healthcare) a 25 °C con receptores de IL-2 inmovilizados en CMS o chips con estreptavidina. Se calcula la constante de afinidad (K_D) como la proporción k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

5 En un aspecto particular, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende (i) una molécula de inmunoglobulina de subclase IgG₁ que comprende las sustituciones de aminoácido L234A, L235A y P329G (numeración EU) en las cadenas pesadas de inmunoglobulina, y (ii) dos moléculas de interleucina 2 (IL-2) mutante que comprenden la sustitución de aminoácido N88D, cada una fusionada en su aminoácido N terminal con el
10 aminoácido C terminal de una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina a través de un conector peptídico. En un modo de realización, dicha molécula de inmunoglobulina y dichas moléculas de IL-2 son humanas. En un modo de realización específico, dicha molécula de inmunoglobulina comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 11. En otro modo de realización específico, dichas moléculas de IL-2 comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58. En otro modo de realización, dicho conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66). En un modo de realización incluso más específico, dicha proteína de fusión comprende una secuencia de polipéptido que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 50 y una secuencia de polipéptido que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de la
20 SEQ ID NO: 19.

Como se muestra en los ejemplos, la proteína de fusión de la invención activa selectivamente los linfocitos T reguladores (es decir, esencialmente sin la activación simultánea de otros subconjuntos de linfocitos T y/o linfocitos citolíticos naturales (NK)). Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende
25 una molécula de inmunoglobulina y dos moléculas de IL-2 mutante, en la que dicha proteína de fusión activa selectivamente los linfocitos T reguladores sobre los linfocitos T efectores y los linfocitos NK, en particular, sobre los linfocitos T CD4⁺ convencionales, los linfocitos T CD8⁺ y los linfocitos NK. En un modo de realización, dicha proteína de fusión activa los linfocitos T reguladores al menos 10 veces, al menos 100 veces o al menos 1000 veces más que los linfocitos T efectores y los linfocitos NK. En un modo de realización, dicha proteína de fusión activa selectivamente los linfocitos T reguladores sobre los linfocitos T de memoria CD4⁺ convencionales. En un modo de
30 realización, dicha proteína de fusión activa los linfocitos T reguladores al menos 10 veces, al menos 100 veces o al menos 1000 veces más que los linfocitos T de memoria CD4⁺ convencionales. En un modo de realización, se determina dicha activación mediante la medición de los niveles de fosforilación de STAT intracelular, en particular, STAT5. En un modo de realización, dicha medición de los niveles de fosforilación de STAT intracelular se realiza mediante análisis por citometría de flujo. En un modo de realización, el valor de CE₅₀ de dicha proteína de fusión para la inducción de la señalización del receptor de IL-2 en los linfocitos T reguladores es al menos 10 veces, al menos 100 veces o al menos 1000 veces más bajo que su valor de CE₅₀ para la inducción de la señalización del receptor de IL-2 en los linfocitos T efectores y en los linfocitos NK. En un modo de realización, dicha inducción de la señalización del receptor de IL-2 es la inducción de la fosforilación de STAT. En un modo de realización, el valor de
35 CE₅₀ de dicha proteína de fusión para la inducción de la señalización del receptor de IL-2 en los linfocitos T reguladores es al menos 10 veces, al menos 100 veces o al menos 1000 veces más bajo que su valor de CE₅₀ para la inducción de la señalización del receptor de IL-2 en los linfocitos T de memoria CD4⁺ convencionales. En un modo de realización, dicha inducción de la señalización del receptor de IL-2 es la inducción de la fosforilación de STAT.

45 En otro aspecto, la invención proporciona, en particular, la proteína de fusión para su uso en la activación selectiva de los linfocitos T reguladores *in vitro*. En un modo de realización, dicho uso comprende poner en contacto linfocitos T reguladores con dicha proteína de fusión *in vitro*. En un modo de realización, dicho uso comprende además poner en contacto otros linfocitos T (no reguladores) con dicha proteína de fusión. En un modo de realización, dicho uso es *in vitro* y dicha proteína de fusión se usa a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml o menos, en particular,
50 aproximadamente 1 ng/ml o menos.

La invención también proporciona un procedimiento para la activación selectiva de los linfocitos T reguladores *in vitro*, que comprende poner en contacto dichos linfocitos T reguladores con la proteína de fusión de la invención. En un modo de realización, dicho procedimiento comprende además poner en contacto otros linfocitos T (no reguladores) con dicha proteína de fusión. En un modo de realización, dicha activación comprende la inducción de la proliferación y/o la inducción de la señalización del receptor de IL-2. En un modo de realización, dicho procedimiento es *in vitro* y dicha proteína de fusión se usa a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml o menos, en particular, aproximadamente 1 ng/ml o menos.
55

60 De acuerdo con determinados modos de realización de la proteína de fusión, en el uso o procedimiento descrito en los párrafos precedentes, dicha activación comprende la inducción de la proliferación de los linfocitos T reguladores y/o la inducción de la señalización del receptor de IL-2 en los linfocitos T reguladores. Se puede medir la inducción de la proliferación, por ejemplo, mediante detección del marcador de proliferación intracelular Ki-67, como se describe en los ejemplos. En un modo de realización, la proliferación de los linfocitos T reguladores activados por la proteína de fusión de la invención se incrementa al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces o al menos aproximadamente 3 veces en comparación con la proliferación de los linfocitos T reguladores no
65

activados. En un modo de realización, se incrementa la proliferación de otros linfocitos T (no reguladores) y/o linfocitos NK que están en contacto con la proteína de fusión de la invención en menos de aproximadamente 1,5 veces, menos de aproximadamente 1,2 veces o menos de aproximadamente 1,1 veces en comparación con la proliferación de las células correspondientes que no están en contacto con dicha proteína de fusión. Se puede medir la inducción de la señalización del receptor de IL-2, por ejemplo, mediante detección de STAT5 fosforilado, como se describe en los ejemplos. En un modo de realización, la señalización del receptor de IL-2 en los linfocitos T reguladores activados por la proteína de fusión de la invención se incrementa al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces o al menos aproximadamente 5 veces en comparación con la señalización del receptor de IL-2 en los linfocitos T reguladores no activados. En un modo de realización, se incrementa la señalización del receptor de IL-2 en otros linfocitos T (no reguladores) y/o linfocitos NK que están en contacto con la proteína de fusión de la invención en menos de aproximadamente 1,5 veces, o menos de aproximadamente 1,2 veces, o menos de aproximadamente 1,1 veces en comparación con la señalización del receptor de IL-2 en las células correspondientes que no están en contacto con dicha proteína de fusión.

15 Polinucleótidos

La invención proporciona además polinucleótidos que codifican una fusión como se describe en el presente documento.

20 Los polinucleótidos de la invención incluyen aquellos que son al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos a las secuencias expuestas en las SEQ ID NO 10, 12, 20, 51 y 59, incluyendo los fragmentos funcionales o variantes de los mismos.

25 Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de la invención se pueden expresar como un polinucleótido único que codifica toda la proteína de fusión o como polinucleótidos múltiples (por ejemplo, dos o más) que se coexpresan. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan se pueden asociar, por ejemplo, a través de enlaces disulfuro u otros medios para formar una proteína de fusión funcional. Por ejemplo, se puede codificar la porción de la cadena ligera de una inmunoglobulina por un polinucleótido separado de la porción de la cadena pesada de inmunoglobulina. Cuando se coexpresan, los polipéptidos de cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de cadena ligera para formar la inmunoglobulina.

35 En un modo de realización, la presente invención se dirige a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de una molécula de inmunoglobulina y dos moléculas de IL-2, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de la región variable como se muestra en la SEQ ID NO 9 o 11. En otro modo de realización, la presente invención se dirige a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de una molécula de inmunoglobulina y dos moléculas de IL-2, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO 19 o 50. En otro modo de realización, la invención se dirige además a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de una molécula de inmunoglobulina y dos moléculas de IL-2, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO 10, 12, 20, 51 o 59. En otro modo de realización, la invención se dirige a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de una molécula de inmunoglobulina y dos moléculas de IL-2, en la que el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO 10, 12, 20, 51 o 59. En otro modo de realización, la invención se dirige a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de una molécula de inmunoglobulina y dos moléculas de IL-2, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de la región variable que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 9 u 11. En otro modo de realización, la invención se dirige a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de una molécula de inmunoglobulina y dos moléculas de IL-2, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de polipéptido que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 19 o 50. La invención engloba un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de una molécula de inmunoglobulina y dos moléculas de IL-2, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica las secuencias de la región variable de la SEQ ID NO 9 u 11 con sustituciones de aminoácido conservadoras. La invención también engloba un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de una molécula de inmunoglobulina y dos moléculas de IL-2, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica las secuencias de polipéptido de la SEQ ID NO 19 o 50 con sustituciones de aminoácido conservadoras.

60 En determinados modos de realización, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otros modos de realización, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Procedimientos recombinantes

65 Se pueden obtener proteínas de fusión de la invención, por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, se aíslan e insertan uno o más polinucleótidos que codifican la proteína de fusión (fragmento), por ejemplo, como se

describe anteriormente, en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicionales en una célula huésped. Dicho polinucleótido se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales. En un modo de realización, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Se pueden usar los procedimientos que se conocen bien por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una proteína de fusión (fragmento) junto con señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación/recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que el polinucleótido que codifica la proteína de fusión (fragmento) (es decir, la región codificante) se clona en asociación funcional con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción. Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar que es parte de una región codificante, si está presente, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosoma, finalizadores de la transcripción, intrones, regiones no traducidas en 5' y 3' y similares, no son parte de una región codificante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificantes en una construcción de polinucleótido única, por ejemplo, en un vector único, o en construcciones de polinucleótido separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una región codificante única o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan pos o cotraduccionalmente en las proteínas finales por medio de escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, fusionadas o bien sin fusionar con un polinucleótido que codifica la proteína de fusión (fragmento) de la invención, o variante o derivado de la misma. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo. Una asociación funcional es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal manera que la expresión del producto génico se encuentre bajo la influencia o el control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptidos y un promotor asociado con la misma) se "asocian funcionalmente" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad del molde de ADN que se va a transcribir. Por tanto, una región promotora se asociaría funcionalmente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor pudiera efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de finalización de la transcripción, se pueden asociar funcionalmente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. En el presente documento se divulgan promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Se conoce una variedad de regiones de control de la transcripción por los expertos en la técnica. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero no limitadas a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor inmediato temprano, junto con el intrón A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrado, tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovina y globina α de conejo, así como otras secuencias que pueden controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclinas). De forma similar, se conoce una variedad de elementos de control de la traducción por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión a ribosoma, codones de inicio y finalización de la traducción y elementos derivados de sistemas víricos (en particular, un sitio interno de entrada al ribosoma o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otras características, tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica, tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovíricas o repeticiones terminales invertidas (ITR) víricas adenoasociadas (AAV).

Las regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención se pueden asociar con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, si se desea la secreción de la fusión, el ADN que codifica una secuencia señal se puede encontrar en dirección 5' del ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención. De acuerdo con la hipótesis de las señales, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde desde la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento en el retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica saben que los polipéptidos secretados por células de vertebrado tienen, en general, un péptido señal fusionado con el extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinados modos de realización, se usa el péptido señal natural, por ejemplo, un péptido señal de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado

funcional de esa secuencia que retiene la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido que se asocia funcionalmente con él. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterólogo o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, se puede sustituir la secuencia líder natural con la secuencia líder del activador tisular del plasminógeno (TPA) humano o β -glucuronidasa de ratón. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de los péptidos señal secretorios ejemplares se muestran en las SEQ ID NO 39-47.

El ADN que codifica una corta secuencia de proteínas que se podría usar para facilitar la purificación más tarde (por ejemplo, una marca de histidina) o ayudar en el marcaje de la proteína de fusión se puede incluir dentro de o en los extremos del polinucleótido que codifica la proteína de fusión (fragmento).

En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En determinados modos de realización, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, descritas en el presente documento en relación con los polinucleótidos y vectores, respectivamente. En dicho modo de realización, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) una proteína de fusión de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier clase de sistema celular que se pueda genomanipular para generar las proteínas de fusión de la invención o fragmentos de las mismas. Las células huésped adecuadas para replicarse y para respaldar la expresión de las proteínas de fusión se conocen bien en la técnica. Dichas células se pueden transfectar o transducir según sea apropiado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vectores para su siembra en fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la proteína de fusión para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto, o similares. Por ejemplo, se pueden producir polipéptidos en bacterias, en particular, cuando no se necesita glucosilación. Después de la expresión, el polipéptido se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o las levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006). Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar junto con células de insecto, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas de células de mamífero que se adapten para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J Gen Virol* 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol Reprod* 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad Sci* 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO dhfr⁻ (Urlaub *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo unas pocas, pero también células comprendidas en un animal transgénico, planta transgénico o tejido animal o vegetal cultivado. En un modo de realización, la célula huésped es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula YO, NS0, Sp20). Las tecnologías estándar se conocen en la técnica para expresar genes exógenos en estos sistemas. Se pueden genomanipular células que expresen un polipéptido que comprende la cadena pesada o bien la ligera de una inmunoglobulina para que también expresen la otra de las cadenas de inmunoglobulina de tal manera que el producto expresado sea una inmunoglobulina que tenga tanto una cadena pesada como una ligera.

En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de producción de una proteína de fusión de acuerdo con la invención, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión, y recuperar la proteína de fusión de la célula huésped (o

medio de cultivo de células huésped). En las proteínas de fusión de la invención, los componentes (molécula de inmunoglobulina y molécula de IL-2) están fusionados genéticamente entre sí. Se pueden diseñar proteínas de fusión de tal manera que sus componentes se fusionen directamente entre sí o indirectamente a través de una secuencia de conector. La composición y longitud del conector se pueden determinar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica y se pueden someter a prueba para determinar su eficacia. Si se desea, también se pueden incluir secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la proteína de fusión, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endopeptidasas.

En determinados modos de realización, las proteínas de fusión de la invención comprenden al menos una región variable de inmunoglobulina que se puede unir a un antígeno. Las regiones variables pueden formar parte de y derivar de anticuerpos naturales o no naturales y fragmentos de los mismos. Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Fane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Se pueden construir anticuerpos no naturales usando síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.186.567) o se pueden obtener, por ejemplo, cribando colecciones combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.969.108 concedida a McCafferty).

Se puede usar cualquier especie animal de inmunoglobulina en la invención. Las inmunoglobulinas no limitantes útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, de primate o humano. Si se pretende que la proteína de fusión sea para uso humano, se puede usar una forma química de inmunoglobulina en la que las regiones constantes de la inmunoglobulina sean de un ser humano. También se puede preparar una forma humanizada o completamente humana de la inmunoglobulina de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.565.332 concedida a Winter). Se puede lograr la humanización mediante diversos procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones estructurales y constantes humanas (por ejemplo anticuerpo receptor) con o sin retención de los residuos de la región estructural críticos (por ejemplo, los que son importantes para retener una buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), (b) injertar solo las regiones determinantes de la especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los residuos críticos para la interacción anticuerpo-antígeno) en regiones estructurales y constantes humanas o (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero "encubrirlos" con una sección similar a humana mediante reemplazo de los residuos de superficie. Los anticuerpos humanizados y procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); patentes de EE. UU. n.ºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Jones *et al.*, *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri *et al.*, *Methods* 36, 25-34 (2005) (que describe un injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36, 43-60 (2005) (que describe el "barajado de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36, 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR). Las inmunoglobulinas particulares de acuerdo con la invención son inmunoglobulinas humanas. Se pueden producir anticuerpos humanos y regiones variables humanas usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivar de anticuerpos monoclonales humanos preparados mediante el procedimiento de hibridoma (véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). También se pueden preparar anticuerpos humanos y regiones variables humanas administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)). También se pueden generar anticuerpos humanos y regiones variables humanas aislando secuencias de las regiones variables de clones de Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos (véase por ejemplo, Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352, 624-628 (1991)). Los fagos típicamente presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab.

En determinados modos de realización, se genomanipulan las inmunoglobulinas comprendidas en las proteínas de fusión de la presente invención para que tengan una afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, los procedimientos divulgados en la publicación PCT WO 2012/020006 (véanse los ejemplos relacionados con la maduración de la afinidad) o la pub. de sol. de pat. de EE. UU. n.º 2004/0132066. Se puede medir la capacidad de las proteínas de fusión de la invención para unirse a un determinante antigénico específico a través de un ensayo de inmunoenjudo de adsorción (ELISA) o bien a través de otras técnicas consabidas para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (Liljeblad, *et al.*, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). Se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo de referencia para unirse a un antígeno particular. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) que se une mediante el anticuerpo de referencia. Se proporcionan procedimientos

ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competencia ejemplar, se incubaba el antígeno inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno y un segundo anticuerpo sin marcar que se está sometiendo a prueba para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo para unirse al antígeno. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incubaba el antígeno inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo sin marcar. Después de su incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo sin unir, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si se reduce sustancialmente la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, entonces, eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por su unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Las proteínas de fusión preparadas como se describe en el presente documento se pueden purificar mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, hidrofobia, hidrofilia, etc., y serán evidentes para los expertos en la técnica. Para la purificación mediante cromatografía de afinidad, se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la proteína de fusión. Por ejemplo, para la purificación mediante cromatografía de afinidad de las proteínas de fusión de la invención, se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Se pueden usar cromatografía de afinidad secuencial con proteína A o G y cromatografía de exclusión por tamaño para aislar una proteína de fusión esencialmente como se describe en los ejemplos. Se puede determinar la pureza de la proteína de fusión mediante cualquiera de una variedad de procedimientos analíticos bien conocidos, incluyendo electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta presión y similares. Por ejemplo, las proteínas de fusión expresadas como se describe en los ejemplos demostraron que estaban intactas y apropiadamente ensambladas, como se demuestra mediante SDS-PAGE reductora y no reductora (véase, por ejemplo, la figura 4).

Composiciones, formulaciones y vías de administración

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las proteínas de fusión proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos a continuación. En un modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las proteínas de fusión proporcionadas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las proteínas de fusión proporcionadas en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Se proporciona además un procedimiento de producción de una proteína de fusión de la invención en una forma adecuada para su administración *in vivo*, comprendiendo el procedimiento (a) obtener una proteína de fusión de acuerdo con la invención y (b) formular la proteína de fusión con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, por lo que se formula una preparación de proteína de fusión para su administración *in vivo*.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más proteínas de fusión disueltas o dispersas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéuticas o farmacológicamente aceptables" se refieren a entidades moleculares y composiciones que, en general, no son tóxicas para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica u indeseable cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una proteína de fusión y opcionalmente un ingrediente activo adicional se conocerá por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para su administración en animales (por ejemplo, un ser humano), se entenderá que las preparaciones deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según se requiera por la oficina de normas biológicas de la FDA o las autoridades correspondientes en otros países. Las composiciones preferentes son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos de disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizantes de fármacos, polímeros, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, tintes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como conocerá un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La composición puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o aerosol, y si se necesita que sea estéril para dichas vías de administración como inyección. Las

proteínas de fusión de la presente invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se pueden administrar mediante cualquier procedimiento o cualquier combinación de procedimientos como se conocerían por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990). La administración parenteral, en particular, la inyección intravenosa, se usa más comúnmente para administrar moléculas de polipéptido, tales como las proteínas de fusión de la invención.

Las composiciones parenterales incluyen las diseñadas para su administración mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intrarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para su inyección, las proteínas de fusión de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De forma alternativa, las proteínas de fusión pueden estar en forma de polvo para su sustitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando las proteínas de fusión de la invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados a continuación, según se requiera. Se puede conseguir fácilmente la esterilidad, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los demás ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los procedimientos preferentes de preparación son técnicas de secado al vacío o liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de un medio líquido previamente filtrado de forma estéril del mismo. Se debe tamponar adecuadamente el medio líquido, si fuera necesario, y hacer isotónico el diluyente líquido antes de su inyección con suficiente solución salina o glucosa. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas se debe minimizar hasta una concentración segura, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; glúcidos, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener compuestos que incrementen la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano, o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleatos de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión de la invención se pueden fabricar por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Se pueden formular las composiciones farmacéuticas de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o coadyuvantes fisiológicamente aceptables que faciliten el procesamiento de las proteínas en preparaciones que se puedan usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Las proteínas de fusión se pueden formular en una composición en forma de ácido o base libre, neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que retienen sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las formas de base libre correspondientes.

Composiciones y procedimientos terapéuticos

Se puede usar cualquiera de las proteínas de fusión proporcionadas en el presente documento en los procedimientos terapéuticos.

Para su uso en los procedimientos terapéuticos, las proteínas de fusión de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una manera consistente con la buena práctica médica. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos.

En un aspecto, se proporcionan proteínas de fusión de la invención para su uso como un medicamento. En otros aspectos, se proporcionan proteínas de fusión de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En determinados modos de realización, se proporcionan proteínas de fusión de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento. En un modo de realización, la invención proporciona una proteína de fusión como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En determinados modos de realización, la invención proporciona una proteína de fusión para su uso en un procedimiento de tratamiento a un individuo que tiene una enfermedad que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión. En determinados modos de realización, la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad autoinmunitaria. Las enfermedades autoinmunitarias ejemplares incluyen diabetes de tipo 1, psoriasis, asma, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso diseminado (LED) y esclerosis múltiple. En un modo de realización, la enfermedad es rechazo de trasplante o enfermedad injerto contra huésped. En un modo de realización particular, la enfermedad se selecciona del grupo de diabetes de tipo 1, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LED y esclerosis múltiple. En un modo de realización más particular, la enfermedad es diabetes de tipo 1. En otro modo de realización particular, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria intestinal. En otro modo de realización particular, la enfermedad es esclerosis múltiple. En otros modos de realización, la enfermedad es asma, fibrosis pulmonar o enfermedad pulmonar obstructiva. En todavía otros modos de realización, la enfermedad es una enfermedad cardiovascular, en particular, aterosclerosis y síndrome coronario agudo. En otros modos de realización, la enfermedad es una afección alérgica, en particular, una alergia alimentaria. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente inmunodepresor si la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad autoinmunitaria. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un mamífero, preferentemente un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una proteína de fusión de la invención en la fabricación o preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En un modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En determinados modos de realización, la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad autoinmunitaria. En un modo de realización, la enfermedad es rechazo de trasplante o enfermedad injerto contra huésped. En un modo de realización particular, la enfermedad se selecciona del grupo de diabetes de tipo 1, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LED y esclerosis múltiple. En un modo de realización más particular, la enfermedad es diabetes de tipo 1. En otro modo de realización particular, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria intestinal. En otro modo de realización particular, la enfermedad es esclerosis múltiple. En otros modos de realización, la enfermedad es asma, fibrosis pulmonar o enfermedad pulmonar obstructiva. En todavía otros modos de realización, la enfermedad es una enfermedad cardiovascular, en particular, aterosclerosis y síndrome coronario agudo. En otros modos de realización, la enfermedad es una afección alérgica, en particular, una alergia alimentaria. En un modo de realización, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente inmunodepresor si la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad autoinmunitaria. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de la invención. En un modo de realización, se administra una composición a dicho individuo, que comprende una proteína de fusión de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En determinados modos de realización, la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad autoinmunitaria. En un modo de realización, la enfermedad es rechazo de trasplante o enfermedad injerto contra huésped. En un modo de realización particular, la enfermedad se selecciona del grupo de diabetes de tipo 1, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LED y esclerosis múltiple. En un modo de realización más particular, la enfermedad es diabetes de tipo 1. En otro modo de realización particular, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria intestinal. En otro modo de realización particular, la enfermedad es esclerosis múltiple. En otros modos de realización, la enfermedad es asma, fibrosis pulmonar o enfermedad pulmonar obstructiva. En otros modos de realización, la enfermedad es una afección alérgica, en particular, una alergia alimentaria. En todavía otros modos de realización, la enfermedad es una enfermedad cardiovascular, en particular, aterosclerosis y síndrome coronario agudo. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente inmunodepresor si la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad autoinmunitaria. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En algunos modos de realización, se administra una cantidad eficaz de una proteína de fusión de la invención a una célula. En otros modos de realización, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de la invención a un individuo para el tratamiento de la enfermedad.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de una proteína de fusión de la invención (cuando se usa sola o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, la vía de administración, el peso corporal del paciente, el tipo de proteína de fusión, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si la proteína de fusión se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, las intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, la anamnesis del paciente y la respuesta a la proteína de fusión, y el criterio del médico especialista. El médico de cabecera responsable para su administración, en cualquier caso, determinará la concentración del/de los ingrediente(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis apropiada(s) para el sujeto individual. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero no se limitan a, administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos temporales, administración en inyección intravenosa rápida e infusión pulsada.

La proteína de fusión se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) de proteína de fusión puede ser una dosificación inicial candidata para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendrá, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar de la proteína de fusión estaría en el intervalo desde aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración y cualquier intervalo derivable en los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, etc., en base a los números descritos anteriormente. Por tanto, se pueden administrar una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) al paciente. Se pueden administrar intermitentemente dichas dosis, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente reciba desde aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis de la proteína de fusión). Se puede administrar una dosis de carga más alta inicial, seguido de una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Las proteínas de fusión de la invención se usarán, en general, en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Para su uso para tratar o prevenir una enfermedad, las proteínas de fusión de la invención, o las composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para su administración sistémica, se puede estimar inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos con cultivos de células. Entonces, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones en circulación que incluya la CI_{50} como se determina en un cultivo de células. Se puede usar dicha información para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos.

También se pueden estimar dosificaciones iniciales a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que se conocen bien en la técnica. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos en base a datos de animales.

Se pueden ajustar individualmente la cantidad de dosificación y el intervalo para proporcionar concentraciones en plasma de las proteínas de fusión que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosificaciones habituales para pacientes para su administración mediante inyección varían desde aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg/día, típicamente desde aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Se pueden lograr concentraciones en plasma terapéuticamente eficaces administrando dosis múltiples cada día. Se pueden medir las concentraciones en plasma, por ejemplo, mediante HPLC.

En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de la proteína de fusión puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Un experto en la técnica podrá optimizar dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin demasiada experimentación.

5 Una dosis terapéuticamente eficaz de las proteínas de fusión descritas en el presente documento, en general, proporcionará un beneficio terapéutico sin provocar una toxicidad sustancial. Se pueden determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de una proteína de fusión mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o en animales de experimentación. Se pueden usar ensayos con cultivos de células y estudios con animales para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para un 50 % de una población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de una población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se puede expresar como la proporción DL₅₀/DE₅₀. Son preferentes las proteínas de fusión que presentan grandes índices terapéuticos. En un modo de realización, la proteína de fusión de acuerdo con la presente invención presenta un alto índice terapéutico. Se pueden usar los datos obtenidos de ensayos con cultivos de células y estudios con animales en la formulación de un intervalo de dosificaciones adecuadas para su uso en seres humanos. La dosificación se encuentra preferentemente en un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar en este intervalo dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la forma de dosificación empleada, la vía de administración utilizada, la afección del sujeto, y similares. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación se pueden elegir por el médico individual en vista de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, cap. 1, p. 1).

El médico especialista para pacientes tratados con las proteínas de fusión de la invención sabrá cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la administración debido a la toxicidad, disfunción orgánica y similares. Por el contrario, el médico especialista también sabrá ajustar el tratamiento a concentraciones mayores si la respuesta clínica no fuera adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el tratamiento del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección que se va a tratar, con la vía de administración, y similares. La gravedad de la afección, por ejemplo, se puede evaluar, en parte, mediante procedimientos de evaluación del pronóstico estándar. Además, la dosis y quizás la frecuencia de la dosis también variarán de acuerdo con la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

Las proteínas de fusión de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más agentes en tratamiento. Por ejemplo, se puede coadministrar una proteína de fusión de la invención con al menos un agente terapéutico adicional. El término "agente terapéutico" engloba cualquier agente administrado para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesite dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquier ingrediente activo adecuado para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. En determinados modos de realización, un agente terapéutico adicional es un agente inmunodepresor.

Dichos otros agentes están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de proteína de fusión usada, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Las proteínas de fusión se usan, en general, en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente desde un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma composición o en composiciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración de la proteína de fusión de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o tras la administración del adyuvante y/o agente terapéutico adicional.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o combinada con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una proteína de fusión de la invención. La etiqueta o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende una proteína de

fusión de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente terapéutico adicional. El artículo de fabricación de la descripción puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

10 Ejemplos

Lo que sigue son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

15 Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina humana se proporciona en: Kabat, E.A. *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta ed., publicación del NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

25 Se determinaron secuencias de ADN mediante secuenciación bicatenaria.

Síntesis génica

30 Cuando se requirió, se generaron segmentos génicos deseados mediante PCR usando moldes apropiados o bien se sintetizaron mediante Geneart AG (Ratisbona, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automatizada. En los casos donde no estaba disponible ninguna secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores de oligonucleótidos en base a las secuencias de los homólogos más próximos y se aislaron los genes mediante RT-PCR del ARN que provenía del tejido apropiado. Se clonaron los segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares en vectores de clonación/secuenciación estándar. Se purificó el ADN plasmídico de bacterias transformadas y se determinó la concentración mediante espectroscopia UV. Se confirmó la secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados mediante secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los vectores de expresión respectivos. Se diseñaron todas las construcciones con una secuencia de ADN en extremo 5' que codifica un péptido líder que se dirige hacia proteínas para su secreción en células eucariotas. Las SEQ ID NO 39-47 dan péptidos líder ejemplares y secuencias de polinucleótido que los codifican.

Preparación de fusiones subunidades β y de IL-2R-Fc y fusión subunidad α de IL-2R-Fc

45 Para estudiar la afinidad de unión con respecto al receptor de IL-2, se generó una herramienta que permitió la expresión de un receptor de IL-2 heterodimérico. La subunidad β del receptor de IL-2 se fusionó con una molécula Fc que se genomanipuló para heterodimerizar (Fc(ojal)) (véanse las SEQ ID NO 21 y 22 (humanas), las SEQ ID NO 27 y 28 (de ratón) y las SEQ ID NO 33 y 34 (de macaco cangrejero)) usando la tecnología de "botones en ojales" (Merchant *et al.*, Nat Biotech. 16, 677-681 (1998)). Entonces, la subunidad γ del receptor de IL-2 se fusionó con la variante de Fc(botón) (véanse las SEQ ID NO 23 y 24 (humanas), las SEQ ID NO 29 y 30 (de ratón) y las SEQ ID NO 35 y 36 (de macaco cangrejero)), que se heterodimerizaron con Fc(ojal). Entonces, se usó esta proteína de fusión a Fc heterodimérica como sustrato para analizar la interacción IL-2/receptor de IL-2. La subunidad α de IL-2R se expresó como una cadena monomérica con un sitio de escisión de AcTev y una marca Avi His (SEQ ID NO 25 y 26 (humanas), SEQ ID NO 31 y 32 (de ratón) y SEQ ID NO 37 y 38 (de macaco cangrejero)). Se expresaron de forma transitoria subunidades de IL-2R respectivas en células HEK EBNA 293 con suero para la construcción de las subunidades $\beta\gamma$ de IL-2R y sin suero para la construcción de la subunidad α . Se purificó la construcción de las subunidades $\beta\gamma$ de IL-2R en la proteína A (GE Healthcare), seguido de cromatografía de exclusión por tamaño (GE Healthcare, Superdex 200). Se purificó la subunidad α de IL-2R por medio de marca His en una columna NINTA (Qiagen) seguido de cromatografía de exclusión por tamaño (GE Healthcare, Superdex 75). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos correspondientes de diversas construcciones de receptores se dan en las SEQ ID NO 21-38.

Preparación de las proteínas de fusión

65 Las secuencias de ADN se generaron mediante síntesis génica y/o técnicas clásicas de biología molecular y se subclonaron en vectores de expresión en mamíferos bajo el control de un promotor MPSV y en dirección 5' de un

sitio de poliA sintética, portando cada vector una secuencia OriP de VEB. Se produjeron proteínas de fusión como se aplica en los ejemplos a continuación cotransfectando células HEK293-EBNA que crecen exponencialmente con los vectores de expresión en mamíferos usando transfección con fosfato de calcio. De forma alternativa, se transfectoron células HEK293 que crecían en suspensión con los vectores de expresión respectivos mediante polietilenimina (PEI). De forma alternativa, se usaron grupos de células CHO transfectadas de forma estable o clones de células CHO para la producción en medio libre de suero. Posteriormente, se purificaron las proteínas de fusión a partir del sobrenadante. En resumen, se purificaron proteínas de fusión mediante una etapa de afinidad con proteína A (HiTrap ProtA, GE Healthcare) equilibrada en fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. Después de cargar el sobrenadante, la columna se lavó en primer lugar con fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5, y posteriormente se lavó con fosfato de sodio 13,3 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 5,45. La proteína de fusión se eluyó con citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3, o citrato de sodio 10 mM, pH 3,0. Las fracciones se neutralizaron con Na₂HPO₄ 0,5 M, pH 8,0 (1:10), se agruparon y purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (HiLoad 16/60 Superdex 200, GE Healthcare o HiLoad 26/60 Superdex 200, GE Healthcare) en el tampón de formulación final: histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Se determinó la concentración de proteínas de las muestras de proteínas purificadas midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. También se determinó el peso molecular en base a la secuencia de aminoácidos. Se analizaron la pureza y peso molecular de las proteínas de fusión mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y se tiñeron con azul de Coomassie (SimpleBlue™ SafeStain, Invitrogen). Se usó el sistema en gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (geles Tris-glicina al 4-20 % o Bis-Tris al 3-12 %). De forma alternativa, se analizaron la pureza y el peso molecular de las moléculas mediante análisis EC-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor, usando el sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Lifescience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizó el contenido total de las muestras de proteína de fusión usando una columna analítica de exclusión por tamaño Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare) en MOPS 2 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ al 0,02 %, tampón de migración a pH 7,3 a 25 °C. De forma alternativa, se analizó el contenido total de las muestras de anticuerpo usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K₂HPO₄ 125 mM, NaCl 125 mM, monoclóhidrato de L-arginina 200 mM, NaN₃ al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

Los resultados de la purificación y caracterización de las construcciones de IgG DP47GS-IL-2, IgG DP47GS-(IL-2)₂, IgG DP47GS-IL-2 N88D, IgG DP47GS-(IL-2 N88D)₂ e IgG DP47GS-(IL-2 E95A)₂ se muestran en las figuras 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente.

Afinidad con respecto a los receptores de IL-2

La afinidad de las proteínas de fusión se determinó mediante resonancia de plasmón superficial (RPS) en un Biacore T200 (GE Healthcare) para el heterodímero βγ de IL-2R humano, murino y de macaco cangrejero usando el heterodímero βγ de IL-2R recombinante en las siguientes condiciones: ligandos: heterodímero botón β ojal γ de IL-2R humano, murino y de macaco cangrejero biotinilado inmovilizado en un chip SA (las concentraciones de inmovilización fueron de 194, 114 y 116 UR, respectivamente), analitos: IgG DP47GS-IL-2 (véanse las SEQ ID NO 13, 15 y 19), IgG DP47GS-(IL-2)₂ (véanse las SEQ ID NO 17 y 19), IgG DP47GS-IL-2 N88D (véanse las SEQ ID NO 15, 19 y 48), IgG DP47GS-(IL-2 N88D)₂ (véanse las SEQ ID NO 19 y 50) e IgG DP47GS-(IL-2 E95A)₂ (véanse las SEQ ID NO 19 y 52), temperatura: 25 °C, tampón: HBS-EP, concentración de analito: 100 nM hasta 1,2 nM (diluciones 1:3), caudal: 30 μl/min, asociación: 120 s, disociación: 600 s para las 2 concentraciones más altas y 120 s para las concentraciones más bajas, regeneración: 60 s MgCl₂ 3 M, ajuste: modelo de unión de Langmuir 1:1, IR≠0, R_{máx}=local. Se determinaron las afinidades en base a las constantes de velocidad cinética k_{as} y k_{dis}. La afinidad de las proteínas de fusión también se determinó para la subunidad α de IL-2R humano, murino y de macaco cangrejero usando la subunidad α de IL-2R monomérica recombinante en las siguientes condiciones: ligandos: subunidad α de IL-2R humano, murino y de macaco cangrejero inmovilizada en un chip CM5 por medio de acoplamiento de amina (las concentraciones de inmovilización fueron de 240, 245 y 220 UR, respectivamente), analitos: IgG DP47GS-IL-2 (véanse las SEQ ID NO 13, 15 y 19), IgG DP47GS-(IL-2)₂ (véanse las SEQ ID NO 17 y 19), IgG DP47GS-IL-2 N88D (véanse las SEQ ID NO 15, 19 y 48), IgG DP47GS-(IL-2 N88D)₂ (véanse las SEQ ID NO 19 y 50) e IgG DP47GS-(IL-2 E95A)₂ (véanse las SEQ ID NO 19 y 52), temperatura: 25 °C, tampón: HBS-EP, concentración de analito 300 nM hasta 0,41 nM (diluciones 1:3), caudal: 30 μl/min, asociación: 120 s, disociación: 180 s, regeneración: glicina 10 mM, pH 1,5, durante 60 s. Se determinaron las afinidades mediante análisis en estado estacionario.

Los resultados de las mediciones de la afinidad en base a la cinética para el heterodímero βγ de IL-2R y el estado estacionario para la subunidad α de IL-2R se proporcionan en la tabla 1.

Tabla 1. Unión de proteínas de fusión a βγ de IL-2R y α de IL-2R.

K _D en nM	βγ de IL-2R hu	βγ de IL-2R mc	βγ de IL-2R mu	α de IL-2R hu	α de IL-2R mc	α de IL-2R mu
IgG DP47GS-IL-2	0,15	0,60	0,85	51	81	112

IgG DP47GS-(IL-2) ₂	0,11	0,17	0,37	20	31	26
IgG DP47GS-IL-2 N88D	0,93	1,3	2,4	18	31	48
IgG DP47GS-(IL-2 N88D) ₂	0,24	0,57	2,1	22	30	25
IgG DP47GS-(IL-2 E95A) ₂	0,16	0,29	0,36	24	32	26

Las fusiones IgG DP47GS-IL-2 humanas y mutantes de las mismas no solo se unen a las 3 cadenas diferentes α , β y γ del receptor de IL-2 humano, sino también a las respectivas cadenas del receptor de macaco cangrejero y ratón, aunque las afinidades, en promedio, tienden a ser ligeramente más bajas para las últimas dos especies. Las afinidades de estas fusiones de citocinas con respecto a las cadenas α humanas y de macaco cangrejero son comparables, con respecto a la cadena α murina existe una diferencia de afinidad ~ 2 veces en comparación con respecto a la cadena α humana observada para las moléculas que portan solo una porción de citocina. Para las moléculas con dos porciones de citocina, lo más probablemente debido a la avidéz, esta diferencia no existe. Las afinidades de IgG DP47GS-IL-2 e IgG DP47GS-IL-2 N88D con respecto a las cadenas α , en teoría, deberían ser iguales, ya que la mutación N88D no debería afectar a la interfase con respecto a la cadena α . N88 se posiciona en la interfase con respecto a la cadena β del receptor de IL-2 y la mutagénesis con respecto a D da lugar a una afinidad disminuida, como se puede observar comparando la unión de IgG DP47GS-IL-2 e IgG DP47GS-IL-2 N88D a $\beta\gamma$ de IL-2R de las tres especies (0,15 nM, 0,60 nM y 0,85 nM frente a 0,93 nM, 1,3 nM y 2,4 nM, respectivamente). Para IgG DP47GS-(IL-2 N88D)₂ que porta dos citocinas IL-2 mutadas, al menos hacia las $\beta\gamma$ de IL-2R humano, esta diferencia es menos pronunciada, lo más probablemente debido a la avidéz. IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2 E95A)₂ presentan avidéces muy similares en la unión a $\beta\gamma$ de IL-2R de las tres especies. Aunque E95 también se posiciona en la interfase con respecto a la cadena β del receptor de IL-2, la mutagénesis con respecto a A, al menos cuando dos de estos mutantes se fusionan con la IgG, no da lugar a una disminución significativa de la avidéz.

Expresión de receptores de IL-2 en células inmunitarias

El receptor de IL-2 trimérico de afinidad alta está compuesto por las cadenas α (IL-2RA, CD25), β (IL-2RB, CD122) y γ (IL-2RG, CD132) y tiene una K_D de ~ 10 pM. Solo CD25 tiene una afinidad baja ($K_D \sim 10$ nM) para IL-2. El dímero IL-2RB/IL-2RG, que se expresa en algunos tipos de células en ausencia de IL-2RA, también se une a IL-2, pero con una afinidad intermedia ($K_D \sim 1$ nM). La señalización por medio del receptor de IL-2 se media por las cadenas IL-2RB e IL-2RG. A partir de los análisis de estructuras cristalinas, IL-2RA no parece entrar en contacto con IL-2RB o bien con IL-2RG. Se ha propuesto que la base de la cooperación del receptor trimérico sea una reducción de entropía cuando CD25 captura IL-2 en la superficie de las células para su presentación a IL-2RB e IL-2RG, o, de forma alternativa, se produce una alteración inducida por CD25 en la conformación de IL-2, estabilizando, por tanto, el complejo. En los linfocitos T FOXP3⁺ CD4⁺ reguladores existe un gran exceso estequiométrico de IL-2RA en comparación con las cadenas β y γ del receptor, lo que respalda la hipótesis de que los dímeros, o incluso complejos más grandes, de la cadena α contribuyen a la unión de IL-2. También existen pruebas de que CD25 en una célula puede presentar IL-2 para dímeros IL-2RB/IL-2RG en otra célula, en una interacción intercelular de afinidad alta que enfatiza la relación única entre las tres cadenas que componen el receptor de IL-2 de afinidad alta.

Se determinó la expresión de CD25 (IL-2RA) y CD122 (IL-2RB) en subconjuntos de Treg CD4⁺, subconjuntos de linfocitos NK y linfocitos NKT, así como en subconjuntos de linfocitos T convencionales CD4⁺ y CD8⁺ mediante FACS (figura 6 y 7). Se usaron marcadores de superficie de las células para definir subconjuntos de Treg CD4⁺, linfocitos NKT y linfocitos NK (figura 6). A fin de optimizar la tinción para CD25 y CD122, no se realizó ninguna tinción para FoxP3 intracelular. En resumen, usando 150 μ l de sangre donada por un voluntario sano, se incubaron anticuerpos fluorescentes durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad (mezclada en vórtex al comienzo y después de 20 min). Los eritrocitos se lisaron con tampón de lisis BD (BD FACS Lysing Solution, 349202) durante 9 minutos y las células restantes se lavaron (2 ml de PBS + BSA al 0,1 %) y se fijaron (PFA al 1 %). Se analizaron las células en un analizador de células LSRFortessa[™] (Becton Dickinson) y se analizaron los datos usando el programa informático FloJo (TreeStar). Se identificaron subconjuntos de Treg usando anticuerpos específicos para TCR $\alpha\beta$ -FITC (IP26, BioLegend), CD4-Alexa Fluor[®] 700 (RPA-T4, BioLegend), CD127-PE/CY7 (ebioRDR5, Ebioscience), CD45RA-Pacific Blue (HI100, BioLegend), CD25-APC (2A3, M-A251, BD Biosciences) y CD122-PE (TU27, BioLegend). Se tiñeron linfocitos NK y NKT en un tubo separado con anticuerpos específicos para TCR $\alpha\beta$ -FITC, CD4-Alexa Fluor[®] 700, CD8-PE/CY7 (HTT8a, BioLegend), CD56-Pacific Blue (HCD56, BioLegend), CD25-APC y CD122-PE. Tras la selección de los linfocitos en base a FSC/SSC, y la exclusión de los dobletes, se identificaron los Treg indiferenciados como TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺CD45RA⁺, se identificaron los Treg de memoria como TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺CD45RA⁻ y se identificaron los Treg activados como TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD127⁺

CD25^{alta}CD45RA⁻. Se identificaron los linfocitos NK como TCRαβ⁻CD56^{-/débil} y se identificaron los linfocitos NK activados como TCRαβ⁺CD56^{fuerte}. Se identificaron los linfocitos NKT como TCRαβ⁺CD56⁺. Se usaron controles de isotipo (CI) conjugados con APC y PE a fin de estimar la fluorescencia de fondo para CD25 y CD122, respectivamente.

5 De forma similar, se usaron marcadores de superficie de las células para definir linfocitos T CD4⁺ convencionales indiferenciados y de memoria (figuras 7A y 7B), linfocitos T CD8⁺ convencionales de memoria y linfocitos T CD8 CD45RA⁺ (una combinación de los subconjuntos indiferenciados y TEMRA; TEMRA se refiere a los linfocitos T de memoria efectora que han vuelto a expresar CD45RA) (figuras 7C y 7D). La tinción y el análisis se realizaron como se describe anteriormente. Usando el mismo tubo descrito anteriormente para caracterizar los Treg CD4⁺, se identificaron los linfocitos T indiferenciados convencionales CD4⁺ como TCRαβ⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{-/+}CD45RA⁺ y se identificaron los linfocitos T de memoria convencionales CD4⁺ como TCRαβ⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{+/-}CD45RA⁻. Se definieron los linfocitos T CD8 usando TCRαβ-FITC, CD8-Alexa Fluor[®] 700 (HTT8a, BioLegend), CD28-PE/Cy7 (CD28.2, BioLegend), CD45RA-Pacific Blue, CD25-APC y CD122-PE. Se identificaron los linfocitos T de memoria CD8⁺ como TCRαβ⁺CD8⁺CD45RA⁺. Se identificaron linfocitos TEMRA e indiferenciados CD8⁺ como TCRαβ⁺CD8⁺CD45RA⁺. No se usó CD28 para distinguir los linfocitos T indiferenciados CD8⁺ de los linfocitos T TEMRA CD8⁺, puesto que el marcador CD28 no se incluyó en el análisis de pSTAT5a que se describe a continuación (véase la figura 8). En algunas pruebas (figura 15), se definieron los subconjuntos adicionales como sigue: linfocitos T CD4⁺ de memoria central (TCRαβ⁺CD4⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{+/-}), linfocitos T CD4⁺ de memoria efectora (TCRαβ⁺CD4⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{+/-}), linfocitos T CD8⁺ de memoria central (TCRαβ⁺CD8⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{+/-}), linfocitos T CD8⁺ de memoria efectora (TCRαβ⁺CD8⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{+/-}) y linfocitos CD8⁺ TEMRA (TCRαβ⁺CD8⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{+/-}).

En las figuras 6 y 7, se muestra la expresión específica de célula de IL-2RA e IL-2RB para subconjuntos de linfocitos T, linfocitos NK y linfocitos T NK en sangre periférica humana (IL-2RG tiene una expresión esencialmente ubicua en células hematopoyéticas, puesto que se asocia con un gran número de receptores de citocina). La concentración más alta de IL-2RA está presente en las tres poblaciones de linfocitos T CD4⁺ reguladores (Treg): indiferenciados (CD45RA⁺CD25⁺), de memoria (CD45RA⁻CD25⁺) y activados (CD45RA⁻CD25^a) (figura 6A). En promedio, los linfocitos T CD4⁺ de memoria convencionales expresan aproximadamente 10 veces menos CD25 que los Treg (figura 7A). La expresión de CD25 en linfocitos T CD4⁺ indiferenciados varía significativamente entre los donantes, pero siempre es más baja que la observada en los linfocitos T CD4⁺ de memoria (figura 7A). La expresión de CD25 en los linfocitos T CD8, NKT y NK es muy baja o no detectable, excepto para los linfocitos NK CD56^{fuerte} (figuras 6C y 1C). Los linfocitos NK CD56^{fuerte} y NK CD56⁺ expresan la concentración más alta de IL-2RB (figura 6D), aproximadamente 10 veces más que cualquiera de los subconjuntos de linfocitos T, incluyendo los linfocitos NKT (figuras 6B, 6D, 7B, 7D).

Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de células de sangre periférica humana

Tras la oligomerización inducida por IL-2 del IL-2R trimérico, se activan las proteínas tirosina cinasas citoplásmicas JAK1 y JAK3, que se asocian con los dominios intracelulares de IL-2RB e IL-2RG, respectivamente. Estas cinasas fosforilan determinados residuos de tirosina de IL-2RB que actúan como sitios de acoplamiento para STAT5a y STAT5b que, a su vez, se fosforilan. La activación inducida por IL-2 de varias vías de señalización finalmente da como resultado la transcripción de genes diana que contribuyen a las diversas funciones asociadas con la vía IL-2/IL-2R. Puesto que diversos tipos de células expresan diferentes concentraciones de las moléculas IL-2RA e IL-2RB del receptor de IL-2 (figuras 6 y 7), se midieron las concentraciones de pSTAT5a en células individuales mediante citometría de flujo policromática a fin de entender la respuesta de señalización integrada a IL-2 mediada mediante diversas combinaciones de los receptores de afinidad alta e intermedia.

Se evaluaron los efectos de diversas dosis de IgG DP47GS-IL-2, IgG DP47GS-(IL-2)₂, IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂, IgG DP47GS-IL-2N88D e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ sobre la inducción de la fosforilación de STAT5a en subconjuntos de Treg CD4⁺ humanos, linfocitos T CD4⁺ convencionales indiferenciados y de memoria, linfocitos T CD8⁺ convencionales de memoria, linfocitos T CD8 CD45RA⁺, linfocitos NKT y linfocitos NK (figura 8-14 y tabla 2 y 3). Todos los subconjuntos se caracterizaron en un tubo único para cada dosis. En resumen, se obtuvo sangre de un voluntario adulto humano sano en tubos heparinizados. Se añadieron diversas concentraciones de proteínas de fusión IgG DP47GS-IL-2 a 500 µl de sangre y se incubaron a 37 °C. Después de 30 minutos, se lisó y se fijó la sangre usando un tampón de lisado/fijación calentado previamente (Becton Dickinson n.º 558049) durante 10 minutos a 37 °C, se lavó 2 veces con PBS que contenía BSA al 0,2 % seguido de permeabilización con metanol enfriado previamente a -20 °C (Sigma, Biotech, grado 494437) durante 20 minutos en hielo. Entonces, las células se lavaron exhaustivamente 4 veces con PBS que contenía BSA al 0,2 % antes de que se realizara la tinción con FACS usando un panel de anticuerpos fluorescentes para distinguir diferentes subpoblaciones de linfocitos y linfocitos NK y el estado de pSTAT5a. Los anticuerpos utilizados fueron anti-CD4-Alexa Fluor[®] 700 (clon RPA-T4), CD3-PerCP/Cy5.5 (UCHT1), CD45RA-PE/Cy7 (HI100), CD8-Brilliant Violet 605 (RPA-T8), CD56-Brilliant Violet 421 (HCD56), FOXP3-PE (259D) (todos de BioLegend), CD25-APC (clones M-A251 y 2A3) y pSTAT5a-Alexa Fluor[®] 488 (pY694) (Becton Dickinson). Se adquirieron las muestras usando un analizador de células LSRFortessa[™] (Becton Dickinson) y se analizaron los datos usando el programa informático FlowJo (FlowJo, EEC). Después de la selección de los linfocitos y la exclusión de los dobletes, se definieron los Treg como CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺ y se subdividieron

como CD45⁻ FOXP3^a (Treg activados), CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻FOXP3⁺ (Treg de memoria) y CD3⁺CD4⁺CD45⁺FOXP3⁺ (Treg indiferenciados). Se definieron los linfocitos T CD4⁺ convencionales como CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ (indiferenciados) y CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻ (de memoria). Se definieron los linfocitos T CD8 como CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻ (de memoria) y CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺. Se definieron los linfocitos NKT como CD3⁺CD56⁺ y se definieron los linfocitos NK como CD3⁻CD56^{fuerte} (linfocitos NK activados) o CD3⁻CD56⁻ (linfocitos NK). Se cuantificaron concentraciones de pSTAT5a intracelular en todos los subconjuntos de células a todas las dosis.

La figura 8 muestra la respuesta a la dosis del inmunoconjugado IgG DP47GS-IL-2 en los linfocitos T, linfocitos NK y linfocitos T NK en sangre periférica humana de tres donantes individuales, cada uno sometido a prueba en días diferentes. La jerarquía de la reactividad a IgG DP47GS-IL-2 fue la misma en los tres donantes y la misma que la observada cuando se usó IL-2 humana recombinante (Proleukin[®]) (datos no mostrados). Las tres poblaciones de Treg, activados (CD45RA⁻CD25^a), de memoria (CD45RA⁻CD25⁺) e indiferenciados (CD45RA⁺CD25⁺), incrementaron las concentraciones de pSTAT5a a la concentración de 0,1 ng/ml de IgG DP47GS-IL-2, mientras que otras poblaciones de células requirieron más de 1 ng/ml (linfocitos NK CD56^{fuerte} y T CD4⁺ de memoria) o bien 10-100 ng/ml (linfocitos T CD8⁺ T de memoria, linfocitos NK CD56⁺, linfocitos T CD4⁺ indiferenciados, linfocitos NKT y linfocitos T CD8⁺ CD45RA⁺) de IgG DP47-IL-2 para producir incrementos detectables de pSTAT5a. Véase también la figura 11 para obtener respuestas a la dosis más detalladas por las poblaciones de Treg que presenten su alta sensibilidad frente a IgG DP47GS-IL-2. Es notable que la expresión alta de IL-2RB en los linfocitos NK con concentraciones intermedias de CD56 (figura 6D) en comparación con la expresión de IL-2RB en los subconjuntos de linfocitos T no sea suficiente para permitir la sensibilidad de IL-2 similar a Treg. En general, los subconjuntos de Treg activados, de memoria e indiferenciados mostraron la mayor sensibilidad a IgG DP47GS-IL-2, mientras que los linfocitos NK CD56^{fuerte} y los linfocitos T efectores de memoria convencionales CD4⁺ fueron 20-50 veces menos sensibles. Entre los demás subconjuntos de células analizados frente a los incrementos de pSTAT5a, los linfocitos T efectores de memoria CD8⁺, los linfocitos T efectores indiferenciados CD4⁺, los linfocitos NKT, los linfocitos NK “en reposo” (positivos, sin tinción fuerte para CD56) y los linfocitos T efectores indiferenciados CD8⁺ + de memoria CD45RA⁺ fueron relativamente insensibles al inmunoconjugado IgG-IL-2.

La figura 9 muestra la respuesta a la dosis de IgG DP47GS-(IL-2)₂ en los linfocitos T, linfocitos NK y linfocitos T NK en sangre periférica humana de cinco donantes individuales, cada uno sometido a prueba en días diferentes. Como se observó para IgG DP47GS-IL-2 (figura 8), los tres subconjuntos de Treg fueron las células más sensibles a pSTAT5a inducido por IgG DP47GS-(IL-2)₂ (figuras 9 y 11) y se descubrieron respuestas a la dosis jerárquicas similares para los demás subconjuntos de células en los cinco donantes.

Para comparar más fácilmente IgG DP47GS-IL-2 e IgG DP47GS-(IL-2)₂, se normalizaron los valores de pSTAT5a (figura 10). Para normalizar los valores de IMF, se restaron los valores de IMF de pSTAT5a sin estimular específicos para cada subconjunto seleccionado de todos los valores de IMF estimulados para ese subconjunto de células. Los valores resultantes se dividieron por el valor de IMF de pSTAT5a más alto obtenido por ese subconjunto en la respuesta a la dosis. Las CE₅₀ se estimaron en base a la cantidad de proteína de fusión de IL-2 requerida para alcanzar un 50 % de la IMF de pSTAT5a máxima observada para ese subconjunto. Como se muestra en la figura 10, el inmunoconjugado IgG DP47GS-(IL2)₂ produjo una inducción más potente de pSTAT5a en células que expresaban constitutivamente CD25, potencialmente como consecuencia de una avidéz incrementada del inmunoconjugado por el receptor de IL-2 de afinidad alta. Se observó que la CE₅₀ para la activación de pSTAT5a era 5-9 veces más baja en los Treg cuando se comparaba directamente IgG DP47GS-(IL-2)₂ con IgG DP47GS-IL-2. La tabla 2 resume los valores de CE₅₀ representativos y la tasa de diferencia para la activación de pSTAT5a mediante IgG DP47GS-IL-2 frente a IgG DP47GS-(IL-2)₂ en los diferentes subconjuntos de células.

Tabla 2. Valores de CE₅₀ y tasas de diferencia para la activación de pSTAT5a mediante IgG DP47GS-IL-2 frente a IgG DP47GS-(IL-2)₂ en diferentes subconjuntos de células.

Linfocito T	IgG-IL-2	IgG-(IL-2) ₂	Tasa de cambio
Treg activados	0,10 ng/ml	0,020 ng/ml	5
Treg de memoria	0,22 ng/ml	0,033 ng/ml	7
Treg indiferenciados	0,20 ng/ml	0,023 ng/ml	9
NK CD56 ^{fuerte}	2,0 ng/ml	0,63 ng/ml	3
Tef de memoria CD4 ⁺	5 ng/ml	0,7 ng/ml	7
Linfocitos NK	35 ng/ml	10 ng/ml	4

Incluso a concentraciones extremadamente limitantes, IgG DP47GS-(IL-2)₂ produjo concentraciones más altas de pSTAT5a en comparación con IgG DP47GS-IL-2 (figura 11). Para este experimento, se sometió a prueba individualmente la sangre de tres voluntarios sanos en el mismo día para obtener respuestas con respecto a una valoración por duplicado de IgG DP47-IL-2 e IgG DP47-(IL-2)₂ a concentraciones limitantes de IL-2. Los gráficos en

la figura 11 representan la media \pm DE de la IMF de pSTAT5a para los tres donantes. Además de los tres subconjuntos de Treg examinados individualmente (figura 11B-D), se aplicó una selección para evaluar pSTAT5a en los Treg CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ totales (figura 11 A). Los resultados indican claramente un incremento de 5-10 veces en la potencia para la activación por IgG DP47GS-(IL-2)₂ de los de Treg a pesar de solo un incremento de 2 veces en la IL-2 por molécula de IgG. Se realizó citometría de flujo policromática como se describe anteriormente (véase la figura 8).

Los linfocitos T efectores de memoria convencionales CD4⁺ también respondieron a concentraciones más bajas (7 veces) de IgG DP47GS-(IL-2)₂ en comparación con IgG DP47GS-IL-2. Mientras que los valores de CE₅₀ fueron más bajos para los linfocitos NK CD56^{fuerte} y los linfocitos NK CD56⁺ al comparar IgG DP47GS-(IL-2)₂ con IgG DP47-IL-2, la reducción solo fue de 3 veces y 4 veces, respectivamente. Esto probablemente se debe a la dependencia de estas células del receptor de IL-2 de afinidad intermedia para la señalización mediada por IL-2. Este cambio diferencial en la DE₅₀ para los Treg frente a los linfocitos NK incrementa la preferencia por la activación de los Treg en varias veces.

La figura 12 muestra la respuesta a la dosis del IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂ en los linfocitos T, linfocitos NK y linfocitos T NK en sangre periférica humana de tres donantes individuales, cada uno sometido a prueba en días diferentes. Se diseñó la molécula de IL-2E95A y se predijo que reduciría la actividad de unión a IL-2R $\beta\gamma$, pero, de hecho, presentó propiedades de unión similares al receptor de IL-2R $\beta\gamma$ como lo hizo la IL-2 natural. La jerarquía de la reactividad a IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂ fue la misma en los tres donantes y la misma que la observada en los mismos donantes con el inmunoconjugado IgG DP47GS-(IL-2)₂ con IL-2 natural. Las tres poblaciones de Treg, activados (CD45RA⁻CD25⁺), de memoria (CD45RA⁺CD25⁺) e indiferenciados (CD45RA⁺CD25⁻) incrementaron las concentraciones de pSTAT5a a menos de concentraciones de 0,1 ng/ml de IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂, mientras que otras poblaciones de células requirieron 1 ng/ml (linfocitos NK CD56^{fuerte} y linfocitos T efectores de memoria convencionales CD4⁺) o bien 10-100 ng/ml (linfocitos T CD8⁺ de memoria, linfocitos NK CD56⁺, linfocitos T CD4⁺ indiferenciados, linfocitos NKT y linfocitos T CD45RA⁺CD8⁺) de IgG DP47-(IL-2E95A)₂ para producir incrementos detectables de pSTAT5a. Es notable que la expresión alta de IL-2RB en los linfocitos NK con concentraciones intermedias de CD56 (figura 6D) en comparación con la expresión de IL-2RB en los subconjuntos de linfocitos T no sea suficiente para permitir la sensibilidad de IL-2 similar a Treg. En general, los subconjuntos de Treg activados, de memoria e indiferenciados mostraron la mayor sensibilidad a IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂, mientras que los linfocitos NK CD56^{fuerte} y los linfocitos T efectores de memoria convencionales CD4⁺ fueron 20-50 veces menos sensibles. Entre los demás subconjuntos de células analizados frente a los incrementos de pSTAT5a, los linfocitos T efectores de memoria CD8⁺, los linfocitos T efectores indiferenciados CD4⁺, los linfocitos NKT, los linfocitos NK "en reposo" (positivos, sin tinción fuerte para CD56) y los linfocitos T efectores indiferenciados CD8⁺ CD45RA⁺ fueron relativamente insensibles al inmunoconjugado IgG-(IL-2E95A)₂.

La figura 13 muestra la respuesta a la dosis de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en los linfocitos T, linfocitos NK y linfocitos T NK en sangre periférica humana de cinco donantes individuales, cada uno sometido a prueba en días diferentes. Se diseñó la molécula de IL-2N88D para reducir la actividad de unión a IL2R $\beta\gamma$ y, a diferencia de la mutación puntual E95A, tenía 6,2 veces menos afinidad de unión a IL2R $\beta\gamma$ mediante análisis con Biacore (tabla 1, K_D 0,15 nM frente a 0,93 nM). Como se observó para todos los inmunoconjugados de IL-2 hasta la fecha, los tres subconjuntos de Treg fueron las células más sensibles a la activación de pSTAT5a mediante IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ y se descubrieron respuestas a la dosis jerárquicas similares para los demás subconjuntos de células en los cinco donantes. Cabe destacar la falta de reactividad de los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ cuando se estimulan con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂; incluso a dosis de 1000 ng/ml, tuvo poco efecto sobre la estimulación de esta importante población de células autoinmunitarias.

En este ejemplo, una mutación puntual única en IL-2 diseñada de manera única, N88D, redujo drásticamente la actividad estimuladora en la población de células deseada, los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺, todo mientras mantenía los efectos estimuladores de Treg requeridos para una entidad terapéutica novedosa y mejorada.

Para comparar IgG DP47GS-(IL-2)₂ para IL-2 natural con los inmunoconjugados con las mutaciones puntuales en IL-2 E95A y N88D, se representaron los valores de pSTAT5a frente a sí mismos para cada uno de los tipos de células que se están sometiendo a prueba (figura 14). IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂ mostró una actividad idéntica a su homólogo natural IgG DP47GS-(IL-2)₂ estimulando cada una de las poblaciones de células humanas con curvas de respuesta a la dosis superponibles. En cambio, las moléculas de unión reducida a IL2R $\beta\gamma$, IgG DP47GS-IL-2N88D e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, tuvieron poco efecto sobre los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ y solo el conjugado bivalente IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ retuvo una actividad estimuladora significativa en las diferentes poblaciones de Treg.

Los resultados en la figura 15 muestran las respuestas de pSTAT5a de sangre completa obtenidas de diez donantes de sangre humana adicionales. En días separados, se sometió a prueba cada donante comparando un amplio intervalo de valoración (≥ 6 log) de IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. Como se observó previamente con IgG DP47GS-(IL-2)₂ (figura 9), los Treg de memoria y los Treg indiferenciados fueron las células más sensibles a pSTAT5a inducido por IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ (figura 15A, B); mientras que cada proteína de fusión estimuló las respuestas de pSTAT5a máximas, diferían en las concentraciones necesarias para el

punto de inflexión de la activación, así como la dosis máxima para la activación. Los linfocitos NK CD56^{fuerte} se presentaron como un subconjunto de células menos sensible que Treg a IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en comparación con las proteínas de fusión de IL-2 natural (figura 15C); el punto de inflexión de la activación fue más alto y, en este caso, nunca logró un efecto máximo incluso a la dosis más alta sometida a prueba (5000 ng/ml). A diferencia de IgG DP47GS-(IL-2)₂, los linfocitos NK fueron no reactivos a IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ (figura 15D). Tanto los linfocitos T CD4⁺ de memoria central (figura 15E) como los linfocitos T CD4⁺ de memoria efectora (figura 15F) fueron relativamente no reactivos a IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ con un punto de inflexión de activación 1000 veces más alto que IgG DP47GS-(IL-2)₂ e induciendo solo respuestas parciales a la dosis más alta sometida a prueba (5000 ng/ml). Mientras que IgG DP47GS-(IL-2)₂ indujo diversos grados de activación, IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ no tuvo ningún efecto sobre los siguientes subconjuntos celulares: linfocitos T CD4⁺ indiferenciados (figura 15G), linfocitos T CD8⁺ de memoria central (figura 15H), linfocitos T CD8⁺ de memoria efectora (figura 15I), linfocitos T CD8⁺ indiferenciados (figura 15J), linfocitos T CD8⁺ CD45RA⁺ de memoria efectora (figura 15K), linfocitos NKT (figura 15L) y linfocitos T CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD56⁻ (figura 15M).

Los valores de CE₅₀ se muestran en la tabla 3 y se basaron en la cantidad de proteínas de fusión de IL-2 requeridas para alcanzar un 50 % de la respuesta de pSTAT5a máxima observada para ese subconjunto de células. IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂, como su homólogo IgG DP47GS-(IL-2)₂ para IL-2 natural, produjo la inducción más potente de pSTAT5a en los Treg, las células que expresan constitutivamente el receptor de afinidad alta CD25 (IL2R α), potencialmente como consecuencia de su avidéz incrementada por el receptor de IL-2 de afinidad alta. Las respuestas a la dosis a IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂ e IgG DP47GS-(IL-2)₂ fueron superponibles. La CE₅₀ para la activación de pSTAT5a en los Treg fue de 6 a 7 veces más baja con IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂ e IgG DP47GS-(IL-2)₂ en comparación con IgG DP47GS-IL-2 monovalente. Asimismo, la CE₅₀ para la activación de los Treg fue de 7 a 10 veces más baja con IgG DP47GS-IL-2 monovalente en comparación con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ bivalente. Y por último, la CE₅₀ para la activación de los Treg fue de 36 a 61 veces más baja con IgG DP47GS-(IL-2)₂ bivalente en comparación con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ bivalente.

La ventaja inmunológica más significativa que tiene IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ para tratar los trastornos autoinmunitarios se ilustra mejor en la tabla 3, que demuestra el drástico margen de especificidad que tiene IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ para la activación de los Treg frente a los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ (de >320 veces a >500 veces). En comparación, el margen de especificidad para los Treg frente a los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ es sustancialmente más bajo para IgG DP47GS-(IL-2)₂ (de 13 a 14 veces) e IgG DP47GS-IL-2 (de 10 a 16 veces).

Tabla 3. Valores de CE₅₀ y diferencias en las tasas de especificidad para la activación de pSTAT5a mediante IgG DP47GS-(IL-2E95A)₂, IgG DP47GS-IL-2 e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en diferentes subconjuntos de células.

Subconjunto de células humanas	DE ₅₀ (pM) de IgG-IL-2	DE ₅₀ (pM) de IgG-(IL-2) ₂	DE ₅₀ (pM) de IgG-(IL-2N88D) ₂
Treg de memoria	2,2	0,31	11,4
Treg indiferenciados	1,8	0,29	17,7
Linfocitos T efectores de memoria CD4 ⁺	29	4	>5700
Tasa de especificidad de:			
Treg de memoria frente a Tef de memoria CD4 ⁺	10	13	>500
Treg indiferenciados frente a Tef de memoria CD4 ⁺	16	14	>320

5

Efectos diferenciales de las proteínas de fusión de IL-2 sobre los linfocitos NK y los linfocitos T CD8⁺ humanos *in vitro*

Se cultivaron *in vitro* células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana recién obtenida sin otra estimulación distinta de IL-2, condiciones conocidas que favorecen la supervivencia y el crecimiento de los linfocitos NK y de los linfocitos T CD8⁺. Los linfocitos NK humanos se pueden subdividir en aquellos que expresan poco o ningún CD56 detectable (denominado CD56^{-débil}) y un subconjunto "activado" que expresa concentraciones altas de CD56 (denominado CD56^{fuerte}); la mayoría de los linfocitos NK en la sangre son CD56^{-débil} con una minoría clasificada como CD56^{fuerte}. Se cree que los linfocitos NK "activados" que son CD56^{fuerte} son precursores de los linfocitos NK a los que les falta la expresión de CD56 (es decir, CD56^{-débil}). Después de seis días *in vitro* con IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ (cada una a 0, 5, 50 y 500 ng/ml), se detectaron diferencias en el crecimiento y la supervivencia de los linfocitos NK CD56^{-débil}, los linfocitos NK CD56^{fuerte} y los linfocitos T CD8⁺. Se observaron diferencias significativas en los números de células entre los estímulos con IgG DP47GS-(IL-2)₂ que estimulaban los mayores incrementos de los linfocitos CD56^{fuerte} (una mediana de 101x10³ frente a 38x10³, p<0,005) (figura 16A) y también de los linfocitos T CD8⁺ (una mediana de 13,6x10³ células frente a 2,5x10³ células, p<0,0001) (figura 16B).

10

15

20

Efectos de las proteínas de fusión de IL-2 en ratones humanizados

Se construyeron ratones humanizados usando ratones NOD.*Prkdc*^{scid} *IL2rg*^{anulados} (NSG) recién nacidos ligeramente irradiados como huésped inmunodeficiente e injertándoles células madre CD34⁺ de hígado humano fetal inyectadas i.p. A las de 8 a 10 semanas de edad, se sometió a prueba la sangre de cada ratón para asegurar que se había producido el injerto humano. Comparando Proleukin e IgG DP47GS-(IL-2)₂, se descubrió que las células primarias afectadas *in vivo* eran los linfocitos NK y Treg; tras el tratamiento con IgG DP47GS-(IL-2)₂ hubo un incremento sustancial tanto en los linfocitos NK como en los Treg, respondiendo los linfocitos NK proporcionalmente mejor. Los efectos *in vivo* de Proleukin fueron similares, pero los efectos sobre los linfocitos NK y Treg en un grupo fueron menos consistentes y el grado de los incrementos se redujo en comparación con IgG DP47GS-(IL-2)₂. Los ratones humanizados también pudieron diferenciar los efectos *in vivo* de las proteínas de fusión de IL-2. IgG DP47GS-(IL-2)₂ natural incrementó tanto los Treg (figura 17A) como los linfocitos NK (figura 17B), mientras que IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ no tuvo ningún efecto sobre los linfocitos NK (figura 17B), pero incrementó los Treg a un grado significativamente mayor (figura 17A) que la IgG-(IL-2)₂ natural.

25

30

35

Una consecuencia a largo plazo de la humanización de los ratones NSG es su tiempo de supervivencia más corto debido a una respuesta del injerto contra huésped xenogénico humano que da como resultado una pérdida de peso y una insuficiencia multiorgánica. La administración de vehículo dos veces por semana no tuvo ningún efecto y dio como resultado una mediana de supervivencia de 36 días después del inicio del tratamiento (figura 18). De forma similar al vehículo, el tratamiento con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ dio como resultado una mediana de supervivencia de 37 días. En cambio, el tratamiento dos veces por semana con IgG DP47GS-(IL-2)₂ acortó la mediana del tiempo de supervivencia de este grupo a 21 días (figura 18, p<0,0037 en comparación con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂).

40

45

50

Cuando una gravedad predeterminada de la respuesta del injerto contra huésped dictó el final de la porción en vida para cada ratón (pérdida de peso ≥15 %), se evaluó la composición de células humanas en la sangre. Con una respuesta del injerto contra huésped potencialmente mortal a la vista, se observaron diferencias sorprendentes en las ramas de tratamiento en la composición final de los Treg, linfocitos NK y linfocitos T CD8⁺ en la sangre (figura 19). En los ratones tratados con vehículo, los Treg humanos representaron menos de un 1 % del total de células CD45⁺ humanas y los linfocitos NK y T CD8⁺ comprendieron ~3 % de las células CD45⁺ humanas en la sangre. El tratamiento con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ incrementó los linfocitos NK y T CD8⁺ a un 2 % y un 5 %, respectivamente, mientras que los Treg se incrementaron a un 6 %. En cambio, el tratamiento con IgG DP47GS-(IL-2)₂ natural incrementó la fracción de los linfocitos NK y los linfocitos T CD8⁺ a un 30 % del total de células CD45⁺ humanas y los Treg a un 3,5 %, quizás explicando la reducción significativa de los tiempos de supervivencia en este grupo en comparación con los ratones tratados con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂.

Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de células de sangre periférica de macaco cangrejero

Como se observó en la sangre periférica humana, existe una inducción de pSTAT5a dependiente de la dosis preferente y similar en los subconjuntos de Treg en la sangre periférica de macaco cangrejero estimulada con IL-2 (Proleukin) (datos no mostrados). En una comparación directa de la capacidad de IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2)₂ para inducir pSTAT5a en los tres subconjuntos de Treg, se requirió de 2 a 8 veces menos IgG DP47GS-(IL-2)₂ para alcanzar un 50 % de la concentración máxima de pSTAT5a que para IgG DP47GS-IL-2. La tabla 4 resume los valores de CE₅₀ para la activación de pSTAT5a mediante IgG DP47GS-IL-2 frente a IgG DP47GS-(IL-2)₂ en los diferentes subconjuntos de Treg de macaco cangrejero, resultados que son sorprendentemente similares a los observados con sangre periférica humana (tabla 3).

De forma similar a la sangre completa humana, se usaron marcadores intracelulares y de superficie de las células para identificar subconjuntos de linfocitos T reguladores y linfocitos T convencionales en la sangre completa de macacos cangrejeros sanos normales. Se obtuvieron muestras de sangre en el mismo día de tres macacos cangrejeros sanos en tubos con heparina de sodio y se añadieron diversas concentraciones de IgG DP47GS-IL-2 o IgG DP47GS-(IL-2)₂ a 500 µl de sangre y se incubaron a 37 °C. Después de 10 minutos a 37 °C, las muestras se lisaron y se fijaron con tampón BD Lyse/Fix calentado previamente (BD Biosciences). Después del lavado, las células se permeabilizaron con 1 ml de metanol durante 30 min en hielo. Las muestras se lavaron 3 veces y se tiñeron con un panel de FOXP3-Alexa Fluor[®] 647 (clon: 259D, BioLegend), CD4-V500 (clon: L200, BD Biosciences), CD45RA-V450 (clon: 5H9, BD Biosciences), CD25-PE (clon: 4E3, eBioscience), pSTAT5a-Alexa Fluor[®] 488 (clon: 47, BD Biosciences) y Ki-67-PerCP-Cy5.5 (clon: B56, BD Biosciences) durante 1 hora a 4 °C. Todas las muestras se adquirieron mediante un analizador de células LSRFortessa™ (Becton Dickinson) y, entonces, se analizaron con el programa informático FlowJo (FlowJo, LLC).

Tabla 4. Inducción de pSTAT5a en subconjuntos de Treg de sangre periférica de macaco cangrejero en respuesta a IgG DP47GS-IL-2 e IgG DP47GS-(IL-2)₂.

Linfocito T	IgG-IL-2	IgG-(IL-2) ₂	Tasa de cambio
Treg activados	0,07 ng/ml	0,02 ng/ml	4
Treg de memoria	0,21 ng/ml	0,025 ng/ml	8
Treg indiferenciados	0,04 ng/ml	0,02 ng/ml	2

En otro experimento, similar a los ensayos de pSTAT5a con sangre humana, se estimuló *in vitro* la sangre heparinizada recién obtenida de macacos cangrejeros adultos sanos normales con PBS como control con vehículo, IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ y se examinaron los efectos sobre la fosforilación de STAT5a en subconjuntos de Treg y linfocitos T efector de memoria CD4⁺ convencionales. Se eligió una dosis de estimulación de 20 ng/ml basada en las respuestas máximas de Treg humanos a ≤ 1 ng/ml y en las respuestas cuasimáximas de los linfocitos T efector de memoria CD4⁺ convencionales en ese intervalo de dosis (resultados en la figura 9).

Las condiciones experimentales fueron como se describe anteriormente. Se obtuvieron muestras de sangre en el mismo día de tres macacos cangrejeros sanos (donantes C1, C2, C3) en tubos con heparina de sodio y se añadieron 20 ng/ml de IgG DP47GS-(IL-2)₂ o IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ a 500 µl de sangre y se incubó a 37 °C durante 20 minutos antes de su lisis y análisis.

La estrategia de selección de la citometría de flujo para dividir Treg CD4⁺CD25⁺ de macaco cangrejero en subconjuntos indiferenciados (FOXP3⁺CD45RA⁺), de memoria (FOXP3⁺CD45RA⁻) y activados (FOXP3⁻CD45RA⁺) para su análisis se muestra en la figura 20A. Como en los seres humanos, los tres subconjuntos de Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ de cada donante expresaron concentraciones altas del receptor de IL-2 de afinidad alta CD25 (figura 20B). Después de la estimulación *in vitro* con 20 ng/ml tanto de IgG DP47GS-(IL-2)₂ como de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, los Treg de los tres donantes produjeron una fosforilación de STAT5a significativa (figura 20C). De forma similar a los humanos, los Treg activados y de memoria de macaco cangrejero mostraron un mayor potencial para la inducción de pSTAT5a en comparación con los Treg indiferenciados.

Los linfocitos T efector de memoria CD4⁺ convencionales humanos, aunque no sean tan sensibles como los Treg, se pueden estimular con IL-2 con una DE₉₀ estimada de 20 ng/ml para IgG DP47GS-(IL-2)₂ usando pSTAT5a como el biomarcador de activación (figura 14). Los linfocitos T efector de memoria CD4⁺ convencionales de macaco cangrejero se pueden identificar de forma similar en la sangre como células CD4⁺FOXP3⁻CD45RA⁻, siendo la mayoría de las células CD25⁻ y siendo un subconjunto más pequeño CD25⁺ (figura 21A). Cuando se tomaron como una población completa, los linfocitos Tef de memoria de macaco cangrejero de los tres donantes respondieron a 20 ng/ml de IgG DP47GS-(IL-2)₂ con incrementos de pSTAT5A mientras que 20 ng/ml de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ tuvieron poco (mc 2) o ningún efecto (mc 1 y 3) sobre pSTAT5a (figura 21B). Cuando los linfocitos Tef de memoria se subdividieron además en los subconjuntos CD25⁻ y CD25⁺, se descubrió que la respuesta a IgG DP47GS-(IL-2)₂

principalmente residía en el subconjunto CD25⁺ (figura 21D) con poca respuesta en el subconjunto CD25⁻ (figura 21C). En cambio, IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ no tuvo efecto sobre los linfocitos Tef de memoria CD25⁻ (figura 21C) y tuvo un 70-80 % menos de actividad estimuladora sobre el subconjunto CD25⁺ (figura 21D).

- 5 Los estudios adicionales en la sangre de macaco cangrejero normal recién obtenida compararon directamente concentraciones variables de IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ de una manera con respuesta a la dosis para determinar su capacidad para estimular pSTAT5a en diferentes subconjuntos de linfocitos T, es decir, los Treg activados, indiferenciados y de memoria y los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺. Tanto IgG DP47GS-(IL-2)₂ como IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ estimularon los Treg de una manera dependiente de la dosis con la proteína de fusión de IL-2 bivalente natural ~10 veces más potente que la proteína de fusión de IL-2N88D bivalente en cada uno de los subconjuntos de Treg (figura 22A-C). En cambio, se observó una drástica diferencia entre las dos moléculas cuando se evaluaron los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺ para determinar la inducción de pSTAT5a (figura 22D). Se presentó IgG DP47GS-(IL-2)₂ con una ~CE₅₀ a 300 ng/ml, mientras que IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ virtualmente no tuvo efecto a esa dosis alta. Los valores de CE₅₀ para la estimulación de pSTAT5a de macaco cangrejero se muestran en la tabla 5, así como las tasas de especificidad relativas para estimular los Treg frente a los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺. Estos resultados en la sangre completa de macaco cangrejero son bastante similares a los resultados que usan sangre completa humana (figura 14 y tabla 3) y sugieren que los estudios en el macaco cangrejero pueden tener un valor predictivo alto para los ensayos clínicos en seres humanos.
- 10
- 15
- 20 **Tabla 5. Valores de CE₅₀ y diferencias en las tasas de especificidad para la activación de pSTAT5a mediante IgG DP47GS-(IL-2)₂ e IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en subconjuntos de linfocitos T de macaco cangrejero.**

Treg de mc	IgG-(IL-2)₂ (ng/ml)	IgG-(IL-2 N88D)₂ (ng/ml)
Treg activados	0,1	0,7
Treg de memoria	0,1	1,1
Treg indiferenciados	0,06	0,8
Linfocitos T efectores de memoria CD4 ⁺	1,2	>1.000
<u>Tasa de especificidad de:</u>		
Treg act. frente a Tef de memoria CD4 ⁺	12	>1.400
Treg de mem. frente a Tef de memoria CD4 ⁺	12	>900
Treg indiferenciados frente a Tef de memoria CD4 ⁺	20	>1.200

Propiedades farmacocinéticas en ratones

- 25 Antes de realizar los estudios funcionales en ratones, se evaluaron las propiedades farmacocinéticas (PF) de los inmunoconjugados de IL-2 monovalentes y bivalentes naturales y con N88D en ratones NOD, NOD.scid y NOD.scid.II2r^α-/- (figura 23).

- 30 A ratones NOD y NOD.scid (n=3) se les inyectaron por vía intravenosa (i.v.) 0,3 mg/kg por ratón de IgG DP47GS-IL-2 o IgG DP47GS-(IL-2)₂ en PBS que contenía suero de ratón al 0,5 % y se les extrajo sangre en diversos tiempos después de la inyección, variando desde 2 minutos a 168 horas (figura 23A). La IL-2 humana se evaluó en las muestras de suero de ratón usando mAb anti-IL-2 humana de ratón (BD Pharmingen, n.º 555051, clon 5344.111) para recubrir placas de 96 pocillos a fin de capturar la IL-2. Entonces, se detectó IL-2 humana usando mAb biotinilado anti-IL-2 humana de ratón (BD Pharmingen, n.º 555040, clon B33-2). La unión a IL-2 se visualizó y cuantificó usando estreptavidina conjugada con europio. Durante las primeras 24 horas, IgG DP47GS-(IL-2)₂ se aclaró más rápidamente que IgG DP47GS-IL-2 tanto en ratones NOD como en NOD.scid. En 48 horas, las concentraciones en suero de cada uno estaban a concentraciones similares y todos estaban por debajo del límite de detección a las 72 horas. El límite de detección de IL-2 fue de 0,05 ng/ml y se indica mediante la línea de puntos. El aclaramiento sorprendentemente rápido de los inmunoconjugados IgG-IL-2 tanto monovalentes como bivalentes en ratones sin un sistema inmunitario adaptativo sugirió que existe un compartimento no hematopoyético con IL-2 o "sumidero" en ratones y podría estar promoviendo el aclaramiento rápido *in vivo* de los inmunoconjugados de IL-2.
- 35
- 40

- 45 Para someter a prueba esta hipótesis, se realizaron estudios PF en ratones NOD.scid que también carecían del receptor de IL-2 de afinidad alta, IL2R α (CD25), es decir, ratones NOD.scid.II2r^α-/- (figura 23B). En los ratones NOD.scid.II2r^α-/-, IgG DP47GS-(IL-2)₂, a pesar de que se administra a una dosis tres veces más alta (0,3 mg/kg), se aclaró más rápidamente durante las primeras 24 a 48 horas que 0,1 mg/kg de IgG DP47GS-IL-2 y 0,1 mg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. Sin embargo, después de 48 horas, las concentraciones en la sangre de cada conjugado presentaron una fase de eliminación lenta y constante con IL-2 fácilmente detectable en la sangre hasta 6 días. De forma interesante, en estos ratones carentes del receptor de IL-2 de afinidad alta, la molécula IgG DP47GS-(IL-
- 50

2N88D)₂ tuvo una fase de distribución inicial de 24 horas ligeramente más rápida que IgG-IL-2, pero luego presentó una fase de eliminación similar a la del inmunocombinado monovalente natural hasta seis días, la última vez que se sometieron a prueba. Estos datos para IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ son, en particular, pertinentes, puesto que los resultados PF en los ratones NOD.scid.II2ra^{-/-} parecen predecir estrechamente los resultados PF en primates no humanos.

Incremento de FOXP3 y CD25 en los Treg de ratón después del tratamiento con IL-2

Para comparar las capacidades de diferentes formas y configuraciones moleculares de IL-2 humana para estimular los Treg FoxP3⁺ *in vivo*, a los ratones se les inyectó por vía subcutánea un vehículo, Proleukin (IL-2 humana recombinante), IgG DP47GS-IL-2, IgG DP47GS-(IL-2)₂ o IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ y se evaluaron los Treg para determinar los cambios en la expresión de CD25 en la superficie de las células y FOXP3 intracelular en un tiempo óptimo determinado previamente de 24 horas (figura 24). A ratones BALB/c jóvenes y sanos (n=3/grupo de tratamiento, n=4/cohortes con vehículo) se les inyectó por vía subcutánea Proleukin (20.000 o 100.000 UI/ratón), IgG DP47GS-IL-2 (60, 300 o 1500 UI/ratón), IgG DP47GS-(IL-2)₂ (60, 300 o 1500 UI/ratón) o IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ (60, 300 o 1500 UI/ratón). Las dosis se administraron en un vehículo que comprendía 100 µl de PBS estéril, pH 7,2, que contenía un 0,5 % de suero de ratón filtrado de forma estéril. Después de 24 horas, se sacrificaron los ratones y se extirparon los bazo. Se generó una suspensión de células sueltas de esplenocitos en 1 ml de medio L-15 y se almacenó en hielo, hasta su procesamiento adicional. Se transfirió una alícuota filtrada de la suspensión de células sueltas, 40 µl, a tubos de FACS y se lavó con 2 ml de tampón de FACS (600 x g, 5 min). Entonces, las muestras se incubaron con anticuerpos conjugados con fluorocromo dirigidos frente a los antígenos de superficie celular: CD4 (clon RM4-5, fluorocromo A700), CD25 (eBio7D4, Af488), CD44 (IM7, e605), CD62L (MEL-14, PE), ICOS (C398.4A, PE/Cy7), CD103 (2E7, APC). La tinción se realizó durante 30 min a 4 °C en 100 µl de tampón de FACS (PBS pH 7,2 + BSA al 0,2 %). Tras la tinción de la superficie de las células, las muestras se lavaron con 4 ml de tampón de FACS (600 x g, 5 min) antes de la tinción intracelular (de acuerdo con el protocolo de tinción intracelular de eBioscience). En resumen, las muestras se resuspendieron en 200 µl de tampón de fijación/permeabilización (eBioscience n.º 00-5521) y se incubaron durante 1 h, 4 °C. Se añadió 1 ml de 1 x de tampón de permeabilización (eBioscience n.º 00-8333) a las muestras antes de 3 ml de tampón de FACS y lavado (600 x g, 5 min). Se tiñeron los antígenos intracelulares Ki-67 (B56, PerCP Cy5.5) y FOXP3 (FJK-16S, e450) en 100 µl 1x de tampón de permeabilización durante 1 h, 4 °C. Las muestras se lavaron con 4 ml de tampón de FACS (600 x g, 5 min, dos veces) y los datos se adquirieron en un analizador BD Fortessa™ y se analizaron usando el programa informático FlowJo (FlowJo, LLC). Los Treg se definieron como CD4⁺FOXP3⁺ de singletes en la selección de los linfocitos; a partir de esta población, se calcularon las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de CD25 y FOXP3 para todas las muestras.

Como se muestra en la figura 24, los tres inmunocombinados de IL-2 fueron igualmente potentes en la estimulación de la expresión de CD25 (24A) y FoxP3 (24B) en los Treg de ratón y mostraron respuestas dependientes de la dosis consistentes en el intervalo de 60, 300 y 1500 UI/dosis de ratón. En todos los casos, 1500 UI de cada inmunocombinado (barras en negro) fueron significativamente más eficaces que 100.000 UI de Proleukin (barras en negro). En la mayoría de los casos, 300 UI de los inmunocombinados (barras en gris oscuro) fueron equivalentes a 100.000 UI de Proleukin, y 60 UI de los inmunocombinados (barras en gris claro) fueron equivalentes a 20.000 UI de Proleukin (barras en gris claro). En todos los grupos de tratamiento, los datos se muestran como la media ± DE.

Propiedades farmacocinéticas en macacos cangrejeros

Antes de realizar estudios funcionales en primates no humanos, se evaluaron las propiedades farmacocinéticas (PF) de los inmunocombinados de IL-2 en macacos cangrejeros adultos sanos sin tratamiento previo con biofármaco (figura 25). A los monos (n=2/dosis) se les inyectó por vía intravenosa (i.v.) una corta inyección intravenosa rápida de IgG DP47GS-IL-2 o IgG DP47GS-(IL-2)₂ estéril en PBS que contenía suero de macaco cangrejero al 0,5 % y se les extrajo sangre en diversos tiempos después de la inyección, variando desde 30 minutos a 72 horas. La IL-2 humana se evaluó en las muestras de suero de macaco cangrejero usando mAb anti-IL-2 humana de ratón (BD Pharmingen, n.º de catálogo 555051, clon 5344.111) para recubrir placas de 96 pocillos a fin de capturar la IL-2 humana. Entonces, se detectó IL-2 humana usando mAb biotinilado anti-IL-2 humana de ratón (BD Pharmingen, n.º de catálogo 555040, clon B33-2). La unión a IL-2 se visualizó y cuantificó usando estreptavidina conjugada con europio. La concentración de detección usando suero de macaco cangrejero en el ensayo fue de 0,05 ng/ml de IL-2 (línea de puntos en las figuras). El suero de macaco cangrejero tomado antes del tratamiento no tenía ninguna IL-2 detectable (por lo tanto, < 0,05 ng/ml).

Se detectó IL-2 en suero de macaco cangrejero desde 30 minutos a 48 horas después de la inyección i.v. de todas las dosis de IgG DP47GS-IL-2 (figura 25A) e IgG DP47GS-(IL-2)₂ (figura 25B). En 72 horas, las concentraciones en suero de IL-2 estaban por debajo del límite de detección (0,05 ng/ml, línea de puntos) para todos los animales tratados con 10 y 25 µg/kg de IgG DP47GS-IL-2 o IgG DP47GS-(IL-2)₂. Después de las dosis de 100 µg/kg de IgG DP47GS-IL-2, la IL-2 en suero detectable todavía estaba presente a las 72 horas.

Inducción del número de Treg en macacos cangrejeros

Los animales macacos cangrejeros tratados *in vivo* con IgG DP47GS-IL-2 tuvieron incrementos dependientes de la

5 dosis en el número absoluto de Treg, así como la tasa de incremento por encima del valor de referencia 7 días
 10 posteriores a la dosificación (figura 26A y 26B, respectivamente). En todas las pruebas se usaron macacos
 15 cangrejeros sanos normales de ambos sexos en edades que variaban desde los 3 a los 6 años y no se usó ningún
 20 animal más de una vez. Durante la anestesia, se inyectaron s.c. diversas dosis de IgG DP47GS-IL-2 (n=4-6) o
 25 vehículo (n=3) en el costado lateral. Las dosis individuales de IgG DP47GS-IL-2 se basaron en el peso corporal y se
 formularon para su inyección en un vehículo de PBS estéril, pH 7,2, que contenía suero de macaco cangrejero
 normal estéril al 0,5 %. Se obtuvieron muestras de sangre en diversos tiempos posteriores al tratamiento y se
 sometieron a prueba para determinar los cambios hematológicos (hemograma y diferencial) con un analizador
 automático para hematología Advia, así como los marcadores intracelulares y de superficie de las células detallados
 anteriormente (procedimientos experimentales para la tabla 4). Los cambios en los linfocitos T reguladores
 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ en la sangre completa en el día 7 posterior al tratamiento se muestran en la figura 26 como el
 número de células absoluto por mm³ de sangre completa (figura 26A) y la tasa de cambio en los Treg (figura 26B);
 todos los datos se representan como la media ± DE. En las dosis más altas de 25 µg/kg y 36 µg/kg de IgG DP47GS-
 IL-2, se observaron incrementos en los Treg promedio de prácticamente 3 veces (intervalo de 111-255 %, n=6) y 4
 veces (intervalo de 110-470 %, n=6), respectivamente. La reducción adicional de la dosis s.c. de IgG DP47GS-IL-2
 (12, 6 y 2 µg/kg) continuó produciendo cambios reducidos de forma correspondiente en el número de Treg y en la
 tasa de cambio. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, el incremento ~2 veces en los Treg (que varía desde un
 67-133 %, n=6) con la dosis de 12 µg/kg de IgG DP47GS-IL2 puede representar el incremento deseable en los Treg
 para algunas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Existe un gran intervalo en los números de Treg en los
 seres humanos (20-90 Treg por mm³ de sangre; de un 4 a un 10 % de linfocitos T CD4⁺) y es razonable suponer que
 un incremento de los Treg inducidos por IL-2 en un individuo dará como resultado un incremento general de la
 supresión funcional.

25 Cuando se evaluaron las dosis más bajas de IgG DP47GS-IL-2 (2-6 µg/kg), se obtuvieron muestras de sangre más
 frecuentes para identificar los tiempos óptimos para detectar los cambios en los Treg posteriores a la administración
 de IgG DP47GS-IL-2 (figura 27). Mientras que estuvieron presentes cambios en los Treg a los 7 días, la estimulación
 máxima se produjo en el día 4, antes de lo que se midió con las dosis más altas de IgG DP47GS-IL-2 (día 7, figura
 26).

30 Proleukin e IgG DP47GS-IL-2 son comparables *in vitro* en ensayos de sangre completa humana y de macaco
 cangrejero al comparar directamente mediante las unidades de actividad de IL-2 usadas para estimular pSTAT5a en
 los Treg y otras células reactivas a IL-2 (datos no mostrados). Con la corta semivida conocida de Proleukin en los
 seres humanos, se realizó un estudio de dosis única en macacos cangrejeros para evaluar *in vivo* la inducción y
 activación de Treg. Proleukin produjo un cambio dependiente de la dosis y del tiempo en los Treg medido mediante
 35 la tasa de cambio en los números absolutos, así como en la activación de pSTAT5a. Mientras que el incremento en
 los números de Treg fue nominal (figura 28A: un 10-40 %), el incremento inducido por Proleukin[®] en pSTAT5a en los
 Treg fue sustancial y dependiente de la dosis un día después del tratamiento (figura 28B), pero de corta duración *in*
vivo, regresando a la normalidad del día 2 al 3.

40 En la figura 29 se muestra una comparación de la capacidad de IgG DP47GS-IL-2 para inducir un incremento en los
 Treg *in vivo* en macacos cangrejeros con la de Proleukin. Se trataron macacos cangrejeros sanos normales (grupos
 de n=5) con dosis bajas de IgG DP47GS-IL-2 o dosis altas de Proleukin y se sometió a prueba el cambio en los
 linfocitos T reguladores el día 10. En los días 0 y 7, se administró s.c. IgG DP47-IL-2 a una dosis de 16.800 UI/kg (la
 dosis de 12 µg/kg mostrada en la figura 26). En base al trabajo publicado donde se administró Proleukin a pacientes
 45 con diabetes de tipo 1 (4,5x10⁶ UI/persona, 3 veces/semana), que demostró que incrementaba los Treg, y los datos
 de dosis única en la figura 28, se administró s.c. Proleukin 3 veces por semana (L/M/V) en un total de 5 dosis cada
 una a 200.000 UI/kg (el equivalente para macaco cangrejero de 4,5x10⁶ UI/persona). Los resultados se muestran en
 la figura 29 como la media ± DE para el cambio en los Treg totales por mm³ de sangre (figura 29A), la tasa de
 incremento en el número de Treg (figura 29B) y el cambio en la proporción de Treg con respecto a las células CD4⁺
 50 FOXP3⁻ convencionales (figura 29C).

Aunque se administró IgG DP47GS-IL-2 prácticamente 30 veces menos durante el periodo de 10 días, IgG
 DP47GS-IL-2 indujo un incremento más grande en el número de Treg que Proleukin (figura 29A, p=0,06). La tasa de
 incremento de los números de Treg por encima del valor de referencia (figura 29B) y el incremento de los Treg en
 55 relación con los linfocitos T CD4 convencionales (figura 29C) también fueron más grandes (p=0,0011 y p=0,016,
 respectivamente) en los monos a los que se les dosificó IgG DP47GS-IL-2 en comparación con Proleukin. En los
 seres humanos, se usa a menudo la proporción de linfocitos T reguladores CD4⁺ (normalmente definidos como
 FOXP3⁺ y una combinación de marcadores de superficie) con respecto a los linfocitos T CD4 no reguladores
 (denominados células convencionales o efectoras) para definir las concentraciones funcionales de Treg en los
 60 pacientes a través del tiempo.

Respuesta *in vivo* de subconjuntos de células de sangre periférica de macaco cangrejero al tratamiento con IgG DP47GS-IL-2 en dosis baja

65 La especificidad celular *in vivo* del tratamiento con IL-2 en dosis baja es un parámetro crítico. Se ha determinado que
 se puede supervisar con sensibilidad la activación de las células *in vivo* inducida por IgG DP47GS-IL-2 o Proleukin

midiendo las concentraciones de pSTAT5a *ex vivo* en la sangre extraída en diversos tiempos después de su dosificación en macacos cangrejeros o ratones. La respuesta *in vivo* de todas las poblaciones de células que se pueden supervisar *in vitro* (figuras 8-10) también se puede examinar *ex vivo*.

5 Uno y 3 días después de la administración *in vivo* de una dosis baja única de IgG DP47GS-IL-2 (12 µg/kg) a macacos cangrejeros sanos (n=5), se obtuvo sangre completa y se sometió a prueba para determinar la fosforilación de STAT5a como se describe anteriormente (procedimientos experimentales con respecto a la tabla 4). Se extrajo sangre de cada mono en el día 0 antes del tratamiento y se midió la cantidad de fosforilación de STAT5a y se usó individualmente para evaluar las tasas de cambio posteriores al tratamiento. La tasa de cambio en pSTAT5a en los Treg en los días 1 y 3 se muestra en la figura 30A, la tasa de cambio en pSTAT5a en los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺CD45RA⁻ convencionales en la figura 30B y la tasa de cambio en pSTAT5a en los linfocitos T efectores indiferenciados CD4⁺CD45RA⁺ convencionales están en la figura 30C. Los resultados muestran claramente que la sangre de macaco cangrejero obtenida uno y tres días después de una dosis baja única (12 µg/kg) de IgG DP47GS-IL-2 mostró incrementos de pSTAT5a preferentes en los linfocitos Treg en comparación con los linfocitos T CD4⁺ de memoria e indiferenciados (figura 30A-C). IgG DP47GS-IL-2 en dosis baja única fue claramente superior a Proleukin en dosis alta única (figura 28B) en la producción de un estado de activación de Treg mantenido *in vivo*.

Los estudios iniciales que usaron la fosforilación de STAT5a como un biomarcador *in vivo* de la activación de los Treg experimentaron un pSTAT5a máximo solo el día 1 con Proleukin en dosis única (figura 28B) y 1 y 3 días con IgG DP47GS-IL-2 en dosis baja (12 µg/kg) (figura 30A). La valoración adicional de IgG DP47GS-IL-2 combinada con tiempos de muestreo adicionales mostró que las señales de pSTAT5a *in vivo* se podrían mantener durante 4 días antes de reducirse a la normalidad a los 7 días (figuras 31A, 31B). La IMF (intensidad media de fluorescencia) de las señales de pSTAT5a, tanto para la dosis de 2 µg/kg (31A, n=4) como de 6 µg/kg (31B, n=6), sugirió que se producía una señalización de pSTAT5a más baja que la máxima (véase la figura 33B). Incluso estas dosis muy bajas de IgG DP47GS-IL-2 proporcionaron una señalización de Treg mantenida *in vivo* y fueron superiores a Proleukin (figura 28B). Estos resultados respaldan la hipótesis de que concentraciones muy bajas de IL-2 de larga duración, es decir, IgG DP47GS-IL-2, pero no Proleukin, pueden estimular los Treg durante periodos prolongados de tiempo *in vivo*, reduciendo, de este modo, la frecuencia de tratamiento necesaria para restablecer la autotolerancia dominante y mejorar la evolución de la enfermedad. El incremento en los linfocitos Treg en la sangre periférica después del tratamiento con IL-2 en dosis baja podría reflejar un cambio en la distribución de las células en el cuerpo en lugar de un incremento real de las células. Para justificar que los incrementos en los Treg *in vivo* se deben, al menos en parte, a la inducción de la división de las células mediante el tratamiento con IL-2, se evaluó el marcador de proliferación intracelular Ki-67. Ki-67 es una proteína que se puede detectar en el núcleo durante G₁, S, G₂ y mitosis, pero está ausente en las células en reposo que están en la fase G₀ del ciclo celular. También se supervisaron los macacos cangrejeros tratados con 2 y 6 µg/kg de IgG DP47GS-IL-2 descritos anteriormente (figura 31) para determinar cambios *ex vivo* en el marcador intracelular Ki-67 como se describe (procedimientos experimentales con respecto a la tabla 4) para evaluar el grado de proliferación *in vivo*. Se comparó el porcentaje de células que estaban en el ciclo celular (Ki-67⁺) en el día 0 con el porcentaje de células Ki-67⁺ a los 1 a 11 días posteriores al tratamiento. Los Treg Ki-67⁺ se muestran en la figura 32A, los linfocitos T efectores de memoria CD4⁺CDRA45⁻ convencionales se muestran en la figura 32B y los linfocitos T efectores de indiferenciados CD4⁺CD45RA⁺ convencionales se muestran en la figura 32C. Las células sanguíneas de macaco cangrejero obtenidas de uno a siete días después de una dosis baja única de IgG DP47GS-IL-2 (6 µg/kg) mostraron incrementos de Ki-67 preferentes en los Treg en comparación con los linfocitos T efectores indiferenciados CD4⁺ convencionales (figura 32A frente a 32C). A diferencia de los linfocitos T efectores indiferenciados, IgG DP47GS-IL-2 (6 µg/kg) pudo estimular la proliferación de linfocitos T efectores CD4⁺ de memoria convencionales (figura 32B). En la dosis más baja de IgG DP47GS-IL-2 (2 µg/kg), hubo una activación mínima en el ciclo celular y una proliferación en comparación con la dosis de 6 µg/kg.

En los ensayos de sangre completa humana y de macaco cangrejero la actividad *in vitro* de IgG DP47GS-(IL-2)₂ bivalente fue, en conjunto, aproximadamente 6 veces más potente en los Treg que con IgG DP47GS-IL-2 monovalente (tablas 2 y 4). De ahí que la primera dosis en los macacos cangrejeros fuera 6 veces más baja que la dosis más alta de IgG DP47GS-IL-2 sometida a prueba (36 µg/kg). IgG DP47GS-(IL-2)₂ administrada a 6 µg/kg (n=4) produjo grandes incrementos en los Treg en circulación (figura 33A) que permanecieron muy por encima de la normalidad 14 días después del tratamiento, pSTAT5a significativo y prolongado en los Treg que regresaron a la normalidad en 1 semana (figura 33B) y prácticamente un incremento de 3 veces en el número de Treg (figura 33C). Las tasas de cambio inducidas mediante IgG DP47GS-IL-2 (de la figura 26, barras abiertas) se compararon con la dosis de 6 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2)₂ bivalente (barras sombreadas) (figura 33D). De forma similar a los ensayos de sangre completa humana y de macaco cangrejero, IgG DP47GS-(IL-2)₂ presentó una potencia *in vivo* potenciada más allá de su incremento de 2 veces en IL-2 por molécula de IgG.

Se administraron dosis adicionales de IgG DP47GS-(IL-2)₂ bivalente a macacos cangrejeros para evaluar sus efectos *in vivo* a dosis muy bajas (2 y 0,7 µg/kg) (figura 34). Mientras que 2 µg/kg produjeron tasas de cambio moderadas (media de un 46 %, variando desde un 20 a un 70 %, n=8), la dosis de 0,7 µg/kg tuvo poco efecto sobre los números de linfocitos T (media de incremento de un 16 %, n=3) (figura 34A). Ambas dosis bajas estimularon incrementos de pSTAT5a en los Treg (figura 34B, n=3 cada uno), mientras que tuvieron poco efecto sobre pSTAT5a en linfocitos Tef/de mem. (figura 34C, n=3 cada uno).

Los efectos generales del tratamiento con la proteína de fusión de IL-2 natural monovalente y bivalente y su capacidad para incrementar los Treg en macacos cangrejeros se presentan en la figura 35. Ambas formas de IgG-IL-2 de larga duración son potentes inductores de los Treg que se pueden seguir *in vivo* con pSTAT5a como biomarcador de activación y en esta figura como la tasa de incremento en los números de Treg en circulación. IgG DP47GS-(IL-2)₂ con su potencia potenciada lograda duplicando las moléculas de IL-2 en el extremo C de la IgG tiene una superioridad dependiente de la dosis sobre IgG DP47GS-IL-2.

Desmetilación del ADN de FOXP3 y CTLA-4 en subconjuntos de linfocitos T de macaco cangrejero

Los Treg funcionalmente activos pueden producir las citocinas inmunodepresoras CTLA-4, IL-10 y TGFβ y requieren la expresión estable del factor de transcripción FOXP3. La expresión de FOXP3 en los Treg humanos y de macaco cangrejero depende de la desmetilación de los diez sitios de metilación en el ADN con CpG en la región desmetilada específica de Treg (TSDR) en el locus de FOXP3. Asimismo, la expresión y producción de CTLA-4 depende de la desmetilación de los siete sitios de metilación en el ADN con CpG en el locus de CTLA-4 humano y de macaco cangrejero. En consecuencia, se evaluó el estado de desmetilación tanto de FOXP3 como de CTLA-4 en diversos subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ antes y después del tratamiento con IgG DP47GS-IL-2 (n=4, 25 μg/kg s.c.) e IgG DP47GS-(IL-2)₂ (n=4, 6 μg/kg s.c.) administradas a dosis y tiempos mostrados previamente para incrementar significativamente el número de Treg en la sangre. En el estudio, solo se usaron macacos cangrejeros adultos macho sin tratamiento previo con biofármaco y sus pesos variaban desde 9,1 a 10,9 kg. Se administraron los tratamientos 3 semanas después de la obtención de sangre en el valor de referencia inicial y se obtuvo sangre posterior al tratamiento 4-5 días más tarde. Se clasificaron PBMC de 30 ml de sangre heparinizada usando un FACS Aria™ (Becton Dickinson) en los subconjuntos CD4⁺ pertinentes incluyendo los Treg (CD4⁺CD25⁺CD127^{baja}), los linfocitos T efectores de memoria (CD4⁺CD45RA⁻), los linfocitos T efectores indiferenciados (CD4⁺CD45RA⁺) y las células CD4⁺CD25⁺CD127⁻.

Se congelaron los subconjuntos de células clasificados en alícuotas de 100.000 células y se almacenaron como sedimentos secos a -80 °C para permitir el procesamiento de todas las muestras juntas. Los sedimentos celulares se descongelaron y el ADN se extrajo y se trató con bisulfito en una etapa única usando el kit Epitect Fast Lyse All (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron 5 ng (en 2 μl) de ADN tratado con bisulfito en una primera tanda de PCR doble de 20 μl que contenía 10 μl del kit Multiplex PCR (Qiagen), 6 μl de agua, 0,5 μl del cebador directo de FOXP3 tgtaaacgacggccagtTTTAGAAGTTGTATGGGGGATGTT (SEQ ID NO: 54), 0,5 μl del cebador inverso de FOXP3 caggaaacagctatgaccAAAATATCTACCCTCTTCTCTTCCTC (SEQ ID NO: 55), 0,5 μl del cebador directo de CTLA-4 tgtaaacgacggccagtGGGTTTGGTTATGAAGGAGTATGA (SEQ ID NO: 56) y 0,5 μl del cebador inverso de CTLA-4 caggaaacagctatgaccTTCACCTAATTTCCACTAAAAATACCC (SEQ ID NO: 57). El ciclo de la primera tanda de PCR fue 95 °C durante 15 minutos, seguido de 20 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 90 segundos y 72 °C durante 60 segundos, seguido de 10 minutos a 72 °C. El producto de PCR se purificó usando microesferas de AMPure XP (Becton Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se eluyó en 20 μl de agua. Se realizó una segunda tanda de PCR que añadió una secuencia índice única al comienzo de cada muestra, a través de una PCR de 15 μl que contenía 7,5 μl del kit Multiplex PCR (Qiagen), 6,5 μl del producto de PCR de la primera tanda y 1 μl de cebador índice. Las condiciones de ciclo de la segunda tanda de PCR fueron 95 °C durante 15 minutos seguido de 7 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 90 segundos y 72 °C durante 60 segundos, seguido de 5 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron usando microesferas de AMPure XP y se eluyeron en 15 μl de agua, y se usaron 4 μl para cuantificar la cantidad de producto de PCR usando un Shimadzu MultiNA. Se agrupó una concentración molar equivalente de cada muestra para crear la colección de secuenciación que se cuantificó usando el kit de cuantificación de colecciones de Kapa Illumina. La colección se secuenció usando un Illumina MiSeq con reactivos v3 y secuenciación de ambos extremos de 2 x 300 pb. Los datos secuenciados se desmultiplexaron usando un archivo de instrucciones de Python hecho a medida y se usó el programa Cutadapt para retirar los adaptadores de secuenciación. Se combinaron las lecturas inversas y directas usando FLASH y se extrajo la secuencia de cada sitio de metilación.

El tratamiento de los macacos cangrejeros tanto con IgG DP47GS-IL-2 como con IgG DP47GS-(IL-2)₂ indujo números sustancialmente incrementados de los Treg en la sangre en todos los animales tratados, similar a lo que se observó antes usando el mismo protocolo de tratamiento (figuras 33 y 35). Es importante destacar que el incremento rápido y drástico en los Treg tras el tratamiento con tanto IgG DP47GS-IL-2 como con IgG DP47GS-(IL-2)₂ no afectó de manera adversa ni redujo el estado de desmetilación de FOXP3 (figura 36, panel superior) o CTLA-4 (figura 36, panel inferior). Se observaron resultados similares para ambas moléculas y los datos con IgG DP47GS-(IL-2)₂ se muestran en la figura 36. El hecho de que el estado de desmetilación tanto de FOXP3 como de CTLA-4 no se viera afectado y no se redujera mediante el tratamiento indica que todos los Treg mantuvieron su fenotipo inmunodepresor funcional maduro natural a pesar de los incrementos sustanciales en los números absolutos. Estos resultados de desmetilación de Treg FOXP3 y CTLA-4 en primates no humanos sugieren que el tratamiento con dosis bajas de moléculas similares a IgG-(IL-2)₂ de larga duración en el hombre debe poder incrementar los números de Treg maduros completamente funcionales que, a su vez, corregirá los desequilibrios inmunorreguladores presentes en las enfermedades autoinmunitarias humanas, así como otras enfermedades inflamatorias crónicas mediadas por el sistema inmunitario.

Farmacocinética de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en macacos cangrejeros

Se evaluaron las propiedades PF de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en macacos cangrejeros sin tratamiento previo con biofármaco (figura 37). A los monos (n=2/dosis) se les inyectaron por vía intravenosa (i.v.) y por vía subcutánea (s.c.) 30 o 100 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ estéril en PBS que contenía suero de macaco cangrejero al 0,5 % y se les extrajo sangre en diversos tiempos después de la inyección, variando desde 30 minutos a los 14 días. Se evaluó IL-2 humana en las muestras de plasma de macaco cangrejero como se describe previamente. La concentración de detección usando plasma de macaco cangrejero en el ensayo fue de 0,05 ng/ml de IL-2. El plasma de macaco cangrejero tomado antes del tratamiento no tenía ninguna IL-2 detectable (por lo tanto, < 0,05 ng/ml).

A diferencia de la PFFC de las proteínas de fusión naturales (figura 25) donde las concentraciones en sangre solo se podían detectar hasta de las 48 a las 72 horas, se detectó IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en el plasma de macaco cangrejero de todos los animales en todos los puntos temporales hasta 14 días con las vías de administración i.v. (figura 37A) y s.c. (figura 37B). Las concentraciones en plasma fueron proporcionales a la dosis durante los primeros dos a tres días y presentaron una semivida prolongada en comparación con las moléculas de fusión de IL-2 natural.

Como biomarcador de la exposición a IL-2 *in vivo*, se midieron las concentraciones en plasma de CD25 soluble (sCD25, IL-2RA) (figura 37C). Se usaron reactivos de anticuerpos monoclonales para sCD25 humanos conocidos por reaccionar de forma cruzada con sCD25 de macaco cangrejero en un inmunoensayo de tipo sándwich usando anticuerpos de captura (MAB623, R&D Systems) y de detección biotinilados (BAF223, R&D Systems) usando estreptavidina conjugada con Eu⁺⁺ para detectar el sCD25 unido. Los incrementos de sCD25 después de la administración de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ fueron dependientes de la dosis y estuvieron presentes entre 1 a 7 días, regresando a las concentraciones normales en el día 8.

La inducción de Treg en macacos cangrejeros con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂

Las pruebas descritas previamente en macacos cangrejeros tratados *in vivo* con IgG DP47GS-IL-2 natural e IgG DP47GS-(IL-2)₂ presentaron incrementos dependientes de la dosis de 2 a 4 veces en el número absoluto de Treg (figura 26 y 33, respectivamente) que reflejaban sus actividades *in vitro* en los análisis de sangre completa humana, es decir, diferencias *in vitro* de 6 a 9 veces (tablas 2 y 3). Con su pérdida de potencia *in vitro* en la sangre completa humana (tabla 3), se eligieron dosis *in vivo* de 30 y 100 µg/kg para IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂. De forma similar a las pruebas previas, se inyectó IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ mediante una vía i.v. o s.c. con dosis individuales basadas en el peso corporal y se formuló para su inyección en un vehículo de PBS estéril, pH 7,2, que contenía suero de macaco cangrejero normal estéril al 0,5 % (n=2 por dosis y vía de inyección). Se obtuvieron muestras de sangre antes del tratamiento (días 4 y 5), inmediatamente antes del tratamiento (día 0) y en diversos tiempos posteriores al tratamiento (días 1-14) y se sometieron a prueba para determinar los cambios hematológicos (hemograma y diferencial), así como los marcadores intracelulares y de superficie de las células descritos previamente.

Los incrementos en los Treg CD4⁺ totales, Treg de memoria CD4⁺, Treg indiferenciados CD4⁺ y Treg CD8⁺ FOXP3⁺ se muestran como respuestas dependientes del tiempo como el número absoluto de células/ml de sangre (figura 38A y 38B) o bien como el % de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ totales (figura 38C y 38D).

Los Treg CD4⁺ totales se incrementaron en número después de 100 µg/kg de 90.000/ml a 810.000/ml (9 veces) y desde un 4,2 % a un 26 % de los linfocitos T CD4⁺ totales (6,2 veces) y todavía estaban elevados a los 14 días. A 30 µg/kg, los Treg CD4⁺ totales se incrementaron desde 62.000/ml a 447.000/ml (7,2 veces) y desde un 4,5 % a un 16,7 % de las células CD4⁺ totales (3,7 veces).

Los Treg de memoria se incrementaron en número a 100 µg/kg desde 42.000/ml a 536.000/ml (12,8 veces) y desde un 2 % a un 17,4 % de los linfocitos T CD4⁺ totales (8,7 veces). A 30 µg/kg, los Treg de memoria se incrementaron desde 51.000/ml a 280.000/ml (5,5 veces) y desde un 2,3 % a un 10,5 % de los linfocitos T CD4⁺ totales (4,6 veces).

Los Treg indiferenciados se incrementaron en número a 100 µg/kg desde 35.000/ml a 272.000/ml (7,8 veces) y desde un 2 % a un 8,6 % de los linfocitos T CD4⁺ totales (4,3 veces). A 30 µg/kg, los Treg indiferenciados se incrementaron desde 46.000/ml a 166.000/ml (3,6 veces) y desde un 2,2 % a un 6,2 % de los linfocitos T CD4⁺ totales (2,8 veces).

Después de la administración de 100 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, los Treg CD8⁺FOXP3⁺ se incrementaron de un tipo de células escaso a 16.000/ml a 183.000/ml (11,4 veces) y desde un 0,7 % a un 7,8 % de los linfocitos T CD8⁺ totales (11,1 veces). A la dosis de 30 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, los Treg CD8⁺ totales se incrementaron desde 17.000/ml a 101.000/ml (5,9 veces) y desde un 0,5 % a un 4,3 % de los linfocitos T CD8⁺ totales (8,6 veces). No existió ningún incremento relacionado con el tratamiento en los linfocitos Tef de memoria CD4⁺ después de 100 µg/kg o 30 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ (figura 39A); de hecho, los porcentajes disminuyeron en el día 4 probablemente debido al gran incremento en los Treg CD4⁺ en ese momento. Los linfocitos Tef de memoria CD4⁺CD25^a se mantuvieron sin cambios después de 30 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, pero se elevaron 1,6 veces en el día 4 con un regreso al valor de referencia a los 7-10 días (figura 39B).

Inducción de pSTAT5a, CD25 y Ki-67 en macacos cangrejeros con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂

Como se describe anteriormente, la especificidad celular *in vivo* del tratamiento con IL-2 es un parámetro crítico y se demuestra que la activación de los subconjuntos de células *in vivo* se podría supervisar midiendo pSTAT5a *ex vivo*, CD25 en la superficie de las células y Ki-67 intracelular en la sangre tomada en diversos tiempos después de la dosificación.

Los resultados en la figura 40A y 40B muestran la inducción de pSTAT5a preferente y las respuestas de señalización de pSTAT5a prolongado de los Treg CD4⁺ y CD8⁺ tras el tratamiento con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂; las respuestas máximas se mantuvieron desde el día 1 al día 4 tanto en 100 µg/kg como en 30 µg/kg, regresando al valor de referencia a los 7 días. Los Tef de memoria CD4⁺CD25^a respondieron con respuestas ~semimáximas en el día 1 y regresaron a la normalidad en el día 4. Todos los demás tipos de células sometidos a prueba mostraron poca o ninguna inducción de pSTAT5a después del tratamiento.

Un incremento de CD25 en la superficie de las células es una consecuencia de la activación de IL-2 y es un biomarcador sensible de la activación *in vivo*. Poco después del tratamiento tanto con 100 µg/kg como con 30 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂, se incrementó preferentemente CD25 en los Treg de memoria e indiferenciados CD4⁺, así como en los Treg CD8⁺ FOXP3⁺ (figura 41A, 41B). Las respuestas de CD25 de los Treg de memoria e indiferenciados CD4⁺ alcanzaron su punto máximo en el día 4 y regresaron al valor de referencia en 7 días, mientras que las elevaciones de CD25 en los Treg CD8⁺ FOXP3⁺ se mantuvieron a través de los 10-14 días.

En las pruebas con proteínas de fusión de IL-2 natural, se demostró que Ki-67 era un marcador intracelular sensible para las células que habían comenzado a proliferar *in vivo* y era un biomarcador sensible para la activación inducida por IL-2 en macacos cangrejeros. Las respuestas a 100 µg/kg de IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ mostraron que un 80-90 % de los Treg CD4⁺ y CD8⁺ se convirtieron en Ki-67⁺ (figura 42A) mientras que un 60-90 % se convirtieron en Ki-67⁺ después de 30 µg/kg (figura 42B). Como se muestra, los demás subconjuntos de células sometidos a prueba fueron menos reactivos en comparación con los Treg.

Para capturar los penúltimos efectos *in vivo* de los números de Treg en incremento con las moléculas de IL-2 genomanipuladas novedosas, se convirtieron todas las dosis de macaco cangrejero a pmol/kg, lo que permitió las comparaciones directas independientemente del peso molecular; se compararon directamente las respuestas dependientes de la dosis como los incrementos máximos en los Treg CD4⁺ como el % de linfocitos T CD4⁺ totales (figura 43). A pesar de su pérdida de potencia *in vitro* en comparación con las proteínas de fusión naturales, IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ indujo incrementos inesperadamente grandes en los Treg de macaco cangrejero, quizás en parte debido a su incremento de la exposición sistémica tras la administración tanto i.v. como s.c.

Eosinofilia como consecuencia de la administración de IL-2 *in vivo*

Proleukin en humanos estimula una eosinofilia cuando se administra diariamente en dosis de 1x10⁶ a 4,5x10⁶ UI/persona. En macacos cangrejeros se observaron incrementos similares en los eosinófilos en un 100 % de los animales después de un tratamiento repetido con Proleukin en dosis alta o dosis únicas de 226 pmol/kg de IgG DP47GS-IL-2 (figura 44). Los resultados en la figura 44 representan todos los animales sometidos a prueba (se tomaron valores de referencia de las colonias para los animales antes de las pruebas: n=44 y n=30) y para los diversos grupos de tratamiento con IL-2 (n=5-9) independientemente de si los números de eosinófilos eran normales o elevados. Sorprendente, a diferencia de los efectos de Proleukin e IgG DP47GS-IL-2, fue la virtual falta de efecto sobre los eosinófilos con IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ en dosis *in vivo* de 170 y 570 pmol/kg (30 y 100 µg/kg, respectivamente). Esta falta de inducción de una eosinofilia sistémica por IgG DP47GS-(IL-2N88D)₂ es sorprendente a la luz del grado de expansión de los Treg inducida por estos diferentes tratamientos (en comparación con la figura 43).

El tratamiento *in vivo* con IgG DP47GS-IL-2 suprime las respuestas inmunitarias en ratones

En estudios preliminares, se observó que una dosis de 4000 UI de IgG DP47GS-IL-2 activó los linfocitos T reguladores FOXP3⁺ de ratón *in vivo*; entonces, se usó esta dosis para evaluar su capacidad para suprimir las clásicas respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T en ratones, es decir, hipersensibilidad de tipo retardado (figura 45) y una respuesta de IgG anti-KLH (figura 46).

Se inmunizaron i.v. ratones NOD y ratones C57BL/6 (n=7) con eritrocitos de carnero (srbc) y se expusieron 3 días más tarde a una inyección intravenosa rápida de srbc en una pata trasera única para inducir una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). Un día después de la exposición, se sacrificaron los ratones con CO₂ y se extirparon y pesaron las patas. La magnitud de la respuesta de DTH se muestra como el cambio en el peso de la pata en comparación con los ratones no inmunizados (Δ peso de la pata). Se administró s.c. IgG DP47GS-IL-2 a 4000 UI por ratón 3 días antes y en el día de la inmunización con srbc y el vehículo era PBS estéril, pH 7,2. La significación estadística derivó de la prueba de Mann Whitney en GraphPad Prism.

La dosificación de IgG DP47GS-IL-2 tres días antes y en el día de la inmunización con eritrocitos de carnero

suprimió la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado posterior con respecto a una exposición a eritrocitos de carnero en un 51 % en ratones NOD (figura 45A; $p=0,0023$) y en un 38 % en ratones C57BL/6 (figura 45B; $p=0,002$). CTLA-4-Ig de ratón como inmunodepresor de control positivo inhibió la respuesta de DTH a una concentración similar a IgG DP47GS-IL-2.

5 IgG DP47GS-IL-2 también pudo suprimir las respuestas de IgG específicas para KLH en ratones C57BL/6 (inhibición de un 78 %, $p=0,0007$, figura 46A) y NOD (inhibición de un 67 %, $p=0,004$, figura 46B). Para este experimento, se inmunizaron i.p. crías de ratones C57BL/6 ($n=7-10$) y ratones NOD ($n=13-14$) sanos con 100 μg de KLH de calidad de vacuna humana sin adyuvante como se recomienda por el fabricante (Stellar). El tratamiento con IgG DP47GS-IL-2 consistió en 1 (NOD) o 2 (C57BL/6) tratamientos s.c. semanales con 4000 UI por ratón iniciado el día de la inmunización. Siete días (NOD) y 21 días (C57BL/6) después de la inmunización, se obtuvo sangre y se midieron las respuestas de IgG específicas para KLH en suero mediante ELISA.

10 La capacidad de IgG DP47GS-IL-2 para suprimir las respuestas inmunitarias *in vivo* respalda la hipótesis de que la activación de los linfocitos T reguladores inducida por IL-2 en dosis baja produce linfocitos T reguladores funcionales que median una reducción en la respuesta inmunitaria.

15 Aunque la invención anterior se ha descrito con algo de detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de entendimiento, no se deben interpretar las descripciones y ejemplos como limitantes del alcance de la invención.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 - <120> Proteínas de fusión de interleucina 2 y usos de las mismas
 - <130> 31142
 - 5 <150> US 61/936564
 - <151> 06-02-2014
 - <160> 66
 - <170> PatentIn versión 3.5
 - 10 <210> 1
 - <211> 133
 - <212> PRT
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 1
- 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
- 15 <210> 2
 - <211> 399
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial
 - <220>
 - 20 <223> IL-2 humana natural

ES 2 704 731 T3

<400> 2
 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta 240
 agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct tttgtcaaag catcatctca aactgact 399

<210> 3
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> IL-2 humana natural (C125A)

<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 Ala Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

10

<210> 4
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 704 731 T3

<220>

<223> IL-2 humana natural (C125A) (1)

<400> 4

```
gctcctacat cctccagcac caagaaaacc cagctccagc tggaacatct cctgctggat      60
ctgcagatga tcctgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac cgggatgctg      120
accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgagctga aacatctgca gtgcctggaa      180
gaggaactga agcctctgga agaggtgctg aacctggccc agtccaagaa cttccacctg      240
aggcctcggg acctgatctc caacatcaac gtgatcgtgc tggaaactgaa gggctccgag      300
acaaccttca tgtgcgagta ogccgacgag acagctacca togtggaatt tctgaaccgg      360
tggatcacct tgcccagtc catcatctcc acctgacc      399
```

5

<210> 5

<211> 399

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> IL-2 humana natural (C125A) (2)

<400> 5

```
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat      60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc      120
acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa      180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta      240
agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaaactaaa gggatctgaa      300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga      360
tggattacct ttgccc aaag catcatctca aactgact      399
```

15

<210> 6

<211> 399

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-2 humana natural (C125A) (3)

<400> 6

20

```
gctcctacta gcagctccac caagaaaacc cagctccagc tggaacatct gctgctggat      60
ctgcagatga tcctgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac cgggatgctg      120
accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgaactga aacatctgca gtgcctggaa      180
gaggaactga agcctctgga agaggtgctg aacctggccc agagcaagaa cttccacctg      240
aggcccaggg acctgatcag caacatcaac gtgatcgtgc tggaaactgaa gggcagcgag      300
acaaccttca tgtgcgagta ogccgacgag acagccacca togtggaatt tctgaaccgg      360
tggatcacct tgcccagag catcatcagc acctgaca      399
```

<210> 7

<211> 399

ES 2 704 731 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IL-2 humana natural (C125A) (4)

5 <400> 7
 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatottca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta 240
 agaccagggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct ttgcccaaag catcatctca aactgact 399

<210> 8
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 8
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

ES 2 704 731 T3

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

- 5 <210> 9
- <211> 115
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de DP47GS

- 10 <400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 704 731 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Ser Ser
115

- <210> 10
- <211> 345
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH de DP47GS

<400> 10
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggt 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagt 345

- 10 <210> 11
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> VL de DP47GS

<400> 11

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ES 2 704 731 T3

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

- <210> 12
- <211> 324
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL de DP47GS

<400> 12
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

- 10 <210> 13
- <211> 592
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> HC de DP47GS (Fc botón, P329G LALA)-IL2

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ES 2 704 731 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 731 T3

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

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

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

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

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

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

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
 435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
 450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
 530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 545 550 555 560

ES 2 704 731 T3

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 580 585 590

- <210> 14
- <211> 1776
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> HC de DP47GS (Fc botón, P329G LALA)-IL2

<400> 14
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tctctgtcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt cgcaggct 120
 ccaggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
 ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
 ccatcggctt tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa cgggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa 660
 actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720
 tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aagccctcgg cgcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1080
 gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ES 2 704 731 T3

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa ggcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggoggaggtt ctggaggcgg aggctccgca 1380
 cctacttcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
 cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
 ttttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
 gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcaactaaga 1620
 cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagtctgg aactaaaggg atctgaaaca 1680
 acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
 attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

- 5 <210> 15
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HC de DP47GS (Fc ojal, P329G LALA)
 <400> 15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

ES 2 704 731 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 731 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

- <210> 16
- <211> 1335
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> HC de DP47GS (Fc ojal, P329G LALA)
- <400> 16

ES 2 704 731 T3

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 toctgtgcag cctcoggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtotcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
 ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
 ccctccgtgt tccccctggc ccccagcagc aagagcacca gcggcggcac agccgctctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag ccogtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc 480
 ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg 540
 agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgcgacaaa 660
 actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720
 ttccccccaa aacccaagga cacctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtggtggagc tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtgaaatg gcaaggagta caagtgcaag 960
 gtctccaaca aagccctcgg cgcacctc gaaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgtg cacctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080
 gtcagcctct cgtgocgagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaa 1335

- 5 <210> 17
- <211> 592
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> HC de DP47GS (Fc natural, P329G LALA)-IL2
- 10 <400> 17

ES 2 704 731 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

ES 2 704 731 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
 435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
 450 455 460

ES 2 704 731 T3

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

- <210> 18
- <211> 1776
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> HC de DP47GS (Fc natural, P329G LALA)-IL2

<400> 18
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt cgcaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
ccatcggctct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa cgggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactcctc 540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

10

ES 2 704 731 T3

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatac ttgtgacaaa 660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc 720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgctg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag 960
gtctccaaca aagccctcgg cgcocccatc gagaaaacca tctocaaagc caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatgcctgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcggaggtt ctggaggcgg aggctccgca 1380
cctacttcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
tttaagttt acatgcccga gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaa gcaaaaactt tcaactaaga 1620
cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagttctgg aactaaaggg atctgaaaca 1680
acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

<210> 19
<211> 215
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC de DP47GS

<400> 19

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

ES 2 704 731 T3

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 20
 <211> 645
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LC de DP47GS

<400>
 20
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300

ES 2 704 731 T3

caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgogaagt cacccatcag 600
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 21
 <211> 466
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión IL-2R-beta humano-Fc(ojal)

<400> 21

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys
 20 25 30

Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly
 35 40 45

Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg
 50 55 60

Arg Trp Asn Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp
 65 70 75 80

Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr
 85 90 95

Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp
 100 105 110

Arg Val Met Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu
 115 120 125

Met Ala Pro Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys
 130 135 140

Asn Ile Ser Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His
 145 150 155 160

ES 2 704 731 T3

Leu Glu Phe Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu
 165 170 175

Ala Pro Leu Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu
 180 185 190

Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro
 195 200 205

Leu Gln Gly Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala
 210 215 220

Phe Arg Thr Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Gly Ala Gln Asp
 225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350

ES 2 704 731 T3

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

- <210> 22
- <211> 1401
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Proteína de fusión IL-2R-beta humano-Fc(ojal)
- <400> 22

ES 2 704 731 T3

atggacatga gggccccgc tcagctcctg ggccctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc 60
 aggtgtgctg tgaatggcac ttcccagttc acatgcttct acaactcgag agccaacatc 120
 tcctgtgtct ggagccaaga tggggctctg caggacactt cctgccaagt ccatgcctgg 180
 ccggacagac ggcggtggaa ccaaacctgt gagctgctcc ccgtgagtca agcatcctgg 240
 gcctgcaacc tgatcctcgg agccccagat tctcagaaac tgaccacagt tgacatcgtc 300
 accctgaggg tgctgtgctg tgaggggggtg cgtatggagg tgatggccat ccaggacttc 360
 aagccctttg agaaccttcg cctgatggcc cccatctccc tccaagttgt ccacgtggag 420
 acccacagat gcaacataag ctgggaaatc tcccagcct cccactactt tgaaagacac 480
 ctggagtctg aggcccgac gctgtcccca ggccacacct gggaggaggc ccccctgctg 540
 actctcaagc agaagcagga atggatctgc ctggagacgc tcaccccaga caccagtat 600
 gagtttcagg tgcgggtcaa gcctctgcaa ggcgagttca cgacctggag cccctggagc 660
 cagcccctgg ccttcagaac aaagcctgca gcccttggga aggacaccgg agctcaggac 720
 aaaactcaca catgccccacc gtgcccagca cctgaaactcc tggggggacc gtcagtcttc 780
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900
 gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
 aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggy 1080
 cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1140
 caggtcagcc tctcgtgctg agtcaaaggg ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg 1200
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
 ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
 tcctgtctc cgggtaaatg a 1401

- 5 <210> 23
- <211> 492
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Proteína de fusión IL-2R-gamma humano-Fc(botón)
- 10 <400> 23

ES 2 704 731 T3

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
 20 25 30

Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp
 35 40 45

Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
 50 55 60

Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
 65 70 75 80

Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
 85 90 95

Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
 100 105 110

Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
 115 120 125

Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln
 130 135 140

Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu
 145 150 155 160

Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn
 165 170 175

ES 2 704 731 T3

Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp
 180 185 190

Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe
 195 200 205

Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg
 210 215 220

Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp
 225 230 235 240

Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe
 245 250 255

Leu Phe Ala Leu Glu Ala Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
 385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415

ES 2 704 731 T3

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

- <210> 24
- <211> 1479
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Proteína de fusión IL-2R-gamma humano-Fc(botón)

<400> 24
 atgttgaagc catcattacc attcacatcc ctcttattcc tgcagctgcc cctgctggga 60
 gtggggctga acacgacaat tctgacgccc aatgggaatg aagacaccac agctgatttc 120
 ttctgacca ctatgccac tgactcctc agtgittcca ctctgccct cccagaggtt 180
 cagtgttttg tgttcaatgt cgagtacatg aattgcactt ggaacagcag ctctgagccc 240
 cagcctacca acctcactct gcattattgg tacaagaact cggataatga taaagtccag 300
 aagtgcagcc actatctatt ctctgaagaa atcacttctg gctgtcagtt gcaaaaaaag 360
 gagatccacc tctaccaaac atttgttgtt cagctccagg acccacggga acccaggaga 420
 caggccacac agatgctaaa actgcagaat ctggtgatcc cctgggctcc agagaaccta 480
 acaactcaca aactgagtga atcccagcta gaactgaact ggaacaacag attcttgaac 540
 cactgttttg agcaacttgg gcagtaccgg actgactggg accacagctg gactgaacaa 600
 tcagtggatt atagacataa gttctccttg cctagtgtgg atgggcagaa acgctacag 660
 tttcgtgttc ggagccgctt taaccactc tgtggaagtg ctcagcattg gagtgaatgg 720
 agccacccaa tccactgggg gagcaatact tcaaaagaga atcctttcct gtttgcattg 780
 gaagccggag ctcaggacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 840
 gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 900
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaqa caaagccgcg ggaggagcag 1020

10

ES 2 704 731 T3

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
 atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg 1200
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg tggcgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1260
 gacatgcccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
 aggtggcagc aggggaacgt ottotcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1479

<210> 25
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Subunidad alfa de IL-2R humano + marca Avi + marca His

<400> 25

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala
 20 25 30
 Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu
 35 40 45
 Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu
 50 55 60
 Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys
 65 70 75 80
 Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro
 85 90 95
 Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln
 100 105 110
 Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro
 115 120 125
 Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln
 130 135 140

10

ES 2 704 731 T3

Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr
165 170 175

Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln
180 185 190

Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
195 200 205

His Glu Ala Arg Ala His His His His His His
210 215

<210> 26

<211> 660

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Subunidad alfa de IL-2R humano + marca Avi + marca His

<400> 26

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccgggtg gcattccgag 60

ctctgtgacg atgaccgcc agagatccca cacgccacat tcaaagccat ggcctacaag 120

gaaggaacca tgttgaactg tgaatgcaag agaggtttcc gcagaataaa aagcgggtca 180

ctctatatgc tctgtacagg aaactctagc cactcgtcct gggacaacca atgtcaatgc 240

acaagctctg cactcggaa cacaacgaaa caagtgcac ctcaacctga agaacagaaa 300

gaaaggaaaa ccacagaaat gcaaagtcca atgcagccag tggaccaagc ggccttcca 360

ggtcactgca gggaacctcc accatgggaa aatgaagcca cagagagaat ttatcatttc 420

gtggtggggc agatggttta ttatcagtgc gtccagggat acagggctct acacagaggt 480

cctgctgaga gcgtctgcaa aatgacctac gggaagacaa ggtggacca gccccagctc 540

atatgcacag gtgtcgacga acagttatat tttcagggcg gctcaggcct gaacgacatc 600

ttcgaggccc agaagatcga gtggcacgag gctcagctc accaccatca ccatcactga 660

10 <210> 27

<211> 473

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Proteína de fusión IL-2R-beta murino-Fc(ojal)

<400> 27

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

ES 2 704 731 T3

Phe Pro Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Lys
 20 25 30
 Asn Cys Ser His Leu Glu Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Val Ser
 35 40 45
 Cys Met Trp Ser His Glu Glu Ala Leu Asn Val Thr Thr Cys His Val
 50 55 60
 His Ala Lys Ser Asn Leu Arg His Trp Asn Lys Thr Cys Glu Leu Thr
 65 70 75 80
 Leu Val Arg Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ser Phe
 85 90 95
 Pro Glu Ser Gln Ser Leu Thr Ser Val Asp Leu Leu Asp Ile Asn Val
 100 105 110
 Val Cys Trp Glu Glu Lys Gly Trp Arg Arg Val Lys Thr Cys Asp Phe
 115 120 125
 His Pro Phe Asp Asn Leu Arg Leu Val Ala Pro His Ser Leu Gln Val
 130 135 140
 Leu His Ile Asp Thr Gln Arg Cys Asn Ile Ser Trp Lys Val Ser Gln
 145 150 155 160
 Val Ser His Tyr Ile Glu Pro Tyr Leu Glu Phe Glu Ala Arg Arg Arg
 165 170 175
 Leu Leu Gly His Ser Trp Glu Asp Ala Ser Val Leu Ser Leu Lys Gln
 180 185 190
 Arg Gln Gln Trp Leu Phe Leu Glu Met Leu Ile Pro Ser Thr Ser Tyr
 195 200 205
 Glu Val Gln Val Arg Val Lys Ala Gln Arg Asn Asn Thr Gly Thr Trp
 210 215 220
 Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Thr Phe Arg Thr Arg Pro Ala Asp Pro
 225 230 235 240
 Met Lys Glu Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 245 250 255

ES 2 704 731 T3

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 28

<211> 1422

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión IL-2R-beta murino-Fc(ojal)

ES 2 704 731 T3

<400> 28
atggacatga gggccccgc tcagctcctg ggccctcctgc tgctctgggt ccccctcctg 60
ctgctctgggt tcccagggtgc cagggtgtgca gtgaaaaact gttcccctct tgaatgcttc 120
tacaactcaa gagccaatgt ctottgcatg tggagccatg aagaggctct gaatgtcaca 180
acctgccacg tccatgcaa gtogaacctg cgacactgga acaaaacctg tgagctaact 240
cttgtgaggc aggcacccctg ggccctgcaac ctgatccctcg ggtcgttccc agagtcccag 300
tcaactgacct ccgtggacct ccttgacata aatgtggtgt gctgggaaga gaagggttgg 360
cgtagggtaa agacctgca ottocatccc ttgacaacc ttgcctggt ggcccctcat 420
tccctccaag ttctgcacat tgatacccag agatgtaaca taagctggaa ggtctcccag 480
gtctctcact acattgaacc ataactggaa ttgaggccc gtagaogtct tctgggccac 540
agctgggagg atgcatccgt attaagcctc aagcagagac agcagtggct cttcttggag 600
atgctgatcc ctagtacctc atatgaggtc cagggtgagg tcaaagctca acgaaacaat 660
accgggacct ggagtccctg gagccagccc ctgaccttc ggacaaggcc agcagatccc 720
atgaaggagg gagctcagga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 780
ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 840
cggaccctctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tggaggtcaag 900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtccctcaccg tcttgcacca ggactggctg 1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc acaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtgcaccct gccccatcc 1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctctcgtgag cagtcaaagg cttctatccc 1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 1260
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctcgtga gcaagctcac cgtggacaag 1320
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cgggtaaat ga 1422

<210> 29
<211> 500
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión IL-2R-gamma murino-Fc(botón)

<400> 29

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

ES 2 704 731 T3

Phe Pro Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ala Arg Cys Trp Ser Ser
 20 25 30
 Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Asn Glu Asp Ile Lys Ala Asp Leu Ile
 35 40 45
 Leu Thr Ser Thr Ala Pro Glu His Leu Ser Ala Pro Thr Leu Pro Leu
 50 55 60
 Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Ile Glu Tyr Met Asn Cys Thr
 65 70 75 80
 Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Ala Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr
 85 90 95
 Arg Tyr Lys Val Ser Asp Asn Asn Thr Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr
 100 105 110
 Leu Phe Ser Lys Glu Ile Thr Ser Gly Cys Gln Ile Gln Lys Glu Asp
 115 120 125
 Ile Gln Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Gln Lys
 130 135 140
 Pro Gln Arg Arg Ala Val Gln Lys Leu Asn Leu Gln Asn Leu Val Ile
 145 150 155 160
 Pro Arg Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu Ser Asn Leu Ser Glu Ser Gln
 165 170 175
 Leu Glu Leu Arg Trp Lys Ser Arg His Ile Lys Glu Arg Cys Leu Gln
 180 185 190
 Tyr Leu Val Gln Tyr Arg Ser Asn Arg Asp Arg Ser Trp Thr Glu Leu
 195 200 205
 Ile Val Asn His Glu Pro Arg Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp Glu Leu
 210 215 220
 Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Tyr Asn Pro Ile Cys Gly
 225 230 235 240
 Ser Ser Gln Gln Trp Ser Lys Trp Ser Gln Pro Val His Trp Gly Ser
 245 250 255
 His Thr Val Glu Glu Asn Pro Ser Leu Phe Ala Leu Glu Ala Gly Ala
 260 265 270

ES 2 704 731 T3

Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495

Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 30
 <211> 1503
 <212> ADN

ES 2 704 731 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión IL-2R-gamma murino-Fc(botón)

<400> 30

```

atggacatga gggccccgc tcagctcctg ggccctcctgc tgctctgggt cccctcctg      60
ctgctctgggt tcccagggtgc caggtggttg agttccaagg tcctcatgtc cagtgcgaat      120
gaagacatca aagctgattt gatcctgact tctacagccc ctgaacacct cagtgtcctc      180
actctgcccc ttccagaggt tcagtgcttt gtgttcaaca tagagtacat gaattgcact      240
tggaatagca gttctgagcc tcaggcaacc aacctcacgc tgcaactatag gtacaaggta      300
totgataata atacattcca ggagtgcagt cactatttgt tctccaaaga gattacttct      360
ggctgtcaga taaaaaaga agatatccag ctctaccaga catttggtgt ccagctccag      420
gacccccaga aacccagag gcgagctgta cagaagctaa acctacagaa tcttgtgatc      480
ccacgggctc cagaaaatct aacctcagc aatctgagtg aatcccagct agagctgaga      540
tggaaaagca gacatattaa agaacgctgt ttacaatact tgggtgcagta ccggagcaac      600
agagatcgaa gctggacgga actaatagtg aatcatgaac ctagattctc cctgcctagt      660
gtggatgagc tgaaacggta cacatttcgg gttcggagcc gctataacct aatctgtgga      720
agttctcaac agtggagtaa atggagccag cctgtccact gggggagtca tactgtagag      780
gagaatcctt cctgtttgc actggaagct ggagctcagg aaaaaactca cacatgcccc      840
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacct      900
aaggacacce tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc      960
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc      1020
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc      1080
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc      1140
ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag      1200
gtgtacacct tgccccatg ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc      1260
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg      1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggtcctt cttcctctac      1380
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg      1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacagc cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa      1500
tga                                                                 1503

```

5

<210> 31

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Subunidad alfa de IL-2R murino + marca Avi + marca His

ES 2 704 731 T3

<400> 31

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Leu Cys Leu Tyr Asp Pro Pro Glu Val Pro Asn Ala
20 25 30

Thr Phe Lys Ala Leu Ser Tyr Lys Asn Gly Thr Ile Leu Asn Cys Glu
35 40 45

Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Leu Lys Glu Leu Val Tyr Met Arg Cys
50 55 60

Leu Gly Asn Ser Trp Ser Ser Asn Cys Gln Cys Thr Ser Asn Ser His
65 70 75 80

Asp Lys Ser Arg Lys Gln Val Thr Ala Gln Leu Glu His Gln Lys Glu
85 90 95

Gln Gln Thr Thr Thr Asp Met Gln Lys Pro Thr Gln Ser Met His Gln
100 105 110

Glu Asn Leu Thr Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Lys His Glu
115 120 125

Asp Ser Lys Arg Ile Tyr His Phe Val Glu Gly Gln Ser Val His Tyr
130 135 140

Glu Cys Ile Pro Gly Tyr Lys Ala Leu Gln Arg Gly Pro Ala Ile Ser
145 150 155 160

Ile Cys Lys Met Lys Cys Gly Lys Thr Gly Trp Thr Gln Pro Gln Leu
165 170 175

Thr Cys Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Gly Leu Asn
180 185 190

Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Arg Ala His
195 200 205

His His His His His
210

- <210> 32
- <211> 642
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

5

ES 2 704 731 T3

<220>

<223> Subunidad alfa de IL-2R murino + marca Avi + marca His

<400> 32

```

atgggatgga gctgtatcat cctottcttg gtagcaacag ctaccoggtgt gcattccgaa      60
ctgtgtctgt atgacccacc cgaggteccc aatgccacat tcaaagccct ctctacaag      120
aacggcacca tcctaaactg tgaatgcaag agaggtttcc gaagactaaa ggaattggtc      180
tatatgcggt gcttaggaaa ctctgggagc agcaactgcc agtgcaccag caactcccat      240
gacaaatcga gaaagcaagt tacagctcaa cttgaacacc agaaagagca acaaaccaca      300
acagacatgc agaagccaac acagtctatg caccaagaga accttacagg tcaactgcagg      360
gagccacctc cttggaaca tgaagattcc aagagaatct atcatttctg ggaaggacag      420
agtgttcact acgagtgtat tccgggatac aaggctctac agagagggtcc tgctattagc      480
atctgcaaga tgaagtgtgg gaaaacgggg tggactcagc cccagctcac atgtgtcgac      540
gaacagttat attttcaggg oggctcaggc ctgaacgaca tcttogaggc ccagaagatc      600
gagtggcacg aggctcgagc tcaccacat caccatcact ga      642
    
```

5

<210> 33

<211> 480

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión IL-2R-beta de macaco cangrejero-Fc(botón) + marca Avi

<400> 33

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10           15

Val His Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Arg Phe Thr Cys Phe Tyr Asn
           20           25           30

Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln
           35           40           45

Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn
           50           55           60

Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn
65           70           75           80
    
```

ES 2 704 731 T3

Leu Ile Leu Gly Thr Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Ala Val Asp Ile
85 90 95

Val Thr Leu Arg Val Met Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp Arg Met Met
100 105 110

Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro
115 120 125

ES 2 704 731 T3

Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser
 130 135 140

Trp Lys Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His Leu Glu Phe
 145 150 155 160

Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu
 165 170 175

Met Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr
 180 185 190

Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly
 195 200 205

Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr
 210 215 220

Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Gly Ala Gln Asp Lys Thr His
 225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

ES 2 704 731 T3

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser
 450 455 460

Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 465 470 475 480

- <210> 34
- <211> 1443
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Proteína de fusión IL-2R-beta de macaco cangrejero-Fc(botón) + marca Avi

<400> 34
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgcg 60
 gtcaacggca cttcccggtt cacatgcttc tacaactoga gagccaacat ctctgtgtc 120
 tggagccaag atggggctct gcaggacact tcctgccaag tccacgcctg gccggacaga 180
 cggcgggtgga accaaacctg tgagctgctc cctgtgagtc aagcatcctg ggcttgcac 240
 ctgatcctcg gaaccccaga ttctcagaaa ctgaccgcag tggatatogt caccctgagg 300
 gtgatgtgcc gtgaaggggt gcgatggagg atgatggcca tccaggaactt caaaccttt 360
 gagaaccttc gcctgatggc ccccatctcc ctccaagtcg tccacgtgga gaccacaga 420
 tgcaacataa gctggaat ctccaagcc tcccactact ttgaaagaca cctggagttt 480

10

ES 2 704 731 T3

gaggcccgga cgctgtcccc aggccacacc tgggaggagg cccccctgat gacctcaag 540
 cagaagcagg aatggatctg cctggagacg ctcaccccag acaccagta tgagtttcag 600
 gtgCGGGTca agcctctgca aggcgagttc acgacctgga gcccctggag ccagccccctg 660
 gccttcagga caaagcctgc agcccttggg aaggacaccg gagctcagga caaaactcac 720
 acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 780
 ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg 840
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 960
 gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
 aacaaagccc tcccagcccc catogagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1080
 gaaccacagg tgtacaccct gcccocatgc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
 ctgtggtgcc tggtaaagg cttotatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggtccttc 1260
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcctgtct 1380
 ccgggtaaatt ccggaggcct gaacgacatc ttcgaggccc agaagattga atggcagcag 1440
 tga 1443

- <210> 35
- <211> 489
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Proteína de fusión IL-2R-gamma de macaco cangrejero-Fc(ojal)
- <400> 35

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly Asn Glu Asp
 20 25 30
 Ala Thr Thr Asp Phe Phe Leu Thr Ser Met Pro Thr Asp Ser Leu Ser
 35 40 45
 Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Val
 50 55 60
 Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Pro Thr
 65 70 75 80

ES 2 704 731 T3

Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn Asp Lys Val
 85 90 95

Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr Ser Gly Cys
 100 105 110

Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val Gln
 115 120 125

Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln Met Leu Lys
 130 135 140

Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu Arg
 145 150 155 160

Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn Arg Phe Leu
 165 170 175

Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp Asp His
 180 185 190

Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe Ser Leu Pro
 195 200 205

Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Phe
 210 215 220

Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp Ser His Pro
 225 230 235 240

Ile His Trp Gly Ser Asn Ser Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala
 245 250 255

Leu Glu Ala Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 275 280 285

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 290 295 300

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 305 310 315 320

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 325 330 335

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 340 345 350

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 355 360 365

Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 370 375 380

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 385 390 395 400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 405 410 415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 435 440 445

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485

<210> 36
 <211> 1470
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión IL-2R-gamma de macaco cangrejero-Fc(ojal)

<400> 36
 atgggatgga gctgtatcat cctottcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccctg 60
 aacacgacaa ttctgacgcc caatgggaat gaagacgcca caactgattt cttcctgacc 120
 totatgocca ctgactccct cagtgtttcc actctgcccc tcccagaggt tcagtgtttt 180
 gtgttcaatg tcgagtacat gaattgcact tggaacagca gctctgagcc ccagcctacc 240
 aacctcactc tgcattattg gtacaagaat tcggataatg ataaagtcca gaagtgcagc 300
 cactatctat tctctgaaga aatcacttct ggctgtcagt tgcaaaaaaa ggagatccac 360

5

10

ES 2 704 731 T3

ctctaccaa cgtttgttgc tcagctccag gaccacggg aaccaggag acaggccaca 420
 cagatgctaa aactgcagaa tctggtgat ccctgggctc cggagaacct aacacttcgc 480
 aaactgagtg aatcccagct agaactgaac tggacaaca gattcttgaa cactgtttg 540
 gagcacttgg tgcagtaccg gactgactgg gaccacagct ggactgaaca atcagtggat 600
 tatagacata agttctcctt gcctagtgtg gatgggcaga aacgctacac gtttcgtgtc 660
 cggagccgct ttaaccact ctgtggaagt gctcagcatt ggagtgaatg gagccacca 720
 atccactggg ggagcaatag ttcaaaagag aatccttcc tgtttgcatt ggaagccgga 780
 gctcaggaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 840
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaca gacacctca tgatctcccg gaccctgag 900
 gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 960
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1020
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1080
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca togagaaaac catctccaaa 1140
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcacctgc ccccatcccg ggatgagctg 1200
 accaagaacc aggtcagcct ctogtgcgca gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1260
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1320
 gactccgacg gctccttctt cctogtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1380
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1440
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1470

<210> 37
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Subunidad alfa de IL-2R de macaco cangrejero + marca Avi + marca His

<400> 37

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Lys Ile Thr His Ala Thr Phe Lys
 20 25 30

Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg
 35 40 45

Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Pro Tyr Met Leu Cys Thr Gly
 50 55 60

10

ES 2 704 731 T3

Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser
65 70 75 80

Ala Ala Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln
85 90 95

Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Gln Met Gln Leu Ala Asp
100 105 110

Gln Val Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn
115 120 125

Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Thr Val Tyr
130 135 140

Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu
145 150 155 160

Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln
165 170 175

Leu Ile Cys Thr Gly Glu Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly
180 185 190

Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
195 200 205

Ala Arg Ala His His His His His His
210 215

<210> 38
<211> 654
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subunidad alfa de IL-2R de macaco cangrejero + marca Avi + marca His

<400> 38
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtga gctctgtgac 60
gatgaccgcg caaaaatcac acatgccaca ttcaaagcca tggcoctacaa ggaaggaacc 120
atgttgaact gtgaatgcaa gagaggtttc cgcagaataa aaagcgggtc accctatatg 180
ctctgtacag gaaactctag ccactcgtcc tgggacaacc aatgtcaatg cacaagctct 240
gctgctcgga acacaacaaa acaagtgaca cctcaacctg aagaacagaa agaaagaaaa 300
accacagaaa tgcaaagtca aatgcagctg gcggaaccaag tgagccttcc aggtcactgc 360

ES 2 704 731 T3

agggaacctc cacctgtggga aatgaagcc acagaaagaa tttatcattt cgtggtgggg 420
 cagacggttt actaccagtg cgtccagga tacagggctc tacacagagg tctgctgag 480
 agcgtctgca aatgaccca cgggaagaca agatggacc agccccagct catatgcaca 540
 ggtgaagtgc acgaacagtt atattttcag ggcggctcag gcctgaacga catcttcgag 600
 gccagaaga tcgagtggca cgaggctoga gctcaccacc atcaccatca ctga 654

<210> 39
 <211> 19
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia líder

<400> 39

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser

10 <210> 40
 <210> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia líder

<400> 40

atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

20 <210> 41
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia líder

<400> 41

25 atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 42
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia líder

<400> 42

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
 20

ES 2 704 731 T3

<210> 43
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia líder

<400> 43
atggacatga gggccccgc tcagctcctg ggctcctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60
aggtgt 66

10 <210> 44
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia líder

15 <400> 44

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

20 <210> 45
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia líder

<400> 45
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccgggtg gcattcc 57

25 <210> 46
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia líder

<400> 46
atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccactggagt gcattcc 57

35 <210> 47
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia líder

40 <400> 47
atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct 57

<210> 48
 <211> 592
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 704 731 T3

<220>

<223> HC de DP47GS (Fc botón, P329G LALA)-IL2 N88D

<400> 48

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

ES 2 704 731 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 731 T3

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
 435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser
 450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
 530 535 540

Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 580 585 590

<210> 49

<211> 1776

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC de DP47GS(Fc botón, P329G LALA)-IL2 N88D

<400> 49

gaggtgcaat tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tctgtgacag cctcoggatt cacotttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccagget 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

10

ES 2 704 731 T3

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
 ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtg agcccaaatac ttgtgacaaa 660
 actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc 720
 ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960
 gtctccaaca aagccctcgg cgcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1080
 gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatgcctgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc cagtgcctgga ctccgacggc 1200
 tocttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct cgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcggaggtt ctggaggcgg aggetccgca 1380
 cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
 cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatcca aactcaccag gatgctcaca 1500
 ttttaagttt acatgcccga gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
 gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaa gcaaaaactt tcaactaaga 1620
 cccagggact taatcagcga tatcaacgta atagttctgg aactaaagg atctgaaaca 1680
 acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
 attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

- <210> 50
- <211> 592
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> HC de DP47GS(Fc natural, P329G LALA)-IL2 N88D

- <400> 50

ES 2 704 731 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

ES 2 704 731 T3

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

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

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

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

ES 2 704 731 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
 435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser
 450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 500 505 510

ES 2 704 731 T3

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
 530 535 540

Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 580 585 590

- <210> 51
- <211> 1776
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> HC de DP47GS(Fc natural, P329G LALA)-IL2 N88D

```

<400> 51
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc      300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc      360
ccatcggctc tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc      480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtccctacagt cctcaggact ctactcctc      540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agaactacat ctgcaacgtg      600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatac ttgtgacaaa      660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc      720
ttccccccaa aacccaagga cacctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag      960
    
```

10

ES 2 704 731 T3

gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggt atgagctgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcggaggtt ctggaggcgg aggctccgca 1380
 cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
 cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
 ttttaagtttt acatgcccac gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
 gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcaactaaga 1620
 cccagggact taatcagcga tatcaacgta atagtctgg aactaaagg atctgaaaca 1680
 acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
 attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

<210> 52

<211> 592

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC de DP47GS(Fc natural, P329G LALA)-IL2 E95A

<400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

ES 2 704 731 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 731 T3

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

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

ES 2 704 731 T3

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

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

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

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

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
 435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser
 450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
 530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Pro Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 580 585 590

<210> 53
 <211> 1776

ES 2 704 731 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HC de DP47GS (Fc natural, P329G LALA)-IL2 E95A

5 <400> 53

```

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc      300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc      360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc      480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtt gtcctacagt cctcaggact ctactcctc      540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg      600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtg agcccaaata ttgtgacaaa      660
actcacacat gccaccctg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc      720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag      960
gtctccaaca aagccctcgg cgcacctcgc gagaaaacca tctocaaagc caaagggcag      1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag      1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag      1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc      1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc      1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc      1320
ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcggagggt ctggaggcgg aggctccgca      1380
cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta      1440
cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca      1500
tttaagttt acatgcccac gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa      1560
gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcacttaaga      1620
cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagttctgc cactaaaggg atctgaacaa      1680
    
```

ES 2 704 731 T3

		acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg	1740
		attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact	1776
	<210>	54	
	<211>	42	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador directo de FOXP3	
	<400>	54	
		tgtaaaacga cggccagttt tagaagttgt atgggggatg tt	42
10	<210>	55	
	<211>	44	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
15	<223>	cebador inverso de FOXP3	
	<400>	55	
		caggaaacag ctatgaccaa aatatctacc ctctctctt cctc	44
	<210>	56	
	<211>	42	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador directo de CTLA-4	
	<400>	56	
25		tgtaaaacga cggccagtgg gtttggttat gaaggagtat ga	42
	<210>	57	
	<211>	45	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
30	<223>	cebador inverso de CTLA-4	
	<400>	57	
		caggaaacag ctatgacctt cacttaattt ccactaaaa taccc	45
	<210>	58	
35	<211>	133	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	IL-2 N88D T3A C125A	
40	<400>	58	

ES 2 704 731 T3

Ala Pro Ala 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 Asp 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 Ala Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 59
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-2 N88D T3A C125A

<400> 59
 gcacctgcct caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta 240
 agaccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct ttgcccaaag catcatctca aactgact 399

10 <210> 60
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 704 731 T3

<223> IL-2 N88D

<400> 60

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 Asp 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> 61
- <211> 399
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>
<223> IL-2 N88D

10 <400> 61
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta 240
agaccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggattacct tttgtcaaag catcatctca aactgact 399

- <210> 62
- <211> 133

ES 2 704 731 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-2 N88D C125A

5 <400> 62

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 Asp 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 Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 63
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> IL-2 N88D C125A

<400> 63
 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240

15

ES 2 704 731 T3

agaccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct ttgcccaaag catcatctca aactgact 399

- <210> 64
- <211> 133
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL-2 N88D T3A

<400> 64

Ala Pro Ala 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 Asp 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

- 10 <210> 65
- <211> 399
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> IL-2 N88D T3A

<400> 65

ES 2 704 731 T3

```

gcacctgcct caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat      60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc      120
acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa      180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta      240
agaccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaaactaaa gggatctgaa      300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga      360
tggattacct tttgtcaaag catcatctca aactgact      399

```

```

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> Conector con (G4S)3

```

```

<400> 66

```

```

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1      5      10      15

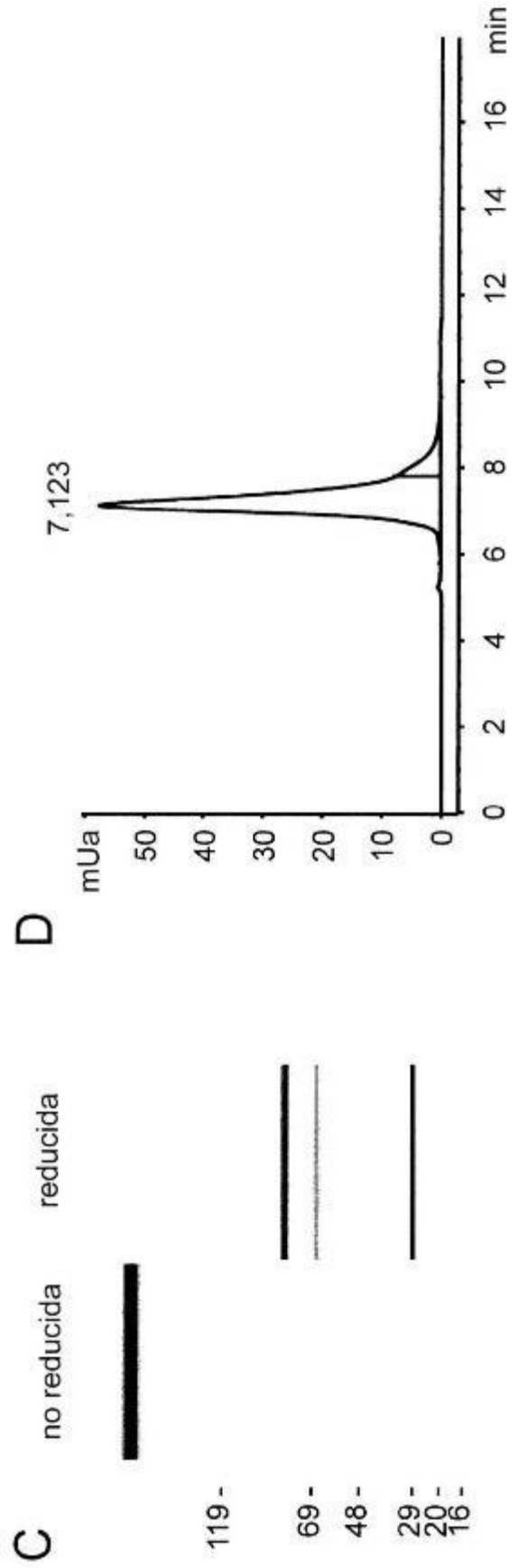
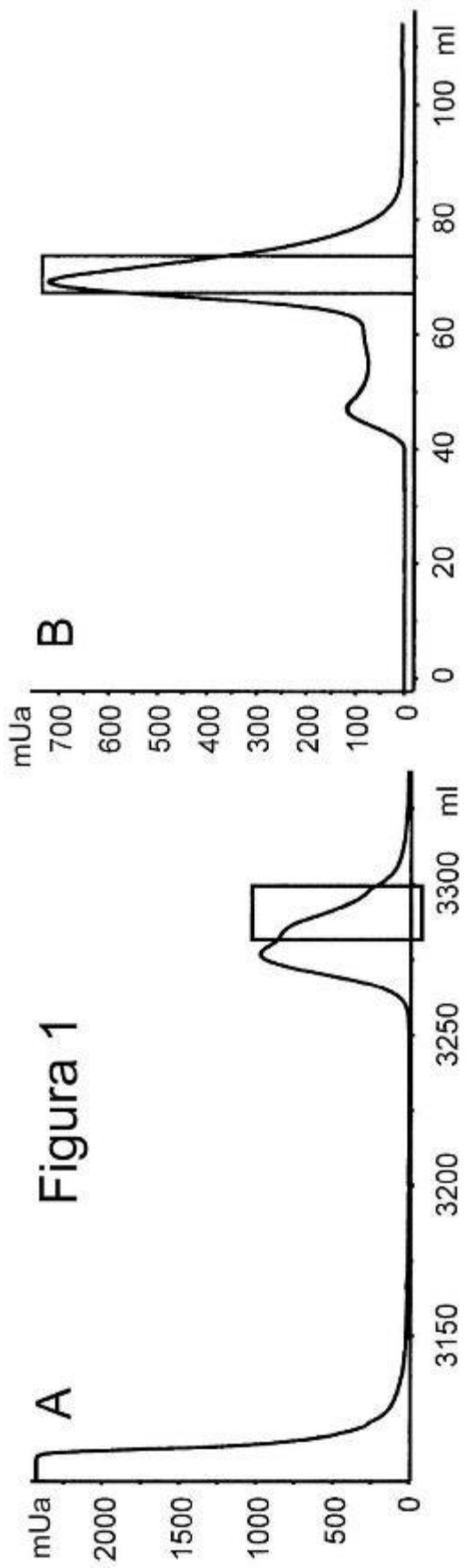
```

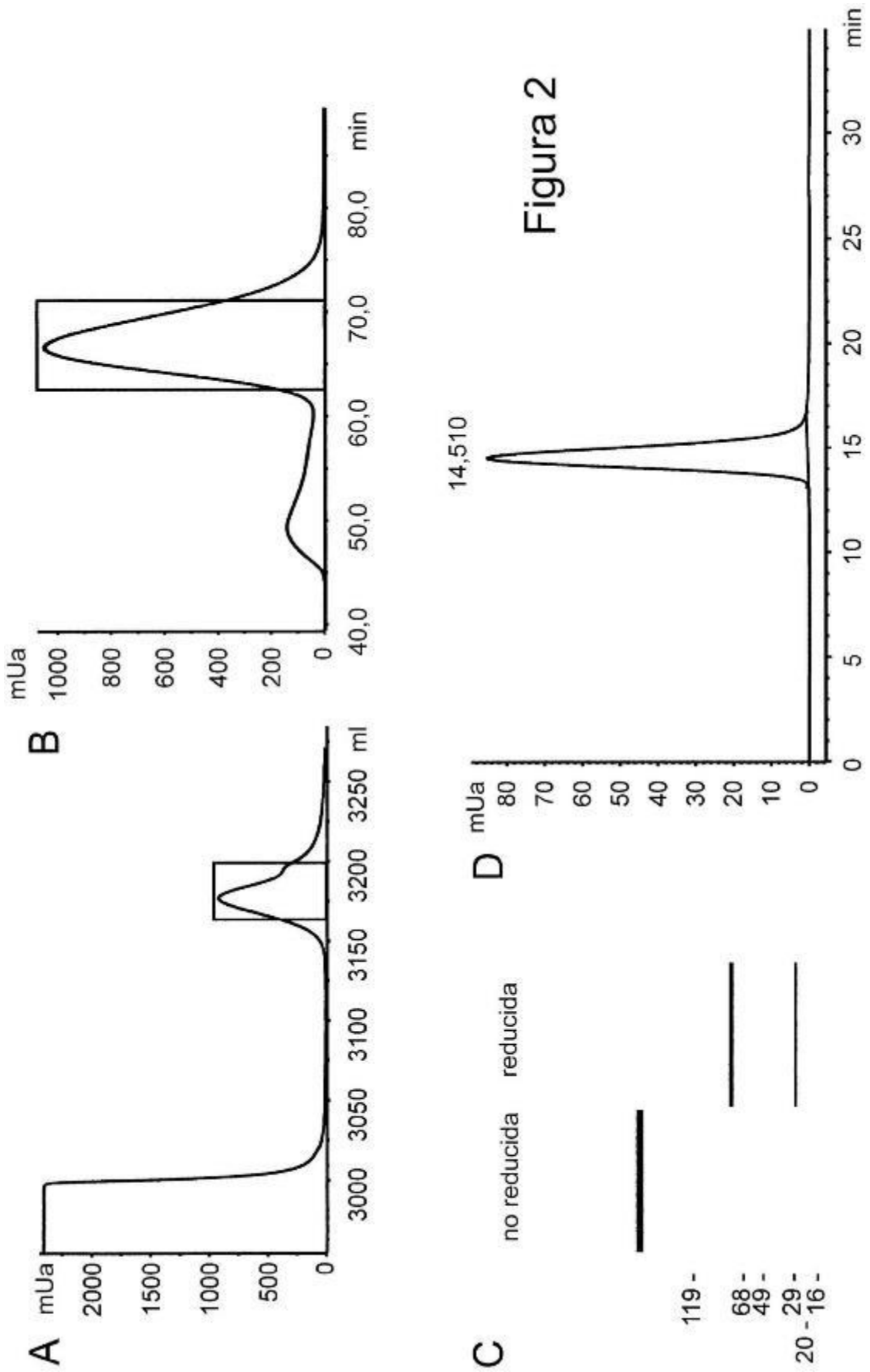
10

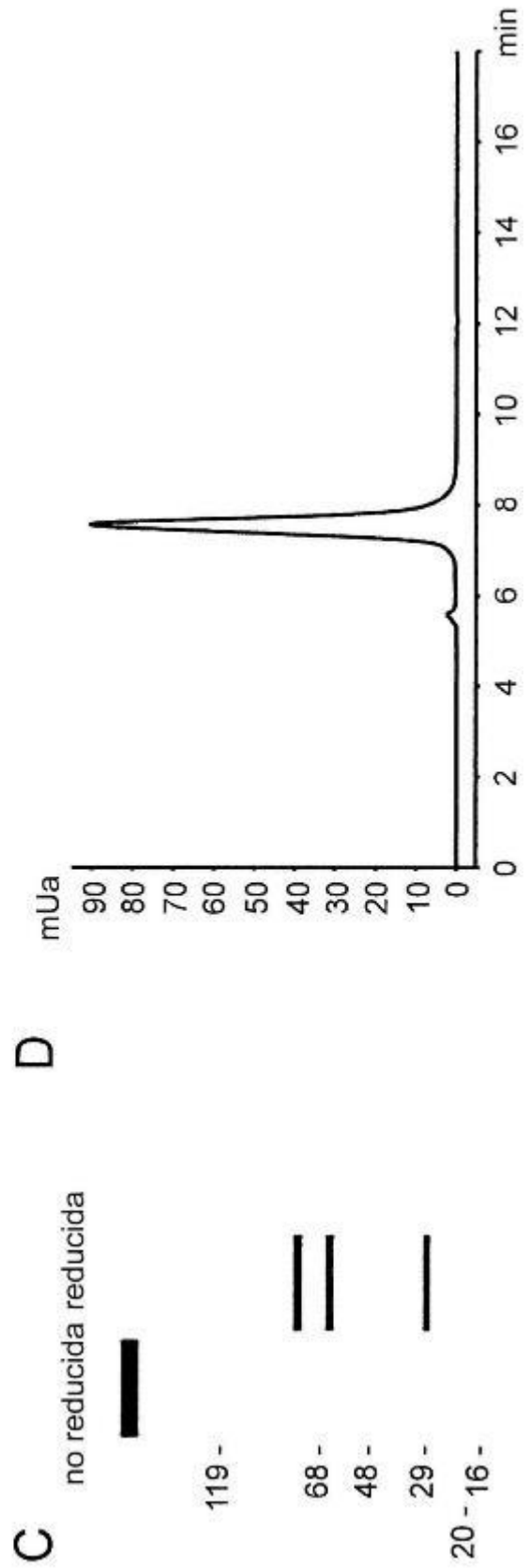
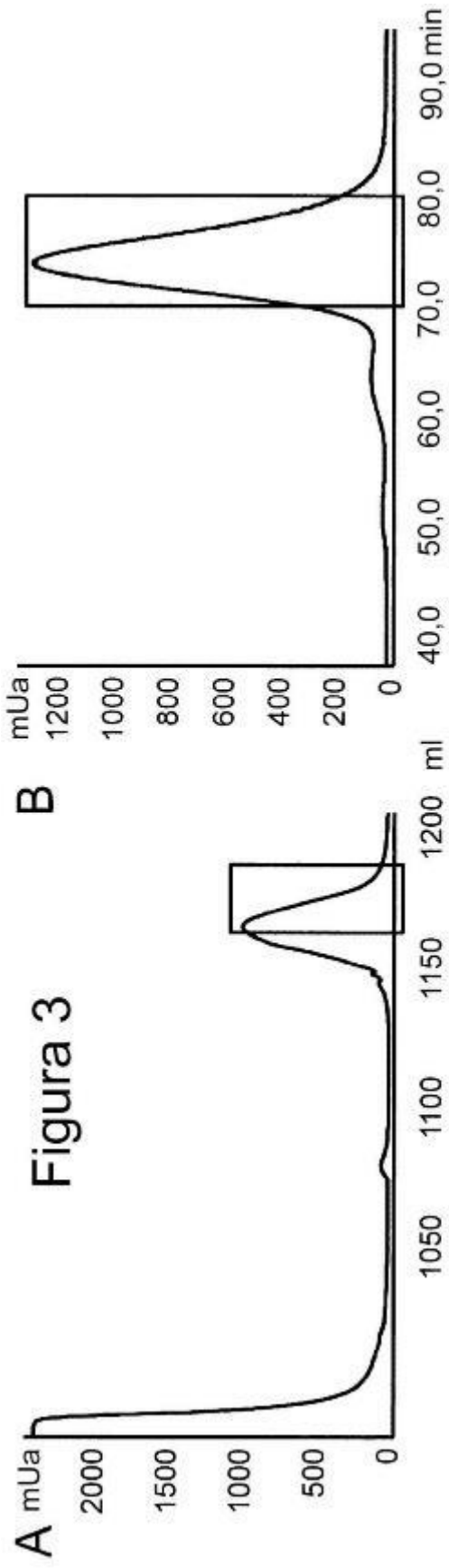
REIVINDICACIONES

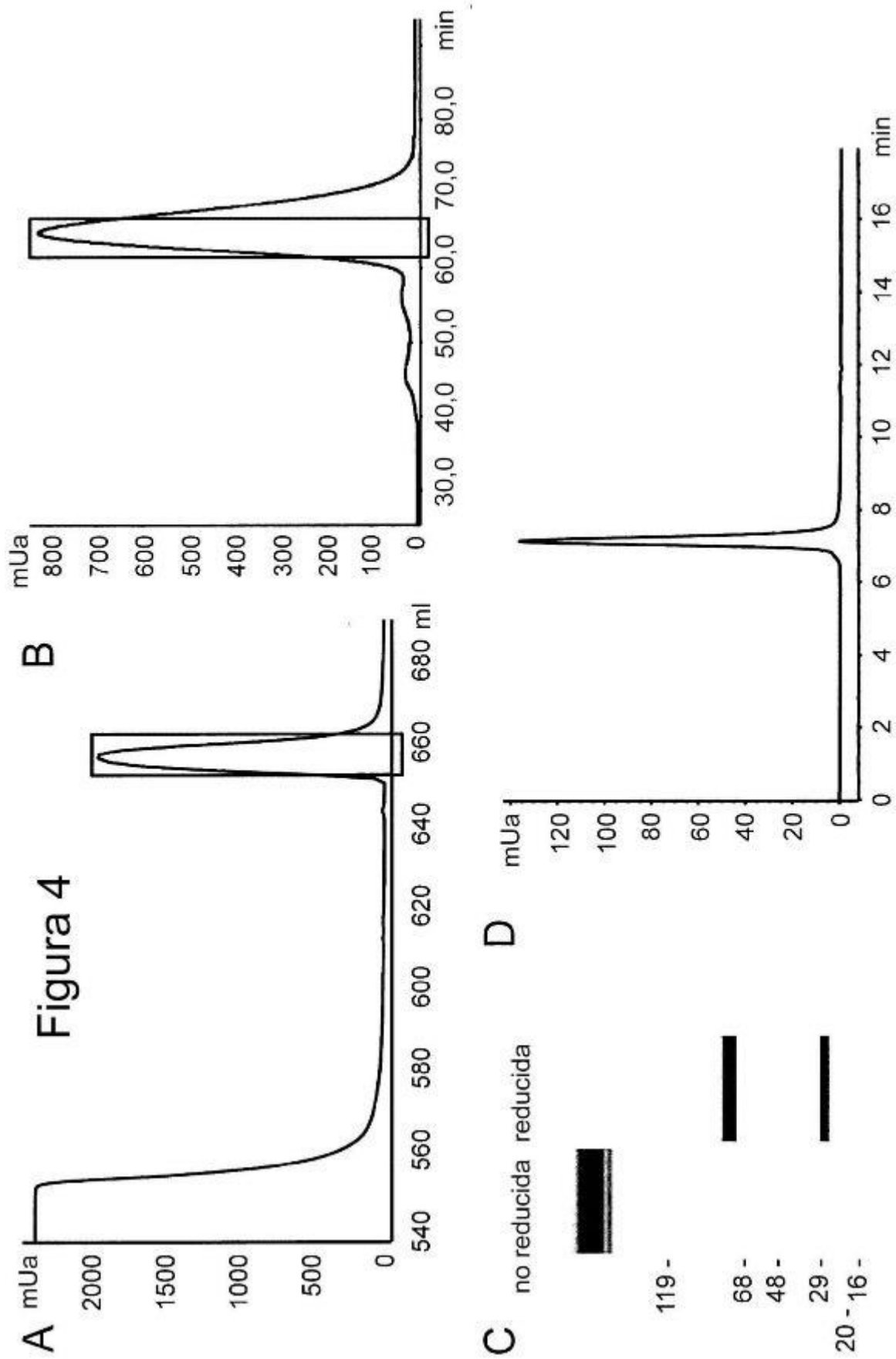
- 5 1. Una proteína de fusión que comprende (i) una molécula de inmunoglobulina que no se puede unir específicamente a un antígeno y (ii) dos moléculas de interleucina 2 (IL-2) mutante que comprenden una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de la molécula de IL-2 mutante con respecto al receptor de IL-2 de afinidad intermedia, en comparación con una molécula de IL-2 natural, en la que dichas moléculas de IL-2 mutante comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 58.
- 10 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que dicha molécula de inmunoglobulina es una molécula de inmunoglobulina de clase IgG, en particular, una molécula de inmunoglobulina de subclase IgG₁.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha molécula de inmunoglobulina es una molécula de inmunoglobulina humana.
- 15 4. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de inmunoglobulina comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada basada en la secuencia de estirpe germinal de Vh3-23 humana.
- 20 5. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de inmunoglobulina comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 9.
6. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de inmunoglobulina comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera basada en la secuencia de estirpe germinal de Vk3-20 humana.
- 25 7. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de inmunoglobulina comprende la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 11.
- 30 8. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de inmunoglobulina comprende una modificación que reduce la afinidad de unión de la molécula de inmunoglobulina con respecto a un receptor Fc en comparación con una molécula de inmunoglobulina correspondiente sin dicha modificación.
- 35 9. La proteína de fusión de la reivindicación 8, en la que dicho receptor Fc es un receptor Fcγ, en particular, un receptor Fcγ humano.
10. La proteína de fusión de la reivindicación 8 o 9, en la que dicho receptor Fc es un receptor Fc activador.
- 40 11. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que dicho receptor Fc se selecciona del grupo de FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89).
12. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que dicho receptor Fc es FcγRIIIa, en particular, FcγRIIIa humano.
- 45 13. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de inmunoglobulina comprende una sustitución de aminoácido en la posición 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de inmunoglobulina.
- 50 14. La proteína de fusión de la reivindicación 13, en la que dicha sustitución de aminoácido es P329G.
15. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de inmunoglobulina comprende sustituciones de aminoácido en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) de las cadenas pesadas de inmunoglobulina.
- 55 16. La proteína de fusión de la reivindicación 15, en la que dichas sustituciones de aminoácido son L234A y L235A (LALA).
- 60 17. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de inmunoglobulina comprende las sustituciones de aminoácido L234A, L235A y P329G (numeración EU) en las cadenas pesadas de inmunoglobulina.
- 65 18. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas moléculas de IL-2 mutante se fusionan cada una en su aminoácido N terminal con el aminoácido C terminal de una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina de dicha molécula de inmunoglobulina, opcionalmente a través de un conector peptídico.

19. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas moléculas de IL-2 mutante se fusionan cada una con dicha molécula de inmunoglobulina a través de un conector peptídico.
- 5 20. La proteína de fusión de la reivindicación 19, en la que dicho conector peptídico comprende al menos 10, en particular, al menos 15, aminoácidos.
21. La proteína de fusión de la reivindicación 19 o 20, en la que dicho conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66).
- 10 22. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proteína de fusión comprende las secuencias de polipéptido de la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 50.
23. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha proteína de fusión activa selectivamente los linfocitos T reguladores.
- 15 24. Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
25. Un vector, en particular, un vector de expresión, que comprende el polinucleótido de la reivindicación 24.
- 20 26. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de la reivindicación 24 o el vector de la reivindicación 25.
27. Un procedimiento para producir una proteína de fusión que comprende una molécula de inmunoglobulina y dos moléculas de IL-2 mutante que comprenden una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de la molécula de IL-2 mutante con respecto al receptor de IL-2 de afinidad intermedia en comparación con una molécula de IL-2 natural, que comprende las etapas de (i) cultivar la célula huésped de la reivindicación 26 en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión y (ii) recuperar la proteína de fusión.
- 25 28. Una proteína de fusión producida mediante el procedimiento de la reivindicación 27.
- 30 29. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o 28 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 30. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o 28, o la composición farmacéutica de la reivindicación 29, para su uso como un medicamento.
31. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o 28, o la composición farmacéutica de la reivindicación 29, para su uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria.
- 40 32. La proteína de fusión o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 31, en la que dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo de diabetes de tipo 1, lupus eritematoso diseminado, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y esclerosis múltiple.
- 45 33. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o 28, o la composición farmacéutica de la reivindicación 29, para su uso en el tratamiento o profilaxis de rechazo de trasplante o enfermedad injerto contra huésped.
- 50 34. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o 28 para su uso en la activación selectiva de los linfocitos T reguladores *in vitro*.
35. La proteína de fusión de la reivindicación 34, en la que dicha activación comprende la inducción de la proliferación de linfocitos T reguladores y/o la inducción de la señalización del receptor de IL-2 en los linfocitos T reguladores.
- 55 36. Un procedimiento para la activación selectiva de los linfocitos T reguladores *in vitro*, que comprende poner en contacto dichos linfocitos T reguladores con la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o 28.
- 60 37. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que dicha activación comprende la inducción de la proliferación de los linfocitos T reguladores y/o la inducción de la señalización del receptor de IL-2 en los linfocitos T reguladores.

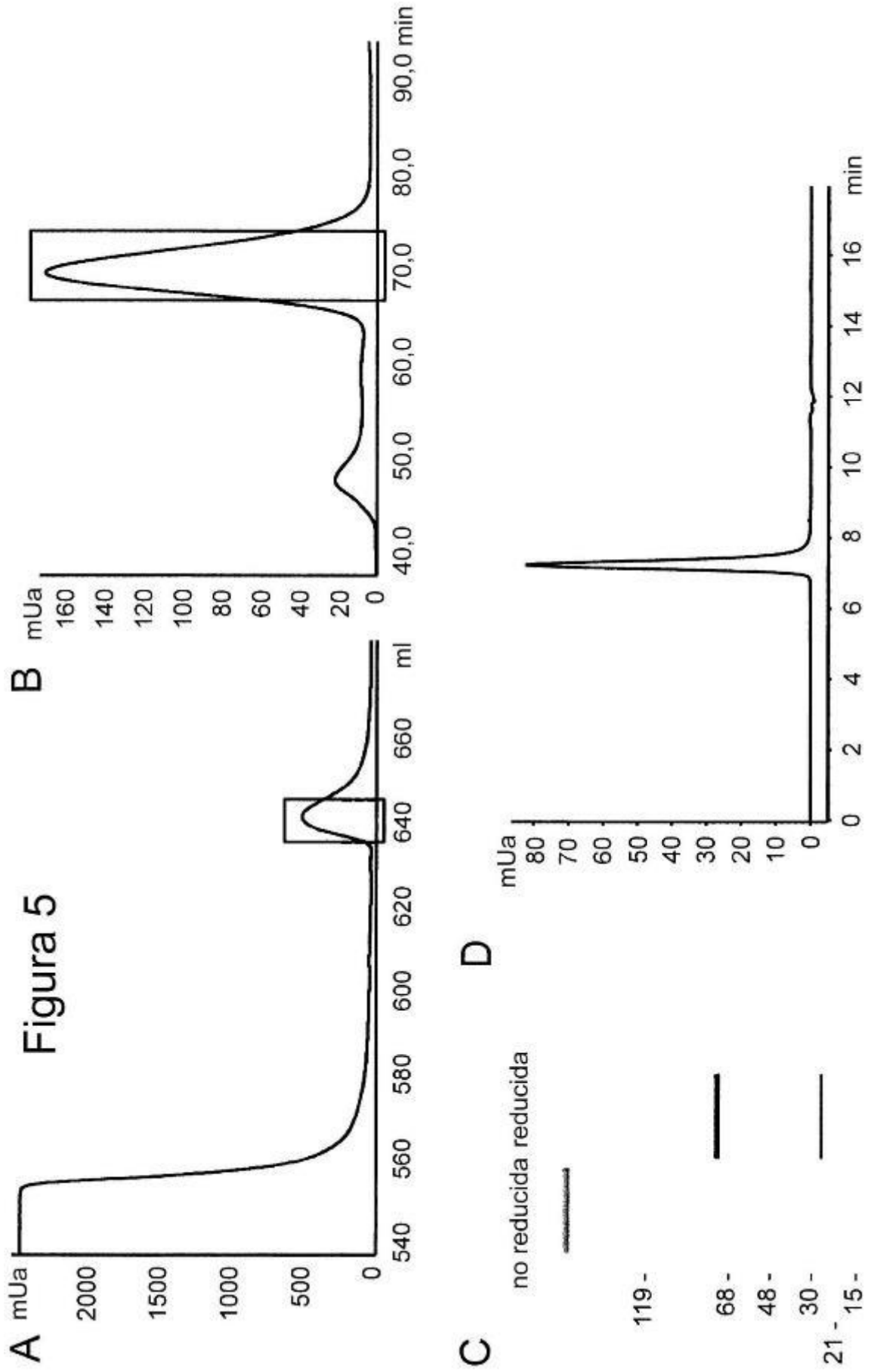


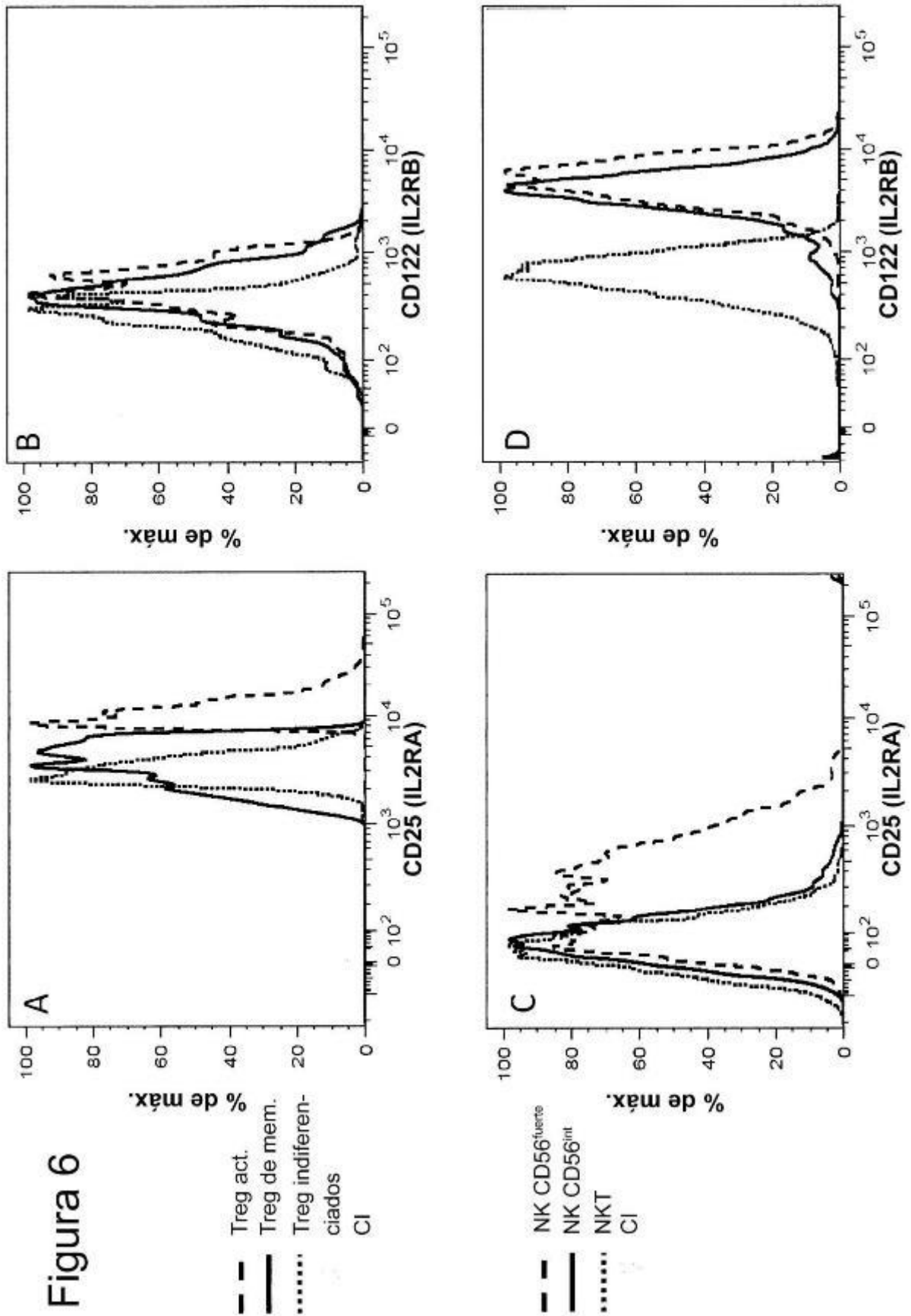






ES 2 704 731 T3





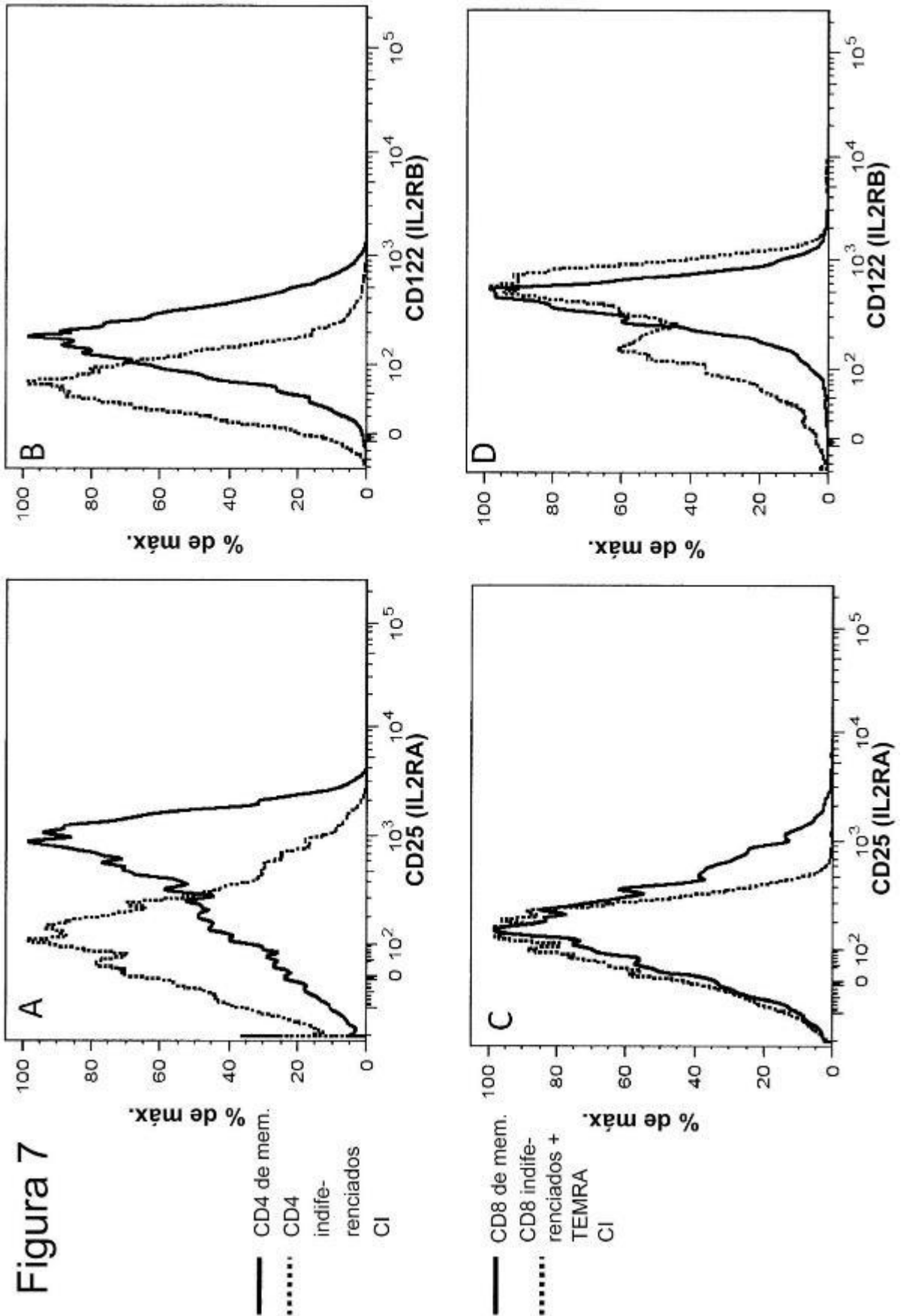
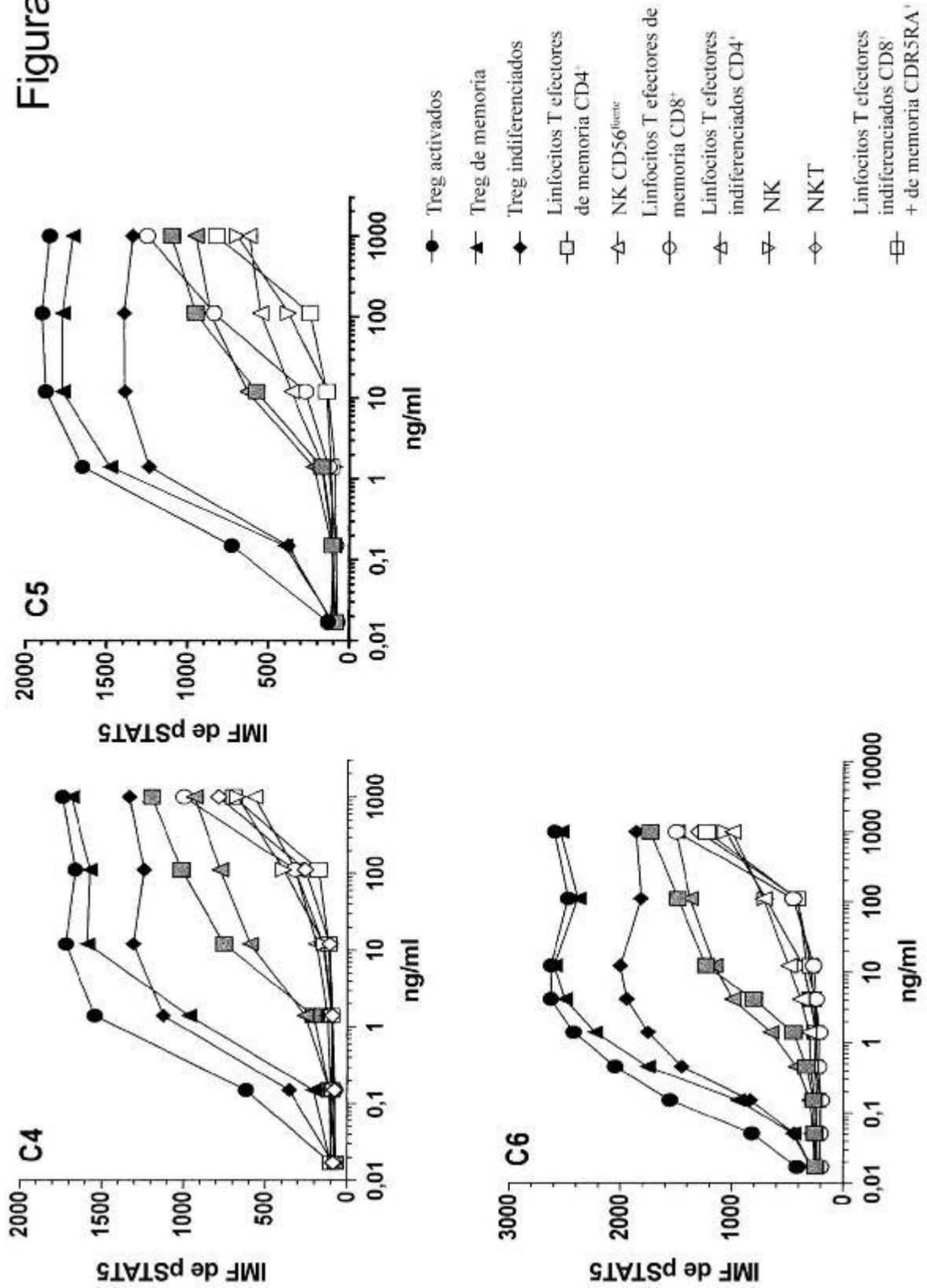


Figura 8



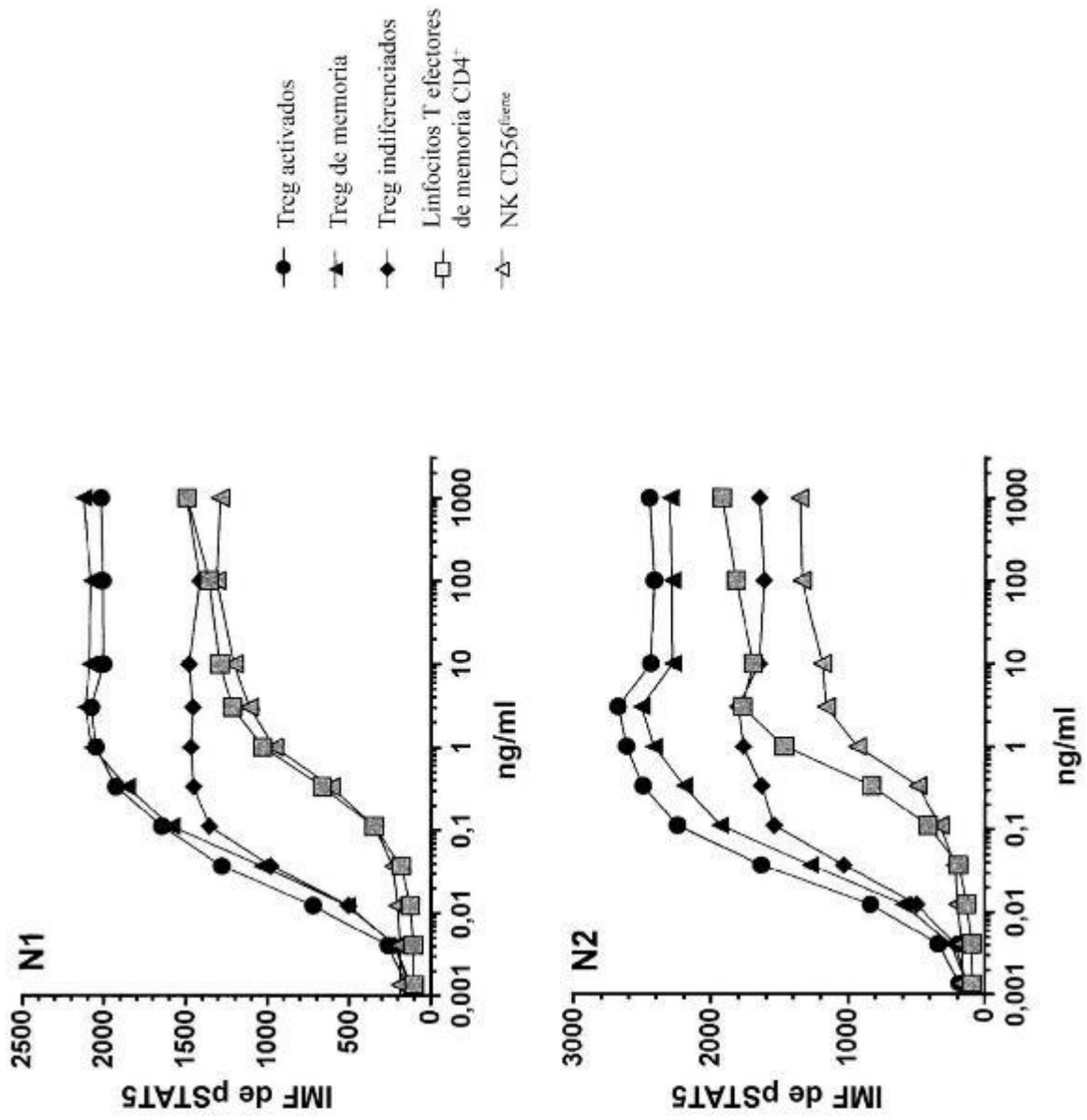


Figura 9

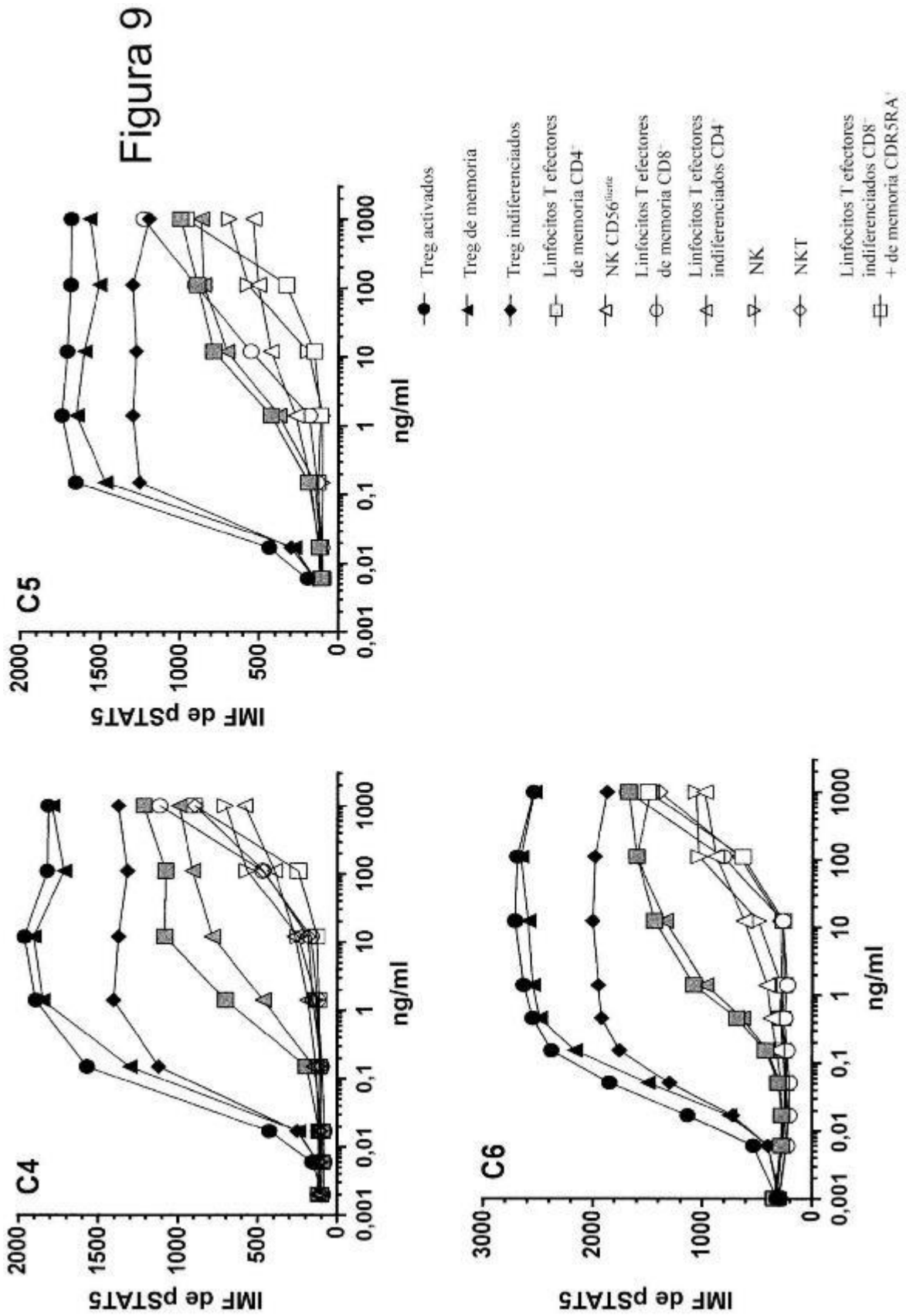


Figura 10

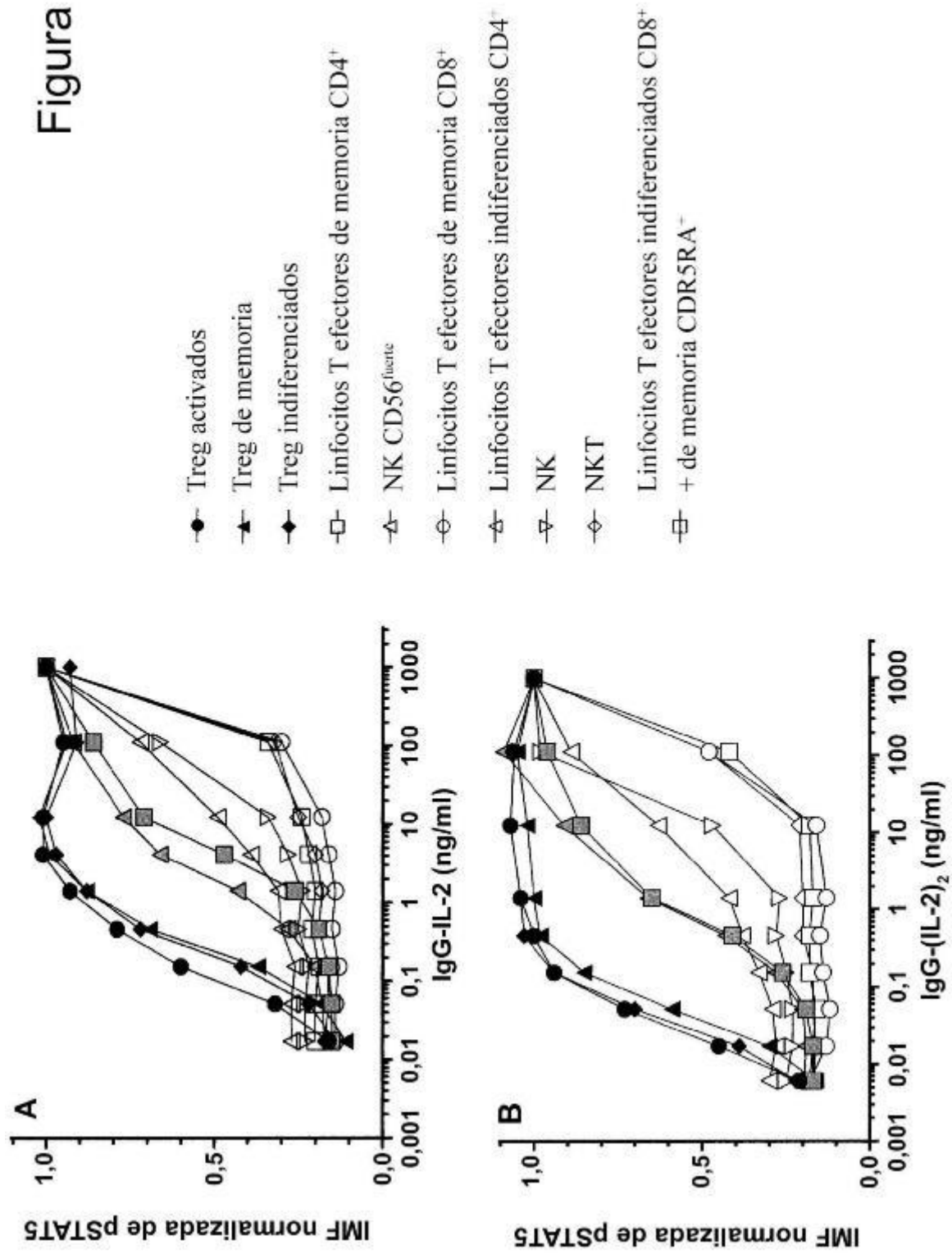


Figura 11

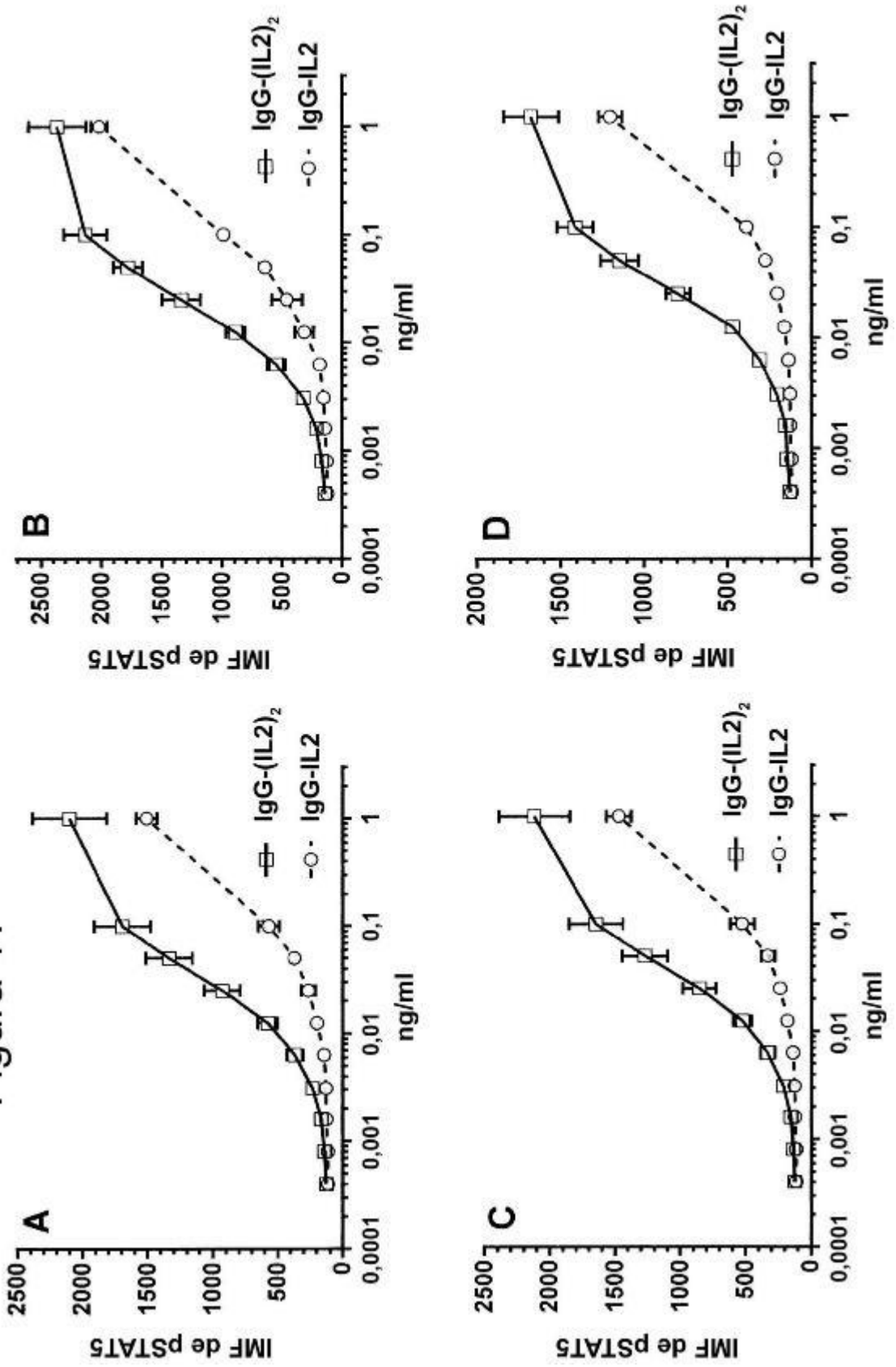
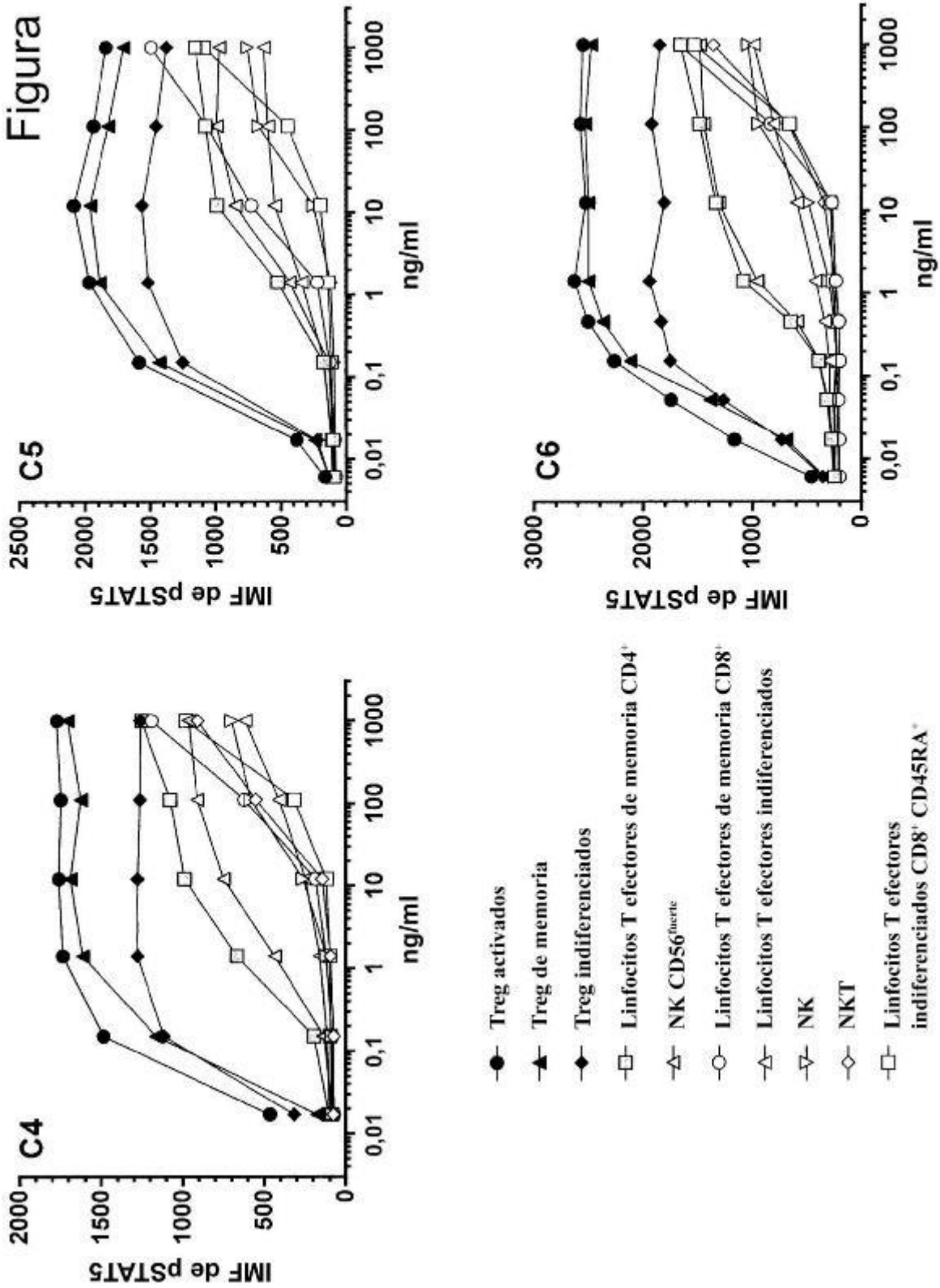


Figura 12



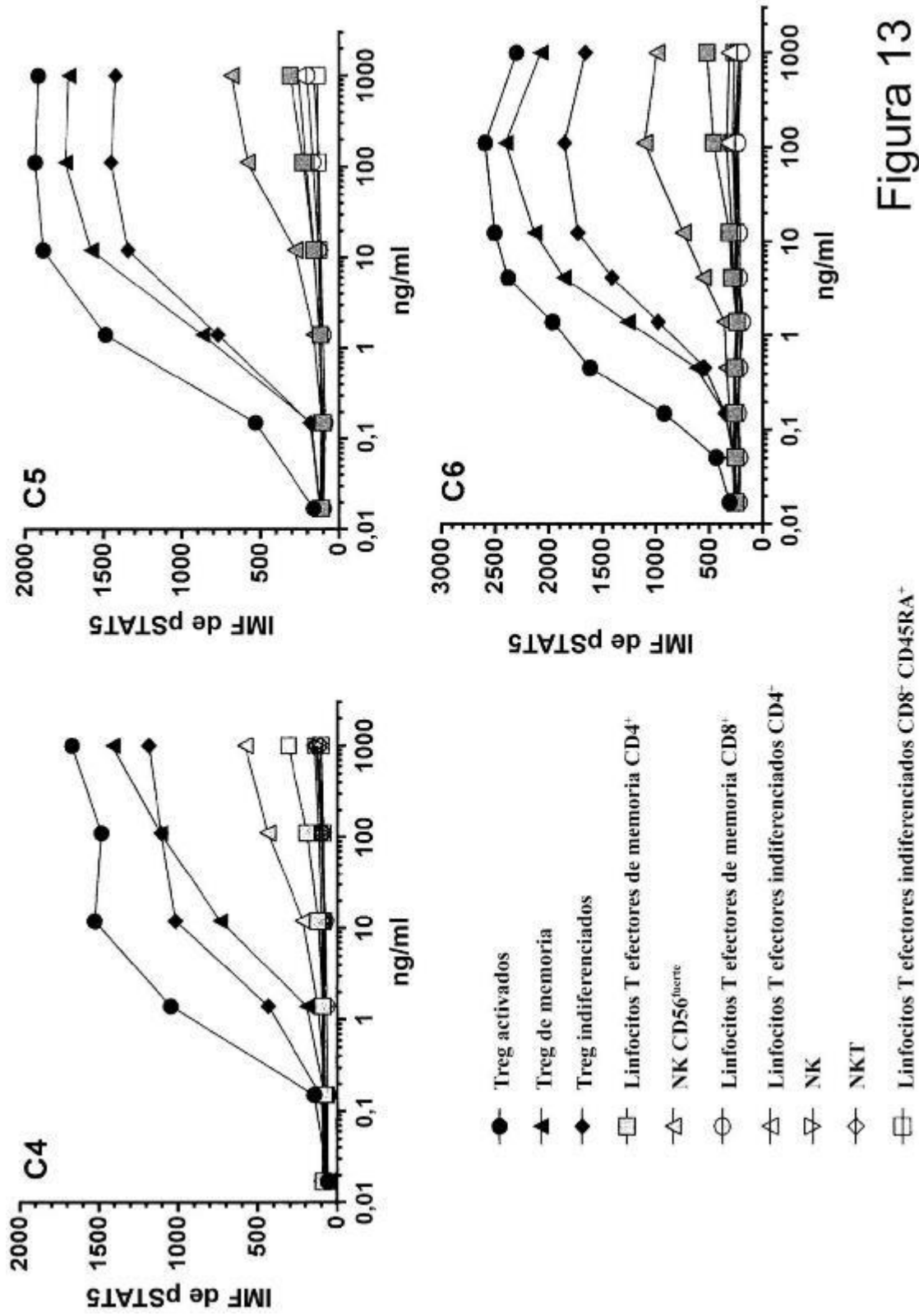


Figura 13

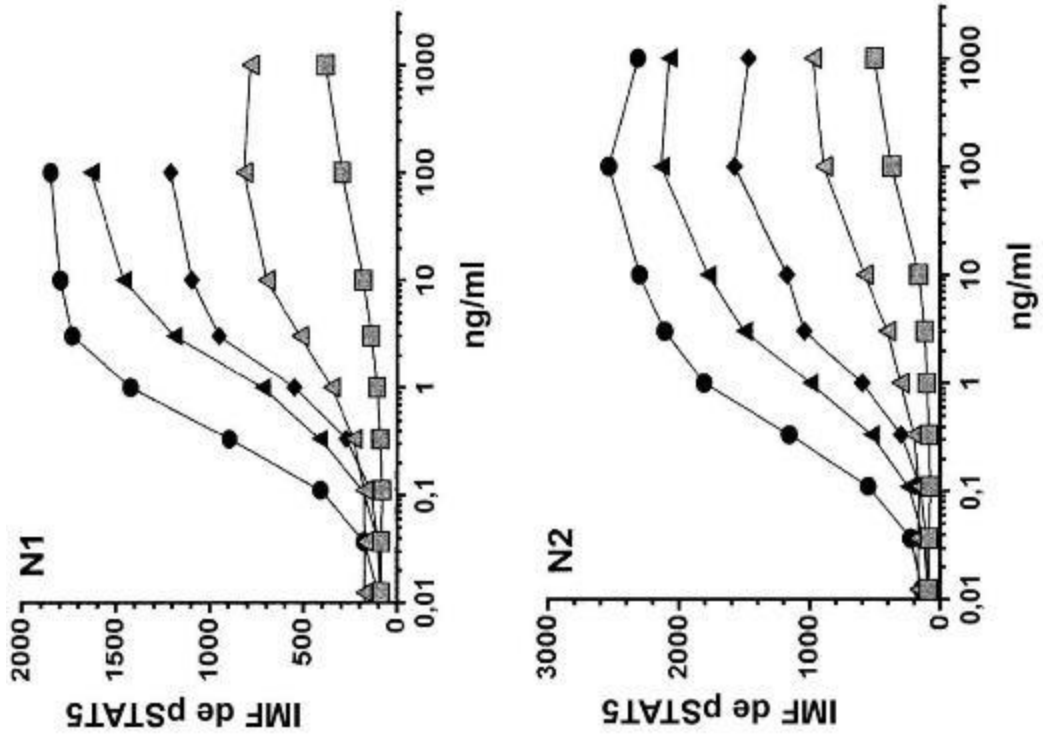


Figura 13

- Treg activados
- ▲ Treg de memoria
- ◆ Treg indiferenciados
- Linfocitos T efectores de memoria CD4⁺
- △ NK CD56^{fuerte}

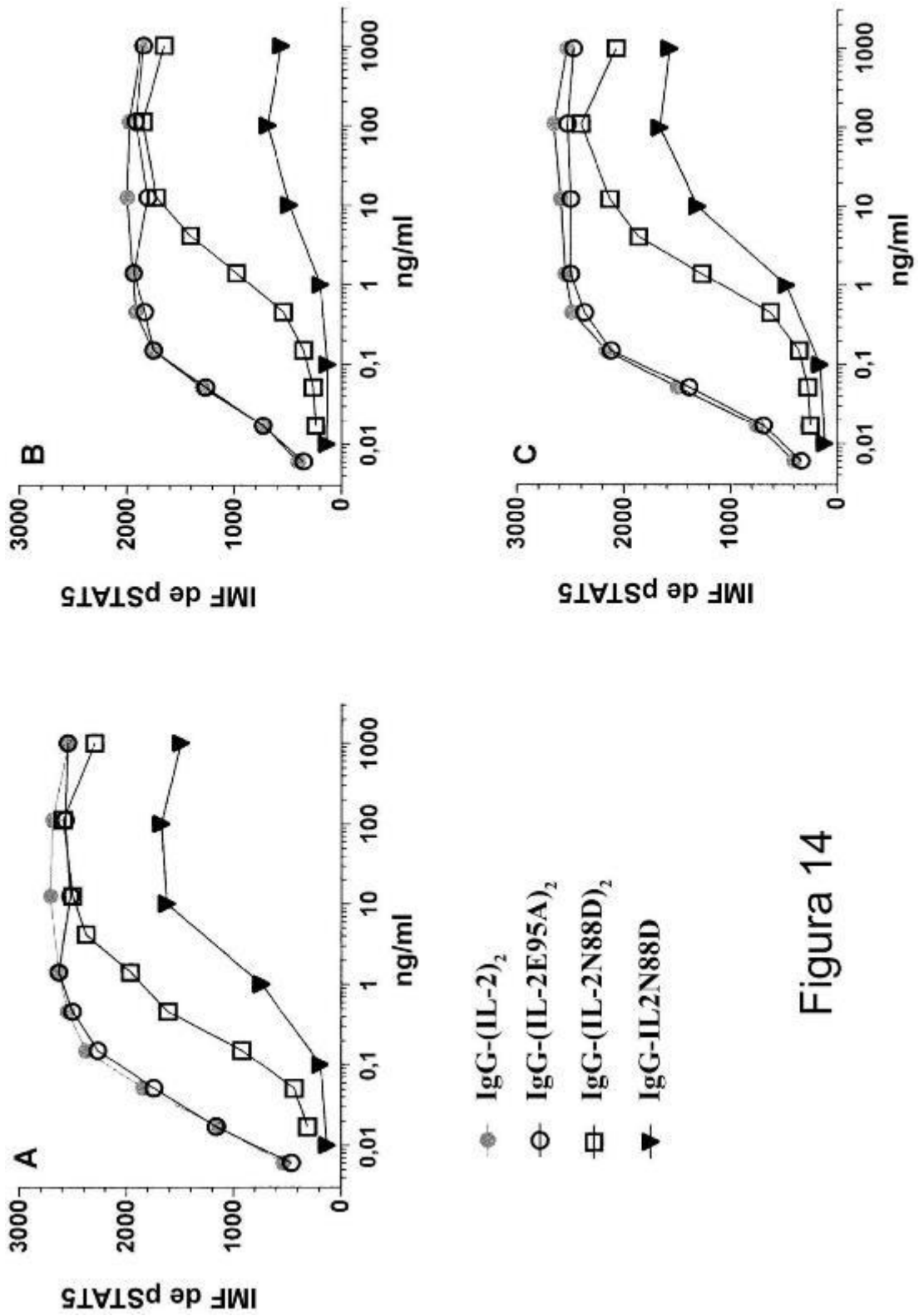
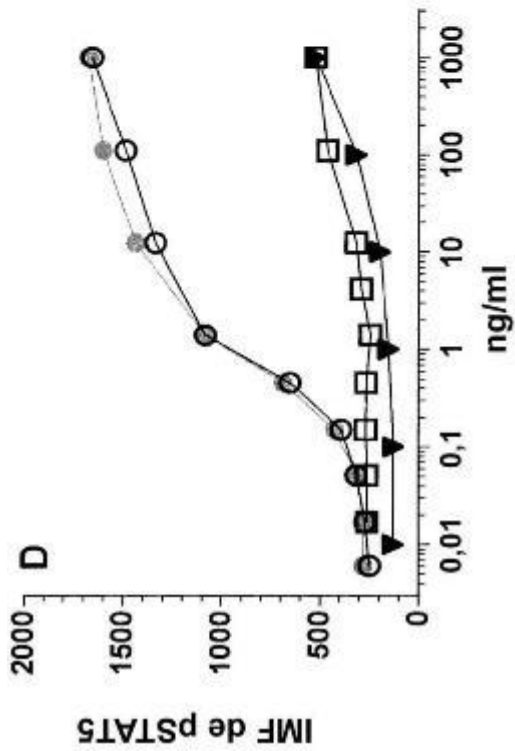
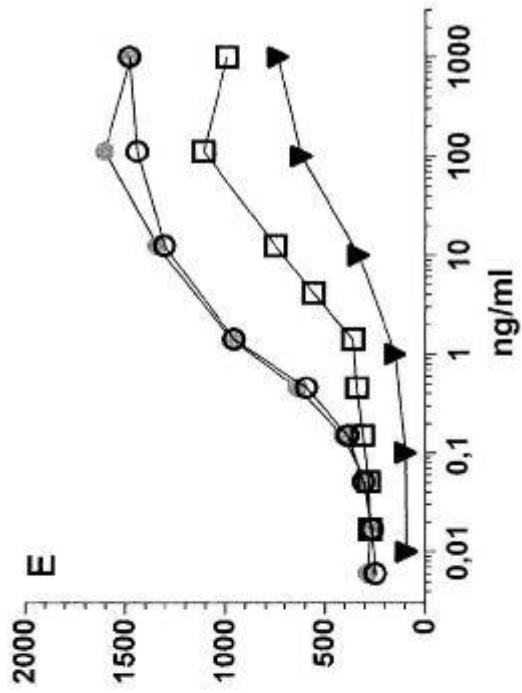


Figura 14



- IgG-(IL-2)₂
- IgG-(IL-2E95A)₂
- IgG-(IL-2N88D)₂
- ▼ IgG-IL2N88D

Figura 14

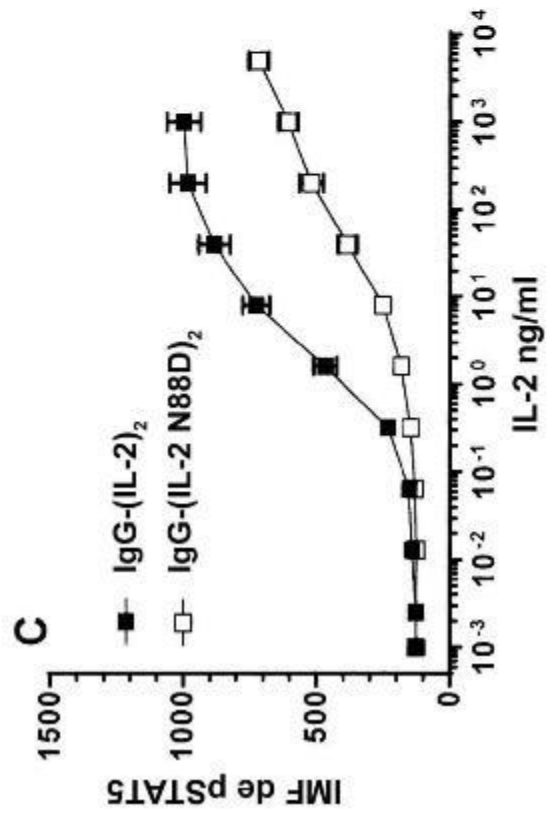
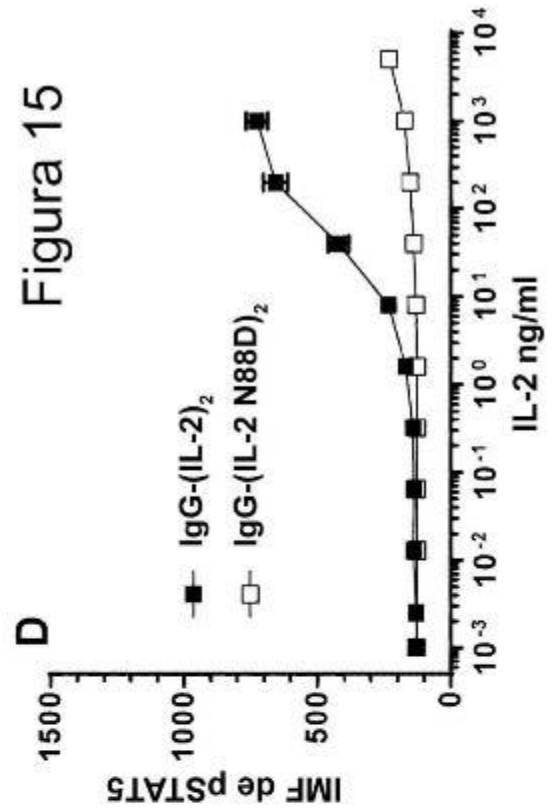
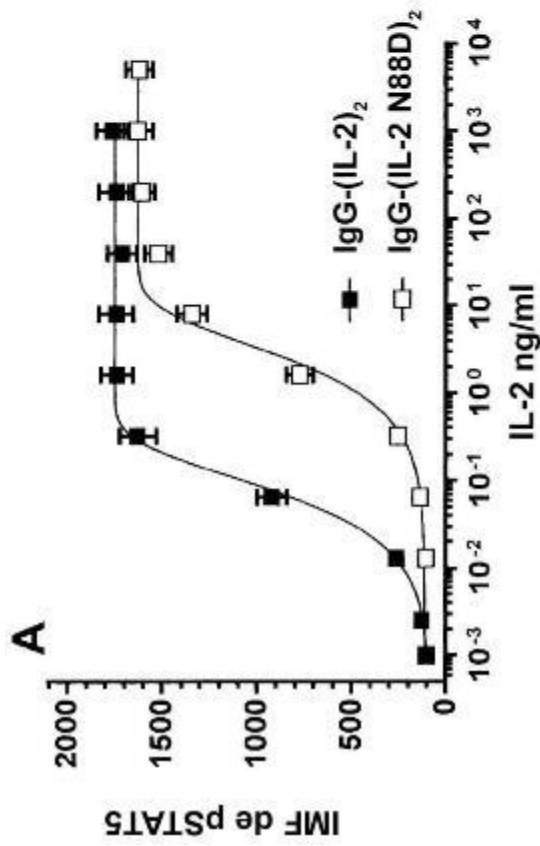
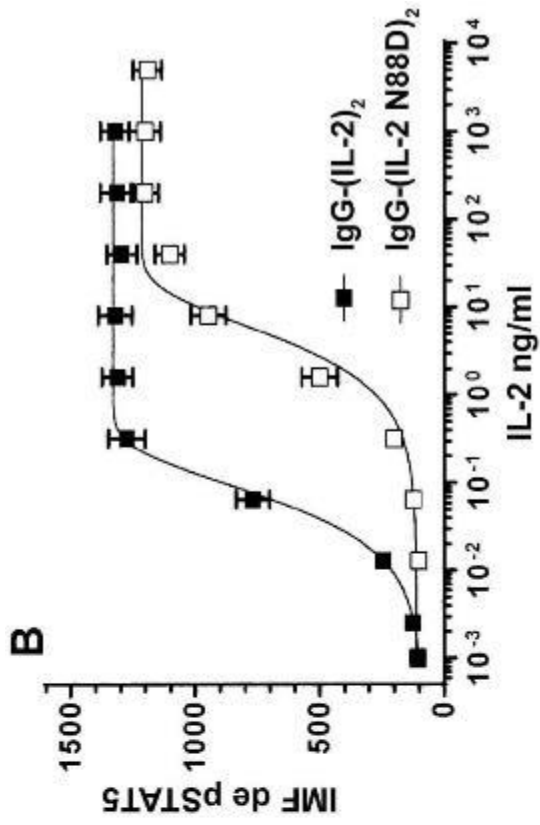


Figura 15

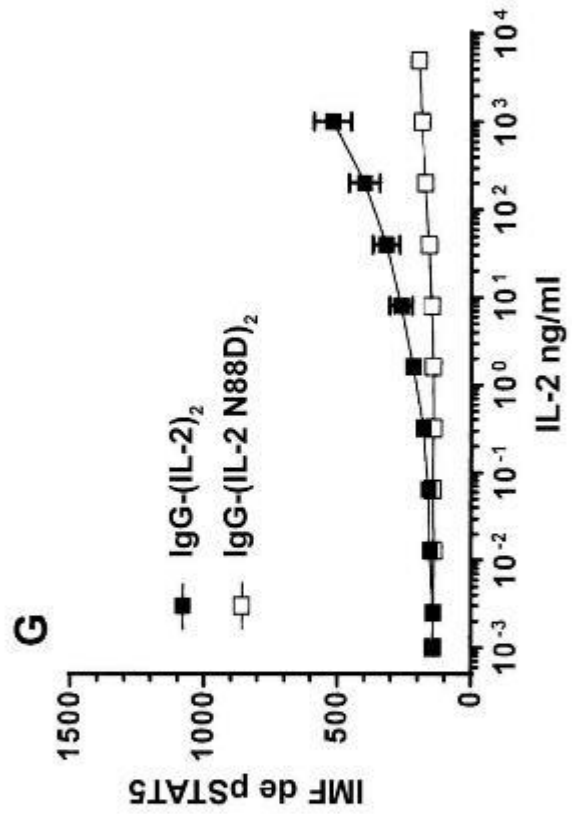
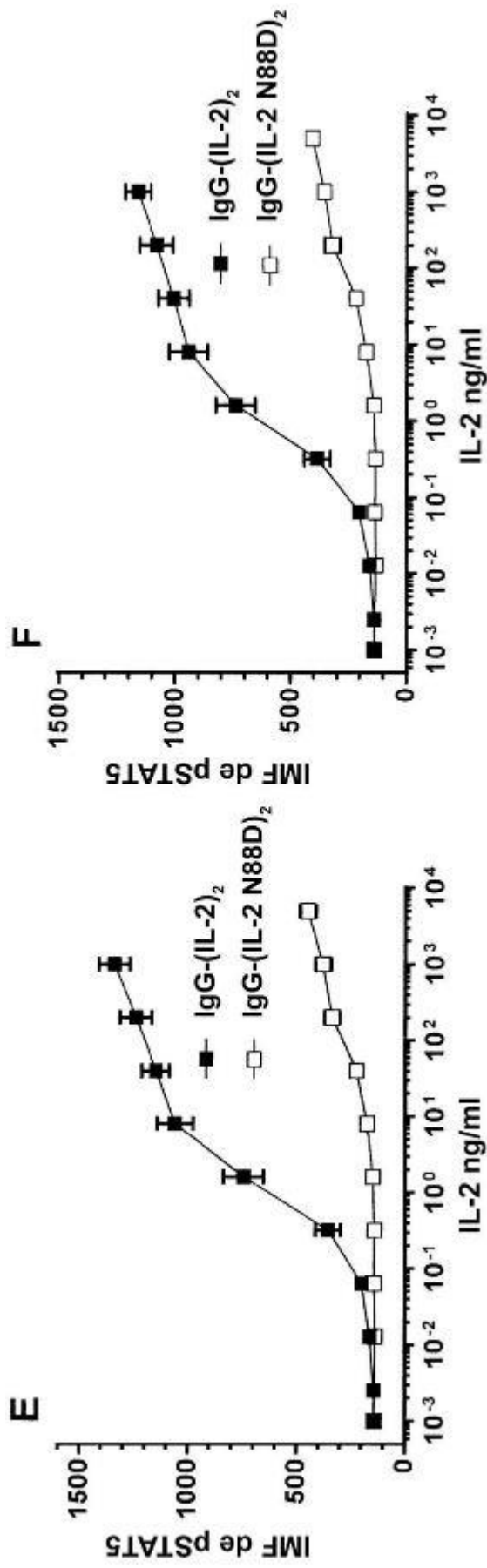
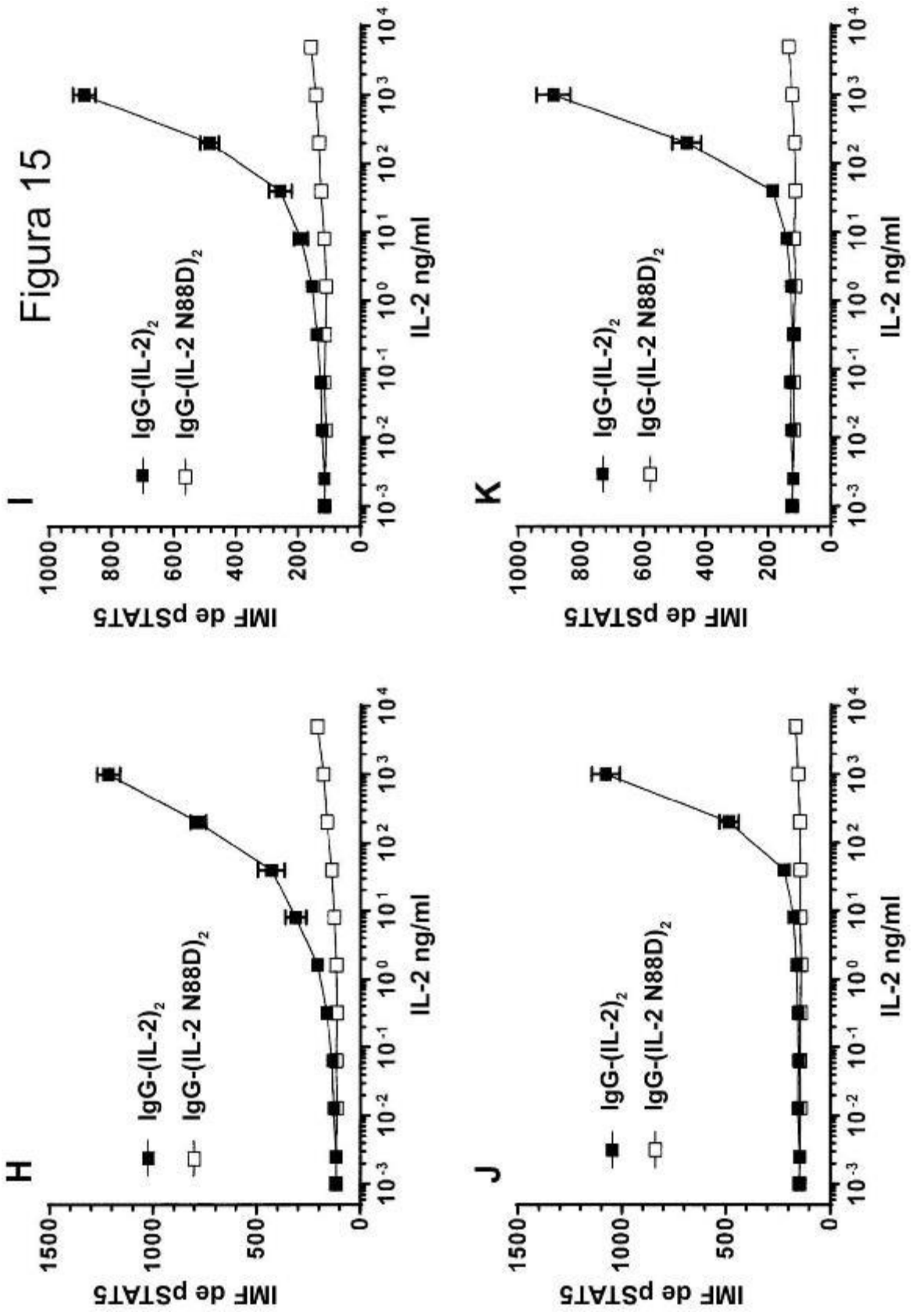


Figura 15



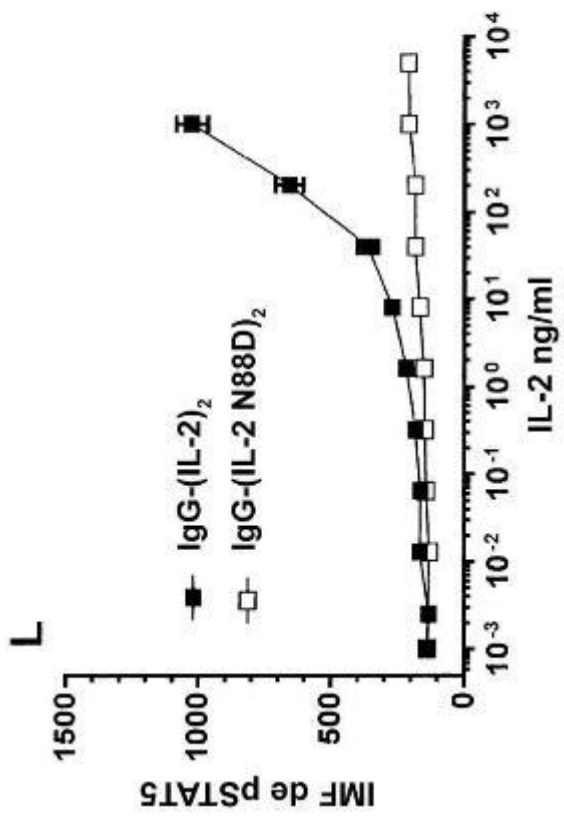
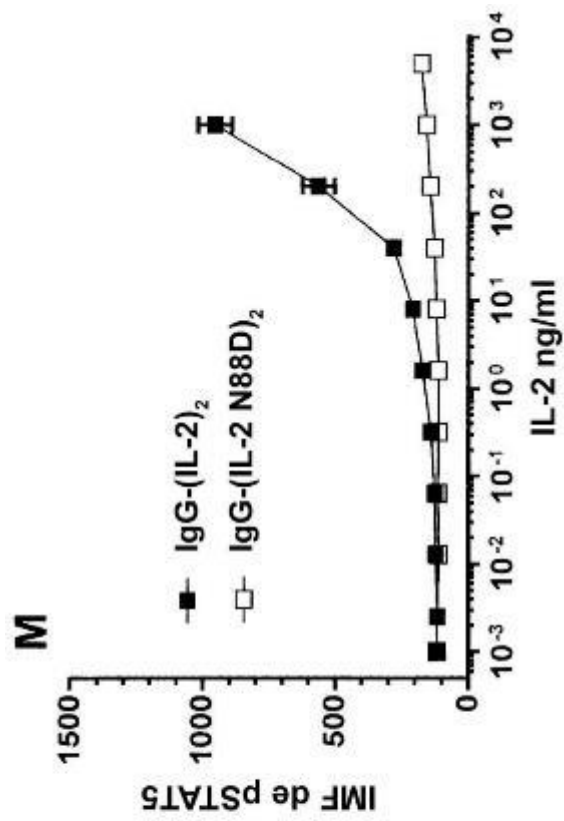


Figura 15

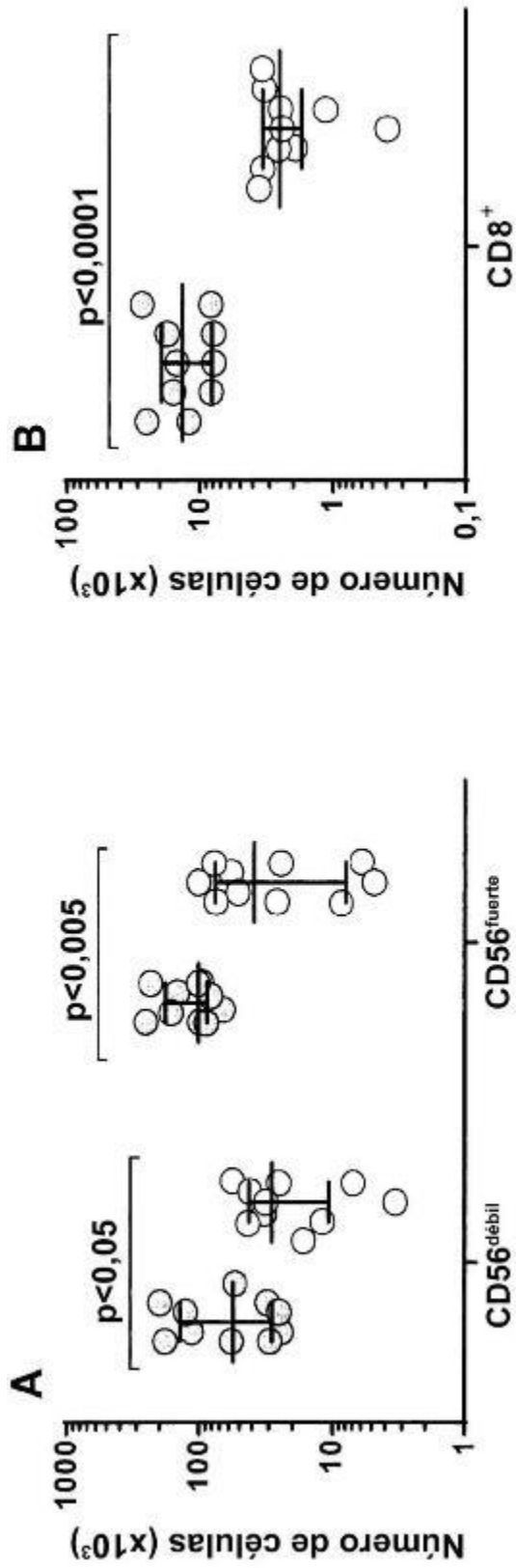


Figura 16

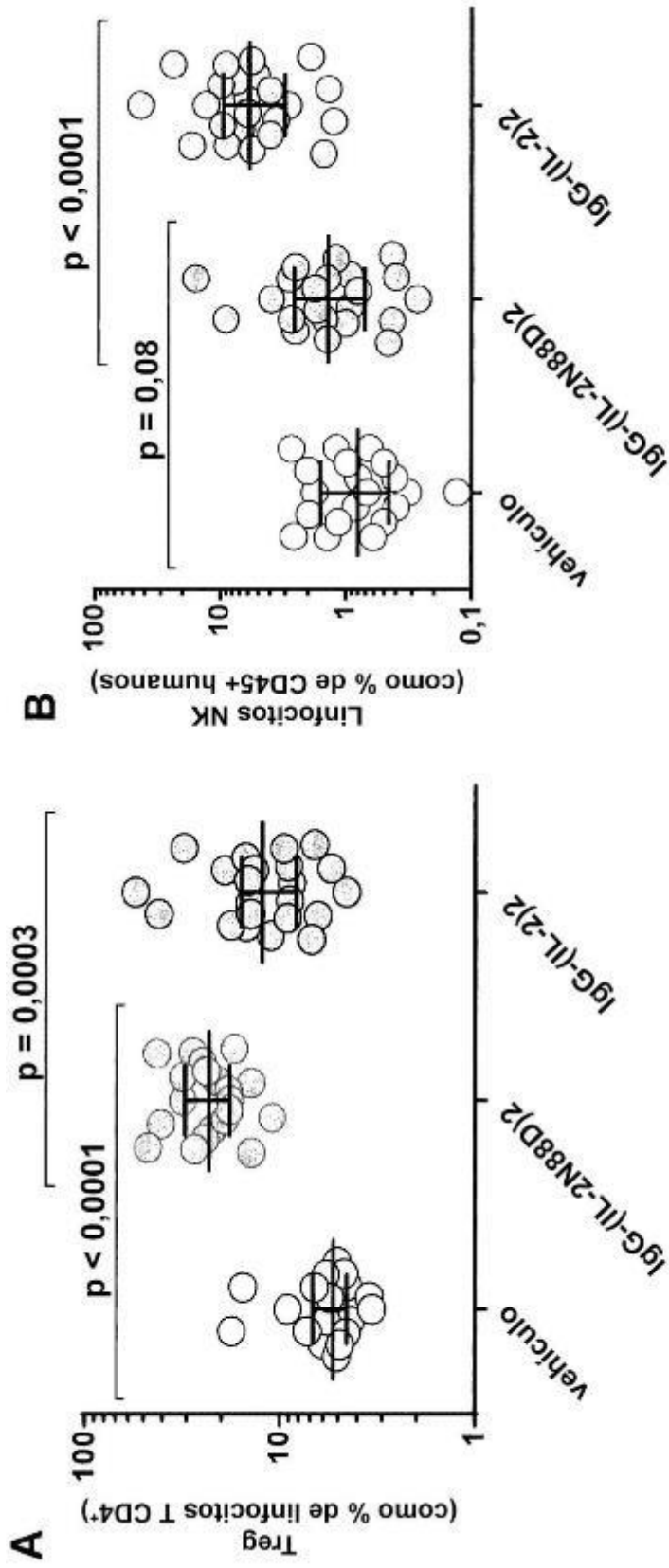


Figura 17

Figura 18

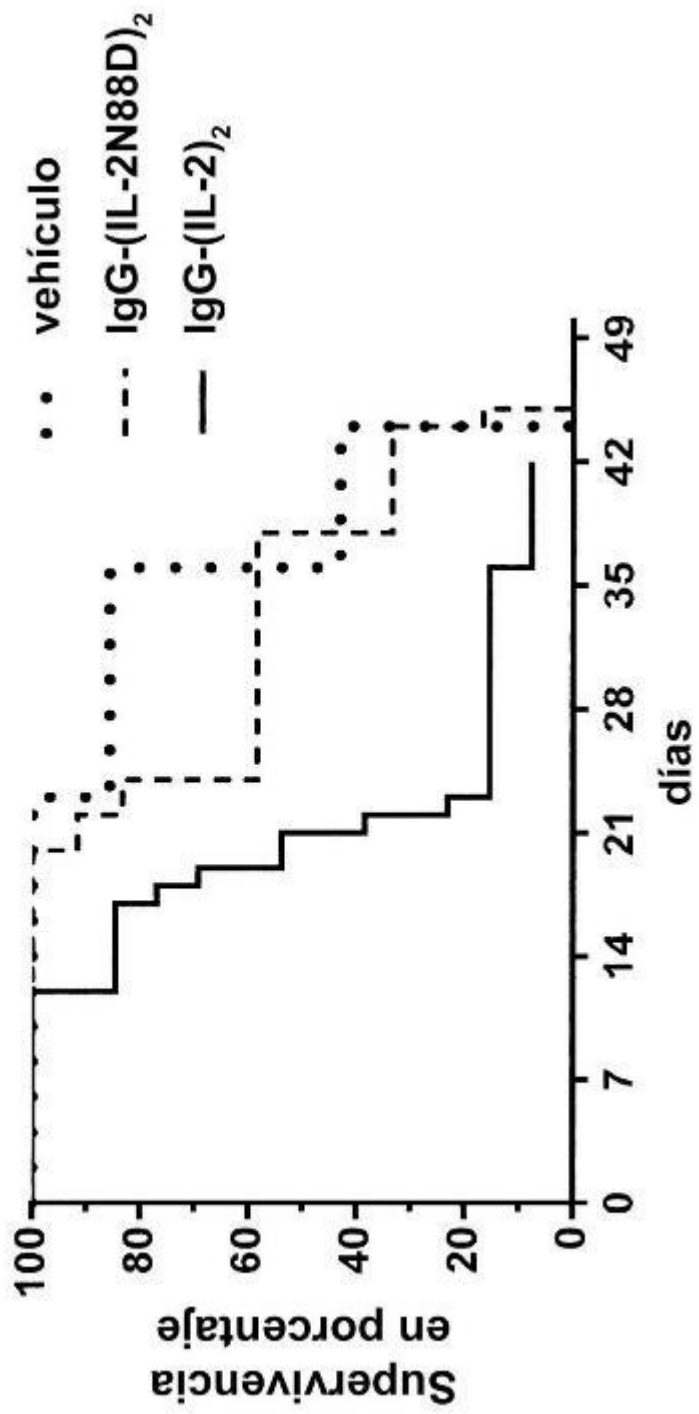
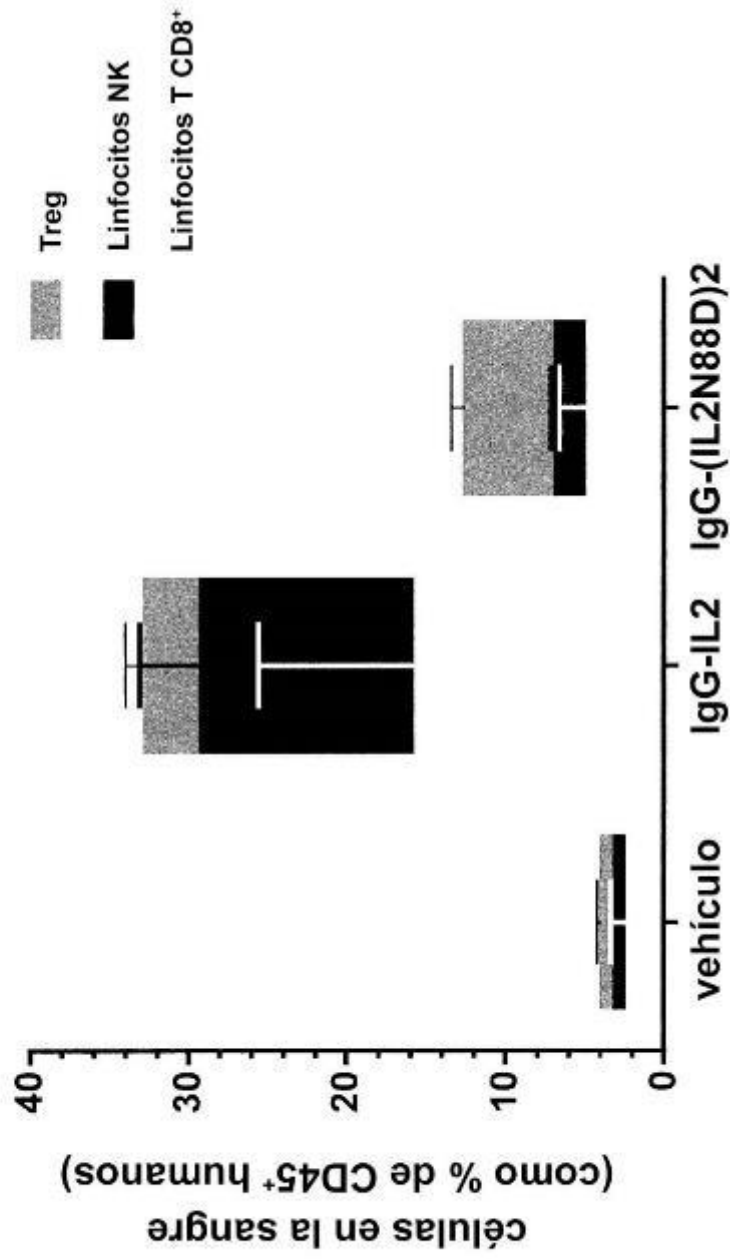


Figura 19



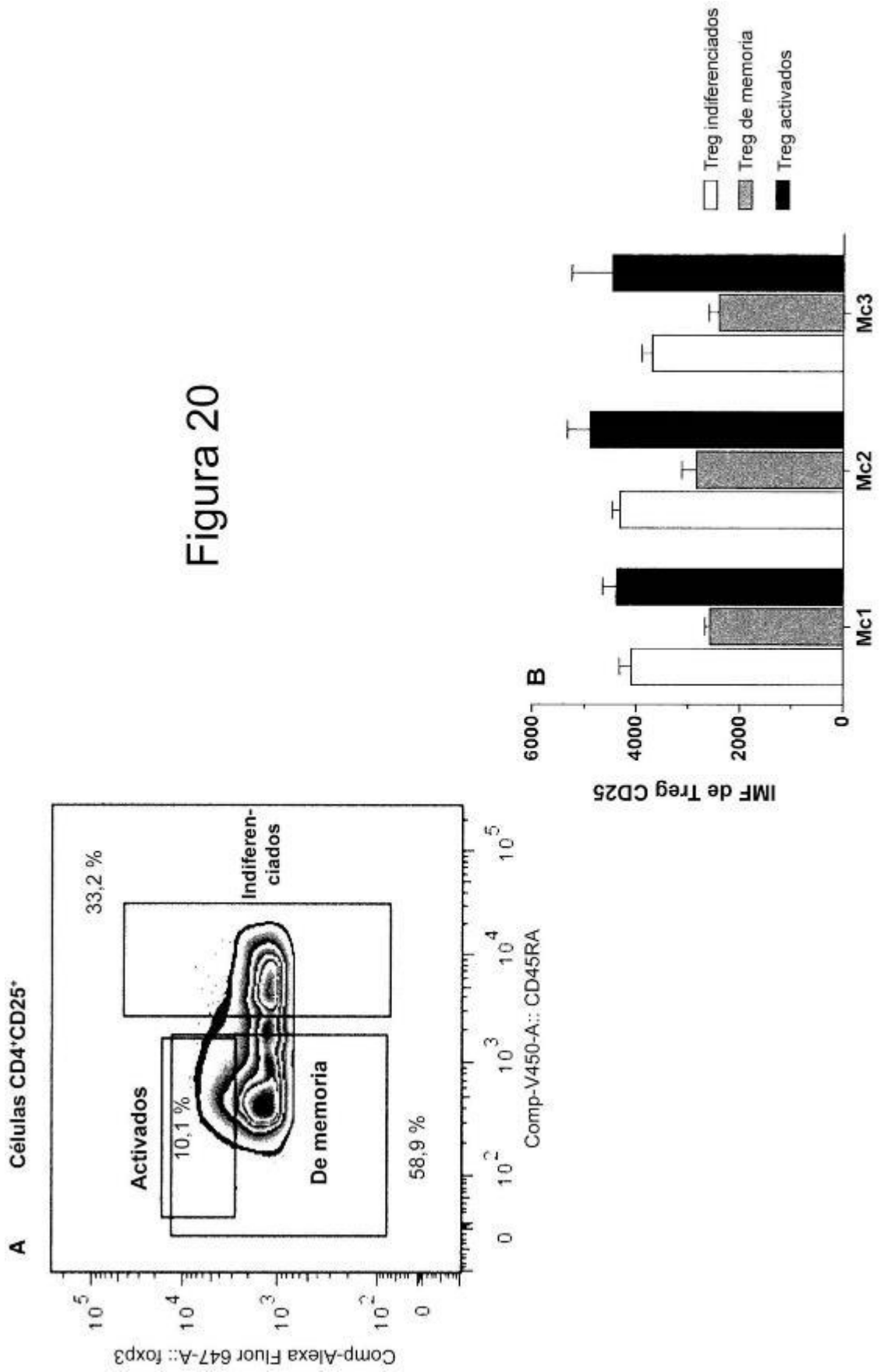


Figura 20

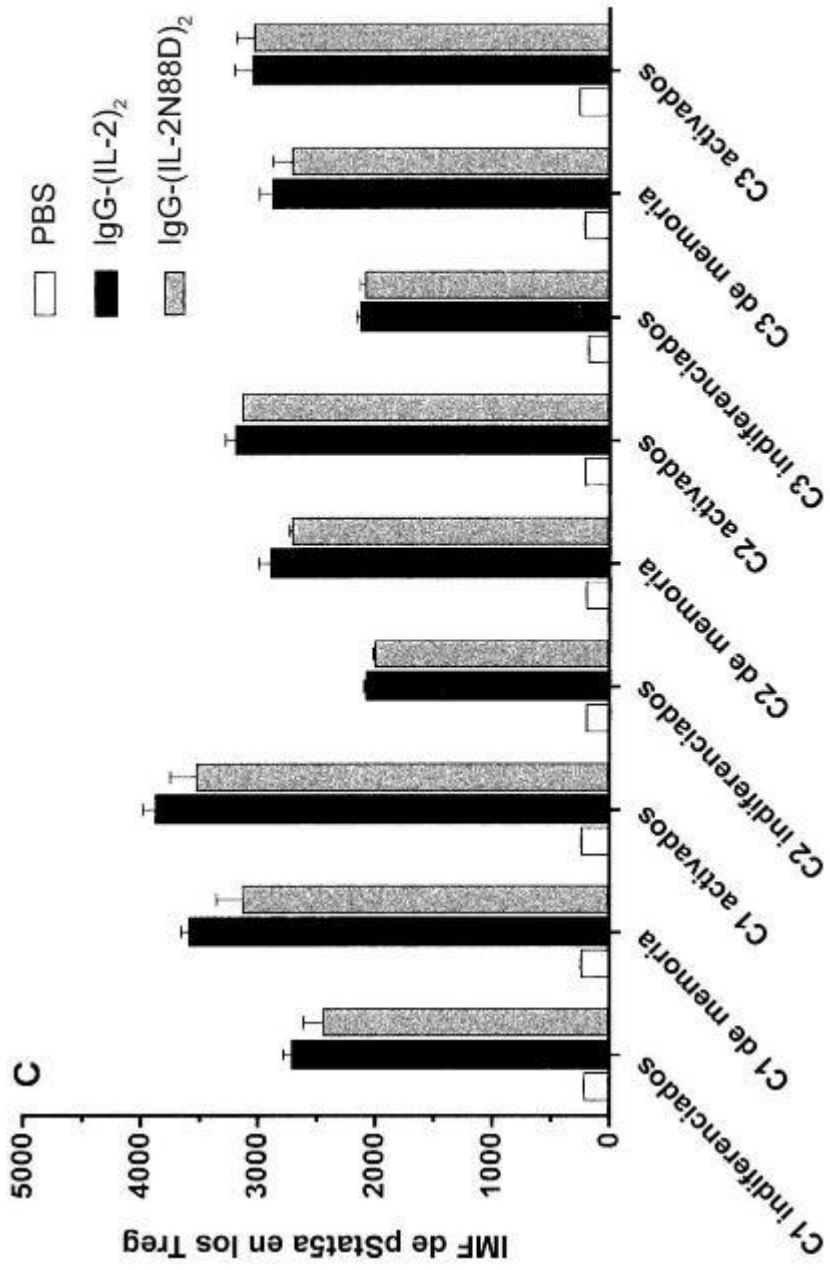


Figura 20

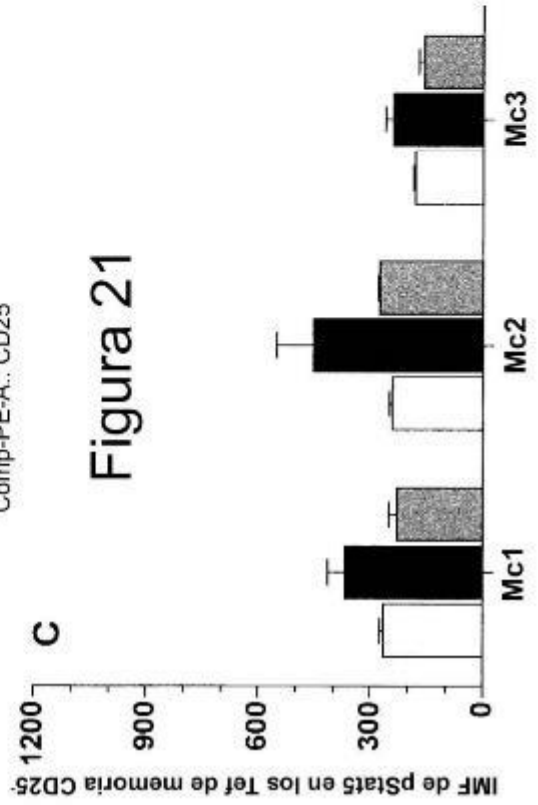
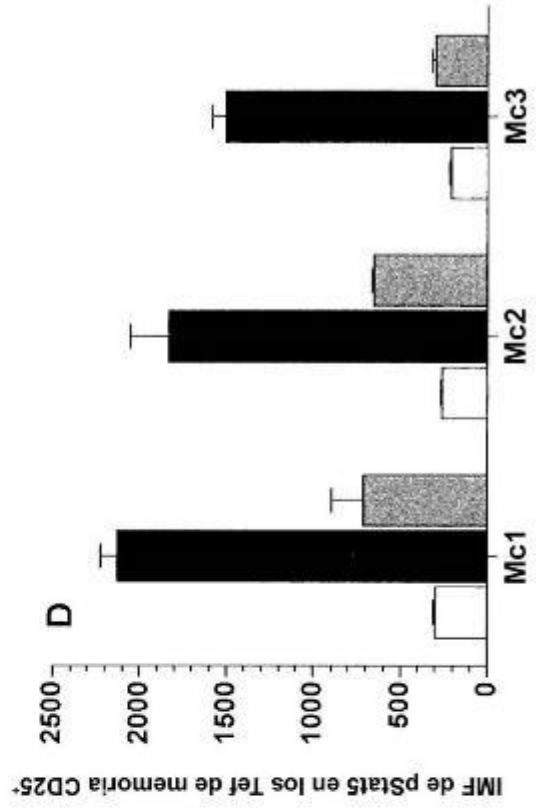
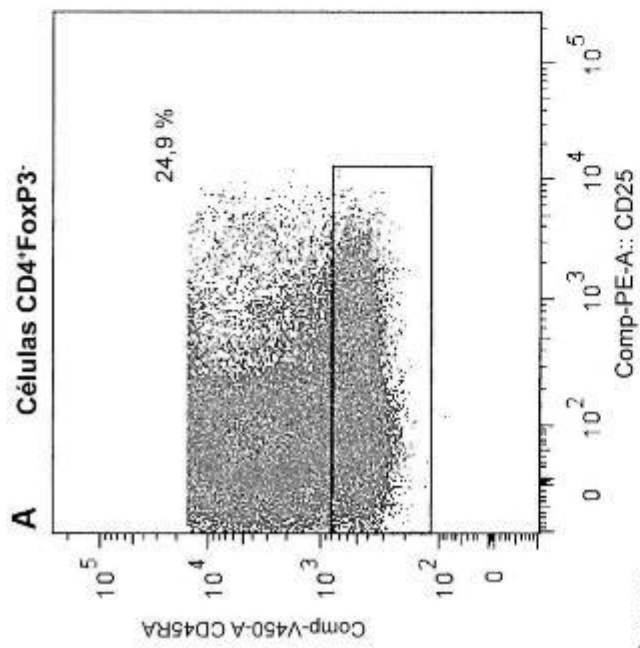
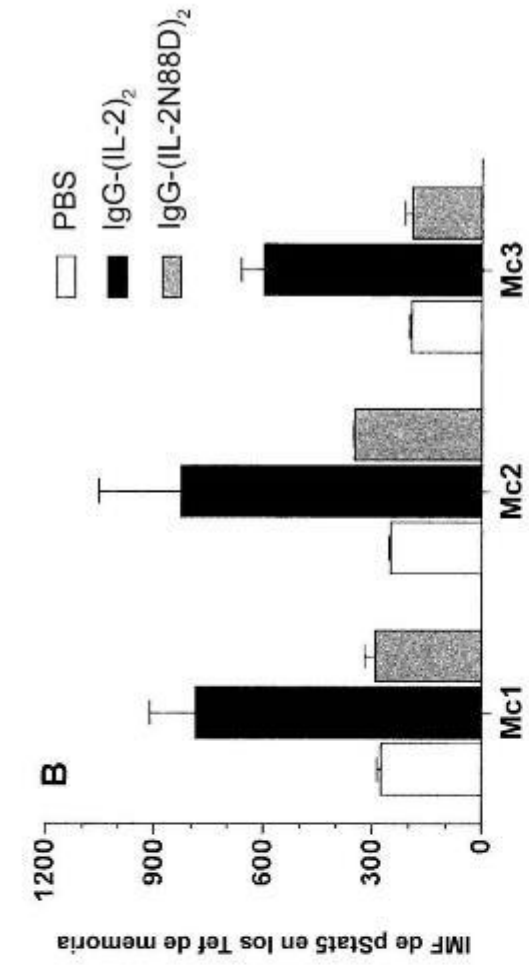
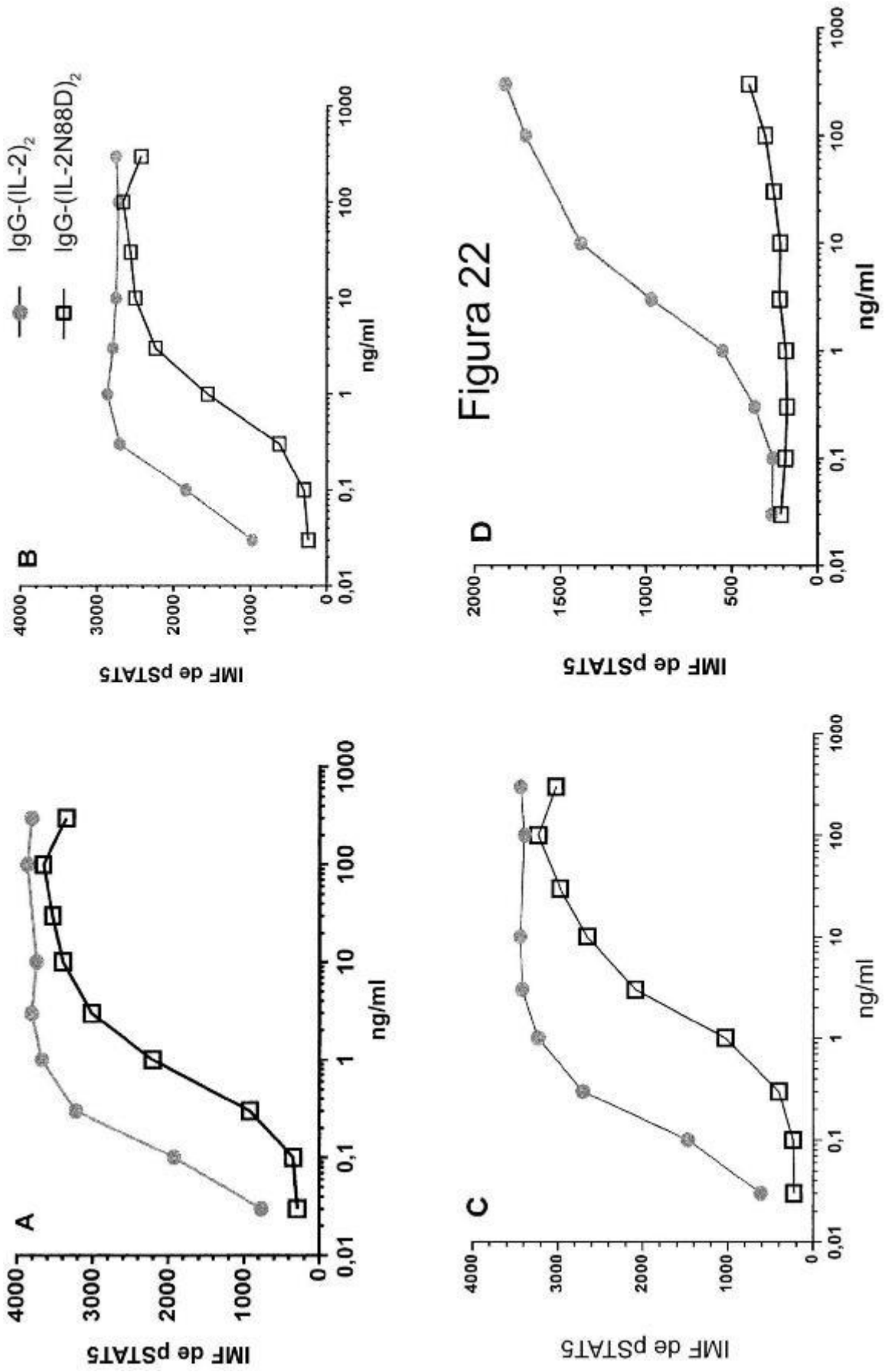


Figura 21



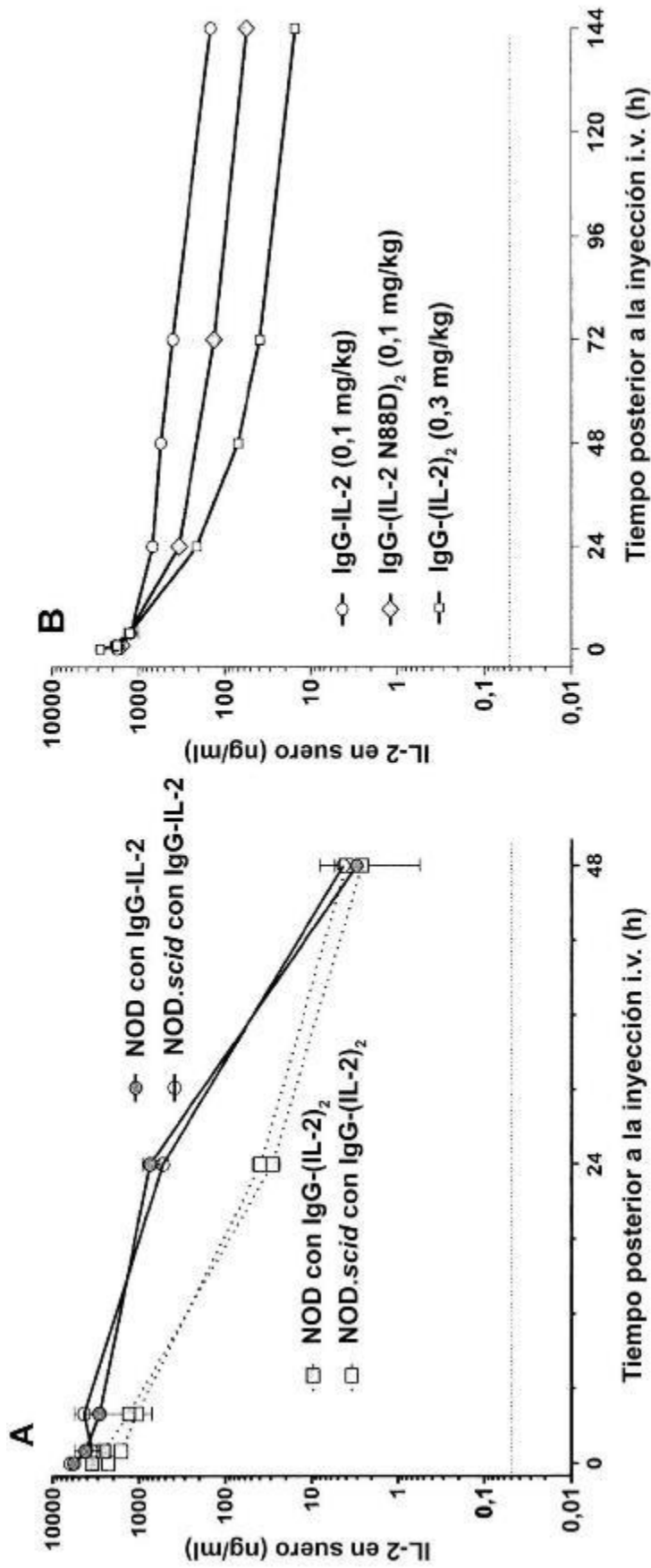


Figura 23

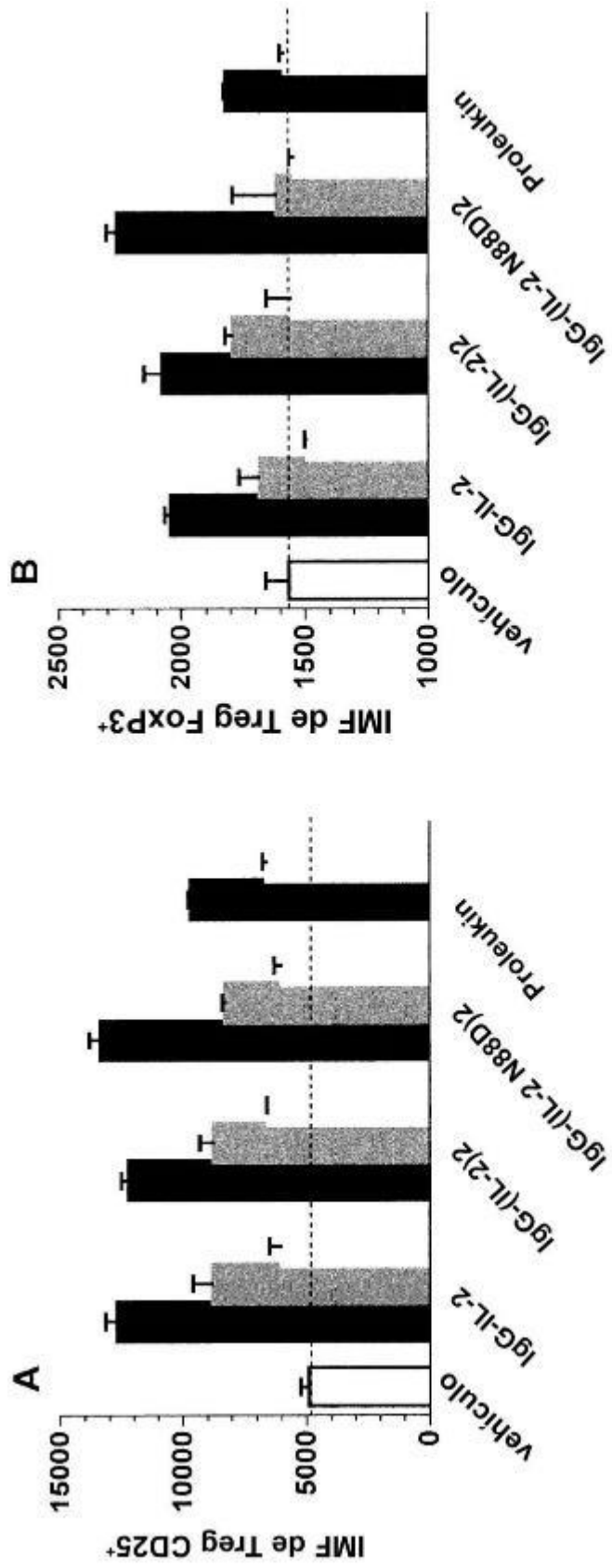


Figura 24

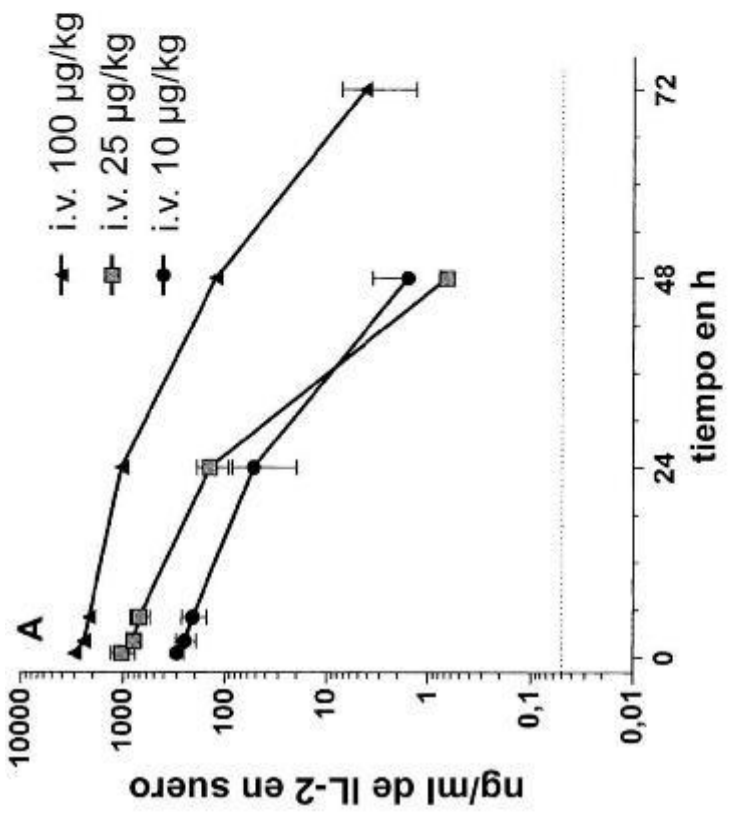
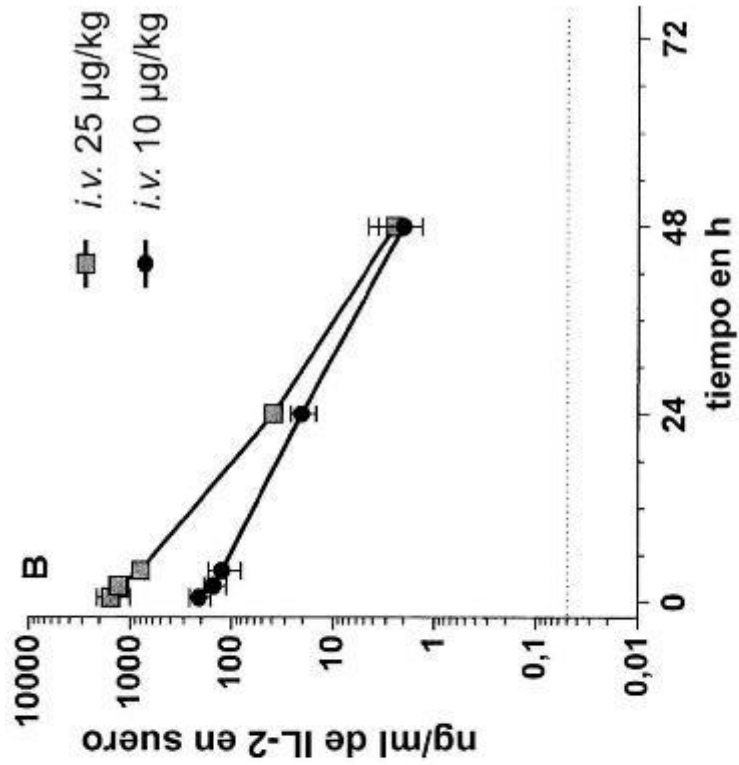


Figura 25

Figura 26

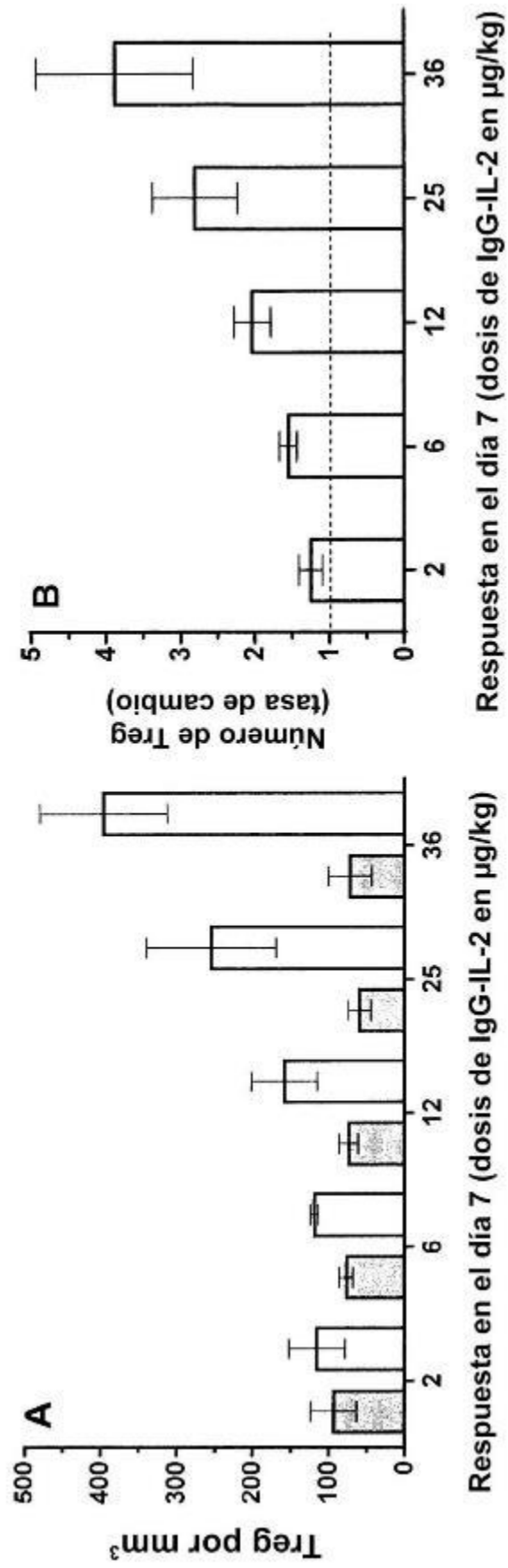
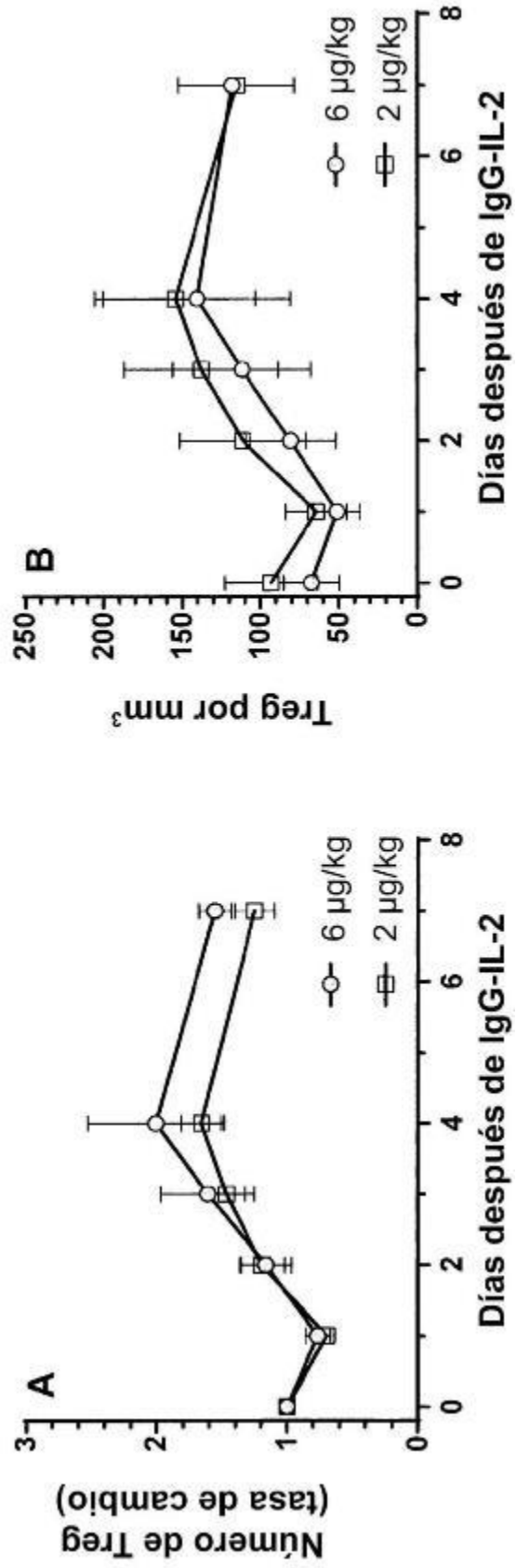


Figura 27



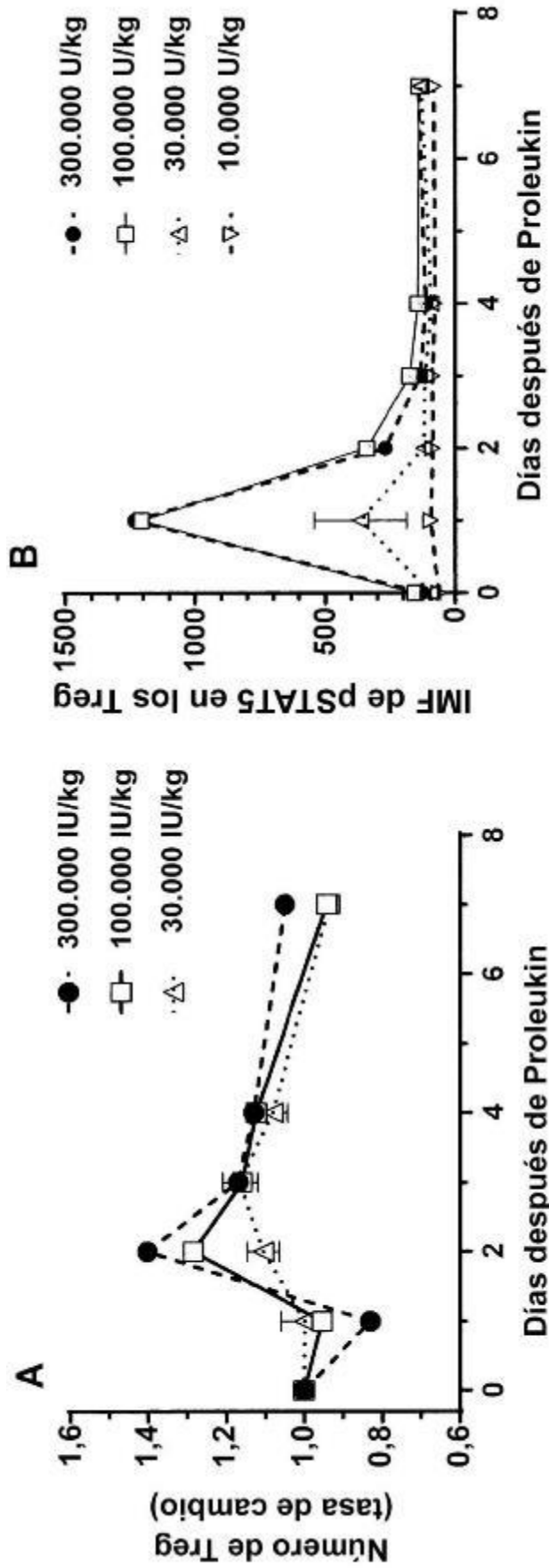
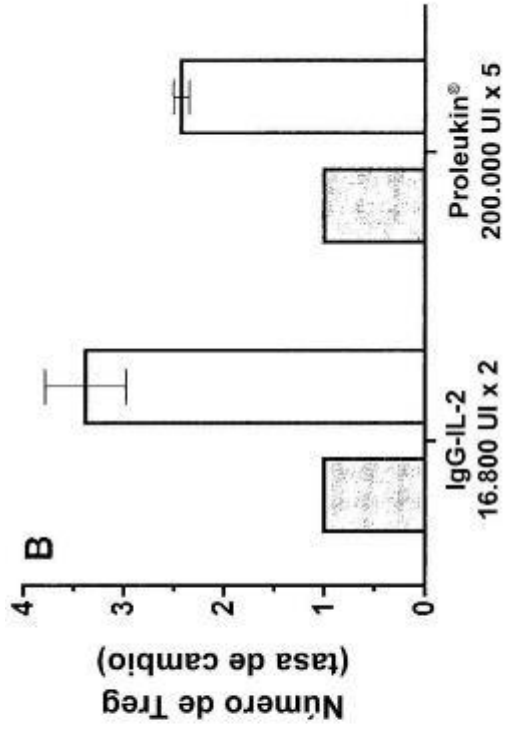
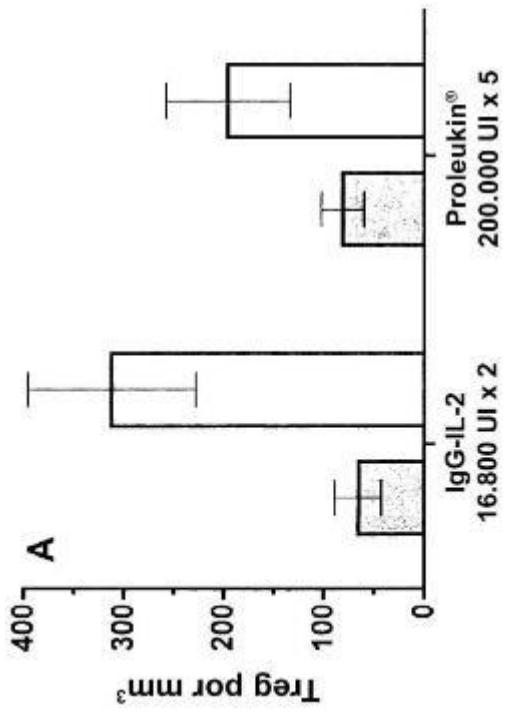


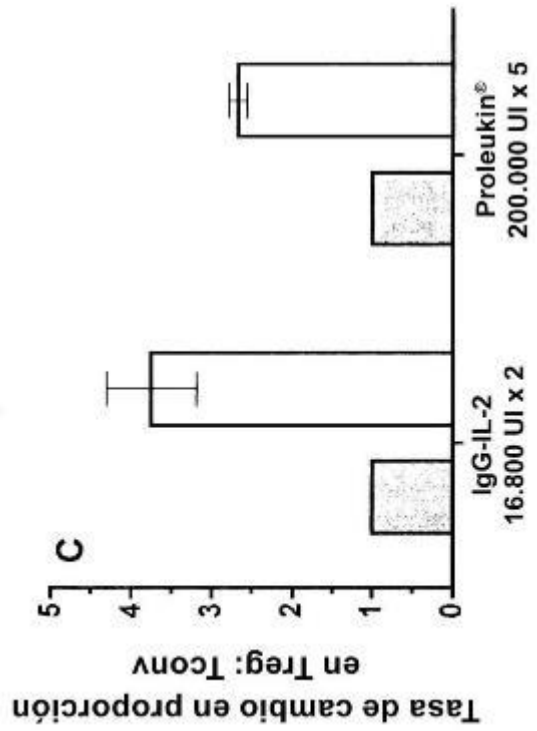
Figura 28



Respuesta en el día 10



Respuesta en el día 10



Respuesta en el día 10

Figura 29

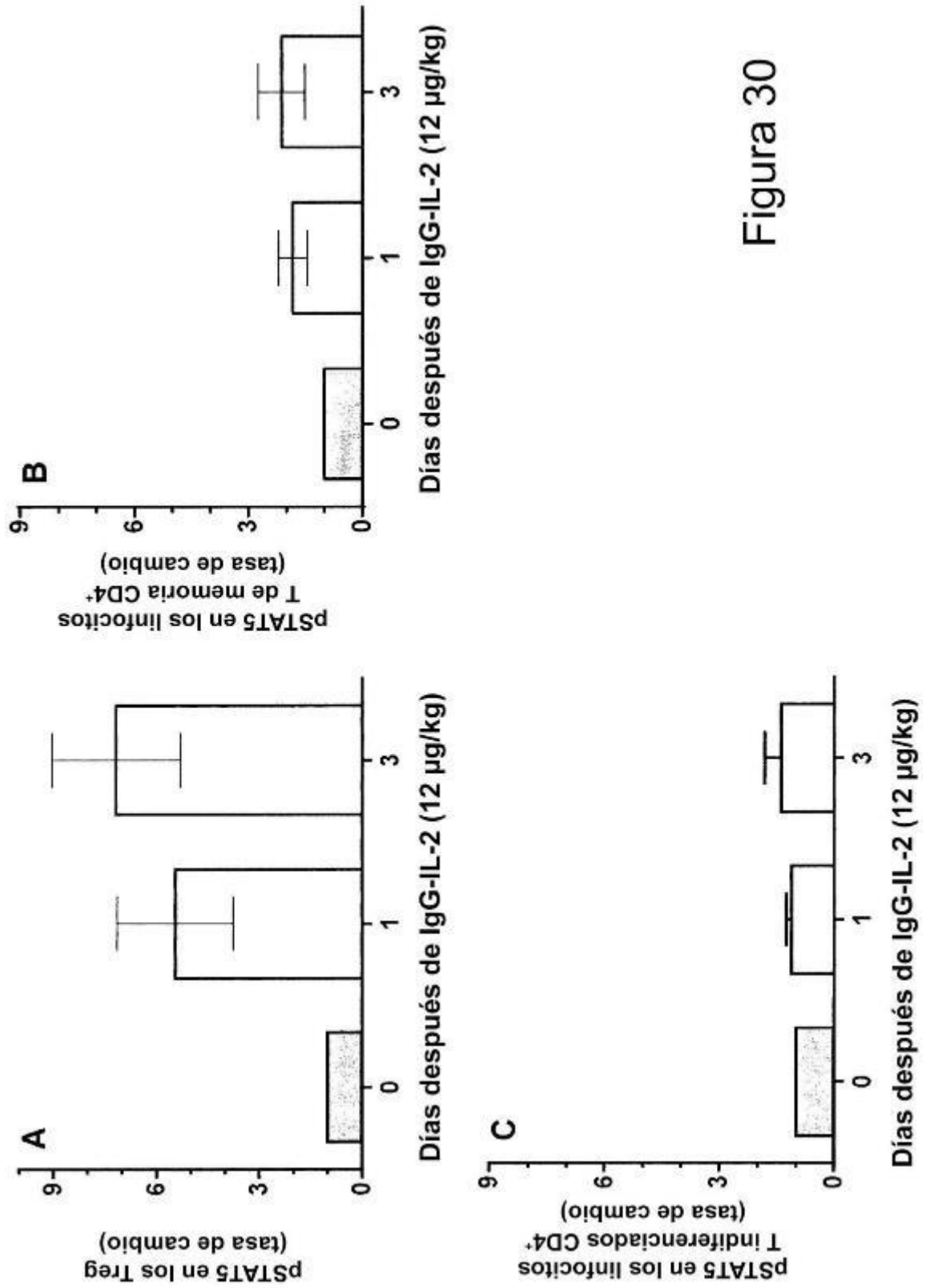


Figura 30

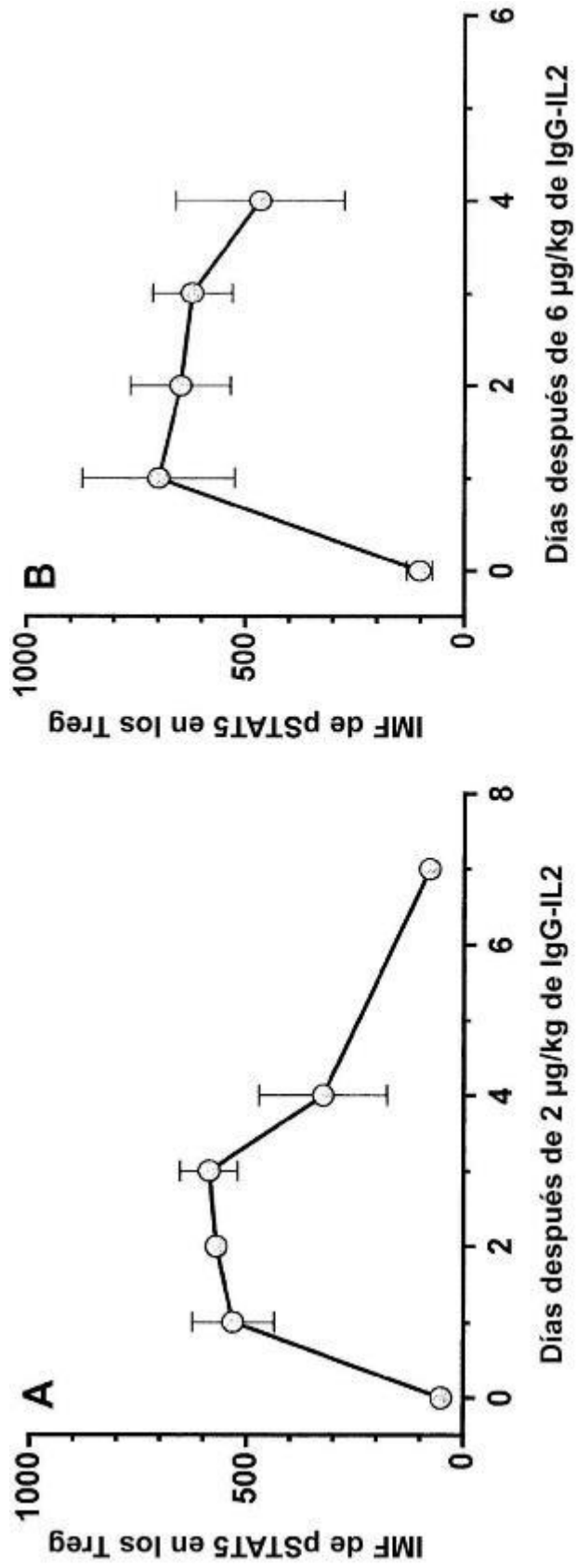


Figura 31

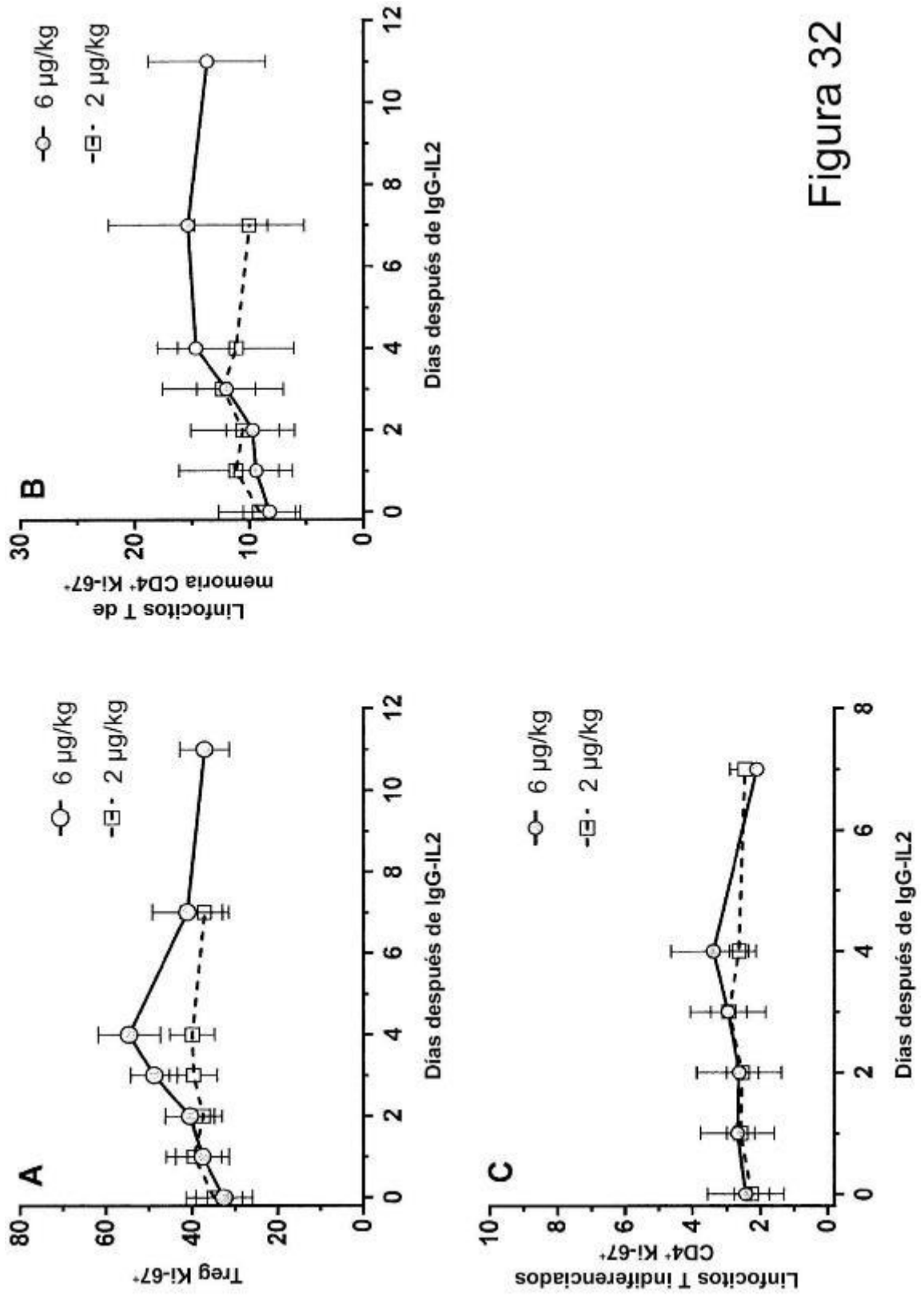


Figura 32

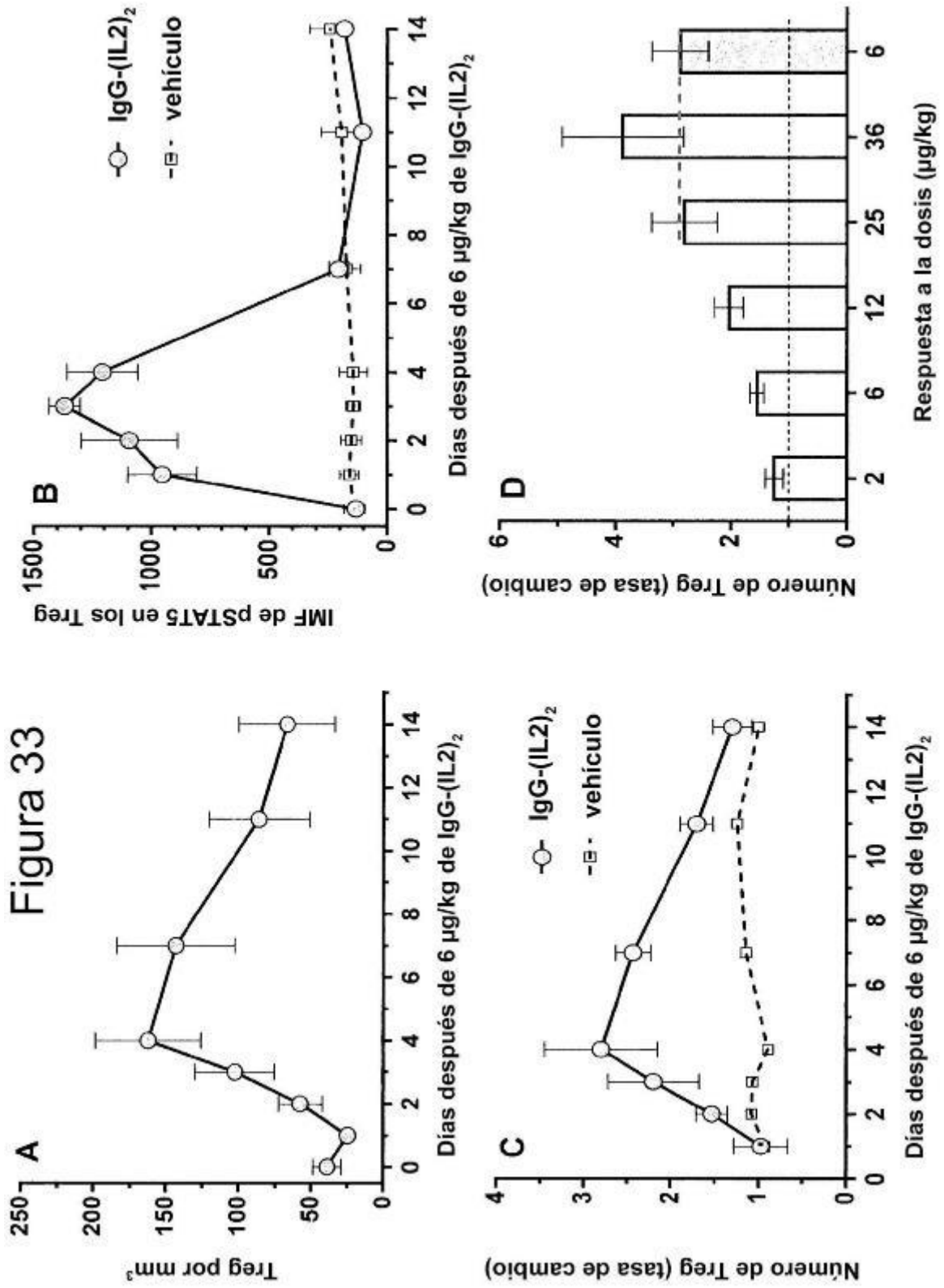
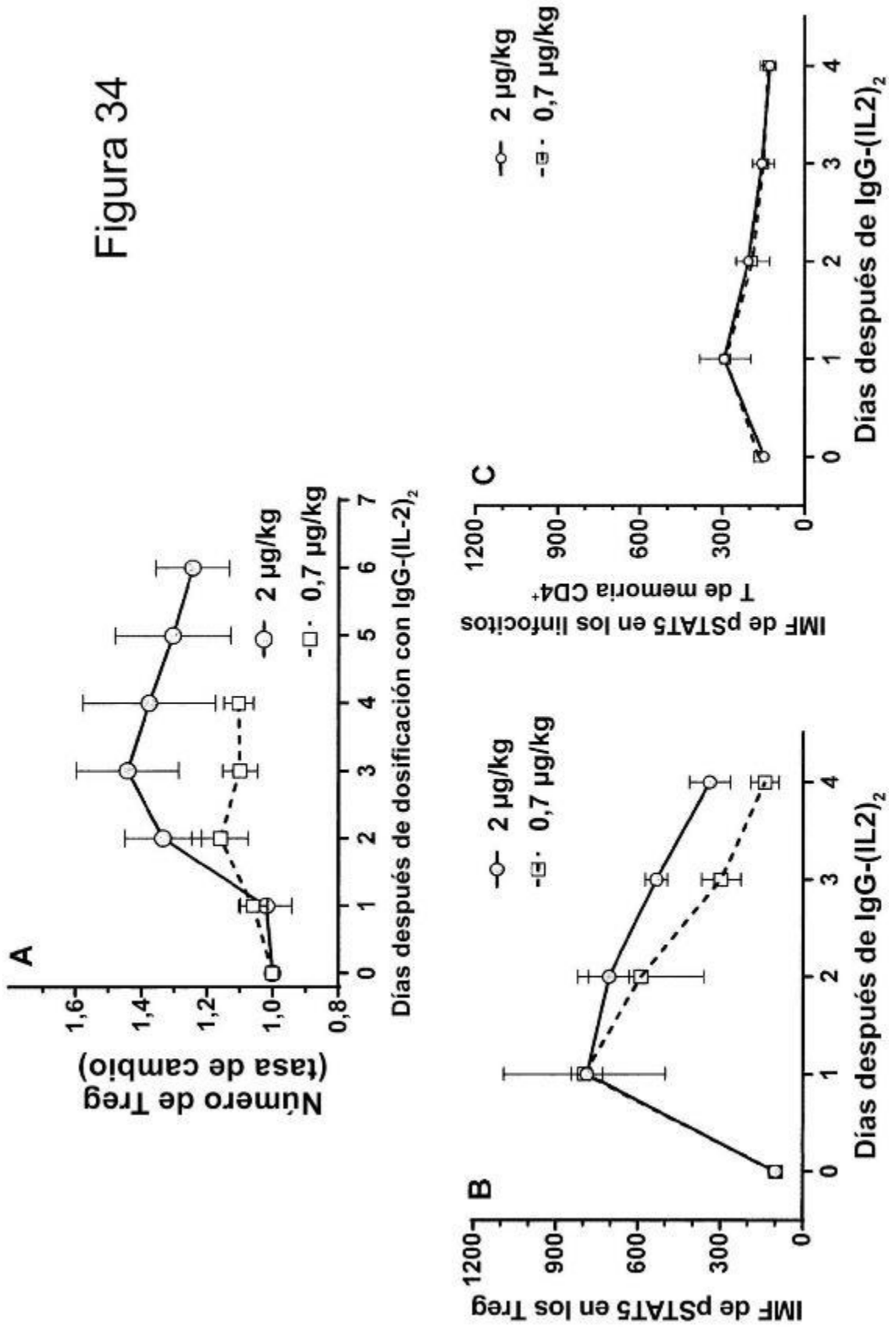


Figura 34



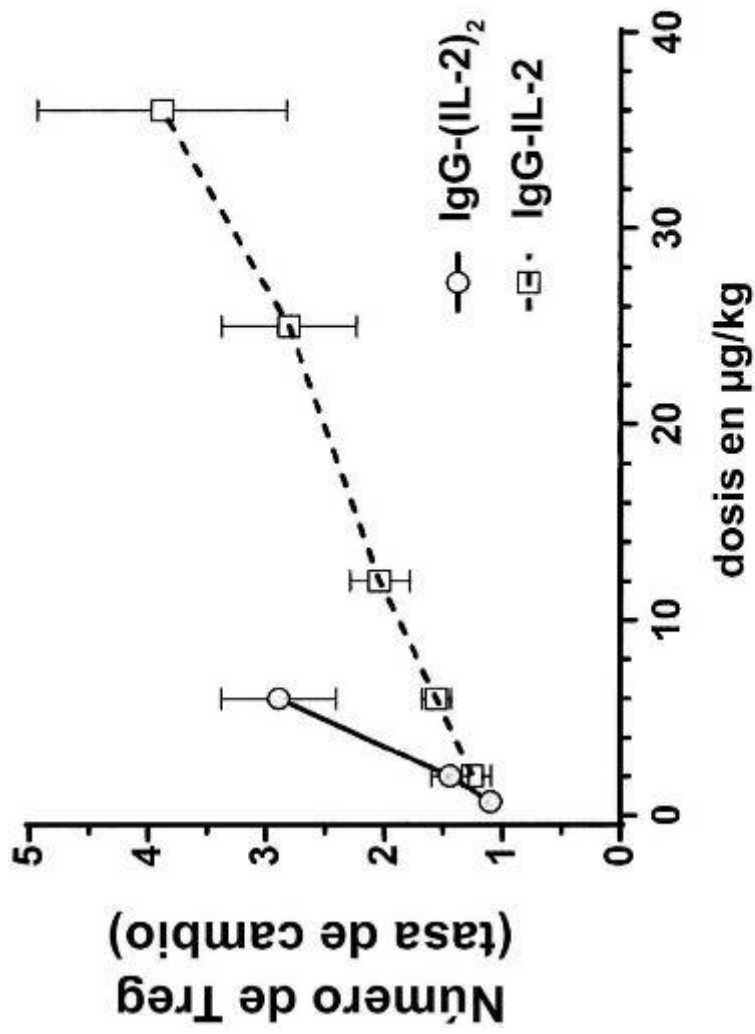
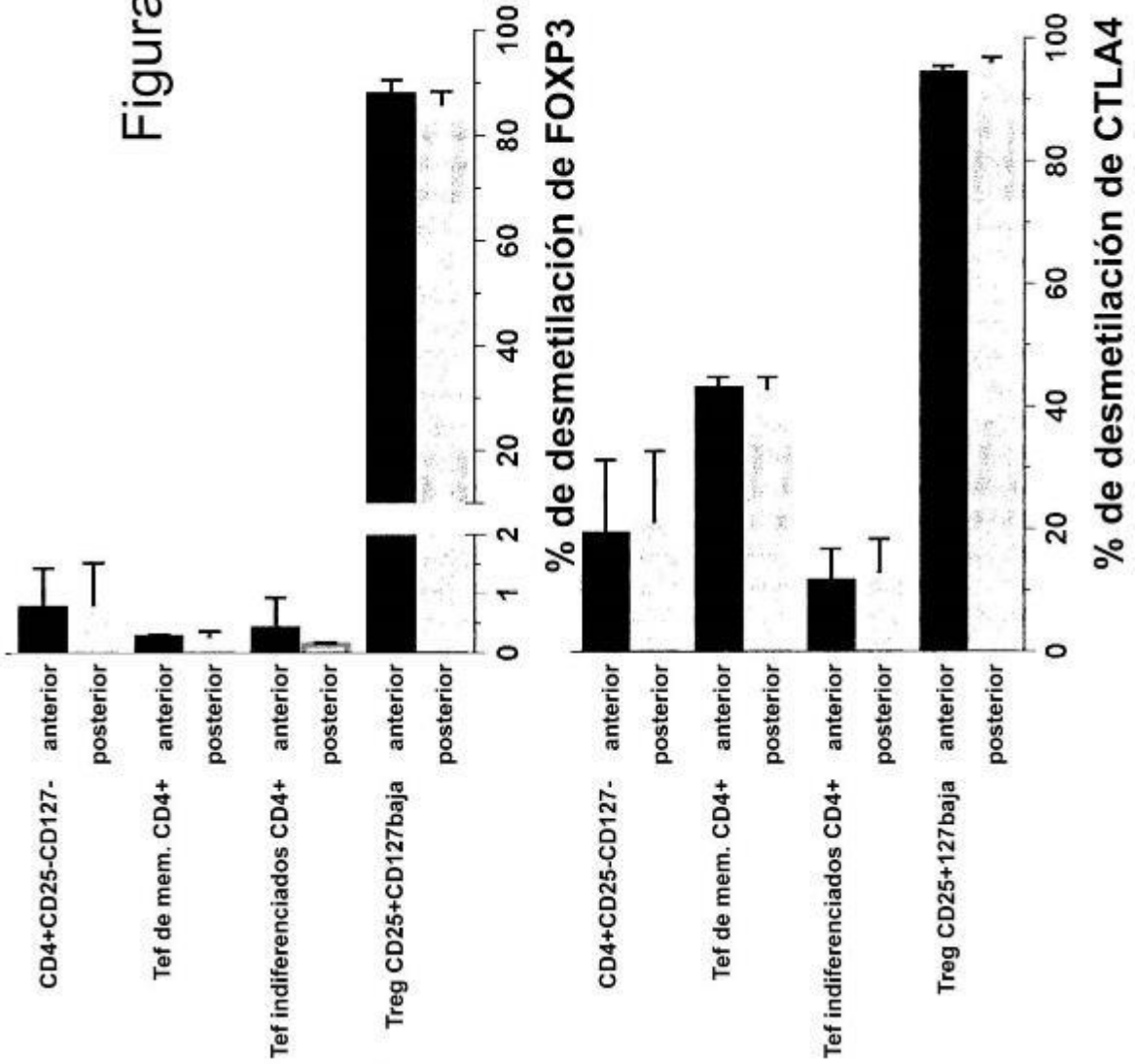


Figura 35

Figura 36



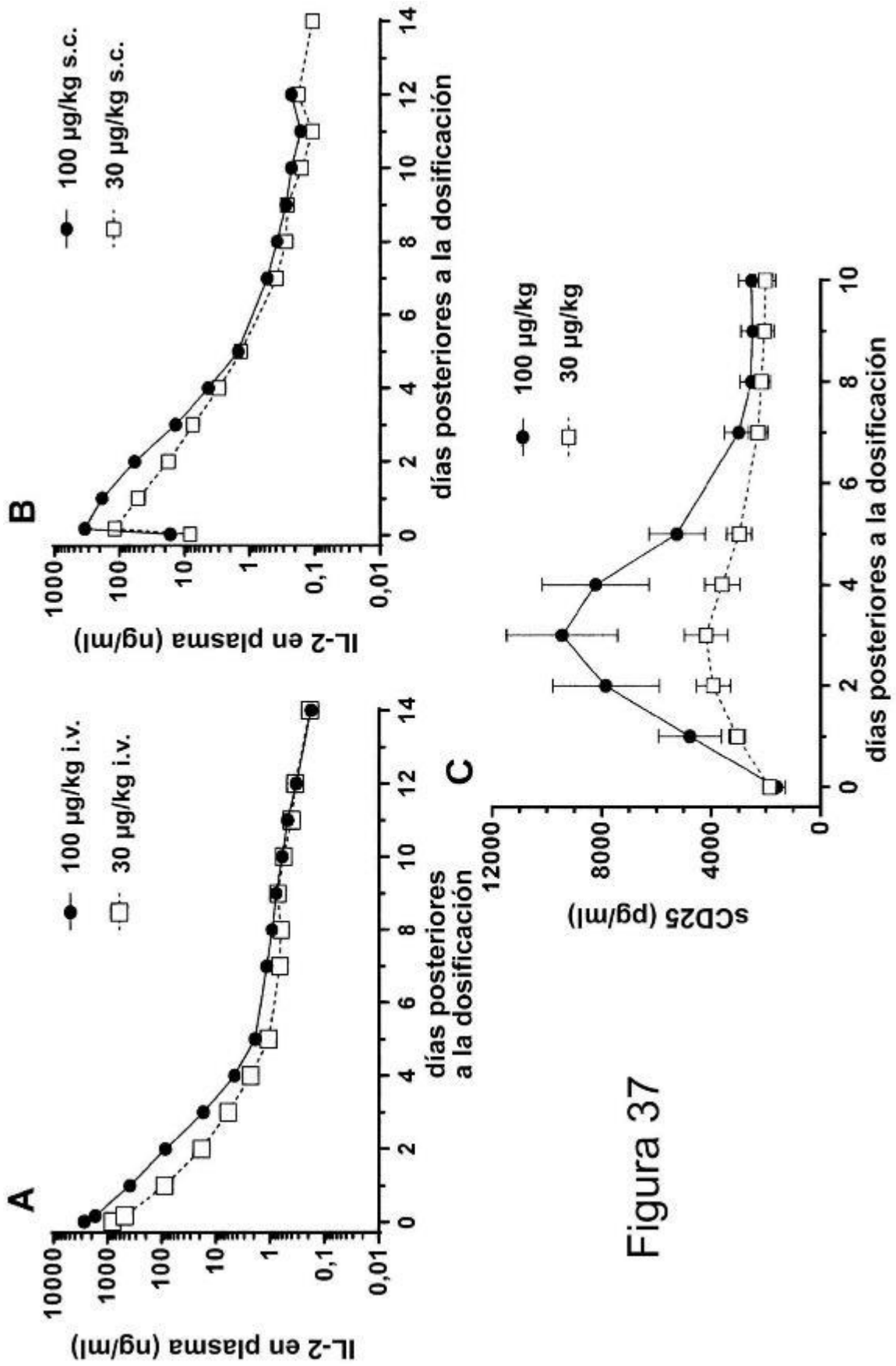


Figura 37

Figura 38

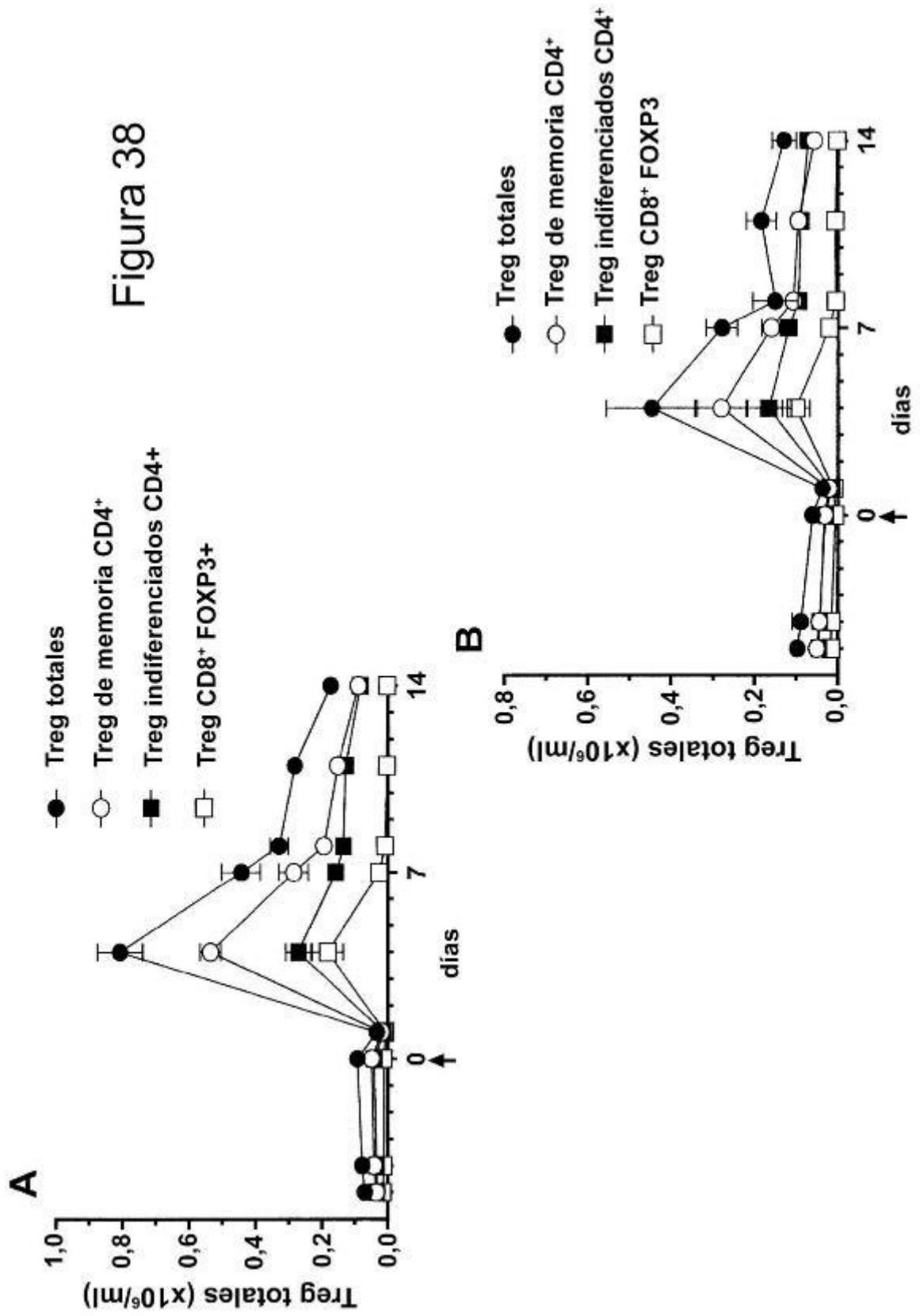
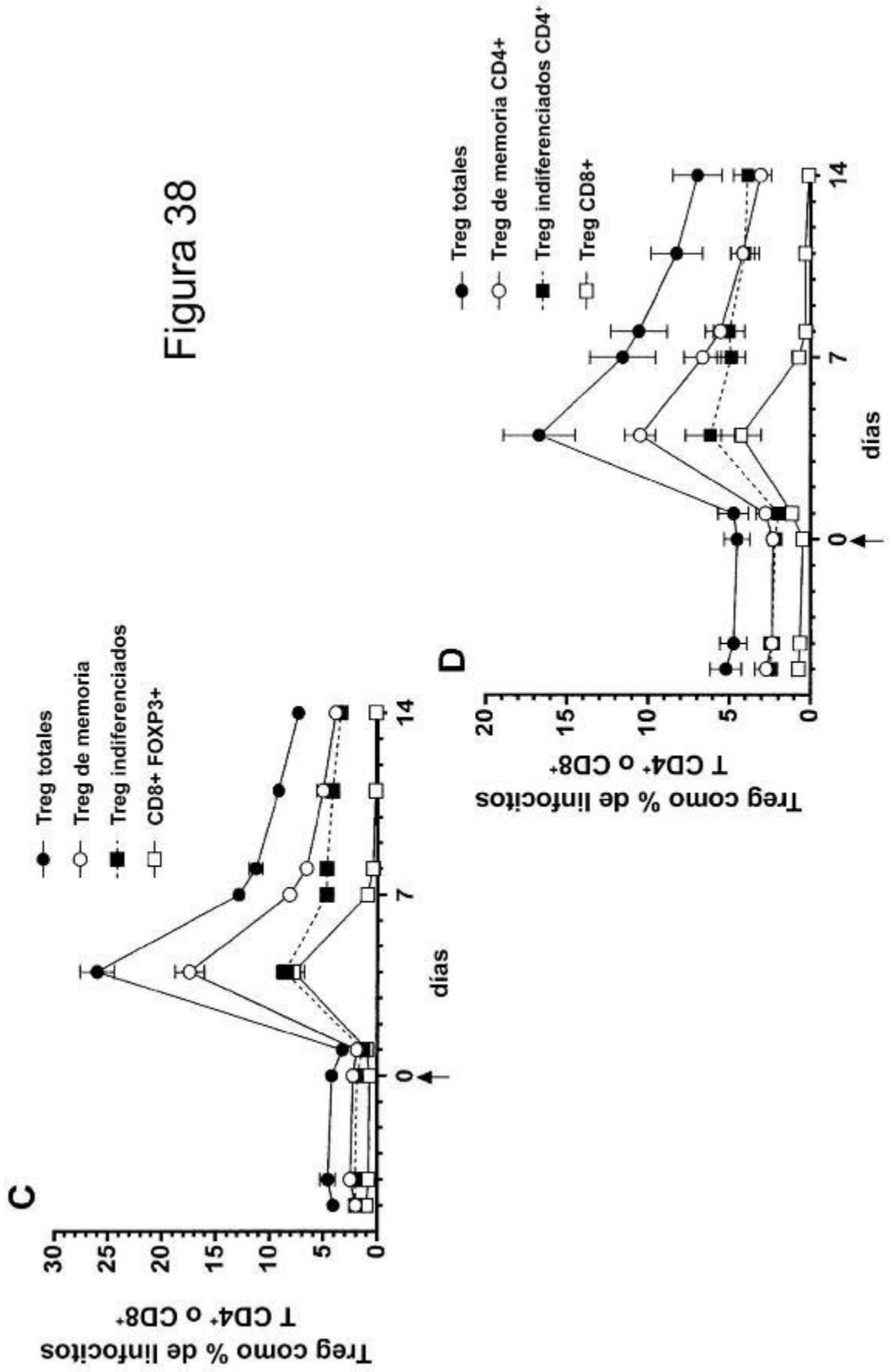
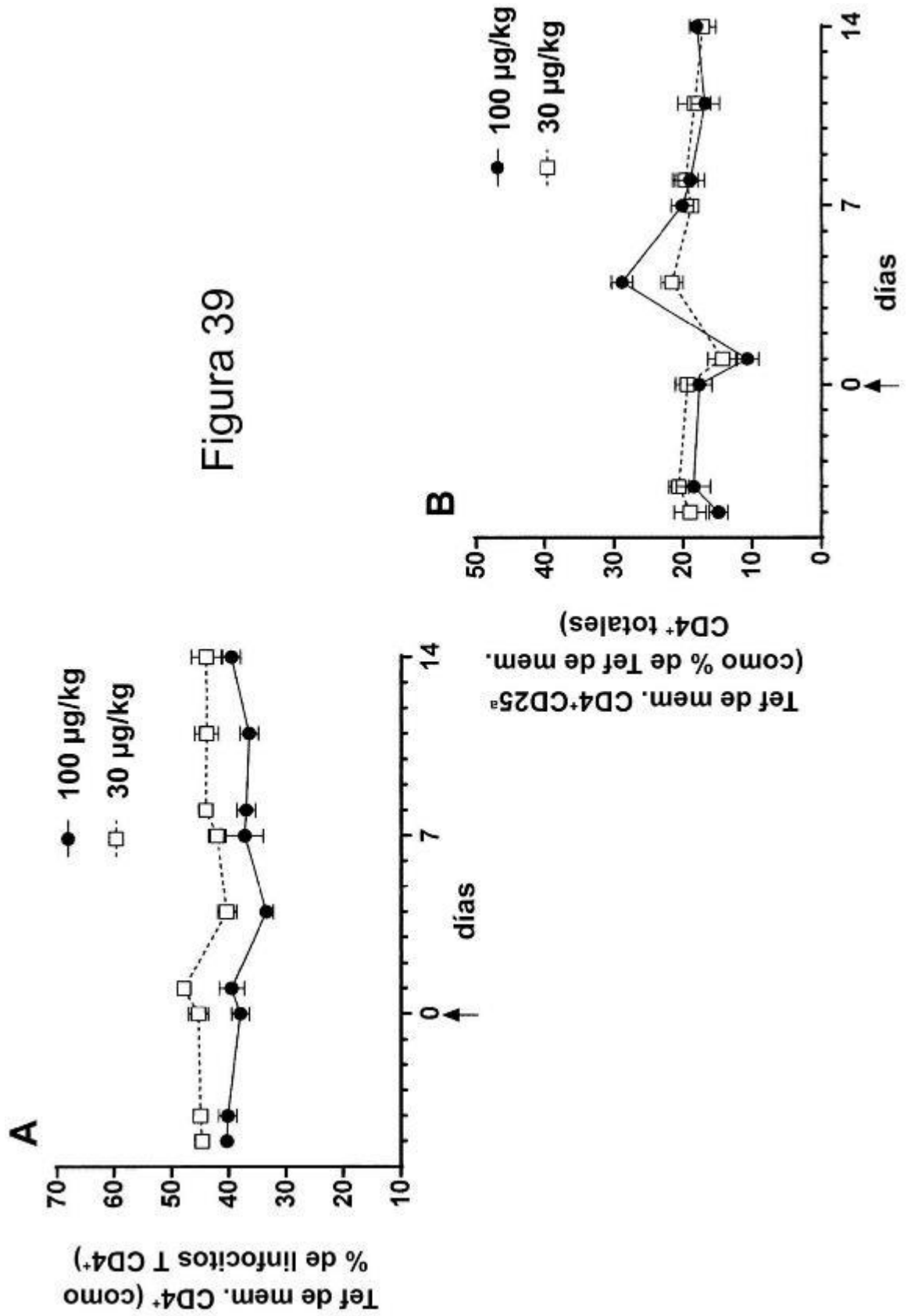


Figura 38





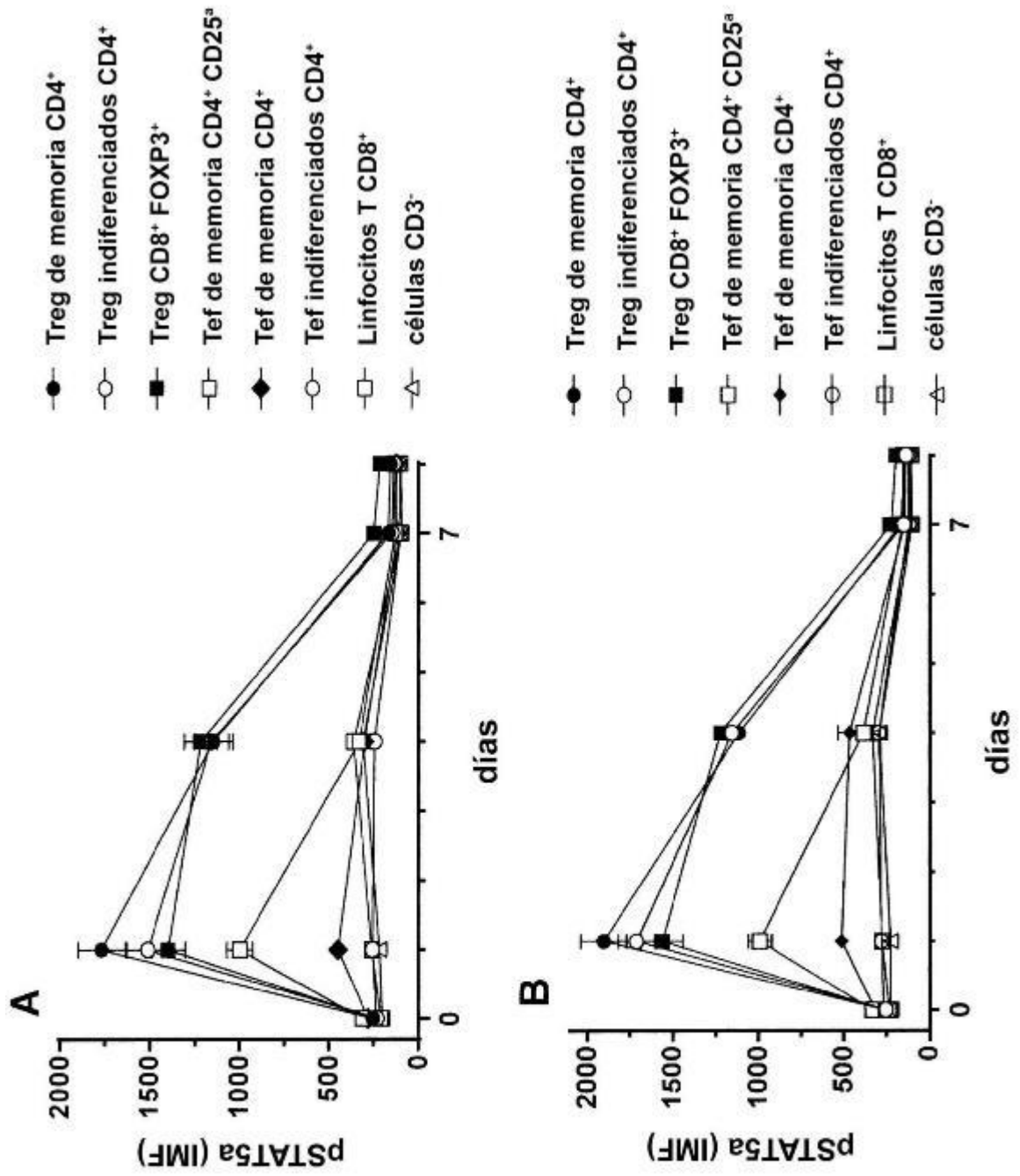


Figura 40

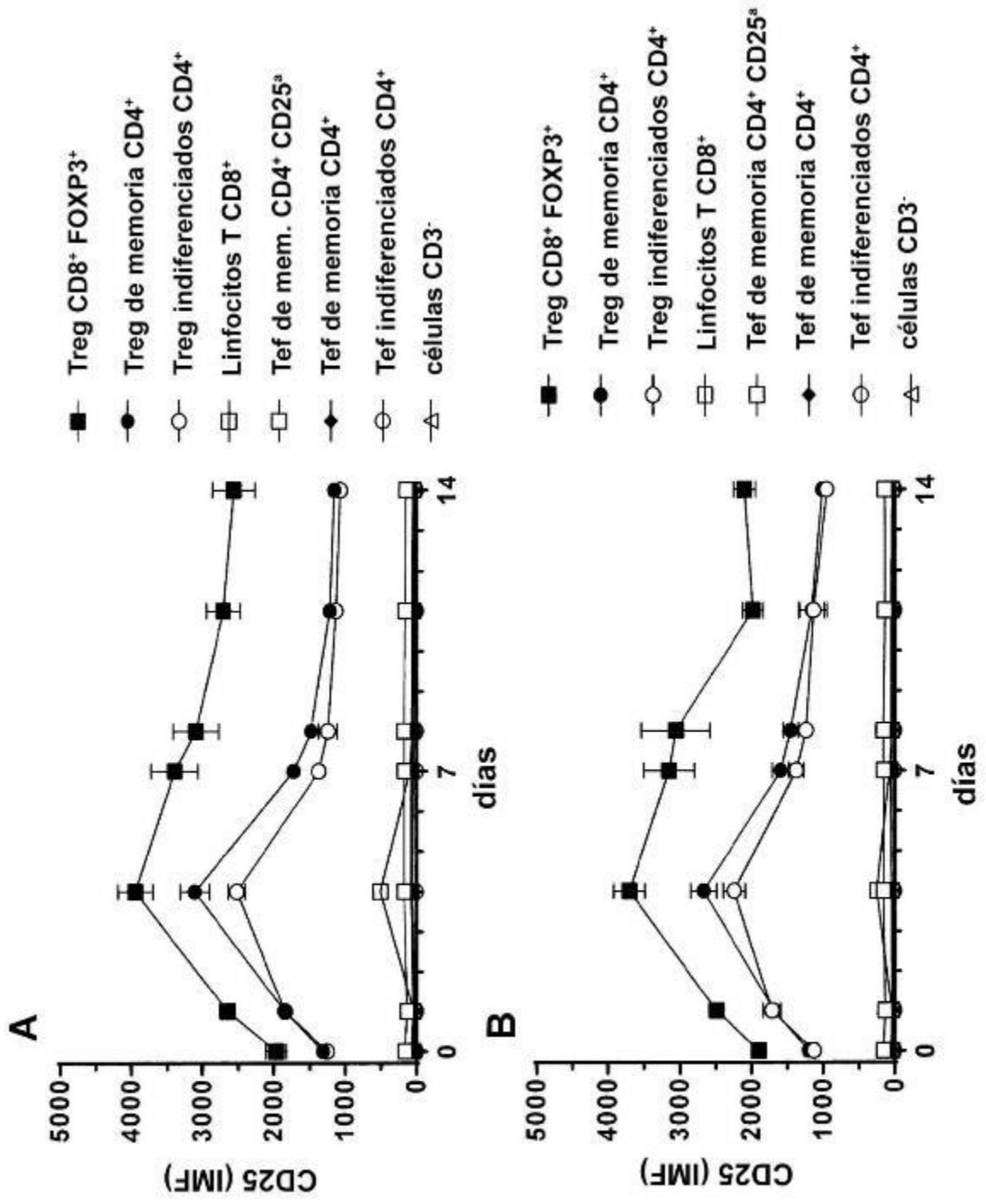


Figura 41

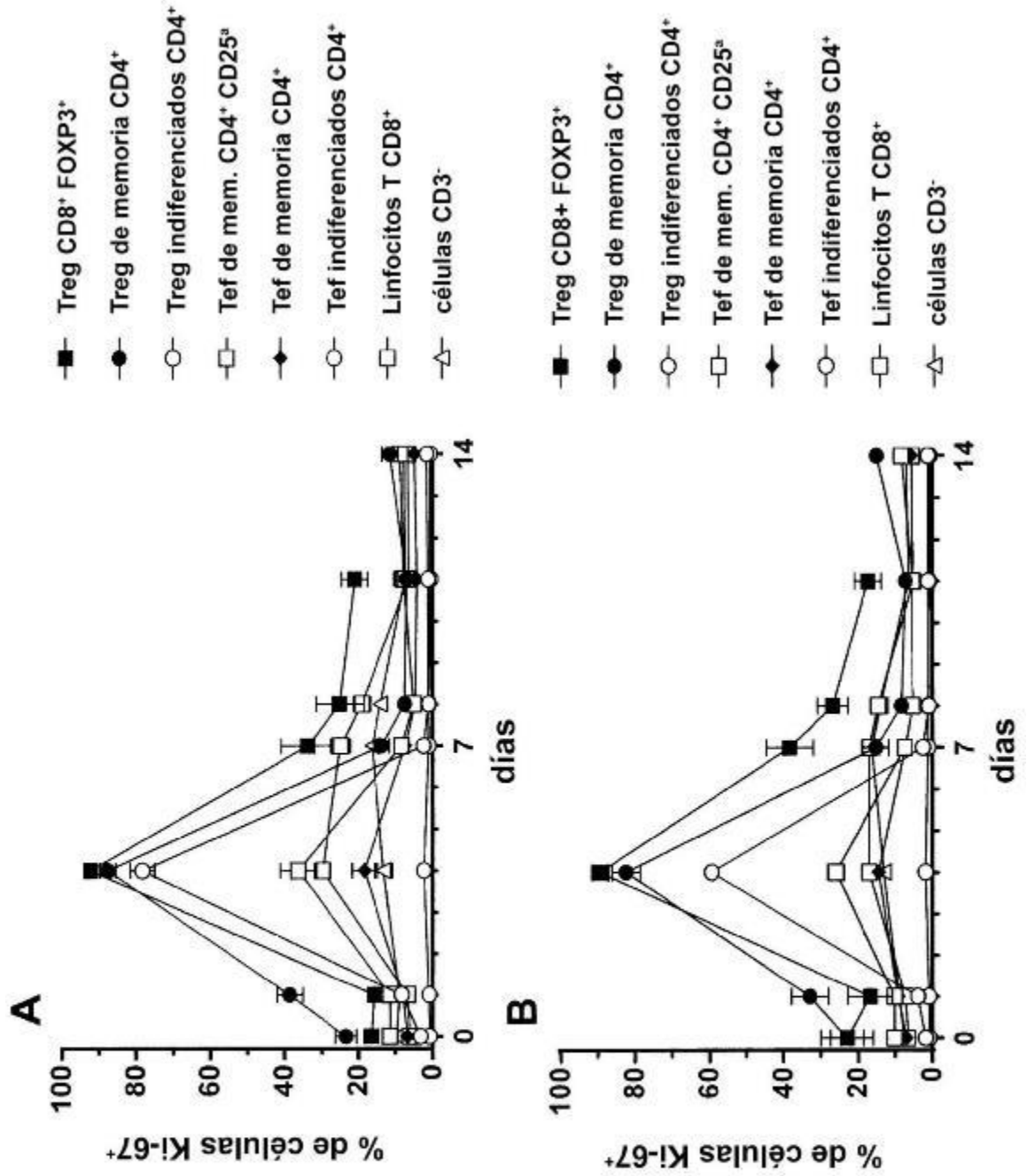


Figura 42

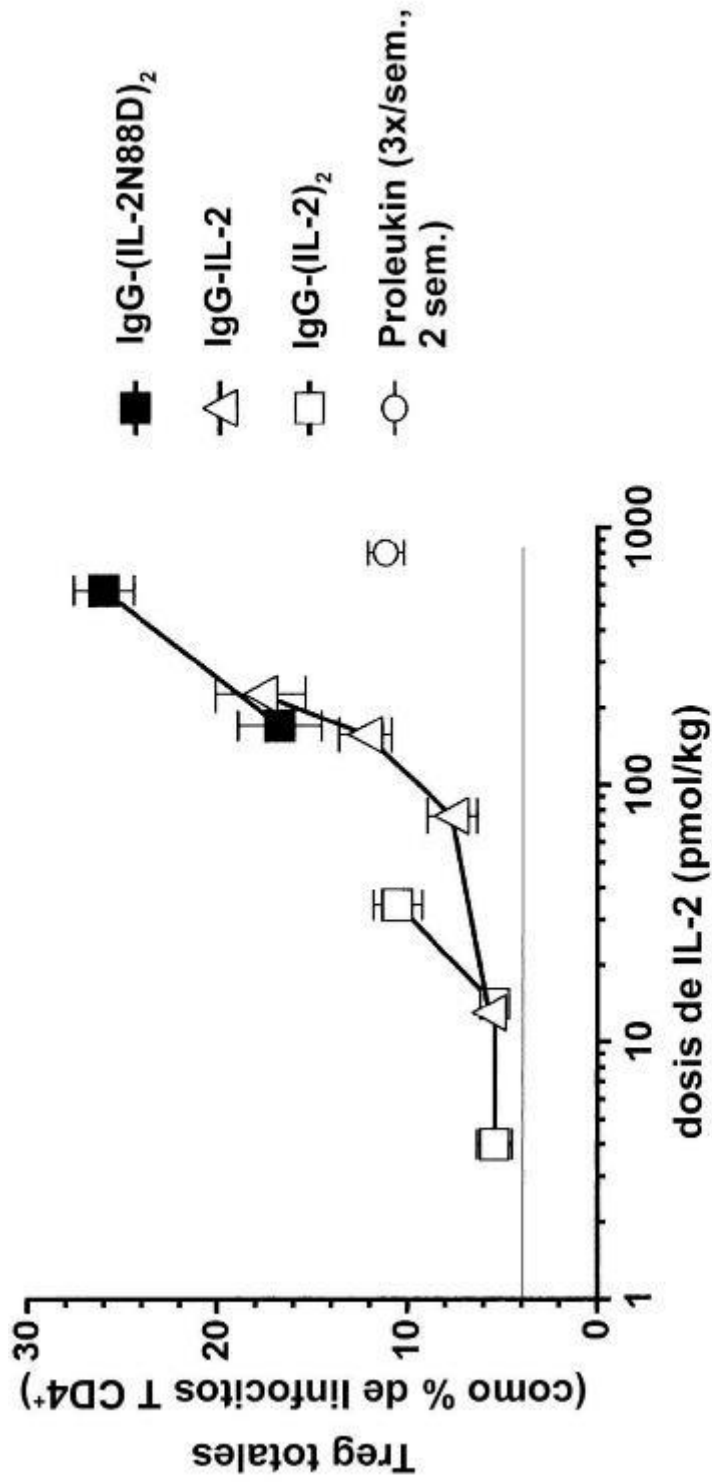


Figura 43

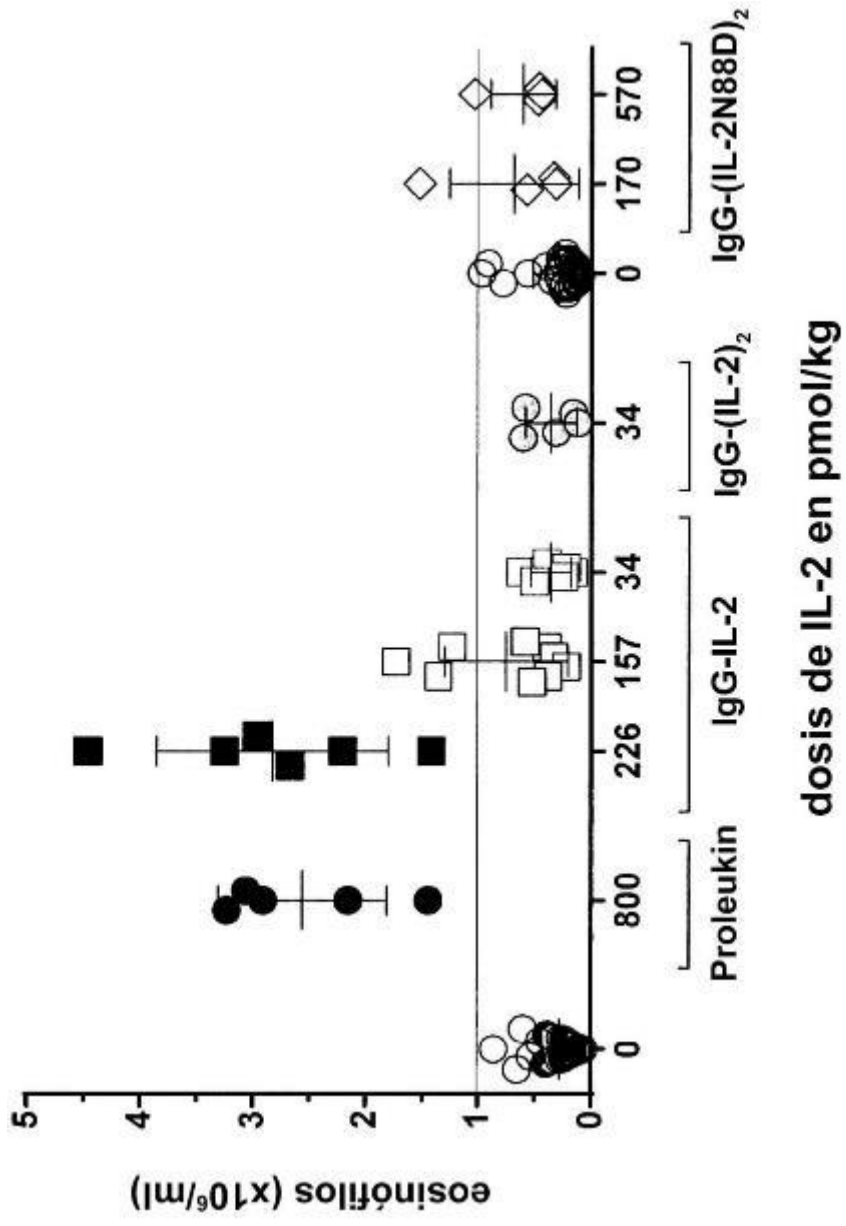


Figura 44

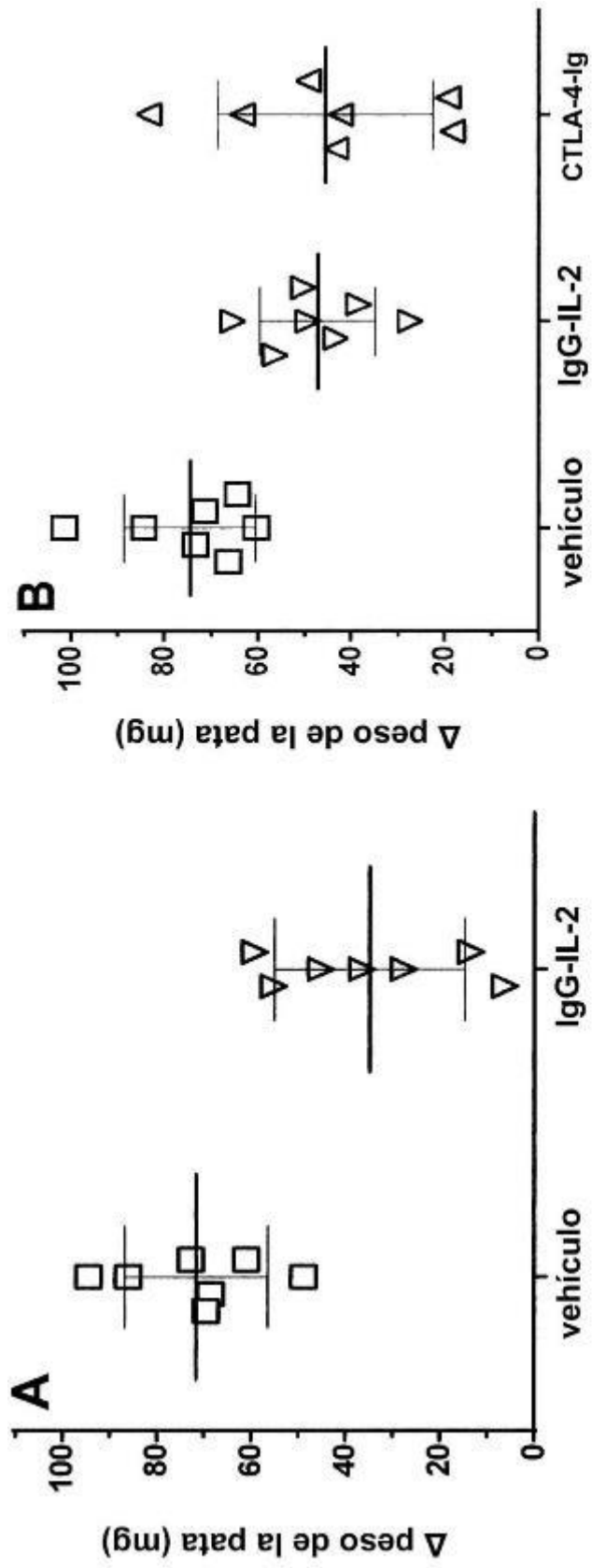


Figura 45

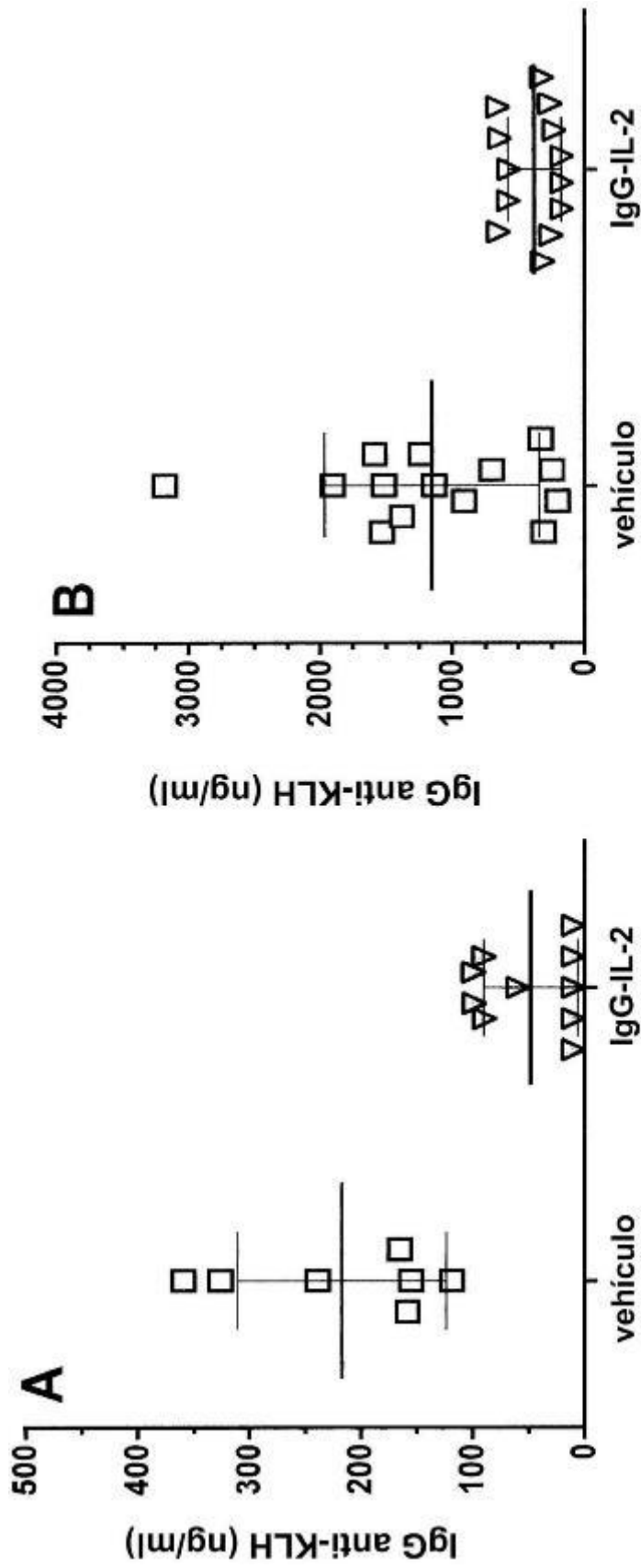


Figura 46