

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 225**

51 Int. Cl.:

C07K 14/55 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/028913**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14153063**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14769541 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2970441**

54 Título: **Polipéptidos aglicosilados que contienen Fc**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361784669 P

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

18.07.2019

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

KANNAN, GUNASEKARAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 720 225 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

Polipéptidos aglicosilados que contienen Fc

5 Antecedentes

La IL-2 se une a tres subunidades receptoras transmembrana: IL-2R β e IL-2R γ que juntas activan acontecimientos de señalización intracelular después de la unión de IL-2, y CD25 (IL-2R α) que sirve para estabilizar la interacción entre IL-2 e IL-2R $\beta\gamma$. Las señales suministradas por IL-2R $\beta\gamma$ incluyen las de las rutas de PI3-cinasa, Ras-MAP-cinasa y STAT5.

Los linfocitos T requieren la expresión de CD25 para responder a las bajas concentraciones de IL-2 que, por lo general, existen en los tejidos. Los linfocitos T que expresan CD25, incluyen linfocitos T reguladores (linfocitos Treg) FOXP3+, que son esenciales para suprimir la inflamación autoinmunitaria y linfocitos T FOXP3- que se han activado para expresar CD25. Los linfocitos T efectores (Tef) FOXP3-CD25+ pueden ser linfocitos CD4+ o CD8+, ambos de los cuales pueden contribuir a la inflamación, a la autoinmunidad, al rechazo de injerto de órganos o a la enfermedad de injerto contra huésped. La señalización de STAT5 estimulada por IL-2 es crucial para el crecimiento y la supervivencia de los linfocitos T-reg normales y para una alta expresión de FOXP3.

En el documento WO 2010/085495 del mismo propietario que la presente invención, se describe el uso de muteínas de IL-2 para expandir o estimular preferentemente linfocitos Treg. Cuando se administran a un sujeto, el efecto sobre los linfocitos Treg es útil para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Aunque las muteínas de IL-2 descritas en este documento son útiles para expandir *in vivo* los linfocitos Treg sobre los Tef, era deseable crear muteínas de IL-2 que tuvieran los atributos óptimos de un agente terapéutico humano.

El documento WO 2011/076781 desvela un dominio de Fc que es un mutante que impide la glicosilación en la posición 297 en el dominio de Fc.

Sumario

En el presente documento se describen muteínas de IL-2 que se prestan a una capacidad de fabricación a alto rendimiento y que tienen actividad farmacológica optimizada. En un intento para producir un agente terapéutico humano ejemplar basado en muteína de IL-2, se produjeron diversas observaciones inesperadas e impredecibles. Las muteínas de IL-2 descritas en este documento son el resultado de ese intento.

Las muteínas de IL-2 descritas en este documento tienen un número mínimo de alteraciones en IL-2, disminuyendo así la probabilidad de crear una respuesta inmunitaria contra la muteína de IL-2 y/o IL-2 endógena, manteniendo, a pesar de ello, la expansión y la activación preferente de linfocitos Treg. Por otra parte, la muteína de IL-2 puede estar fusionada a una molécula, por ejemplo, a un Fc de un anticuerpo, que aumenta la semivida en suero cuando se administra a un sujeto. Las muteínas de IL-2 tienen una semivida corta en suero (de 3 a 5 horas en caso de inyección subcutánea). Las fusiones ejemplares entre la muteína de IL-2 y Fc descritas en este documento, tienen una semivida en seres humanos de al menos 1 día, de al menos 3 días, de al menos 5 días, de al menos 10 días, de al menos 15 días, de al menos 20 días o de al menos 25 días. Este efecto sobre la farmacocinética de las muteínas de IL-2 permite disminuir la dosificación de la muteína terapéutica de IL-2 o reducir su frecuencia.

Por otra parte, cuando se crea una molécula farmacéutica grande, debe tenerse en cuenta la capacidad de producir la molécula grande en grandes cantidades, minimizando al mismo tiempo la agregación y maximizando la estabilidad de la molécula. Las moléculas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc demuestran dichos atributos.

Adicionalmente, la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc contiene una región Fc de IgG1. Cuando se deseaba anular las funciones efectoras de IgG1 (por ejemplo, la actividad de ADCC, del inglés *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, que significa citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), se encontró que la mutación de la asparagina a glicina en la posición 297 (N297G; según el esquema de numeración de la UE), proporcionaba en gran medida una eficiencia de purificación y propiedades biofísicas mejoradas sobre otras mutaciones que conducían a una aglicosilación de Fc de IgG1. En la región Fc, las cisteínas están diseñadas para permitir la formación de enlaces disulfuro, lo que aumenta la estabilidad de la molécula que contiene dicha región Fc aglicosilada. La utilidad de la Fc aglicosilada va más allá del contexto de la fusión entre la muteína de IL-2 y Fc. Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan moléculas que contienen Fc, fusiones de Fc y anticuerpos, que comprenden una sustitución N297G y la sustitución de restos adicionales a cisteína.

En particular, la invención proporciona un polipéptido que comprende una región Fc de un anticuerpo de IgG1 humana, en el que dicha región Fc comprende una mutación N297G, utilizando el esquema de numeración de la UE, y dicha región Fc de una IgG1 humana tiene una identidad de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 3 o comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 4; y además, en el que A287 y L306; V259 y L306; R292 y V302; o V323 y I332, utilizando el esquema de numeración de la UE, de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 3 o la SEC ID NO: 4, están sustituidas con cisteína.

También se proporciona un anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende una región Fc de la primera realización.

También se proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención.

5 También se proporciona un vector de expresión o una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la invención.

10 También se proporciona una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la invención en el que la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero.

La invención también proporciona un método para preparar una molécula que contiene la región Fc de IgG1 aglicosilada, comprendiendo dicho método:

- 15 a) expresar un ácido nucleico que codifique un polipéptido de la primera realización en un cultivo celular de mamífero; y
b) recoger de dicho cultivo la molécula que contiene la Fc de IgG1 aglicosilada.

20 Breve descripción de las figuras

FIG. 1 En un ensayo de estimulación a corto plazo, la homodimerización por fusión de IgG-Fc con el extremo C no altera la actividad de las muteínas de IL-2 con fuerza reducida y alta afinidad por CD25.

25 FIG. 2A y FIG. 2B Se analizaron las muteínas de IL-2 con las mutaciones indicadas y fusionadas con el extremo C de un lado de un heterodímero de Fc para determinar su capacidad para estimular la fosforilación de STAT5 en linfocitos T. Estas muteínas también contenían tres mutaciones que conferían alta afinidad por CD25 (V69A, N71R, Q74P). Su actividad se comparó con la de tres formas de IL-2 sin fusión a Fc (símbolos blancos): IL-2 TS (de tipo silvestre), HaTS (alta afinidad por CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) y HaD (alta afinidad por CD25 y actividad de señalización reducida) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D). Se muestran las respuestas de la fosforilación de STAT5 de los linfocitos T FOXP3+CD4+ y FOXP3- CD4+ seleccionados.

35 FIG. 3 Proliferación de subconjuntos de linfocitos T en respuesta a titulaciones de muteínas de IL-2 fusionadas con el heterodímero de Fc. La actividad de las proteínas de fusión se comparó con la de tres formas de IL-2 sin fusión a Fc (símbolos en blanco): IL-2 TS (de tipo silvestre), HaTS (alta afinidad por CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) y HaD (alta afinidad por CD25 y actividad de señalización reducida) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D)

40 FIG. 4 Proliferación de linfocitos citolíticos naturales (células NK, del inglés *natural killer cells*) en respuesta a titulaciones de muteínas de IL-2 fusionadas con el heterodímero de Fc. La actividad de las proteínas de fusión se comparó con la de tres formas de IL-2 sin fusión a Fc (símbolos blancos): IL-2 TS (de tipo silvestre), HaTS (alta afinidad por CD25) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) y HaD (alta afinidad por CD25 y actividad de señalización reducida) (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D)

45 FIG. 5 Proliferación de subconjuntos de linfocitos T en respuesta a titulaciones de muteínas de IL-2 fusionadas con N297G del homodímero de Fc. La actividad de las muteínas.Fc se comparó con la de la IL-2 TS (de tipo silvestre) (círculos blancos) y con la de Fc.TS (círculos negros). Las mutaciones que conferían alta afinidad por CD25 (HaMut1) fueron V69A y Q74P.

50 FIG. 6 Proliferación de linfocitos citolíticos naturales (células NK) en respuesta a titulaciones de muteínas de IL-2 fusionadas con N297G del homodímero de Fc. La actividad de las muteínas.Fc se comparó con la de la IL-2 TS (de tipo silvestre) (círculos blancos) y con la de Fc.TS (círculos negros).

55 FIG. 7A y FIG. 7B Las muteínas Fc.IL-2 sin mutaciones que confieren alta afinidad por CD25, promueven la expansión de Treg y la regulación positiva de FOXP3 en ratones humanizados.

FIG. 8 Dosis semanales reducidas (0,5 µg por animal) de muteínas Fc.IL-2 promueven la expansión de Treg y la regulación positiva de FOXP3 en ratones humanizados, observándose mejor actividad para Fc.V91K en relación con Fc.N88D y Fc.WT.

60 FIG. 9 Fc.V91K y Fc.N88D persisten en la superficie de linfocitos T activados a través de la asociación con CD25.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

65 Los títulos de los apartados utilizados en el presente documento solo tienen fines organizativos, y no deben considerarse como limitantes de la materia objeto descrita.

Pueden utilizarse técnicas convencionales de ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo y transformación de tejidos, purificación de proteínas, etc. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación pueden llevarse a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza habitualmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Los siguientes procedimientos y técnicas pueden realizarse generalmente de acuerdo con métodos convencionales muy conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y explican a lo largo de la memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica y química médica y farmacéutica, descritos en el presente documento, son los que tanto se conocen y los habitualmente utilizados en la técnica. Para la síntesis química, análisis químicos, preparaciones y formulaciones farmacéuticas, y suministro y tratamiento de los pacientes, pueden utilizarse técnicas convencionales.

IL-2

Las muteínas de IL-2 descritas en este documento son variantes de IL-2 humana de tipo silvestre. Como se usa en el presente documento, "IL-2 humana de tipo silvestre," "IL-2 de tipo silvestre," o "IL-2 TS", se refieren al polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHQLQ-
 CLEELKPLLEEVNLAQSKNFHLR PRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT En la que X es C, S, V o A (SEQ ID NO:2).

Las variantes pueden contener una o más sustituciones, deleciones o inserciones en la secuencia de aminoácidos de IL-2 de tipo silvestre. En el presente documento, los restos se especifican mediante el código de aminoácidos de una letra seguido de la posición del aminoácido en la IL-2, por ejemplo, K35 es el resto de lisina en la posición 35 de la SEQ ID NO:2. En el presente documento, las sustituciones se designan mediante el código de aminoácidos de una letra seguido de la posición de aminoácidos de IL-2, seguido del código de aminoácidos de una letra sustituyente, por ejemplo, K35A es una sustitución del resto de lisina en la posición 35 de la SEQ ID NO:2 con un resto de alanina.

Muteínas de IL-2

En el presente documento se describen muteínas de IL-2 humanas que estimulan preferentemente linfocitos T reguladores (Treg). Tal como se usa en el presente documento, la expresión "que estimulan preferentemente linfocitos T reguladores" significa que la muteína promueve la proliferación, la supervivencia, la activación y/o la función de los linfocitos T CD3+FoxP3+ sobre la de los linfocitos T CD3+FoxP3-. Los métodos de medición de la capacidad para estimular preferentemente linfocitos Treg pueden medirse mediante citometría de flujo de leucocitos de sangre periférica, en los que se observa un aumento en el porcentaje de linfocitos T FOXP3+ CD4+ entre el total de linfocitos T CD4+, un aumento en el porcentaje de linfocitos T FOXP3+ CD8+ entre el total de linfocitos T CD8+, un aumento en el porcentaje de linfocitos T FOXP3+ con respecto a los linfocitos NK, y/o un mayor aumento en el nivel de expresión de CD25 en la superficie de linfocitos T FOXP3+ con respecto al aumento de la expresión de CD25 en otros linfocitos T. El crecimiento preferencial de los linfocitos Treg también puede detectarse como una representación aumentada del ADN promotor de FOXP3 desmetilado (es decir, la región desmetilada específica de Treg, o TSDR, del inglés *Treg-specific demethylated region*) en relación con los genes CD3 desmetilados en el ADN extraído de sangre entera, detectado mediante secuenciación de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) a partir de ADN genómico tratado con bisulfito (J. Sehouli, et al. 2011). Epigenetics 6:2, 236-246).

Las muteínas de IL-2, que estimulan preferentemente los linfocitos Treg, aumentan la relación de linfocitos T CD3+FoxP3+ sobre la de linfocitos T CD3+FoxP3- en un sujeto o en una muestra de sangre periférica, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos un 200 %, al menos un 300 %, al menos un 400 %, al menos un 500 %, al menos un 600 %, al menos un 700 %, al menos un 800 %, al menos un 900 % o al menos un 1000 %.

La muteínas de IL-2 de la divulgación incluyen, pero sin limitación, las muteínas de IL-2 que comprenden la sustitución V91K o N88D en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En la SEC ID NO: 1 se expone una muteína de IL-2 de la divulgación. Particularmente preferida es la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 1 que comprende una sustitución C125A. Aunque puede ser ventajoso reducir el número de mutaciones adicionales en la secuencia de IL-2 de tipo silvestre, la invención incluye muteínas de IL-2 que tienen truncamientos o inserciones, deleciones o sustituciones adicionales además de la sustitución V91K o N88D, siempre que dichas muteínas mantengan la actividad de linfocitos Treg preferentemente estimulantes. Por lo tanto, los aspectos de la divulgación incluyen muteínas de IL-2 que estimulan preferentemente linfocitos Treg y que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una V91K o N88D que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En aspectos particularmente preferidos, dichas muteínas de IL-2 comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2.

al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2.

Para las secuencias de aminoácidos, la identidad y/o similitud de secuencias se determina utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, el algoritmo de identidad de secuencias local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, el algoritmo de alineación de identidad de secuencias de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, utilizando preferentemente la configuración predeterminada, o por inspección. Preferentemente, el porcentaje de identidad se calcula mediante FastDB en función de los siguientes parámetros: penalización de 1 por emparejamiento erróneo; penalización de 1 por apertura de hueco; penalización de 0,33 por tamaño de hueco; y penalización de 30 por unión, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, págs 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineamientos progresivos por pares. También puede trazar un árbol que muestra las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear el alineamiento. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; el método es similar al descrito por Higgins y Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Parámetros útiles de PILEUP incluyen un peso de hueco predeterminado de 3,00, un peso de longitud de hueco predeterminado de 0,10 y huecos terminales ponderados.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en: Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; y en Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5873-5787. Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology* 266: 460-480. WU-BLAST-2 utiliza diversos parámetros de búsqueda, estableciéndose la mayoría de ellos a los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se establecen con los siguientes valores: tramo de solapamiento=1, fracción de solapamiento=0,125, umbral (U) de palabra= 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y los establece el propio programa en función de la composición de la secuencia particular y de la composición de la base de datos particular contra la que se busca la secuencia de interés; sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad.

Un algoritmo útil adicional es BLAST con huecos, como indican Altschul et al., 1993, *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402. BLAST con huecos utiliza puntuaciones de sustitución BLOSUM-62; el parámetro U de umbral establecido a 9; el método de dos aciertos para desencadenar extensiones sin huecos, cobra longitudes de hueco de un coste k de 10+k; X_u establecido a 16 y X_g establecido a 40 para la fase de búsqueda en la base de datos y a 67 para la fase de resultados de los algoritmos. Los alineamientos con huecos se desencadenan mediante una puntuación que corresponde a aproximadamente 22 bits.

Aunque para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos el sitio o la región puede determinarse, la mutación *per se* no necesita determinarse. Por ejemplo, para optimizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se puede llevar a cabo una mutagénesis aleatoria en el codón o en una región diana y la muteína de IL-2 expresada puede explorarse en búsqueda de la combinación óptima de actividad deseada. Se conocen bien técnicas para preparar mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene una secuencia conocida, por ejemplo, mutagénesis mediante cebadores de M13 y mutagénesis mediante PCR. Por ejemplo, la exploración de los mutantes puede realizarse utilizando los ensayos descritos en el presente documento.

Por lo general, las sustituciones de aminoácidos son de restos individuales; normalmente, las inserciones serán del orden de aproximadamente uno (1) a veinte (20) restos de aminoácidos, aunque pueden tolerarse inserciones considerablemente más grandes. Las deleciones varían de aproximadamente uno (1) a veinte (20) restos de aminoácidos, aunque en algunos casos las deleciones pueden ser mucho más largas.

Pueden utilizarse sustituciones, deleciones, inserciones, o cualquiera de sus combinaciones, para llegar a un derivado o variante final. Generalmente estos cambios se realizan en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula, particularmente la inmunogenicidad y especificidad de la proteína de unión al antígeno. Sin embargo, en determinadas circunstancias pueden tolerarse cambios más grandes. Las sustituciones conservativas generalmente se realizan de acuerdo con el siguiente cuadro representado como TABLA 1.

Tabla 1

Resto original	Sustituciones ejemplares
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

- Los cambios sustanciales en cuanto a la función o identidad inmunológica, se realizan seleccionando sustituciones que son menos conservativas que las mostradas en la TABLA 1. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones que afecten más significativamente a: la estructura de la cadena principal polipeptídica en la zona de la alteración, por ejemplo, a la estructura alfa helicoidal o beta laminar; a la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o al volumen de la cadena lateral. Las sustituciones en las que, en general, se espera que se produzcan los mayores cambios en las propiedades del polipéptido son aquellas en las que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye por (o mediante) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituye por (o mediante) cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye por (o mediante) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o mediante) uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina.
- Por lo general, las variantes exhiben la misma actividad biológica cualitativa y provocarán la misma respuesta inmunitaria que la del análogo natural, aunque también se seleccionan variantes para modificar las características de la muteína de IL-2 según sea necesario. Como alternativa, la variante puede diseñarse de modo que se altera la actividad biológica de la muteína de IL-2. Por ejemplo, los sitios de glicosilación pueden alterarse o eliminarse como se explica en el presente documento.

Muteínas de IL-2 que tienen semivida en suero ampliada

- Dado que las muteínas de IL-2 descritas en el presente documento expanden preferentemente linfocitos Treg sobre, por ejemplo, linfocitos Tef o NK, se espera que, cuando se administren a un paciente, el perfil de seguridad diferirá del de la IL-2 de tipo silvestre o PROLEUCINA. Los efectos secundarios asociados a la IL-2 de tipo silvestre o PROLEUCINA incluyen síntomas gripales, escalofríos/rigidez, artralgia, fiebre, erupción, prurito, reacciones en el lugar de la inyección, hipotensión, diarrea, náuseas, ansiedad, desorientación y depresión. Las muteínas de IL-2 descritas en el presente documento pueden modificarse para incluir o fusionarse con moléculas que amplían la semivida sérica de la muteína sin aumentar el riesgo de que dicha ampliación de la semivida incremente la probabilidad o la intensidad de un efecto secundario o acontecimiento adverso en un paciente. La dosificación subcutánea de dichas muteínas con semivida sérica ampliada puede permitir una cobertura selectiva prolongada con una exposición máxima ($C_{m\acute{a}x}$) sistémica más baja. La semivida sérica ampliada puede permitir un régimen de dosificación más bajo o menos frecuente de la muteína.
- La semivida sérica de las muteínas de IL-2 descritas en el presente documento puede ampliarse esencialmente por cualquier método conocido en la técnica. Dichos métodos incluyen alterar la secuencia de la muteína de IL-2 para incluir un péptido que se una al receptor neonatal de Fcγ o que se una a una proteína que tenga una semivida sérica ampliada, por ejemplo, seroalbúmina humana. En otras realizaciones, la muteína de IL-2 puede fusionarse con un polipéptido que confiere semivida ampliada a la molécula de fusión. Dichos polipéptidos incluyen una Fc de IgG u otros polipéptidos que se unen al receptor neonatal de Fcγ, seroalbúmina humana, o polipéptidos que se unen a una proteína

que tiene una semivida sérica ampliada. En realizaciones preferidas, la muteína de IL-2 puede fusionarse con una molécula de Fc de IgG.

5 La muteína de IL-2 puede fusionarse con el extremo N o con el extremo C de la región Fc de IgG. Tal como se muestra en los Ejemplos, la fusión con el extremo C de la región Fc de IgG mantiene la actividad de la muteína de IL-2 a un mayor grado que cuando se fusiona con el extremo N de la región Fc de IgG.

10 En el presente documento se describe un dímero que comprende dos polipéptidos de fusión con Fc creados mediante la fusión de una muteína de IL-2 con la región Fc de un anticuerpo. El dímero puede producirse, por ejemplo, insertando una fusión génica que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, expresando la fusión génica en las células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante, y permitiendo que la proteína de fusión expresada se ensamble de forma muy similar a las moléculas de anticuerpos, tras lo cual se forman enlaces entre cadenas entre los restos de Fc para producir el dímero.

15 La expresión "polipéptido de Fc", como se usa en el presente documento, incluye formas de polipéptidos naturales y muteínas procedentes de la región Fc de un anticuerpo. También se incluyen formas truncadas de dichos polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. En determinadas realizaciones, la región Fc de IgG comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 de anticuerpo. Junto con la semivida sérica ampliada, las proteínas de fusión que comprenden residuos de Fc (y oligómeros formados a partir de los mismos) ofrecen la ventaja de permitir realizar una purificación fácil mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de Proteína A o Proteína G. Las regiones Fc de la invención proceden de la IgG1 humana. En el presente documento, los restos específicos dentro de la región Fc se identifican por su posición. Todas las posiciones de Fc se basan en el esquema de numeración de la UE.

25 Una de las funciones de la parte Fc de un anticuerpo es comunicarse con el sistema inmunitario cuando el anticuerpo se une a su diana. Se considera que esto es la "función efectora". La comunicación conduce a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés *antibody-dependent cellular cytotoxicity*), a fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, del inglés *antibody-dependent cellular phagocytosis*) y/o a citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, del inglés *complement dependent cytotoxicity*). Tanto la ADCC como la ADCP están mediadas a través de la unión de Fc a los receptores de Fc en la superficie de células del sistema inmunitario. La CDC está mediada a través de la unión de Fc con proteínas del sistema del complemento, por ejemplo, C1q.

35 Las subclases de IgG varían en cuanto a su capacidad para mediar funciones efectoras. Por ejemplo, la IgG1 es muy superior a la IgG2 e IgG4 en la mediación de ADCC y CDC.

La función efectora de un anticuerpo se puede aumentar, o disminuir, introduciendo una o más mutaciones en la región Fc. En el presente documento se desvelan proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc que tienen una región Fc diseñada para aumentar la función efectora (U.S. 7.317.091 y Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009). Las moléculas de IgG1 Fc que tienen una función efectora aumentada incluyen las que tienen las siguientes sustituciones:

- 40 S239D/I332E
- S239D/A330S/I332E
- 45 S239D/A330L/I332E
- S298A/D333A/K334A
- P247I/A339D
- 50 P247I/A339Q
- D280H/K290S
- 55 D280H/K290S/S298D
- D280H/K290S/S298V
- F243L/R292P/Y300L
- 60 F243L/R292P/Y300L/P396L
- F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
- 65 G236A/S239D/I332E

K326A/E333A

K326W/E333S

5 K290E/S298G/T299A

K290N/S298G/T299A

10 K290E/S298G/T299A/K326E

K290N/S298G/T299A/K326E

Otro método para aumentar la función efectora de las proteínas que contienen Fc de IgG, es reducir la fucosilación de la región Fc. La eliminación de la fucosa del núcleo de los oligosacáridos de tipo complejo biantenarico unidos a la Fc incrementó en gran medida la función efectora de ADCC sin alterar la unión del antígeno o la función efectora de CDC. Se conocen varias formas de reducir o anular la fucosilación de moléculas que contienen Fc, por ejemplo, anticuerpos. Estas incluyen la expresión recombinante en determinadas líneas celulares de mamíferos, incluida una línea celular FUT8 inactivada, la línea CHO variante Lec13, la línea celular de hibridoma de rata YB2/0, una línea celular que comprende un ARN interferente pequeño específicamente contra el gen FUT8, y una línea celular que coexpresa β -1,4-*N*-acetilglucosaminiltransferasa III y α -manosidasa II del aparato de Golgi. Como alternativa, la molécula que contiene Fc puede expresarse en una célula que no es de mamífero, tal como una célula vegetal, de levadura, o una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*.

En el presente documento se desvelan proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc que comprenden una región Fc diseñada para disminuir la función efectora. Las moléculas de Fc que tienen función efectora disminuida incluyen las que tienen las siguientes sustituciones:

N297A o N297Q (IgG1)

30 L234A/I235A (IgG1)

V234A/G237A (IgG2)

35 L235A/G237A/E318A (IgG4)

H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)

C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)

40 C226S/C229S/E233P/I234V/I235A (IgG1)

L234F/I235E/P331S (IgG1)

45 S267E/I328F (IgG1)

Se sabe que la IgG1 humana tiene un sitio de glicosilación en N297 (según el sistema de numeración de la UE) y que la glicosilación contribuye a la función efectora de los anticuerpos de IgG1. En la SEQ ID NO: 3 se proporciona una secuencia de IgG1 ejemplar. Los grupos han mutado N297 en un esfuerzo por producir anticuerpos aglicosilados. Las mutaciones se centran en la sustitución de N297 con aminoácidos que se asemejan a la asparagina de naturaleza fisicoquímica, tal como la glutamina (N297Q) o con alanina (N297A) que imita a las asparaginas sin grupos polares.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo aglicosilado" o "fc aglicosilado" se refiere al estado de glicosilación del resto en la posición 297 del Fc. Un anticuerpo u otra molécula puede contener glicosilación en una o más ubicaciones, pero aún puede considerarse un anticuerpo aglicosilado o una proteína de fusión Fc aglicosilada.

En nuestro esfuerzo por crear una Fc de IgG1 efectora sin función, se descubrió que la mutación del aminoácido N297 de la IgG1 humana por glicina, es decir, N297G, proporcionaba una eficiencia de purificación y propiedades biofísicas muy superiores sobre otras sustituciones de aminoácidos en ese resto. véase el ejemplo 8. Por lo tanto, la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc comprende una Fc de IgG1 humana que tiene una sustitución N297G. La Fc que comprende la sustitución N297G es útil en cualquier contexto en el que una molécula comprenda una Fc de IgG1 humana, y no se limita al uso en el contexto de una fusión entre la muteína de IL-2 y Fc. En determinados aspectos, un anticuerpo comprende la Fc que tiene una sustitución N297G.

Una Fc que comprende una Fc de IgG1 humana que tiene la mutación N297G también puede comprender inserciones, deleciones y sustituciones adicionales. En determinados aspectos, la Fc de IgG1 humana comprende la sustitución N297G y es al menos 90 % idéntica, al menos 91 % idéntica, al menos 92 % idéntica, al menos 93 % idéntica, al

ES 2 720 225 T3

menos 94 % idéntica, al menos 95 % idéntica, al menos 96 % idéntica, al menos 97 % idéntica, al menos 98 % idéntica, o al menos 99 % idéntica, a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3. En un aspecto particularmente preferido, el resto de lisina C-terminal está sustituido o deletado. La secuencia de aminoácidos de la IgG1 humana que comprende la sustitución N297G y la delección de la lisina C-terminal se expone en la SEC ID NO: 4.

5 Se demostró que las moléculas que contenían Fc de IgG1 glicosilada eran menos estables que las moléculas que contenían Fc de IgG1 no glicosilada. La región Fc está diseñada adicionalmente para aumentar la estabilidad de la molécula aglicosilada. Dos o más aminoácidos están sustituidos por cisteína para formar enlaces disulfuro en el estado dimérico. Los restos V259, A287, R292, V302, L306, V323 o 1332 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, pueden sustituirse por cisteína. Los pares de restos específicos se sustituyen de tal manera que, preferentemente, forman un enlace disulfuro entre sí, por lo tanto limitando o impidiendo la desorganización del enlace disulfuro. Los pares son A287C y L306C, V259C y L306C, R292C y V302C, y V323C e I332C.

10 En este documento se proporcionan moléculas que contienen Fc en las que dos o más de los restos V259, A287, R292, V302, L306, V323 o 1332 se sustituyen por cisteína, en particular los que comprenden las sustituciones A287C y L306C, V259C y L306C, R292C y V302C o V323C e I332C.

15 Las moléculas ejemplares que contienen Fc comprenden:

20 la Fc de IgG1 humana con las sustituciones N297G, A287C, L306C y la delección de K en C-terminal

```
DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVHLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID
NO:39)
```

25 la Fc de IgG1 humana con las sustituciones N297G, V259C, L306C y la delección de K en C-terminal

```
DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVHLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID
NO:40)
```

la Fc de IgG1 humana con las sustituciones N297G, R292C, V302C y la delección de K en C-terminal

30 DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
YRCVSVTLVHLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID
NO:41)

la Fc de IgG1 humana con las sustituciones N297G, A287C, L306C

```
DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVHLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID
NO:42)
```

35 la Fc de IgG1 humana con las sustituciones N297G, V259C, L306C

```
DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST
YRVVSVCTVHLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID
NO:43)
```

40 la Fc de IgG1 humana con las sustituciones N297G, R292C, V302C

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
 YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:44)

5 Mutaciones adicionales que pueden realizarse en la región Fc de IgG1 incluyen aquellas que facilitan la formación de heterodímeros entre los polipéptidos que contienen Fc. En algunas realizaciones, La región Fc se diseñada para crear "botones" y "orificios" que facilitan la formación de heterodímeros de dos cadenas polipeptídicas diferentes que contienen Fc cuando se expresan conjuntamente en una célula. Documento U.S. 7.695.963. La región Fc puede alterarse para utilizar direccionamiento electrostático para estimular la formación de heterodímeros al tiempo que disuade la formación de homodímeros de dos polipéptidos diferentes que contienen Fc cuando se expresan conjuntamente en una célula. WO 09/089.004, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Las Fc heterodiméricas preferidas incluyen aquellas en las que una cadena de la Fc comprende las sustituciones D399K y E356K y la otra cadena de la Fc comprende las sustituciones K409D y K392D. Una cadena de la Fc puede comprender las sustituciones D399K, E356K y E357K y la otra cadena de la Fc comprende las sustituciones K409D, K392D y K370D.

15 Puede ser ventajoso que la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc sea monomérica, es decir, que solo contenga una molécula de muteína de IL-2. En dichos casos, la región Fc de la proteína de fusión puede contener una o más mutaciones que facilitan la formación de heterodímeros. La proteína de fusión se expresa conjuntamente con una región Fc que tiene mutaciones recíprocas con respecto a las del polipéptido de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, pero carece de una muteína de IL-2. Cuando se forma el heterodímero de los dos polipéptidos que contienen Fc, la proteína resultante comprende solo una única muteína de IL-2.

20 Otro método para crear una proteína de fusión monomérica entre la muteína de IL-2 y Fc es fusionar la muteína de IL-2 con una Fc monomérica, es decir, una región Fc que no forme dímeros. Las Fc monoméricas estables comprenden mutaciones que disuaden la dimerización y que estabilizan la molécula en forma monomérica. En el documento WO 2011/063348 se desvelan Fc monoméricas preferidas. Las proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc pueden comprender una Fc que comprende aminoácidos con carga negativa en las posiciones 392 y 409 junto con una sustitución de treonina en Y349, L351, L368, V397, L398, F405 o Y407.

25 La proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc puede comprender un enlazador entre la Fc y la muteína de IL-2. En la técnica se conocen muchos polipéptidos enlazadores diferentes y pueden utilizarse en el contexto de una proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc. En realizaciones preferidas, la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc comprende una o más copias de un péptido que consiste en GGGGS (SEC ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO:6) o YGNGT (SEQ ID NO:7) entre la Fc y la muteína de IL-2. La región polipeptídica entre la región Fc y la región de muteína de IL-2 puede comprender una sola copia de GGGGS (SEC ID NO: 5), GGNGT (SEQ ID NO:6) o YGNGT (SEQ ID NO:7). Como se muestra en el presente documento, los enlazadores GGNGT (SEQ ID NO: 6) o YGNGT (SEQ ID NO: 7) se glicosilan cuando se expresan en las células apropiadas y dicha glicosilación puede ayudar a estabilizar la proteína en solución y/o cuando se administra *in vivo*. Por lo tanto, una proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc puede comprender un enlazador glicosilado entre la región Fc y la muteína de IL-2.

30 Se contempla que el enlazador glicosilado puede ser útil cuando se coloca en el contexto de un polipéptido. En el presente documento se proporcionan polipéptidos que comprenden GGNGT (SEC ID NO: 6) o YGNGT (SEC ID NO: 7) insertados en la secuencia de aminoácidos del polipéptido o que reemplazan uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. La GGNGT (SEQ ID NO:6) o YGNGT (SEQ ID NO:7) puede insertarse en un bucle de la estructura terciaria de los polipéptidos. En otras realizaciones, uno o más aminoácidos de un bucle se reemplazan con GGNGT (SEQ ID NO: 6) o YGNGT (SEQ ID NO: 7).

35 La parte C-terminal de Fc y/o la parte amino terminal de la muteína de IL-2, pueden contener una o más mutaciones que alteran el perfil de glicosilación de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc cuando se expresa en células de mamíferos. Adicionalmente, la muteína de IL-2 puede comprender una sustitución T3, por ejemplo, T3N o T3A. Adicionalmente, la muteína de IL-2 puede comprender una sustitución S5, tal como S5T

40 En el alcance de la presente invención pueden incluirse modificaciones covalentes de la muteína de IL-2 y de las proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, y generalmente, pero no siempre, se realizan después de la traducción. Por ejemplo, en la molécula se introducen varios tipos de modificaciones covalentes de la muteína de IL-2 o de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc haciendo reaccionar restos de aminoácidos específicos de la muteína de IL-2 o de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, con un agente orgánico derivatizante que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los restos del extremo N o C terminal.

45 Los restos de cisteinilo se hacen reaccionar más habitualmente con α -haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos

de cisteinilo también se derivatizan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozilo)propiónico, cloroacetil fosfato, N-alquilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

5 Los restos de histidilo se derivatizan mediante reacción con dietilpirocarbonato a un pH de 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferentemente en cacodilato de sodio 0,1 M a un pH de 6,0.

10 Los restos de lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivación con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los restos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para la derivatización de restos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción con glioxilato catalizada con transaminasa.

15 Los restos de arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos, fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de los restos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a al alto valor de pK_a del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo amino épsilon de arginina.

20 La modificación específica de los restos de tirosilo puede realizarse, con particular interés, introduciendo marcadores espectrales en restos de tirosilo mediante reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Muy frecuentemente, se utiliza N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los restos de tirosilo se yodan utilizando ¹²⁵I o ¹³¹I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayos, siendo adecuado el método de cloramina T descrito anteriormente.

25 Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidias (R'-N=C=N-R'), donde R y R' son, opcionalmente, grupos alquilo diferentes, tal como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilfenil) carbodiimida. Además, los restos de aspartilo y glutamilo se convierten en restos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones de amonio.

30 La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular proteínas de unión a antígeno a una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su uso en una variedad de métodos. Los agentes reticulantes habitualmente utilizados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres de ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato) y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato, producen productos intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. Como alternativa, matrices reactivas insolubles en agua, tales como hidratos de carbono activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de Estados Unidos N° 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440, se emplean para la inmovilización de las proteínas.

35 Los restos de glutaminilo y asparaginilo se desamidán frecuentemente a los restos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Como alternativa, estos restos se desamidán en condiciones ligeramente ácidas. Cualquier forma de estos restos se incluye en el alcance de la presente invención.

40 Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, págs. 79-86), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

45 Otro tipo de modificación covalente de la muteína de IL-2 o de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, incluida dentro del alcance de esta invención, puede comprender alterar el patrón de glicosilación de la proteína. Tal como se conoce en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de restos de aminoácidos de glicosilación particulares, como se explica más adelante), o de la célula u organismo hospedador en el que se produce la proteína. Más adelante se explican sistemas de expresión particulares.

50 Por lo general, la glicosilación de polipéptidos está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del residuo de hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del residuo de hidrato de carbono con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, en un polipéptido, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas, crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

55

60

65

La adición de sitios de glicosilación a la muteína de IL-2 o a la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, puede realizarse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina, a la secuencia de partida (para sitios de glicosilación ligados a O). Por simplificar, la secuencia de aminoácidos de la muteína de IL-2 o de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, puede alterarse preferentemente a través de cambios al nivel de ADN, particularmente realizando mutaciones en el ADN que codifica el polipéptido diana, en bases preseleccionadas de manera que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio para aumentar el número de residuos de hidratos de carbono en la muteína de IL-2 o en la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, es mediante el acoplamiento químico o enzimático de los glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos ya que para la glicosilación ligada tanto a N como a O, no requieren la producción de la proteína en una célula hospedadora que tiene capacidades de glicosilación. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar (o azúcares) puede unirse a (a) una arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos, tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306.

La eliminación de los residuos de hidratos de carbono presentes en la muteína de IL-2 de partida o en la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, puede realizarse por medios químicos o enzimáticos. La desglicosilación química requiere exponer la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayor parte de los azúcares, o de todos ellos, a excepción del azúcar enlazador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacto el polipéptido. Las desglicosilación química la describen Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. En los polipéptidos, la escisión enzimática de residuos de hidratos de carbono puede realizarse utilizando una variedad de endo y exo-glicosidasas, tal como describen Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glicosilación en los posibles sitios de glicosilación puede impedirse utilizando el compuesto tunicamicina, tal como describen Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glicósido.

Otro tipo de modificación covalente de la muteína de IL-2 o de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, comprende la unión de la muteína de IL-2 o de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, con varios polímeros no proteicos, incluyendo, pero sin limitación, varios polioles, tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de Estados Unidos n.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 u 4.179.337. Además, las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en varias posiciones dentro de la muteína de IL-2 o de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, para facilitar la adición de polímeros tales como PEG, produciendo muteínas de IL-2 y proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc pegiladas. Dichas proteínas PEGiladas pueden tener una semivida aumentada y/o una inmunogenicidad reducida sobre las proteínas no PEGiladas.

Polinucleótidos que codifican muteínas de IL-2 y proteínas de fusión entre muteínas de IL-2 y Fc

En el presente documento se desvelan ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión entre muteínas de IL-2 y Fc. Los aspectos de la invención incluyen variantes de polinucleótidos (por ejemplo, debido a la degeneración) que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento. En aspectos preferidos, el polipéptido codificado por el ácido nucleico aislado es un componente de una proteína de fusión entre muteína IL-2 y Fc.

Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, para utilizar como sondas o cebadores para el aislamiento de ácidos nucleicos o como secuencias de consulta para búsquedas en bases de datos, pueden obtenerse mediante "retromutación" de las secuencias de aminoácidos. El bien conocido procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede emplearse para aislar y amplificar una secuencia de ADN que codifica las muteínas de IL-2 y la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc. Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados de la combinación de fragmentos de ADN se emplean como cebadores en las posiciones 5' y 3'. Los oligonucleótidos pueden contener adicionalmente sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, para facilitar la inserción de la combinación amplificada de fragmentos de ADN en un vector de expresión. Se describen técnicas de PCR en Maniatis et al., Science 239:487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego(1989), págs. 189-196; y "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden incluir ADN y ARN en forma tanto monocatenaria como bicatenaria, así como las secuencias complementarias correspondientes. Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que se ha separado de las secuencias genéticas adyacentes presentes en el genoma del organismo del cual se aisló el ácido nucleico, en el caso de ácidos nucleicos aislados de fuentes naturales. Se entiende que, en el caso de ácidos nucleicos sintetizados por medios enzimáticos a partir de un molde o por medios químicos, tales como productos de PCR, moléculas de ADNc u oligonucleótidos, por ejemplo, los ácidos nucleicos resultantes de dichos procesos son ácidos nucleicos aislados. Una molécula de ácido nucleico aislada se refiere a una molécula de ácido

nucleico en forma de un fragmento individual o como un componente de una construcción de ácido nucleico más grande. Los ácidos nucleicos pueden estar sustancialmente exentos de material endógeno contaminante. La molécula de ácido nucleico se ha obtenido preferiblemente de ADN o ARN aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura y en una cantidad o concentración que permite su identificación, manipulación y recuperación de sus secuencias de nucleótidos componentes mediante métodos bioquímicos convencionales (tales como los indicados en Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Preferentemente, dichas secuencias se proporcionan y/o se construyen en forma de un marco abierto de lectura ininterrumpido por secuencias internas no traducidas, o intrones, que, por lo general, están presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducido pueden estar presentes en las posiciones 5' o 3' a partir de un marco abierto de lectura, donde los mismos no interfieren con la manipulación o expresión de la región codificante.

Las variantes según la invención, se preparan habitualmente mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, utilizando casetes o mutagénesis por PCR u otras técnicas muy conocidas en la materia, para producir ADN que codifica la variante, y posteriormente expresar el ADN recombinante en cultivo celular como se indica en el presente documento. Sin embargo, La fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, puede prepararse por síntesis *in vitro* utilizando técnicas establecidas. Por lo general, las variantes exhiben la misma actividad biológica cualitativa que la del análogo de origen natural, por ejemplo, expansión de Treg, aunque también pueden seleccionarse variantes que tengan características modificadas, como se indicará más detalladamente a continuación.

Como apreciarán los expertos en la técnica, debido a la degeneración del código genético, puede producirse un número extremadamente grande de ácidos nucleicos, todos los cuales codifican las proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc de la presente invención. Por lo tanto, habiendo identificado una secuencia de aminoácidos particular, los expertos en la técnica podrían fabricar cualquier cantidad de ácidos nucleicos diferentes, simplemente modificando la secuencia de uno o más codones de manera que no cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

La presente divulgación también proporciona sistemas de expresión y construcciones en forma de plásmidos, vectores de expresión, transcripción o casetes de expresión que comprenden al menos un polinucleótido como el anterior. La invención proporciona vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos de la invención. Además, la invención proporciona células hospedadoras que comprenden dichos sistemas de expresión o construcciones.

Por lo general, los vectores de expresión utilizados en cualquiera de las células hospedadoras pueden contener secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Dichas secuencias, denominadas en su conjunto "secuencias flanqueantes", incluirán, por lo general, en determinadas realizaciones, una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción de polipéptidos, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región polienlazadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar, y un elemento marcador de selección. Cada una de estas secuencias se explica más adelante.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia codificante de "etiquetas", es decir, una molécula oligonucleotídica localizada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante de las muteínas de IL-2 o de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc; la secuencia oligonucleotídica que codifica la etiqueta de poliHis (tal como hexaHis (SEQ ID NO: 21)), u otra "etiqueta" tal como FLAG, HA (hemaglutinina del virus de la gripe), o *myc*, para las cuales existen anticuerpos disponibles en el comercio. Por lo general, después de la expresión del polipéptido, esta etiqueta se fusiona con el polipéptido y puede servir como un medio para la purificación por afinidad o para la detección de la muteína de IL-2 de la célula hospedadora. La purificación por afinidad puede realizarse, por ejemplo, mediante cromatografía en columna utilizando, como matriz de afinidad, anticuerpos contra la etiqueta. Opcionalmente, la etiqueta puede eliminarse posteriormente de las muteínas de IL-2 purificadas y de las proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc por diversos medios, tales como, utilizando determinadas peptidasas de escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula hospedadora), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintéticas o naturales. Como tal, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procarionta o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional y pueda activarla la maquinaria de la célula hospedadora.

Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención pueden obtenerse por cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica. Por lo general, las secuencias flanqueantes útiles del presente documento se habrán identificado previamente mediante el mapeo y/o la digestión con endonucleasas de restricción y, por lo tanto, pueden aislarse de la fuente de tejido adecuada utilizando endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante puede ser una secuencia conocida. En este caso,

la secuencia flanqueante puede sintetizarse utilizando los métodos descritos en el presente documento para la síntesis o clonación de ácidos nucleicos.

5 Tanto si se conoce toda o solo una parte de la secuencia flanqueante, esta puede obtenerse utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o explorando una biblioteca genómica con una sonda adecuada, tal como un oligonucleótido y/o un fragmento de secuencia flanqueante de la misma especie o de otra especie. Cuando se desconoce la secuencia flanqueante, un fragmento de ADN que contenga una secuencia flanqueante puede aislarse de un trozo de ADN más grande que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede realizarse por digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN adecuado, seguido de aislamiento utilizando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA), u otros métodos conocidos por los expertos en la materia. La selección de enzimas adecuadas para lograr este propósito será fácilmente obvio para un experto en la técnica.

15 Por lo general, un origen de replicación es una parte de aquellos vectores de expresión procariotas adquiridos en el comercio, y el origen ayuda en la amplificación del vector en una célula hospedadora. Si el vector de elección no contiene un origen de sitio de replicación, puede sintetizarse uno por medios químicos basándose en una secuencia conocida, y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas y varios orígenes víricos (por ejemplo, SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VEV) o virus del papiloma, tales como VPH o VPB), son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (por ejemplo, el origen de SV40 a menudo se usa solo porque también contiene el promotor temprano del virus).

25 Por lo general, una secuencia de terminación de la transcripción se localiza en posición 3' al final de una región codificante del polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Normalmente, en las células procariotas, una secuencia de terminación de la transcripción es un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia poli-T. Aunque la secuencia puede clonarse fácilmente de una biblioteca o incluso adquirirse en el comercio como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente utilizando métodos de síntesis de ácidos nucleicos como los descritos en el presente documento.

30 Un gen marcador de selección codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula hospedadora que crece en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, *por ejemplo*, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células hospedadoras procariotas; (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos o definidos. Son marcadores de selección específicos el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. Favorablemente, para la selección en células hospedadoras tanto procariotas como eucariotas, también puede utilizarse un gen de resistencia a neomicina.

40 Para amplificar el gen que se expresará, pueden utilizarse otros genes de selección. La amplificación es el proceso en el que los genes que se requieren para la producción de una proteína crítica para el crecimiento o la supervivencia celular se repiten en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores de selección adecuados para células de mamífero incluyen los genes de dihidrofolato reductasa (DHFR) y de timidina cinasa sin promotor. Los transformantes de células de mamífero se colocan bajo presión de selección, en la que solo los transformantes están adaptados únicamente para sobrevivir en virtud del gen de selección presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio aumenta sucesivamente, conduciendo así a la amplificación tanto del gen de selección como del ADN que codifica otro gen, tal como una muteína de IL-2 y una proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc. Como resultado, cantidades aumentadas de un polipéptido, tal como una muteína de IL-2 o una proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc se sintetizan a partir de ADN amplificado.

55 Un sitio de unión a ribosoma suele ser normalmente necesario para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). Por lo general, el elemento se localiza en la posición 3' con respecto al promotor y en la posición 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido que se va a expresar. Una o más regiones codificantes pueden estar unidas operativamente a un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*), permitiendo la traducción de dos marcos abiertos de lectura a partir de un solo transcrito de ARN.

60 En algunos casos, tal como cuando se desea la glicosilación en un sistema de expresión de células hospedadoras eucariotas, se pueden manipular las diferentes pre- o prosecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de la peptidasa de un péptido señal particular, o añadir prosecuencias, lo que también puede afectar a la glicosilación. El producto proteico final puede tener, en la posición -1 (en relación con el primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales incidentes a la expresión, que puede que no se hayan eliminado por completo. Por ejemplo, el producto proteico final puede tener uno o dos restos de aminoácidos encontrados en el sitio de escisión de la peptidasa, unidos al extremo amino. Como alternativa, el uso

de algunos sitios de escisión enzimática puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en dicha zona dentro del polipéptido maduro.

Por lo general, los vectores de expresión y clonación de la invención contendrán un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y que está unido operativamente a la molécula que codifica la muteína de IL-2 o la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc. Los promotores son secuencias no transcritas localizadas cadena arriba (es decir, en dirección 5') al codón de inicio de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician mayores niveles de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Por otro lado, los promotores constitutivos, transcriben uniformemente el gen al que están unidos operativamente, es decir, con poco o ningún control sobre la expresión génica. Se conoce bien una gran cantidad de promotores, reconocidos por una variedad de posibles células hospedadoras.

En la técnica también se conocen bien promotores adecuados para su uso con hospedadores de levadura. Los potenciadores de levadura se utilizan favorablemente con promotores de levadura. En la técnica se conocen bien promotores adecuados para su uso con células hospedadoras de levadura e incluyen, pero sin limitación, los obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y, más preferentemente, el virus del simio 40 (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

Promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, aunque sin limitación: el promotor temprano de SV40 (Benoit y Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); el promotor de CMV (Thorsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:659-663); el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); promotor y secuencias reguladoras del gen de la metalotionina, Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); y promotores procariotas tales como el promotor de la beta lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); o el promotor tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). También son de interés las siguientes regiones de control transcripcional de animales, que exhiben especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa I, que es activa en células pancreáticas acinares (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de insulina, que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); la región de control del gen de la inmunoglobulina, que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); la región de control del virus del tumor mamario del ratón, que está activa en células testiculares, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); la región de control del gen de la albúmina, que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, *Genes y Devel.* 1:268-276); la región de control del gen de la alfa-1 antitripsina, que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); la región de control del gen de la alfa-1 antitripsina, que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, *Genes y Devel.* 1:161-171); la región de control del gen de la beta-globina, que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina, que es activa en células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); la región de control del gen de la cadena ligera-2 de la miosina, que es activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); y la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica, que es activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Se puede insertar una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción de los eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente con una longitud de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición, habiéndose encontrado en las posiciones 5' y 3' de la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamíferos (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-1 antitripsina e insulina). Sin embargo, por lo general, se utiliza un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del polio y los potenciadores de adenovirus conocidos en la técnica, son elementos potenciadores ejemplares para la activación de promotores eucariotas. Aunque un potenciador puede colocarse en el vector en la posición 5' o 3' en una secuencia codificante, por lo general se localiza en un sitio 5' a partir del promotor. En un vector de expresión puede incorporarse una secuencia que codifica una secuencia señal natural o heteróloga apropiada (secuencia líder o péptido señal), para promover la secreción extracelular de la muteína de IL-2 o de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc. La elección del péptido señal o secuencia líder depende del tipo de células hospedadoras en las que se producirá la proteína, y una secuencia señal heteróloga puede reemplazar la secuencia señal natural. Como ejemplos de péptidos señal que son funcionales en células hospedadoras de mamífero se incluyen los siguientes: la secuencia de señal para la interleucina-7 (IL-7) descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.965.195; la secuencia señal para el receptor de interleucina-2 descrita en Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; el péptido señal del receptor de interleucina-4 descrito en la Patente EP No. 0367 566; el péptido señal del receptor de interleucina-1 de tipo I descrito

en la Patente de Estados Unidos No. 4.968.607; el péptido señal del receptor de interleucina-1 de tipo II descrito en la Patente EP No. 0 460 846.

El vector puede contener uno o más elementos que facilitan la expresión cuando el vector está integrado en el genoma de la célula hospedadora. Como ejemplos se incluyen un elemento EASE (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) y una región de unión a matriz (MAR, del inglés *matrix attachment region*). Las MAR actúan como mediadoras en la organización estructural de la cromatina y pueden aislar el vector integrado del efecto "posicional". Por lo tanto, las MAR son particularmente útiles cuando el vector se utiliza para crear transfectantes estables. En la técnica se conocen diversos ácidos nucleicos naturales y sintéticos que contienen MAR, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 6.239.328; 7.326.567; 6.177.612; 6.388.066; 6.245.974; 7.259.010; 6.037.525; 7.422.874; 7.129.062.

Los vectores de expresión de la invención pueden construirse a partir de un vector de inicio tal como un vector disponible en el comercio. Dichos vectores pueden contener o no todas las secuencias flanqueantes deseadas. Cuando una o más de las secuencias flanqueantes descritas en este documento no están ya presentes en el vector, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. Un experto en la técnica conoce bien los métodos utilizados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes.

Después de que se haya construido el vector y de que se haya insertado una molécula de ácido nucleico que codifica una muteína de IL-2 o una proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc en el sitio adecuado del vector, el vector completado se puede insertar en una célula hospedadora adecuada para la amplificación y/o expresión de polipéptidos. La transformación de un vector de expresión en una célula hospedadora seleccionada puede realizarse mediante métodos bien conocidos que incluyen transfección, infección, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El método seleccionado dependerá, en parte, del tipo de célula hospedadora que vaya a utilizarse. Estos métodos y otros métodos adecuados son muy conocidos por el experto en la técnica, y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001, *citado anteriormente*.

Cuando una célula hospedadora se cultiva en condiciones apropiadas, sintetiza una muteína de IL-2 o una proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, que posteriormente se puede recoger del medio de cultivo (si la célula hospedadora lo segrega en el medio) o directamente de la célula hospedadora que lo produce (si esta no lo segrega). La selección de una célula hospedadora apropiada dependerá de varios factores, tales como de los niveles de expresión deseados, de las modificaciones polipeptídicas que son deseables o necesarias para la actividad (tal como la glicosilación o la fosforilación) y de la facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota o procarionta.

En la técnica se conocen bien líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadoras para la expresión, e incluyen, pero sin limitación, líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y cualquier línea celular utilizada en un sistema de expresión conocido en la técnica que pueda utilizarse para preparar los polipéptidos recombinantes de la invención. En general, las células hospedadoras se transforman con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica una muteína de IL-2 o una fusión entre la muteína de IL-2 y Fc deseadas. Entre las células hospedadoras que pueden emplearse se encuentran las células procariontas, las levaduras o las células eucariotas superiores. Las células procariontas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen células de insecto y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Ejemplos de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), Células de ovario de hámster chino (CHO), o sus derivados, tales como Veggie CHO y líneas celulares relacionadas que crecen en medios exentos de suero (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), células HeLa, las líneas celulares BHK (ATCC CRL 10) y la línea celular CVI/EBNA obtenida de la línea celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) (véase McMahan *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 2821, células de riñón embrionario humano tales como 293, 293 EBNA o MSR 293, células epidérmicas A431 humanas, células Colo205 humanas, otras líneas celulares de primate transformadas, células diploides normales, cepas celulares procedentes de cultivos *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, HL-60, U937, células HaK o Jurkat. Opcionalmente, pueden utilizarse líneas celulares de mamífero, tales como HepG2/3B, KB, NIH 3T3 o S49, por ejemplo, para la expresión del polipéptido cuando es deseable utilizar el polipéptido en diversos ensayos de transducción de señales o indicadores.

Como alternativa, es posible producir el polipéptido en eucariotas inferiores, tales como levaduras, o en procariontas, tales como bacterias. Como levaduras adecuadas se incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida*, o de cualquier cepa de levadura capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Como cepas bacterianas adecuadas se incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Si el polipéptido se fabrica en levaduras o bacterias, puede ser deseable modificar el polipéptido producido en su interior, por ejemplo, por fosforilación o glicosilación de los sitios apropiados, para obtener el polipéptido funcional. Dichas uniones covalentes pueden realizarse utilizando métodos químicos o enzimáticos conocidos.

El polipéptido también puede producirse uniendo operativamente el ácido nucleico aislado de la invención con secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insecto, y empleando un sistema de expresión de insecto. En el comercio se dispone de materiales y métodos de sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto en forma de kit, por ejemplo, Invitrogen, San Diego, Calif., EE. UU. (el kit de MaxBac®), y dichos métodos son muy conocidos en la técnica, como se describe en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), y en Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). También podrían emplearse sistemas de traducción sin células para producir polipéptidos utilizando ARN procedente de construcciones de ácido nucleico desveladas en el presente documento. Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, Nueva York, 1985), describen vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con hospedadores celulares de bacterias, hongos, levaduras y mamíferos. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado de la invención, preferentemente unido operativamente a al menos una secuencia de control de expresión, es una "célula hospedadora recombinante".

En determinados aspectos, la descripción desvela un ácido nucleico aislado que codifica una muteína de IL-2 humana que estimula preferentemente a los linfocitos T reguladores y que comprende una sustitución V91K y una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1. El ácido nucleico aislado puede codificar cualquiera de las muteínas de IL-2 ejemplares proporcionadas en el presente documento.

También se incluyen ácidos nucleicos aislados que codifican cualquiera de las proteínas de fusión de Fc ejemplares descritas en el presente documento. La parte Fc de un anticuerpo y la muteína de IL-2 humana pueden codificarse dentro de un solo marco abierto de lectura, opcionalmente con un enlazador codificado entre la región Fc y la muteína de IL-2.

En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos anteriores que codifican las proteínas de fusión de Fc unidos operativamente a un promotor.

En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos aislados que codifican las proteínas de fusión de Fc. La célula hospedadora puede ser una célula procarionta, tal como *E. coli*, o puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero. La célula hospedadora puede ser una línea celular de ovario de hámster chino (CHO, del inglés *Chinese hamster ovary*).

En el presente documento se describen métodos para preparar una muteína de IL-2 humana. Comprendiendo los métodos cultivar una célula hospedadora en condiciones en las que se expresa un promotor unido operativamente a una muteína de IL-2 humana. Posteriormente, la muteína de IL-2 humana se recoge de dicho cultivo. La muteína de IL-2 puede recogerse de los medios de cultivo y/o de los lisados de células hospedadoras.

En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan métodos para preparar una proteína de fusión de Fc. Comprendiendo los métodos cultivar una célula hospedadora en condiciones en las que se expresa un promotor unido operativamente a una muteína de IL-2 humana. Posteriormente, la proteína de fusión de Fc se recoge de dicho cultivo. La proteína de fusión de Fc puede recogerse de los medios de cultivo y/o de los lisados de células hospedadoras.

Composiciones farmacéuticas

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una muteína de IL-2 junto con un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente eficaz. La muteína de IL-2 puede estar dentro del contexto de una proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc. Las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen, pero sin limitación, composiciones líquidas, congeladas y liofilizadas.

Preferentemente, los materiales de formulación no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula terapéutica que contenga la muteína de IL-2, por ejemplo, una fusión entre la muteína de IL-2 y Fc.

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la tasa de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina, prolina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes formadores de volumen (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y

diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (tal como sodio); conservantes (tal como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenilico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; agentes tensioactivos o humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferentemente cloruro de sodio o de potasio, manitol sorbitol); vehículos de suministro; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª edición, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

En determinados aspectos de la divulgación, un experto en la materia determinará la composición farmacéutica óptima dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración prevista, del formato de suministro y de la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, citado anteriormente. En determinados aspectos, dichas composiciones pueden influir en el estado físico, en la estabilidad, en la velocidad de liberación *in vivo* y en la velocidad de eliminación *in vivo* de las proteínas de unión a antígeno de la invención. En determinados aspectos, en una composición farmacéutica, el vehículo o transportador primario puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o transportador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con seroalbúmina son vehículos adicionales ejemplares. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender también Tris a un pH de aproximadamente 7,0-8,5, o tampón acetato a un pH de aproximadamente 4,0-5,5, y pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. Las composiciones de muteína de IL-2 pueden prepararse para su conservación mezclando la composición seleccionada, que tenga el grado de pureza deseado, con agentes de formulación opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, citado anteriormente), en forma de una torta liofilizada o de una solución acuosa. Además, en determinados aspectos de la divulgación, el producto de muteína de IL-2 puede formularse como un liofilizado utilizando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden seleccionarse para su suministro por vía parenteral. Como alternativa, las composiciones pueden seleccionarse para su suministro por inhalación o a través del tubo digestivo, tal como por vía oral. La preparación de dichas composiciones farmacéuticamente aceptables está incluida en la experiencia de la técnica. Preferentemente, los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables en el sitio de la administración. En determinados aspectos de la divulgación, se utilizan tampones para conservar la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, por lo general en un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en la presente divulgación, pueden proporcionarse en forma de una solución acuosa, apirógena, parenteralmente aceptable, que comprende la composición de muteína de IL-2 deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral, es agua destilada estéril, en la que la composición de muteína de IL-2, se formula como una solución estéril e isotónica, adecuadamente conservada. En determinados aspectos, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar el control o liberación sostenida del producto que puede suministrarse mediante inyección de tipo depósito. En determinados aspectos, también puede utilizarse ácido hialurónico, cuyo efecto es promover la duración sostenida en circulación. En determinados aspectos, para introducir la composición de muteína de IL-2, pueden utilizarse dispositivos implantables de suministro de fármacos.

Para los expertos en la técnica serán obvias otras composiciones farmacéuticas, incluyendo formulaciones que impliquen composiciones de muteína de IL-2 en formulaciones de suministro sostenido o controlado. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular diversos otros medios de suministro sostenido o controlado, tales como transportadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de tipo depósito. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional n.º PCT/US93/00829, que la que se describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el suministro de composiciones farmacéuticas. Las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. La matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (como se desvela en la patente de Estados Unidos No. 3.773.919 y en la publicación de solicitud de patente Europea No. EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 y Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etilvinilacetato (Langer et al., 1981, citado anteriormente) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (publicación de solicitud de patente Europea No. EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas que pueden prepararse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; las publicaciones de solicitud de patente Europea No. EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

Por lo general, las composiciones farmacéuticas que se utilizan para la administración *in vivo* se proporcionan como preparaciones estériles. Esto puede realizarse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, utilizando este método, la esterilización puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. Las composiciones para administración parenteral pueden conservarse en forma liofilizada o en una solución. Las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Aspectos de la invención incluyen formulaciones autotamponadas de muteína de IL-2, que pueden utilizarse como composiciones farmacéuticas, como se describe en la solicitud de patente internacional WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599).

Como se ha explicado anteriormente, determinados aspectos de la invención proporcionan composiciones de muteína de IL-2, particularmente, proteínas farmacéuticas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, que comprenden, además de la composición de muteína de IL-2, uno o más excipientes, tales como los que se describen de manera ilustrativa en este apartado y en cualquier otra parte del presente documento. A este respecto, en la divulgación, los excipientes pueden utilizarse para una amplia variedad de propósitos, tales como ajustar las propiedades físicas, químicas o biológicas de las formulaciones, tales como ajustar la viscosidad y/o los procesos de la invención para mejorar la eficacia y/o estabilizar dichas formulaciones y procesos contra la degradación y la descomposición debido a, por ejemplo, tensiones que se producen durante la fabricación, el transporte, el almacenamiento, la preparación antes del uso, la administración y etcétera.

A este respecto, se dispone de una variedad de exposiciones sobre la estabilización de proteínas y materiales de formulación y métodos útiles, tal como Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," en: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter y Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), y Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), particularmente en partes a propósito de excipientes y procesos de los mismos para formulaciones de proteínas autotamponadas según la presente divulgación, especialmente en lo que se refiere a productos farmacéuticos proteicos y a procesos para usos en medicina veterinaria y/o en seres humanos.

Según determinados aspectos de la divulgación, pueden utilizarse sales para, por ejemplo, ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad de una formulación y/o mejorar la solubilidad y/o la estabilidad física de una proteína u otro ingrediente de una composición según la divulgación.

Como bien se sabe, los iones pueden estabilizar el estado natural de las proteínas uniéndose a restos cargados en la superficie de la proteína y protegiendo los grupos cargados y polares en la proteína y reduciendo la fuerza de sus interacciones electrostáticas, atrayentes o repulsivas. Los iones también pueden estabilizar el estado desnaturalizado de una proteína al unirse, en particular, los enlaces peptídicos desnaturalizados (-CONH) de la proteína. Además, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína también puede reducir las interacciones electrostáticas intermoleculares y, de este modo, impedir o reducir la agregación e insolubilidad de las proteínas.

Las especies iónicas difieren significativamente en sus efectos sobre las proteínas. Se han desarrollado diversas clasificaciones categóricas de los iones y sus efectos sobre las proteínas que pueden utilizarse en la formulación de composiciones farmacéuticas según la divulgación. Un ejemplo es la serie de Hofmeister, que clasifica solutos iónicos y no iónicos polares por sus efectos sobre la estabilidad conformacional de las proteínas en solución. Los solutos estabilizantes se conocen como "cosmotrópicos". Los solutos desestabilizantes se conocen como "caotrópicos". Los cosmotrópicos se utilizan habitualmente a altas concentraciones (por ejemplo, > 1 molar de sulfato de amonio) para precipitar las proteínas de la solución ("desalinización"). Los caotrópicos se utilizan habitualmente para desnaturalizar y/o solubilizar las proteínas ("salinización"). La eficacia relativa de los iones para "salinizar" y "desalinizar" define su posición en la serie de Hofmeister.

Los aminoácidos libres pueden utilizarse en formulaciones de muteína de IL-2 según diversos aspectos de la divulgación como agentes formadores de volumen, estabilizantes y antioxidantes, así como en otros usos convencionales. Lisina, prolina, serina y alanina puede utilizarse para estabilizar proteínas en una formulación. La glicina es útil en la liofilización para garantizar la estructura y propiedades correctas de la torta. La arginina puede ser útil para inhibir la agregación de las proteínas, en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas. La metionina es útil como antioxidante.

Los polioles incluyen azúcares, por ejemplo, manitol, sacarosa y sorbitol y alcoholes polihídricos tales como, por ejemplo, glicerol y propilenglicol, y, por razones comentadas en el presente documento, polietilenglicol (PEG) y sustancias relacionadas. Los polioles son cosmotrópicos. Son agentes estabilizantes útiles en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas para proteger las proteínas de los procesos de degradación física y química. Los polioles también son útiles para ajustar la tonicidad de las formulaciones.

Entre los polioles útiles en aspectos seleccionados de la divulgación está el manitol, habitualmente utilizado para garantizar la estabilidad estructural de la torta en las formulaciones liofilizadas. Garantiza a la torta estabilidad estructural. Se utiliza generalmente con un lioprotector, por ejemplo, sacarosa. El sorbitol y la sacarosa se encuentran entre los agentes preferidos para ajustar la tonicidad y como estabilizadores para proteger contra las tensiones de congelación y descongelación durante el transporte o la preparación de volúmenes durante el proceso de fabricación. Azúcares reductores (que contienen grupos aldehído o cetona libre), como la glucosa y la lactosa, pueden producir la glicación de restos de lisina y arginina de la superficie. Por lo tanto, generalmente no están entre los polioles preferidos para su uso según la invención. Además, los azúcares que forman dichas especies reactivas, tales como sacarosa, que se hidroliza a fructosa y glucosa en condiciones ácidas, y en consecuencia engendra glicación, tampoco está entre los polioles preferidos de la invención a este respecto. El PEG es útil para estabilizar proteínas y como un crioprotector y puede utilizarse en la invención a este respecto.

Las formulaciones de muteína de IL-2 pueden comprender además tensioactivos. Las moléculas proteicas pueden ser susceptibles a la adsorción en las superficies y a la desnaturalización y a la consiguiente agregación en las interfaces aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Generalmente, estos efectos se gradúan inversamente con la concentración de proteínas. Generalmente, estas interacciones perjudiciales se gradúan inversamente con la concentración de proteínas y, por lo general, se exacerban con agitación física, como la generada durante el transporte y la manipulación de un producto.

Los tensioactivos se utilizan habitualmente para impedir, minimizar o reducir la adsorción superficial. Los tensioactivos útiles en la invención a este respecto incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitán y poloxámero 188.

Los tensioactivos también se utilizan habitualmente para controlar la estabilidad conformacional de las proteínas. El uso de tensioactivos en este sentido es específico de proteínas ya que, por lo general, cualquier tensioactivo dado estabilizará algunas proteínas y desestabilizará otras.

Los polisorbatos son susceptibles a la degradación oxidativa y, a menudo, tal como se suministran, contienen cantidades suficientes de peróxidos para causar la oxidación de cadenas laterales de restos de proteínas, especialmente de metionina. En consecuencia, los polisorbatos deben utilizarse con cuidado y, cuando se utilicen, deberían emplearse a su concentración eficaz más baja. En este sentido, los polisorbatos ilustran la regla general de que los excipientes deben utilizarse en sus concentraciones eficaces más bajas.

Las formulaciones de muteína de IL-2 pueden comprender además uno o más antioxidantes. Hasta cierto punto, la oxidación de proteínas puede impedirse en formulaciones farmacéuticas manteniendo niveles adecuados de oxígeno y temperatura ambiente y evitando la exposición a la luz. También pueden utilizarse excipientes antioxidantes para impedir la degradación oxidativa de las proteínas. Entre los antioxidantes útiles en este sentido están los agentes reductores, secuestradores de oxígeno/radicales libres, y agentes quelantes. Los antioxidantes para su uso en formulaciones de proteínas terapéuticas según la invención son preferentemente solubles en agua y conservan su actividad a lo largo de la vida útil de un producto. A este respecto, el EDTA es un antioxidante preferido según la invención.

Los antioxidantes pueden dañar a las proteínas. Por ejemplo, agentes reductores, como el glutatión en particular, puede alterar los enlaces disulfuro intramoleculares. Por lo tanto, los antioxidantes para su uso en la divulgación se seleccionan para, entre otras cosas, eliminar o reducir suficientemente la posibilidad de que dañen a las proteínas en la formulación.

Las formulaciones según la invención pueden incluir iones metálicos que son cofactores de proteínas y que son necesarios para formar complejos de coordinación de proteínas, tal como el zinc necesario para formar determinadas suspensiones de insulina. Los iones metálicos también pueden inhibir algunos procesos que degradan a las proteínas. Sin embargo, los iones metálicos también catalizan procesos físicos y químicos que degradan a las proteínas.

Los iones de magnesio (10-120 mM) pueden utilizarse para inhibir la isomerización del ácido aspártico al ácido isoaspártico. Los iones Ca^{+2} (hasta 100 mM) pueden aumentar la estabilidad de la desoxirribonucleasa humana. Sin embargo, los iones Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , pueden desestabilizar la DNAsahr (humana recombinante). De manera similar, los iones Ca^{+2} y Sr^{+2} pueden estabilizar el factor VIII, el cual puede desestabilizarse con los iones Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} , y su agregación puede aumentarse con iones Al^{+3} .

Las formulaciones de muteína de IL-2 pueden comprender además uno o más conservantes. Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales de dosis múltiple que implican más de una extracción del mismo envase. Su función principal es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto durante todo el período de validez o uso del medicamento. Los conservantes habitualmente utilizados incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen un largo historial de uso con formulaciones parenterales de molécula pequeña, el desarrollo de formulaciones proteicas que incluyan conservantes puede ser un desafío. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizador (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante para limitar su uso en formulaciones proteicas de dosis múltiple. Hasta ahora, la mayoría de

- los fármacos basados en proteínas han sido formulados para un solo uso. Sin embargo, cuando son posibles las formulaciones de dosis múltiple, tienen la ventaja añadida de conferir comodidad al paciente y una mayor capacidad de comercialización. Un buen ejemplo es el de la hormona del crecimiento humano (hGH), donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha llevado a la comercialización de presentaciones de plumas de inyección multiuso más convenientes. Al menos cuatro de estos dispositivos de pluma que contienen formulaciones de hGH conservadas, están actualmente disponibles en el comercio. Norditropin (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ (líquida, Genentech) y Genotropin (liofilizado-cartucho de doble cámara, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol mientras que Somatropo (Eli Lilly) está formulado con m-cresol.
- Durante la formulación y el desarrollo de formas de dosificación conservadas deben considerarse diversos aspectos. La concentración eficaz de conservante en el fármaco debe optimizarse. Esto requiere analizar un conservante dado en la forma de dosificación con intervalos de concentración que confieran efectividad antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de las proteínas.
- Como cabría esperar, el desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más desafiante que las formulaciones liofilizadas. Los productos deshidratados por congelación pueden liofilizarse sin el conservante y reconstituirse con un conservante que contenga un diluyente en el momento de su uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con formulaciones líquidas, la eficacia y estabilidad del conservante deben mantenerse durante toda la vida útil del producto (de aproximadamente 18 a 24 meses). Un punto importante a tener en cuenta es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes del excipiente.
- Las formulaciones de muteína de IL-2 generalmente se diseñarán para vías y métodos de administración específicos, para dosificaciones de administración y frecuencias de administración específicas, para tratamientos específicos de enfermedades específicas, con intervalos de biodisponibilidad y persistencia, entre otras cosas. Por lo tanto, pueden diseñarse formulaciones de acuerdo con la invención para el suministro mediante cualquier vía adecuada, incluyendo, pero sin limitación, la vía oral, ótica, oftalmológica, rectal y vaginal, y por vía parenteral, incluyendo inyección intravenosa e intraarterial, inyección intramuscular y subcutánea.
- Una vez formulada la composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal, o como un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para usar o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración. La invención también proporciona kits para producir una unidad de administración de dosis única. Cada uno de los kits de la invención puede contener un primer recipiente que tenga una proteína deshidratada y un segundo recipiente que tenga una formulación acuosa. En determinados aspectos de la presente divulgación, se proporcionan kits que contienen jeringas precargadas de una sola cámara y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas con líquidos y liojeringas).
- La cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene muteína de IL-2 que se va a emplear dependerá, por ejemplo, del contexto y objetivos terapéuticos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán, en parte, en función de la molécula suministrada, de la indicación para la cual se está utilizando la muteína de IL-2, de la vía de administración y del tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o condición (la edad y el estado general de salud) del paciente. En determinados aspectos, el médico puede valorar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar de aproximadamente 0,1 µg/kg a hasta aproximadamente 1 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En aspectos específicos, la dosificación puede variar de 0,5 µg/kg a hasta aproximadamente 100 µg/kg, opcionalmente de 2,5 µg/kg a hasta aproximadamente 50 µg/kg.
- Una cantidad terapéuticamente eficaz de una muteína de IL-2 produce preferentemente una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia o duración de los periodos sin síntomas de enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la enfermedad padecida.
- Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse utilizando un dispositivo médico. Se describen ejemplos de dispositivos médicos para administrar composiciones farmacéuticas en las patentes de Estados Unidos Nos. 4.475.196; 4.439.196; 4.447.224; 4.447.233; 4.486.194; 4.487.603; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 5.064.413; 5.312.335; 5.312.335; 5.383.851; y 5.399.163.
- Muteínas de IL-2 para su uso en métodos de tratamiento de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios
- Una muteína de IL-2 de la divulgación puede utilizarse para tratar un trastorno autoinmunitario o inflamatorio. En aspectos preferidos, se utiliza una proteína fusión entre la muteína de IL-2 y Fc.
- Los trastornos que son particularmente susceptibles de tratamiento con la muteína de IL-2 desvelados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, inflamación, enfermedad autoinmunitaria, enfermedades atópicas,

enfermedades autoinmunitarias paraneoplásicas, inflamación del cartílago, artritis, artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide juvenil pauciarticular, artritis reumatoide juvenil poliarticular, artritis reumatoide juvenil de inicio sistémico, espondilitis anquilosante juvenil, artritis enteropática juvenil, artritis reactiva juvenil, síndrome de Reiter juvenil, síndrome de SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía y artropatía), dermatomiositis juvenil, artritis soriasica juvenil, esclerodermia juvenil, lupus eritematoso sistémico juvenil, vasculitis juvenil, artritis reumatoide pauciarticular, artritis reumatoide poliarticular, artritis reumatoide de inicio sistémico, espondilitis anquilosante, artritis enteropática, artritis reactiva, síndrome de Reiter, síndrome de SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía y artropatía), dermatomiositis, artritis soriasica, esclerodermia, vasculitis, miositis, polimiositis, dermatomiositis, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis, polimialgia reumática, sarcoidosis, esclerosis, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, síndrome de Sjogren, psoriasis, psoriasis en placa, psoriasis gotosa, psoriasis inversa, psoriasis pustular, psoriasis eritrodérmica, dermatitis, dermatitis atópica, aterosclerosis, lupus, enfermedad de Still, Lupus Eritematoso Sistémico (LES), miastenia grave, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple (EM), asma, EPOC, , rinosinusitis, rinosinusitis con pólipos, esofagitis eosinófila, bronquitis eosinófila, enfermedad de Guillain-Barre, diabetes mellitus de tipo I, tiroiditis (por ejemplo, enfermedad de Grave), enfermedad de Addison, fenómeno de Raynaud, hepatitis autoinmunitaria, EICH, rechazo de trasplante, daño renal, vasculitis inducida por hepatitis C, pérdida espontánea del embarazo, y similares.

En aspectos preferidos, el trastorno autoinmunitario o inflamatorio es lupus, enfermedad del injerto contra el huésped, vasculitis inducida por hepatitis C, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, pérdida espontánea del embarazo, enfermedades atópicas, y enfermedades intestinales inflamatorias.

Uso en métodos de expansión de linfocitos Treg

La muteína de IL-2 o las proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, pueden utilizarse para expandir linfocitos Treg en un sujeto o en una muestra. En el presente documento se proporcionan métodos para aumentar la relación de linfocitos T reguladores (Treg) sobre la de linfocitos T no reguladores. El método comprende poner en contacto una población de linfocitos T con una cantidad eficaz de una muteína de IL-2 humana o fusión entre la muteína de IL-2 y Fc. La relación puede medirse determinando la relación de linfocitos CD3+FOXP3+ sobre la de linfocitos CD3+FOXP3- en la población de linfocitos T. La frecuencia típica de Treg en sangre humana es de 5-10 % del total de linfocitos T CD4+ CD3+, sin embargo, en las enfermedades mencionadas anteriormente este porcentaje puede ser mayor o menor. En aspectos preferidos, el porcentaje de Treg aumenta al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 %, al menos un 400 %, al menos un 500 %, al menos un 600 %, al menos un 700 %, al menos un 800 %, al menos un 900 % o al menos un 1000 %. El factor de aumento máximo en Treg puede variar en el caso de enfermedades particulares; sin embargo, la frecuencia máxima de Treg que puede obtenerse mediante el tratamiento con la muteína de IL-2 es del 50 % o 60 % del total de linfocitos T CD4+ CD3+. En determinados aspectos, la muteína de IL-2 o la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, pueden administrarse a un sujeto y la relación de linfocitos T reguladores (Tregs) sobre la de linfocitos T no reguladores en la sangre periférica de un sujeto aumenta.

Dado que la muteína de IL-2 y las proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc expanden preferentemente los Treg sobre otros tipos de linfocitos, también son útiles para aumentar la relación de linfocitos T reguladores (Treg) sobre la de linfocitos citolíticos naturales (NK) en la sangre periférica de un sujeto. La relación puede medirse determinando la relación de linfocitos CD3+FOXP3+ sobre la de linfocitos CD16+ y/o CD56+ que son CD19- y CD3-.

Se contempla que las muteínas de IL-2 o las proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc, puedan tener un efecto terapéutico en una enfermedad o trastorno en un paciente sin expandir significativamente la relación de linfocitos Treg sobre la de linfocitos T no reguladores o linfocitos NK en la sangre periférica del paciente. El efecto terapéutico puede deberse a la actividad localizada de la muteína de IL-2 o de la proteína de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc en el sitio de la inflamación o autoinmunidad.

Ejemplos

Ejemplo 1: Reducción del número de mutaciones que confieren alta afinidad por CD25

Las muteínas de IL-2 con afinidad elevada por CD25 y fuerza de señalización reducida mediante IL-2Rβγ promueven preferentemente el crecimiento y la función de los linfocitos Treg. Para reducir la posible inmunogenicidad, se buscó el número mínimo de mutaciones necesarias para lograr una alta afinidad por CD25. La estructura cristalina de IL-2 en complejo con sus tres receptores (código PDB-2B5I) muestra que V69A y Q74P se localizan en la estructura helicoidal que interacciona con CD25. Esto puede explicar por qué V69A y Q74P se aislaron con frecuencia en dos selecciones de mutagénesis de IL-2 independientes para una alta afinidad de unión a CD25 (Rao et al. 2005; Thanos et al. 2006). Este ejemplo explora cuál de las otras mutaciones en la muteína de IL-2 "2-4" identificadas en la selección de Rao et al., son más importantes para aumentar la afinidad por encima de la observada con V69A y Q74P en solitario. Para determinar la unión a CD25 en la superficie de linfocitos T activados, se seleccionaron las siguientes

proteínas por citometría de flujo. Todas las construcciones también incluyeron una etiqueta FLAG C-terminal y una etiqueta de poli-His para la purificación y detección. Las mutaciones específicas se proporcionan entre paréntesis.

HaMut1D(V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:8)

5 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEALNLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSI ISTLT

HaMut2D (N30S,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:9)

10 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEALNLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSI ISTLT

HaMut3D (K35R,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:10)

15 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPRLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEALNLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSI ISTLT

HaMut4D (T37A,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:11)

20 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLARMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEALNLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSI ISTLT

HaMut5D (K48E,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:12)

25 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPEKATELKHLQCLEEEELKPLEEALNLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSI ISTLT

HaMut6D (E68D,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:13)

30 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEDALNLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSI ISTLT

HaMut7D (N71R,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:14)

35 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEALRLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSI ISTLT

HaMut8D (K35R,K48E,E68D,N88D,C125A) (SEQ ID NO: 15)

40 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPRLTRMLTFKFYMPEKATELKHLQCLEEEELKPLEDVLNLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSI ISTLT

35 HaMut7D se unió a CD25 con casi la misma afinidad que el aislado original "2-4" (~ 200 pM), lo que indica que la mutación N71R fue capaz de aumentar considerablemente la afinidad por encima de la observada con V69A, Q74P en solitario (HaMut1D, ~2 nM). Las otras construcciones poseían afinidades similares o ligeramente superiores a la de HaMut1D, con la excepción de HaMut8D cuya afinidad fue solo ligeramente mayor que la de IL-2 TS.

40 Ejemplo 2: muteínas de IL-2 fusionadas a dominios IgG1-Fc para mejorar la semivida

45 Para reducir la frecuencia de dosificación necesaria para lograr el enriquecimiento de Treg con una muteína de IL-2, se evaluaron varias fusiones entre los dominios IL-2 e IgG1-Fc. Los dominios Fc contenían mutaciones puntuales para anular las funciones efectoras mediadas por IgG1, como la lisis de células diana. Las mutaciones de la función efectora de Fc utilizadas en nuestros estudios fueron A327Q, Ala Ala (L234A+L235A) o N297G. Dado que las muteínas de IL-2 selectivas para Treg tienen una reducción parcial en la fuerza de IL-2, era importante fusionar IL-2 a Fc de tal manera

que no influyera significativamente en la señalización de IL-2R. Por lo tanto, las muteínas de IL-2 se analizaron con respecto a la activación de IL-2R con y sin fusión a Fc.

Para determinar si la dimerización de IL-2 por fusión a Fc aumentaría la fuerza de señalización de IL-2R debido al aumento de la avidéz por IL-2R, una muteína de IL-2 más débil (haD5) (US20110274650) se fusionó con el extremo amino de Fc, separada por una secuencia enlazadora GGGGS (SEQ ID NO: 5). Esta muteína poseía 3 mutaciones que influían sobre la señalización IL-2R (E15Q, H16N, N88D), 8 mutaciones que conferirían alta afinidad por CD25 (N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P) (Rao et al. 2005), y C125S que impedía el emparejamiento erróneo con la cisteína y la agregación. De esta manera, la fusión con Fc anuló completamente la actividad biológica de haD5, mientras que su unión de alta afinidad con la superficie celular de CD25 se potenció, probablemente debido al aumento de la avidéz por la dimerización.

Las muteínas de IL-2 también se fusionaron con cualquiera de los extremos N o C de un heterodímero de Fc, de manera que solo una cadena del dímero Fc llevaba el dominio de IL-2. El emparejamiento heterodimérico entre dos cadenas Fc asimétricas se promovió mediante interacciones electrostáticas entre las lisinas introducidas en una cadena de Fc y los ácidos aspárticos introducidos en la otra cadena de Fc. La muteína haD6 de IL-2, se fusionó con el extremo N de una cadena de Fc o con el de la otra, en el caso de que se prefiera una configuración, dando como resultado dos construcciones de proteínas denominadas haD6.FcDD y haD6.FcKK. También fusionamos la muteína haMut7D con el extremo C del heterodímero de Fc con uno o dos enlazadores de GGGGS (SEQ ID NO: 5), (FcKK(G4S)haMut7D, FcKK(G4S)2haMut7D). La fusión de la muteína haD6 de IL-2 con el extremo N del heterodímero de Fc dio como resultado una pérdida parcial de actividad con respecto a la haD6 libre en los dos experimentos de proliferación de pSTAT5 y proliferación de linfocitos T. Por el contrario, la fusión de haMut7D con el extremo C del heterodímero de Fc con cualquiera de uno o dos enlazadores de GGGGS (SEQ ID NO: 5), no alteró la fuerza de haMut7D.

También se investigó la fusión de una muteína de IL-2 con el extremo C de un homodímero de Fc. Las PBMC totales se activaron en matraces T75 de cultivo tisular a 300 millones de células por 100 ml con anti-CD3 (OKT3) 100 ng/ml. El día 3 de cultivo, las células se lavaron 3 veces y se dejaron reposar en medio reciente durante 3 días. Después, las células se estimularon con variantes de IL-2 a una titulación de dosis de 10x que variaba de 1 pM a 10 nM a un volumen final de 50 μ l. El nivel de fosforilación de STAT5 se midió utilizando el kit de tampón BD phosflow. En resumen, para detener la estimulación, se añadió 1 ml de tampón de lisis y fijación BD phosflow. Las células se fijaron durante 20 minutos a 37 °C y se permeabilizaron en hielo con 1x de tampón de permeabilización phosflow antes de teñirlas para CD4, CD25, FOXP3 y pSTAT5.

Como puede observarse en la FIG. 1, la bioactividad de las muteínas haMut1D y haMut7D no se alteró por la fusión con el extremo C de un homodímero de Fc. Por lo tanto, la fusión entre el extremo N de IL-2 y el extremo C de Fc no comprometió la actividad agonista de las muteínas de IL-2, incluso en el contexto de un homodímero de Fc.IL-2. En estas construcciones, para mejorar la fabricación, se utilizó la mutación C125A en lugar de C125S.

Ejemplo 3 - Ajuste de la fuerza de la muteína de IL-2 para lograr el crecimiento de Treg preferencial

El panel inicial de muteínas de IL-2 contenía N88D solo o con 1 o 2 mutaciones adicionales que influían en la señalización de IL-2R. Se diseñó un segundo panel de muteínas, todas con mutaciones puntuales únicas, con el objetivo de identificar muteínas con agonismo similar o ligeramente más fuerte que el de la serie N88D. Basándose en los aminoácidos previstos que interactuaban con IL-2R β (estructura cristalina, código PDB-2B5I), se identificó un panel de 24 mutaciones de señalización. Basándose en la disminución prevista en la energía libre de unión entre la muteína e IL-2R β , se seleccionaron sustituciones particulares. La energía libre de unión se calculó utilizando el algoritmo informático EGAD (Handel's Laboratory, University of California at San Diego, USA). La energía exenta de unión de un mutante se define como $\Delta\Delta G_{mut} = \mu (\Delta G_{mut} - \Delta G_{ts})$. Donde, μ (= 0,1, en general) es el factor de escala utilizado para normalizar los cambios previstos en la afinidad de unión para tener una pendiente de 1 cuando se compara con las energías experimentales (Pokala y Handel 2005). La energía libre de disociación (ΔG) se definió como la diferencia de energía entre el estado complejo (ΔG_{unido}) y el libre (ΔG_{libre}). La energía de disociación ΔG_{mut} se calculó para cada sustitución.

Un panel de muteínas de IL-2 con las siguientes sustituciones (H16E, H16Q, L19K, D20R, D20K, D20H, D20Y, M23H, D84K, D84H, S87Y, N88D, N88K, N88I, N88H, N88Y, V91N, V91K, V91H, V91R, I92H, E95K, E95R o E95I) se expresó como fusiones de extremos C con el heterodímero de Fc. Estas construcciones también contenían las mutaciones de haMut7 para una alta afinidad de unión a CD25 (V69A, N71R, Q74P) y C125A para un plegamiento eficaz.

Se exploró la fuerza del panel en el ensayo de fosforilación STAT5 de linfocitos T del Ejemplo 2, y se descubrió que H16E, D84K, V91N, V91K y V91R poseían menor actividad que la IL-2 de tipo silvestre y más que N88D (FIG. 2).

H16E, D84K, V91N, V91K y V91R poseían menor actividad que la IL-2 de tipo silvestre y más que N88D.

Las muteínas seleccionadas también se analizaron en ensayos de crecimiento de linfocitos T y NK.

Para el ensayo de linfocitos T, las PBMC totales se activaron a 3 millones/ml con OKT3 100 ng. El día 2, las células se lavaron 3 veces y se dejaron reposar en medio reciente durante 5 días. Después, las células se marcaron con CFSE (del inglés *carboxyfluorescein succinimidyl ester*, éster de succinimidil-carboxifluoresceína) y adicionalmente, antes de realizar análisis FACS, se cultivaron durante 7 días en una placa de 24 pocillos a 0,5 millones/pocillo en un medio que contenía IL-2. En la FIG. 3 la proliferación de subconjuntos de linfocitos T se presenta como dilución de CFSE (floreescencia media de CFSE).

Para el ensayo de linfocitos NK, los linfocitos NK CD16+ separados mediante MACS (del inglés *Magnetic-Activated Cell Sorting*, separación magnética celular), se cultivaron durante 3 días en medios que contenían IL-2 a 0,1 millones/pocillo en placas de 96 pocillos. Se añadieron 0,5 µCi de ³H-timidina a cada pocillo durante las 18 horas finales de incubación. En la FIG. 4 se muestran los resultados.

Los mutantes H16E, D84K, V91N, V91K y V91R fueron capaces de estimular el crecimiento de Treg de manera similar a IL-2 TS, pero fueron aproximadamente 10 veces menos fuertes sobre otros linfocitos T (FIG. 3) y aproximadamente 100 veces menos fuertes en linfocitos NK (FIG 4).

Se diseñó un panel distinto de proteínas de fusión Fc.IL-2 en el que la distancia entre el heterodímero de Fc y la muteína haMut7 (V69A, N71R, Q74P, C125A) se redujo mediante una serie de truncamientos de aminoácidos individuales.

```
Fc.haMut7 Fc...TQKSLSLSPGKGGGSAAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7
(SEQ ID NO:22)

Trunc1 Fc...TQKSLSLSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:23)
Trunc2 Fc...TQKSLSL--STKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:24)
Trunc3 Fc...TQKSLSL--TKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:25)
Trunc4 Fc...TQKSLSL---KKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:26)
Trunc5 Fc...TQKSLSL----KTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:27)
Trunc6 Fc...TQKSLSL-----TQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:28)
Trunc7 Fc...TQKSLSL-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:29)
Trunc8 Fc...TQKSLSL-----QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO:30)
```

Trunc1-Trunc4 poseían la misma fuerza que la de construcción parental de longitud completa Fc.haMut7, medida mediante el ensayo de fosforilación de STATS y de proliferación de linfocitos T y NK como se describe en las FIGS. 2, 3 y 4. Trunc5 y Trunc6 estimularon respuestas más débiles pero más fuertes que las estimuladas por la mutación N88D (haD y haMut7D) y muy similares a las estimuladas por V91K. Trunc7 era más débil que las muteínas N88D, y Trunc8 tenía muy poca actividad. Sin embargo, cuando se analizaron en linfocitos NK, Trunc5 y Trunc6 fueron agonistas más fuertes que V91K, lo que indica que la selectividad de Treg se realizó más fácilmente con mutaciones de señalización en lugar de con el impedimento estérico por un dominio Fc proximal.

Ejemplo 4 - Mutaciones de alta afinidad por CD25 en el contexto de un homodímero de Fc

Las mutaciones que confirieron alta afinidad de unión por CD25 se consideraron ventajosas porque aumentaron el tropismo de linfocitos T por CD25-*high* y porque promovieron la asociación a largo plazo de la muteína CD25::IL-2 y la señalización prolongada. Sin embargo, la reducción del número de mutaciones puede reducir la posible inmunogenicidad. Las muteínas N88D o V91K, con y sin las mutaciones V69A y Q74P de alta afinidad por haMut1, se expresaron como fusiones con el extremo C de un homodímero de Fc y se compararon para determinar la bioactividad. En los ensayos de estimulación con pSTAT5, la homodimerización no tuvo ningún efecto sobre la fuerza de la señal en relación con la muteína monomérica. La reversión de las mutaciones V69A y Q74P de alta afinidad, tampoco afectó a la señalización de pSTAT5. En los ensayos de crecimiento de linfocitos T, las mutaciones de alta afinidad redujeron la actividad en linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8 convencionales, pero no en linfocitos T reguladores (Figura 5). Las mutaciones de alta afinidad tampoco alteraron las respuestas proliferativas en linfocitos NK (FIG. 6).

Para determinar si las mutaciones de alta afinidad impactaban sobre las respuestas de linfocitos T in vivo, ratones humanizados (ratones NOD.SCID.IL2rg-nulo reconstituidos con células madre hematopoyéticas CD34+ humanas) recibieron dosis de proteínas de fusión entre la muteína de IL-2 y Fc y se comprobó la expansión de Treg. Ratones

ES 2 720 225 T3

NOD.SCID.1l2rg-nulo (NSG) (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) de siete semanas de vida, se irradiaron (180 rad) y se reconstituyeron con 94.000 células madre hematopoyéticas CD34+ de hígado fetal humano. A las 21 semanas, los ratones se distribuyeron en 6 grupos según la distribución equitativa del porcentaje de quimerismo (determinado por citometría de flujo de leucocitos de sangre periférica, PBL, del inglés *peripheral blood leukocytes*) y los días 0 y 7 recibieron 1 µg de inyecciones subcutáneas de las proteínas de fusión Fc.mutéina o PBS indicadas. El día 11, se determinaron las frecuencias de los subconjuntos de linfocitos T en la sangre mediante citometría de flujo. A una dosis baja de 1 µg por animal, las mutaciones de alta afinidad no mejoraron la expansión de Treg más allá de la observada con las mutaciones N88D o V91K en solitario (Figura 7).

La expansión de Treg fue selectiva en cuanto a que la abundancia de los linfocitos T FOXP3⁺CD4⁺ no aumentó en relación con el total de leucocitos de sangre periférica (PBL), que incluye una mezcla de linfocitos B y T humanos y células mieloides de ratón. Además, a dosis más altas, las mutaciones de alta afinidad promovieron un aumento en los linfocitos T CD25⁺FOXP3⁺, reduciendo por lo tanto la selectividad de Treg. Por lo tanto, en contexto del homodímero de Fc, las mutaciones de alta afinidad no se consideraron necesarias para promover el crecimiento preferencial de linfocitos Treg.

Fc.WT IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(C125A) (SEQ ID NO:16)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVHLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.haMutIV91K IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(V69A, Q74P, V91K, C125A) (SEQ ID NO:17)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVHLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.V91K IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(V91K, C125A) (SEQ ID NO:18)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVHLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.haMutIN88D IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::hulL-2(V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:19)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVHLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E A L N L A P S K N F H L R P R D L I
SDIN V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F A Q S I I S T L T

Fc.N88D IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(N88D, C125A) (SEQ ID NO:20)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I
SDIN V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F A Q S I I S T L T

Ejemplo 5 - Asociación prolongada de muteínas Fc.IL-2 con CD25 en la superficie celular

Un resultado inesperado de los estudios con ratones humanizados fue que, a pesar de su reducida capacidad de señalización, las muteínas indujeron un enriquecimiento de Treg más fuerte en relación con el de la muteína IL-2 TS.Fc. El mayor enriquecimiento de Treg y la regulación positiva de FOXP3 en relación con lo observado con Fc.TS se observó a una dosis de 1 µg/ratón (Figura 7) y a una dosis menor de 0,5 µg/ratón (FIG. 8). Este aumento de la fuerza *in vivo* puede deberse a un consumo reducido de linfocitos T, haciendo que haya más muteína de IL-2.Fc disponible para la señalización prolongada.

Sin embargo, los estudios PK (farmacocinéticos) *in vitro* e *in vivo* no demostraron ninguna persistencia significativamente aumentada de Fc.V91K ni de Fc.N88D en relación con Fc.TS en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T activadas o en suero de ratones que recibieron la dosificación. Dado que las fusiones de Fc llevaban dos dominios de muteína de IL-2, se pensó que el aumento del reciclado endosomal podía dar lugar a una asociación prolongada de la superficie celular debido al aumento de la avidéz por CD25. De hecho, se descubrió que Fc.V91K y Fc.N88D persistieron más eficazmente que Fc.TS en la superficie de linfocitos T activados previamente después de una breve exposición de las proteínas de fusión (FIG. 9).

Las PBMC primarias se preestimularon durante 2 días con OKT3 100 ng/ml. Las células se recogieron, se lavaron 4 veces y se dejaron reposar durante la noche en los medios. Después, las células se pulsaron con Fc.IL-2 400 pM durante 30 minutos a 37 °C. Después de pulsarlas, las células se recogieron en T0 después de un lavado, o se lavaron 3 veces más en 12 ml de medio caliente y se cultivaron durante 4 horas. Para detectar la Fc.IL-2 asociada a las células, las células se tiñeron con anti IgG humano-FITC (Jackson Immunoresearch) y anti-CD25-APC.

Ejemplo 6 - Optimización de secuencias de fusión

En estudios preclínicos en ratones, nuestras muteínas Fc.IL-2 mostraron una exposición diferencial cuando las concentraciones séricas de la molécula intacta se compararon con las de la parte Fc humana solamente, indicativo de catabolito de Fc humano circulante. Para optimizar la estabilidad *in vivo* y la farmacocinética de nuestras muteínas Fc.IL-2, caracterizamos las modificaciones de la secuencia de fusión por su impacto sobre la degradación proteolítica de las muteínas Fc.IL-2 en la circulación sistémica y durante el reciclaje a través del sistema reticuloendotelial. Para determinar la degradación proteolítica *in vitro* e *in vivo*, se evaluaron las siguientes construcciones.

(Ala_Ala)_G4S	...TQKSLSLSPGKGGGS	APTSSTKKTQLQ...	ha7N88D (SEQ ID NO:31)
(N297G_delK)_G4S	...TQKSLSLSPG	GGGGSAPTSSTKKTQLQ...	ha1V91K (SEQ ID NO:32)
(N297G_KtoA)_AAPT	...TQKSLSLSPGA	_____APTSSTKKTQLQ...	ha1V91K (SEQ ID NO:33)
(N297G_KtoA)_AAPA	...TQKSLSLSPGA	_____APASSSTKKTQLQ...	ha1V91K (SEQ ID NO:34)

La estabilidad se midió mediante inmunoensayos cuantitativos que compararon las concentraciones a lo largo del tiempo de la Fc humana total con la de la muteína Fc.IL-2 intacta. La proteólisis de las muteínas Fc.IL-2 se verificó mediante análisis de transferencia de Western utilizando anticuerpos anti IL-2 y anti Fc humano, seguido de inmunocaptura de catabolitos y caracterización por espectrometría de masas. La caracterización por espectrometría de masas de catabolitos de (Ala_Ala)_G4S a partir de muestras *in vitro* e *in vivo* identificó la Lys C terminal del dominio Fc como un sitio de escisión proteolítica. La delección o mutación de la lisina C terminal del dominio Fc ((N297G_delK)_G4S y (N297G_KtoA)_AAPT) dio como resultado una estabilidad *in vitro* prolongada en el suero de ratón a 37 °C en comparación con las construcciones Fc con la lisina C terminal ((Ala_Ala)_G4S). Esta estabilidad en suero *in vitro* prolongada se tradujo en una mayor exposición en ratones, según lo medido por el área bajo la curva (ABC) de la concentración en suero de la muteína Fc.IL-2 frente al tiempo. Esta estabilidad prolongada de las muteínas Fc.IL-2, que carecen de la lisina C-terminal de Fc, también se observó *in vitro* en suero de monos cinomolgos y de

seres humanos. La mutación de Thr-3 de IL-2 a Ala ((N297G_KtoA)_AAPA) produjo una estabilidad *in vitro* disminuida a 37 °C (en comparación con (N297G_KtoA)_APA) en suero de ratón y en distintas incubaciones con catepsina humana recombinante D y L. Esto disminuyó la estabilidad sérica *in vitro* traducida a una menor exposición (ABC) en ratones *in vivo* para (N297G_KtoA)_AAPA en comparación con (N297G_KtoA)_AAPT. La caracterización de catabolitos de (N297G_KtoA)_AAPA de muestras *in vitro* e *in vivo* mediante espectrometría de masas identificó Lys 8 y Lys 9 del dominio de la muteína de IL-2 como restos susceptibles de proteólisis que no se observó en muestras equivalentes de (N297G_KtoA)_AAPT. La disminución de la estabilidad a 37 °C de (N297G_KtoA)_AAPA con respecto a la de (N297G_KtoA)_AAPT también se observó *in vitro* en suero de monos cinomolgos y de seres humanos.

10 Dada la importancia de la glicosilación en esta región, y para mejorar posiblemente la capacidad de fabricación de la proteína de fusión, las secuencias de fusión se alteraron del siguiente modo para promover la glicosilación ligada a N en lugar de la ligada a O.

Original

15 IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ (SEQ
ID NO: 32)

Alterada

20 IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPN~~SS~~STKKTQLQ (SEQ
ID NO: 35)

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,S5T,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPN~~ST~~STKKTQLQ (SEQ
ID NO: 36)

25 IgG1Fc(N297G_delK)::GGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGNGTAPAS~~SS~~STKKTQLQ (SEQ
ID NO: 37)

IgG1Fc(N297G_delK)::YGN~~GT~~::huIL-2(T3A,V91K,C125A) TQKSLSLSPGYGNGTAPAS~~SS~~STKKTQLQ (SEQ
ID NO: 38)

Ejemplo 7 - Determinación de la farmacocinética/farmacodinámica, PK/PD, en monos cinomolgos

30 Las terapias estándar de inmunoestimulación con IL-2 requieren descanso farmacológico (sin exposición) entre ciclos de dosificación para evitar efectos secundarios indeseables. Por el contrario, Las terapias de expansión o estimulación de Treg pueden requerir una exposición prolongada con niveles mínimos sostenidos de fármaco (C_{\min} sérica) suficientes para la estimulación de Treg pero con exposiciones máximas (C_{\max} sérica) por debajo de los niveles de fármaco que conducen a la activación inmunitaria. Este ejemplo demuestra las estrategias de dosificación de muteínas con semivida ampliada en monos cinomolgos para permitir una cobertura selectiva ampliada (C_{\min} sérica) manteniendo al mismo tiempo las exposiciones máximas (C_{\max} sérica) por debajo de los niveles de fármaco contemplados que son necesarios para la activación inmunitaria proinflamatoria.

40 Monos cinomolgos recibieron dosis de Fc.V91K (IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2 (V91K, C125A) en cuatro grupos (A-D), recibiendo la dosis por vía subcutánea tres grupos (A-C) y un grupo (D) por vía intravenosa. Para cada grupo, cuatro monos cinomolgos macho, biológicamente intactos, recibieron dosis según la estrategia de dosificación que se describe a continuación. La dosificación subcutánea de muteínas con semivida ampliada puede permitir una mayor absorción linfática que produce una menor exposición máxima (C_{\max} en suero) y/o una respuesta farmacológica más contundente (expansión de Treg). La estrategia de dosificación para el grupo A consiste en tres dosis consecutivas de 10 microgramos por kilogramo los días 0, 2 y 4 para el ciclo 1 y de 10 microgramos por kilogramo el día 14, permitiendo una cobertura selectiva prolongada similar a la de una dosis inicial más alta de 50 microgramos por kilogramo mientras se mantiene una exposición máxima (C_{\max}) más baja. La estrategia de dosificación para el grupo B es de 50 microgramos por kilogramo administrados los días 0 y 14 en comparación con el grupo A. La estrategia de dosificación para el grupo C es de 50 microgramos por kilogramo administrados los días 0 y 28. Lo que permite determinar si se requiere una cobertura mínima para sostener el enriquecimiento de Treg o si un descanso farmacológico es beneficioso entre los ciclos de dosificación. La estrategia de dosificación para el grupo D que recibe la dosis por vía intravenosa, es de 50 microgramos por kilogramo administrados el día 0, lo que permite comparar las exposiciones máximas (C_{\max}) y las diferencias de enriquecimiento de Treg con la de la dosificación por vía subcutánea.

ES 2 720 225 T3

La farmacocinética (inmunoensayo cuantitativo para moléculas intactas y Fc humano total), los anticuerpos contra fármacos, el CD25 soluble liberado y las citocinas séricas (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-13) se miden en los siguientes puntos de tiempo para cada grupo de dosis especificado:

5 Grupo A: predosis (primer ciclo; dosis 1), 48 (predosis primer ciclo; dosis 2), 96 (predosis primer ciclo; dosis 3), 100, 104, 120, 168, 216, 264, 336 (predosis segundo ciclo), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840 y 1008 horas.

10 Grupo B: predosis (primer ciclo), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336 (predosis segundo ciclo), 340, 344, 360, 408, 456, 504, 576, 672, 744, 840 y 1008 horas.

Grupo C: predosis (primer ciclo), 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504, 672 (predosis segundo ciclo), 676, 680, 696, 744, 792, 840, 912, 1008, 1080 y 1176 horas.

15 Grupo D: predosis (primer ciclo), 0,25, 1, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504 y 672 horas.

La farmacodinámica (immunofenotipificación y enumeración de linfocitos Treg, T CD4 y CD8 no reguladores y NK en sangre periférica) se mide en los siguientes puntos de tiempo para cada grupo de dosis especificado:

20 Grupo A: predosis (primer ciclo; dosis 1), 96 (predosis primer ciclo; dosis 3), 168, 336 (predosis segundo ciclo), 456 y 576 horas.

Grupo B: predosis (primer ciclo), 120, 240, 336 (predosis segundo ciclo), 456 y 576 horas.

25 Grupo C: predosis (primer ciclo), 120, 240, 672 (predosis segundo ciclo), 792 y 912 horas.

Grupo D: predosis (primer ciclo), 120 y 240 horas.

30 La hematología y la bioquímica clínica se evalúan en todos los animales y en los grupos de predosis y 24 horas después de la dosis inicial por grupo de dosis. Se evaluaron los siguientes parámetros.

Hematología:

- recuento de leucocitos (diferencial total y absoluto)
- 35 ● recuento de eritrocitos
- hemoglobina
- hematocrito
- hemoglobina corpuscular media, volumen corpuscular medio, concentración de hemoglobina corpuscular media (calculada)
- 40 ● reticulocitos absolutos
- recuento de plaquetas
- morfología de los glóbulos rojos
- amplitud de distribución de los glóbulos rojos
- volumen medio de plaquetas

45 Bioquímica Clínica:

- fosfatasa alcalina
- bilirrubina total (con bilirrubina directa si la bilirrubina total supera 1 mg/dl)
- aspartato aminotransferasa
- 50 ● alanina aminotransferasa
- gamma glutamiltransferasa
- nitrógeno ureico
- creatinina
- proteína total
- 55 ● albúmina
- globulina y relación de A/G (albúmina/globulina) (calculada)
- glucosa
- triglicéridos de colesterol total
- electrolitos (sodio, potasio, cloro)
- 60 ● calcio
- fósforo

Ejemplo 8 - IgG1 Fc aglicosilada

65 Los anticuerpos de IgG de origen natural poseen un sitio de glicosilación en el dominio constante 2 de la cadena pesada (CH2). Por ejemplo, los anticuerpos IgG1 humanos tienen un sitio de glicosilación localizado en la posición

Asn297 (numeración de la UE). Hasta ahora, las estrategias para preparar anticuerpos aglicosilados implican reemplazar el resto de Asn con un aminoácido que se asemeja a Asn en cuanto a propiedades físico-químicas (por ejemplo, Gln) o con un resto de Ala que imita la cadena lateral de Asn sin los grupos polares. Este ejemplo demuestra los beneficios de reemplazar Asn con glicina (N297G). N297G Fc son moléculas aglicosiladas con mejores propiedades biofísicas y atributos de capacidad de fabricación (por ejemplo, recuperación durante la purificación).

El examen de múltiples estructuras cristalinas conocidas de fragmentos Fc y anticuerpos de IgG reveló una considerable flexibilidad conformacional alrededor del segmento de bucle glicosilado, particularmente en la posición Asn297 que está glicosilada. En muchas de las estructuras cristalinas conocidas, Asn297 se adaptó a los ángulos diédricos de la cadena principal positiva. Gly tiene una alta propensión a adaptarse al ángulo diédrico de la cadena principal positiva debido a la ausencia de átomos de la cadena lateral. Por lo tanto, basándose en este razonamiento en cuanto a la conformación y estructura, Gly puede ser un mejor reemplazo para Asn que N297Q o N297A.

La mutación de Asn297 con Gly conduce a moléculas aglicosiladas con una recuperación (o eficiencia) muy mejorada en el proceso de purificación y propiedades biofísicas. Por ejemplo, el porcentaje de recuperación (rendimiento final) de la combinación de proteína A fue 82,6 % para la mutación N297G, comparado con 45,6 % para N297Q y 39,6 % para N297A. El análisis en columna SPHP reveló que el menor porcentaje de recuperación para los mutantes N297Q y N297A se debió a un pico de cola, lo que indica agregación de alto peso molecular y/o especies con plegamiento erróneo. Este resultado se reconfirmó en un proceso a mayor escala de 2 l.

En la industria biofarmacéutica, las moléculas con potencial que requieren producción a gran escala, por ejemplo, potencial para su comercialización como un fármaco, se evalúan en función de una serie de atributos para mitigar el riesgo de que la molécula no sea susceptible de producción y purificación a gran escala. En las evaluaciones de capacidad de fabricación, N297G reveló fiabilidad a los cambios de pH. N297G no tuvo problemas de agregación; mientras que N297Q y N297A tuvieron un aumento del 20 % y 10 % en la agregación, respectivamente. Aunque N297G tenía mejores atributos de capacidad de fabricación, fue similar a N297Q y N297A en todos los ensayos funcionales en los que se analizó. Por ejemplo, en ensayos de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), N297G carecía de citotoxicidad de manera similar a N297Q y N297A.

Ejemplo 9 - IgG1 Fc aglicosilada estabilizada

Este ejemplo describe un método para mejorar la estabilidad de los armazones de anticuerpos de IgG introduciendo uno o más enlaces disulfuro diseñados. Los anticuerpos de IgG de origen natural son moléculas estables. Sin embargo, para determinadas aplicaciones terapéuticas, puede ser necesario hacer mutaciones o crear moléculas aglicosiladas. Por ejemplo, las moléculas de IgG aglicosiladas pueden utilizarse en indicaciones terapéuticas donde existe la necesidad de evitar la ADCC y la unión a los receptores de Fc γ . Sin embargo, la IgG1 aglicosilada tiene una temperatura de fusión mucho más baja (la temperatura de fusión del dominio CH2 disminuye en aproximadamente 10 °C; de 70 °C a 60 °C) que la de la IgG1 glicosilada. La temperatura de fusión más baja observada afecta negativamente a varias propiedades biofísicas de la IgG1 aglicosilada. Por ejemplo, la IgG1 aglicosilada ha aumentado el nivel de agregación a un pH bajo en comparación con la IgG1 glicosilada.

Con el fin de diseñar enlaces disulfuro, inicialmente se utilizó un método basado en la estructura que involucraba el cálculo de la distancia entre los átomos C-alfa para identificar 54 pares de restos en la región Fc para la mutación a Cys. Estos 54 sitios se redujeron aún más a 4 pares de restos (V259C-L306C, R292C-V302C, A287C-L306C y V323C-I332C). Los criterios utilizados incluyeron (i) posiciones dentro del dominio CH2, (ii) lejos de los bucles, giros e hidratos de carbono, (iii) lejos de los sitios de interacción con el receptor Fc γ y FcRn, (iv) accesibilidad a solventes (posiciones enterradas preferidas), etc.

Se crearon sustituciones de cisteína emparejadas en el contexto del Fc N297G aglicosilado. El análisis de mapeo de péptidos no reducido reveló que 3 de los 4 sitios diseñados formaron un enlace disulfuro como se esperaba y diseñó en ese contexto. La mutación V259C-L306C no formó enlaces disulfuro correctamente y condujo a un emparejamiento erróneo con el disulfuro natural ya presente en el dominio CH2. Los otros tres diseños R292C-V302C, A287C-L306C y V323C-I332C, formaron enlace disulfuro correctamente como se predijo y diseñó. La adición de enlace disulfuro a la mutación N297G condujo a una mejora de aproximadamente 15°C en la estabilidad térmica sobre la mutación N297G sola. De las variantes de disulfuro R292C-V302C, A287C-L306C y V323C-I332C, R292C-V302C y A287C-L306C tuvieron una buena farmacocinética cuando se administraron a ratas ($t_{1/2}$ de 11 días y 9 días, respectivamente). Esto contrasta con el perfil farmacocinético que observamos en ratas para el enlace disulfuro del dominio CH2 L247C-K339C publicado anteriormente (Gong et al., J. Biol. Chem. 2009 284: 14203-14210), que tenía una $t_{1/2}$ de 5 días.

El diseño de un enlace disulfuro en el dominio CH2 mejora la estabilidad de la molécula aglicosilada a la par con las moléculas de IgG1 glicosiladas (mejora de 10 a 15 °C en la temperatura de fusión según lo determinado por calorimetría de barrido diferencial). Los sitios diseñados descritos en el presente documento no conducen a la desorganización de disulfuros y los disulfuros se forman, como estaba previsto, en aproximadamente el 100 % de la población. Más importante aún, a diferencia del sitio de enlaces disulfuro publicado en el dominio CH2, los enlaces disulfuro descritos en el presente documento no influyen en el PK de rata.

El perfil farmacocinético (PK) de los anticuerpos aglicosilados estabilizados se determinó en monos cinomolgos. Un anticuerpo de IgG1 que tiene las sustituciones N297G, A287C y L306C (Ab2-1) y un anticuerpo de IgG1 que tiene las sustituciones N297G, R292C y V302C (Ab2-2) se inyectaron por vía subcutánea a una dosis de 5 mg/kg en monos cinomolgos (N = 2). Las muestras de suero se recogieron en pre-dosis, 0,5, 2, 8, 24, 48, 96, 168, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512 y 1680 horas después de la dosis. Las muestras se evaluaron para determinar los niveles de anticuerpos Ab2-1 y Ab2-2 utilizando un ELISA de tipo sándwich anti IgG hu. Para medir el nivel de IgG hu en suero en las muestras del estudio PK, se utilizó el siguiente método: una placa negra de área 1/2 (Corning 3694) se recubrió con 2 µg/ml de anticuerpo anti Fc hu, 1.35.1 en PBS y después se incubó durante una noche a 4 °C. Después, la placa se lavó y se bloqueó con I-Block™ (Applied Biosystems) durante una noche a 4 °C. Si las muestras requieren diluirse, entonces se diluyen en suero de mono cinomolgo. Los estándares y las muestras se diluyeron después a 1:20 en PBS 1X + NaCl 1M + Tween 20 al 0,5 % y tampón BSA al 1 % (suero al 5 %). La placa se lavó y muestras de 50 µl de estándares y muestras diluidos se transfirieron a una placa recubierta con anticuerpo 1.35.1 y se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó, después se añadieron 50 µl de 100 ng/ml de anticuerpo anti Fc humano 21.1 conjugado con HRP en I-Block™ + BSA al 5 % y se incubaron durante 1,5 h. La placa se lavó, y a continuación se añadieron 50 µl de sustrato Pico, después de lo cual la placa se analizó inmediatamente con un luminómetro. Los datos de concentración de tiempo se analizaron utilizando métodos no compartimentales con WinNonLin® (Enterprise versión 5.1.1, 2006, Pharsight® Corp. Mountain View, CA).

Las exposiciones PK de los anticuerpos Ab2-1 y Ab2-2 en monos cinomolgos se compararon con las del anticuerpo IgG1 que comprende solo la sustitución N297G y el anticuerpo IgG1 que comprende N297G, L247C y K339C. Las exposiciones PK de los anticuerpos Ab2-1 y Ab2-2 en monos cinomolgos fueron ambas más altas que las del anticuerpo IgG1 que comprende solo la sustitución N297G y el anticuerpo IgG1 que comprende N297G, L247C y K339C. Además, Ab2-2 tuvo una exposición y una eliminación comparables a las del anticuerpo IgG1 parental.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.

<120> POLIPÉPTIDOS AGLICOSILADOS QUE CONTIENEN Fc

<130> A-1892-WO-PCT

<150> 61/784.669

<151> 14-03-2013

<160> 44

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>

<221 > MOD_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val o Ala

<400> 1

ES 2 720 225 T3

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 Lys 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 Xaa Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

- 5 <210> 2
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (125).. (125)
 <223> Cys, Ser, Val o Ala
- 15 <400> 2

ES 2 720 225 T3

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 Xaa Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

5 <210> 3
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

ES 2 720 225 T3

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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 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

<210> 4
 <211> 226
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 4

ES 2 720 225 T3

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 Gly 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 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
 225

<210> 5

ES 2 720 225 T3

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

10

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <400> 6

Gly Gly Asn Gly Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30

<400> 7

Tyr Gly Asn Gly Thr
 1 5

35

<210> 8
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

45 <400> 8

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

ES 2 720 225 T3

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

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro 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> 9
<211> 133
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 9

ES 2 720 225 T3

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 Ser 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 Ala Leu Asn Leu Ala Pro 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

- 5 <210> 10
- <211> 133
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
- <400> 10

ES 2 720 225 T3

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 Arg 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 Ala Leu Asn Leu Ala Pro 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> 11
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 11

ES 2 720 225 T3

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 Ala 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 Ala Leu Asn Leu Ala Pro 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> 12
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 12

ES 2 720 225 T3

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 Glu
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 Ala Leu Asn Leu Ala Pro 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> 13

<211> 133

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 13

ES 2 720 225 T3

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 Asp Ala Leu Asn Leu Ala Pro 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

5 <210> 14
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 14

ES 2 720 225 T3

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 Ala Leu Arg Leu Ala Pro 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> 15
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 15

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

5

10

ES 2 720 225 T3

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

Asn Pro Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Glu
 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 Asp 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

5 <210> 16
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 16

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 Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

ES 2 720 225 T3

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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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 Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
290 295 300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
305 310 315 320

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

ES 2 720 225 T3

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

<210> 17
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 17

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 Gly 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

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

ES 2 720 225 T3

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 Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320

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

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

<210> 18

<211> 364

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 18

5

10

ES 2 720 225 T3

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320

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

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

<210> 19

<211> 364

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 19

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 Gly 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

5

10

<210> 20
<211> 364
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 20

ES 2 720 225 T3

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 Gly 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 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

ES 2 720 225 T3

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 20 25 30

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 35 40

5 <210> 23
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 23

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25 30

15 <210> 24
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 24

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

25 <210> 25
 <211> 28
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 35 <400> 25

ES 2 720 225 T3

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

20

25

5 <210> 26
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 26

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

15 <210> 27
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 27

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

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

25 <210> 28
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 28

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

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

<210> 29

ES 2 720 225 T3

<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 29

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

Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20

10
15 <210> 30
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
20 <400> 30

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

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20

25 <210> 31
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 31

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

35 <210> 32
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
45 <400> 32

ES 2 720 225 T3

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

20

25

5 <210> 33
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 33

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Thr Ser Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20

15 <210> 34
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 34

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20

25 <210> 35
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 35

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Pro Asn Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

ES 2 720 225 T3

5 <210> 36
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10 <400> 36

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Pro Asn Ser Thr Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

15 <210> 37
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 37

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Asn Gly Thr Ala
 1 5 10 15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

25 <210> 38
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 38

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Thr Ala
 1 5 10 15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

35 <210> 39
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <400> 39

ES 2 720 225 T3

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 Cys Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Cys 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

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
 225

5 <210> 40
 <211> 226

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 40

ES 2 720 225 T3

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 Cys 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 Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Cys 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 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
 225

<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 41

ES 2 720 225 T3

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 Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Cys 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

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
 225

ES 2 720 225 T3

<211> 227
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 42

```

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 Cys Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65          70          75          80

Arg Val Val Ser Val Cys 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
          130          135          140

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
    
```

ES 2 720 225 T3

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

<210> 43
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 43

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 Cys 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 Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Cys 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

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

ES 2 720 225 T3

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

- <210> 44
- <211> 227
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
- <400> 44

ES 2 720 225 T3

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 Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Cys 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende una región Fc de un anticuerpo de IgG1 humano en el que dicha región Fc comprende una mutación N297G, utilizando el esquema de numeración de la UE, y dicha región Fc de una IgG1 humana tiene una identidad de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 3 o comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 4; y adicionalmente en el que A287 y L306; V259 y L306; R292 y V302; o V323 y 1332, utilizando el esquema de numeración de la UE, de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 3 o la SEC ID NO: 4, están sustituidas con cisteína.
- 10 2. Un anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende una región Fc de la reivindicación 1.
3. Un ácido nucleico que codifica un péptido de la reivindicación 1.
- 15 4. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 3.
5. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 3.
- 20 6. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 4, en la que la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero.
7. Un método para preparar una molécula que contiene la Fc de IgG1 aglicosilada, comprendiendo dicho método:
- 25 a) expresar un ácido nucleico que codifique un polipéptido de la reivindicación 1 en un cultivo celular de mamífero;
y
b) recoger de dicho cultivo la molécula que contiene la Fc de IgG1 aglicosilada.

Fosforilación de STAT5
(IFM)

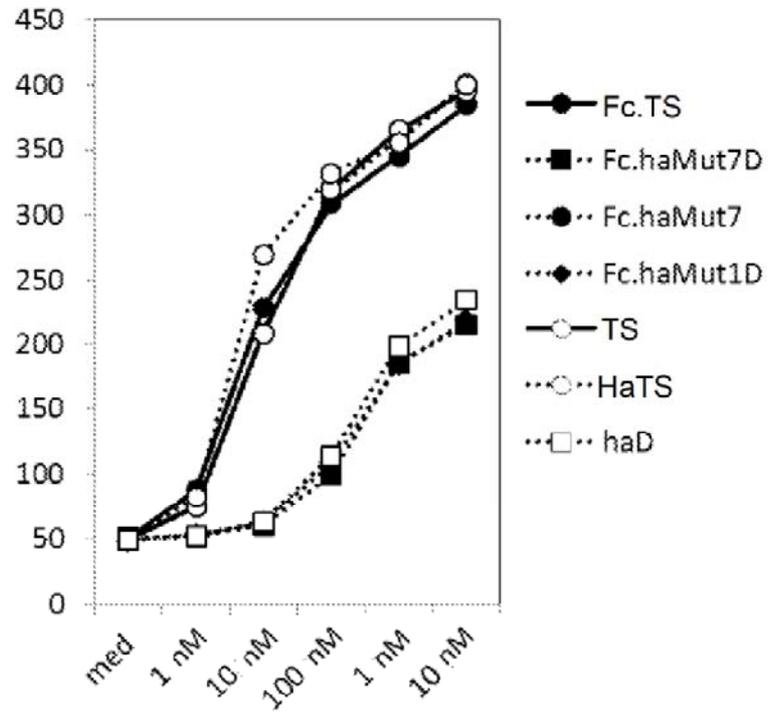


FIG. 1

FIG. 2A

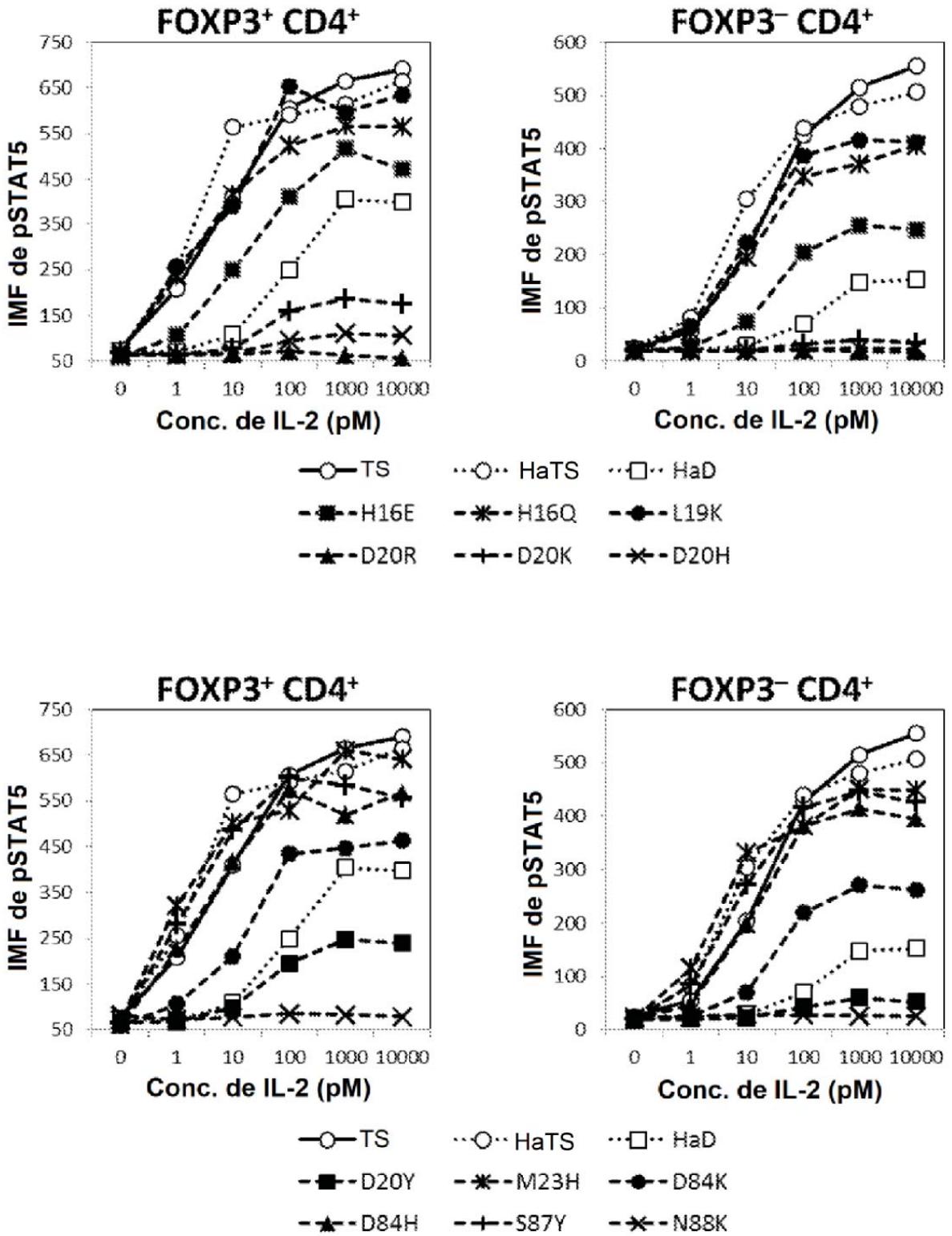
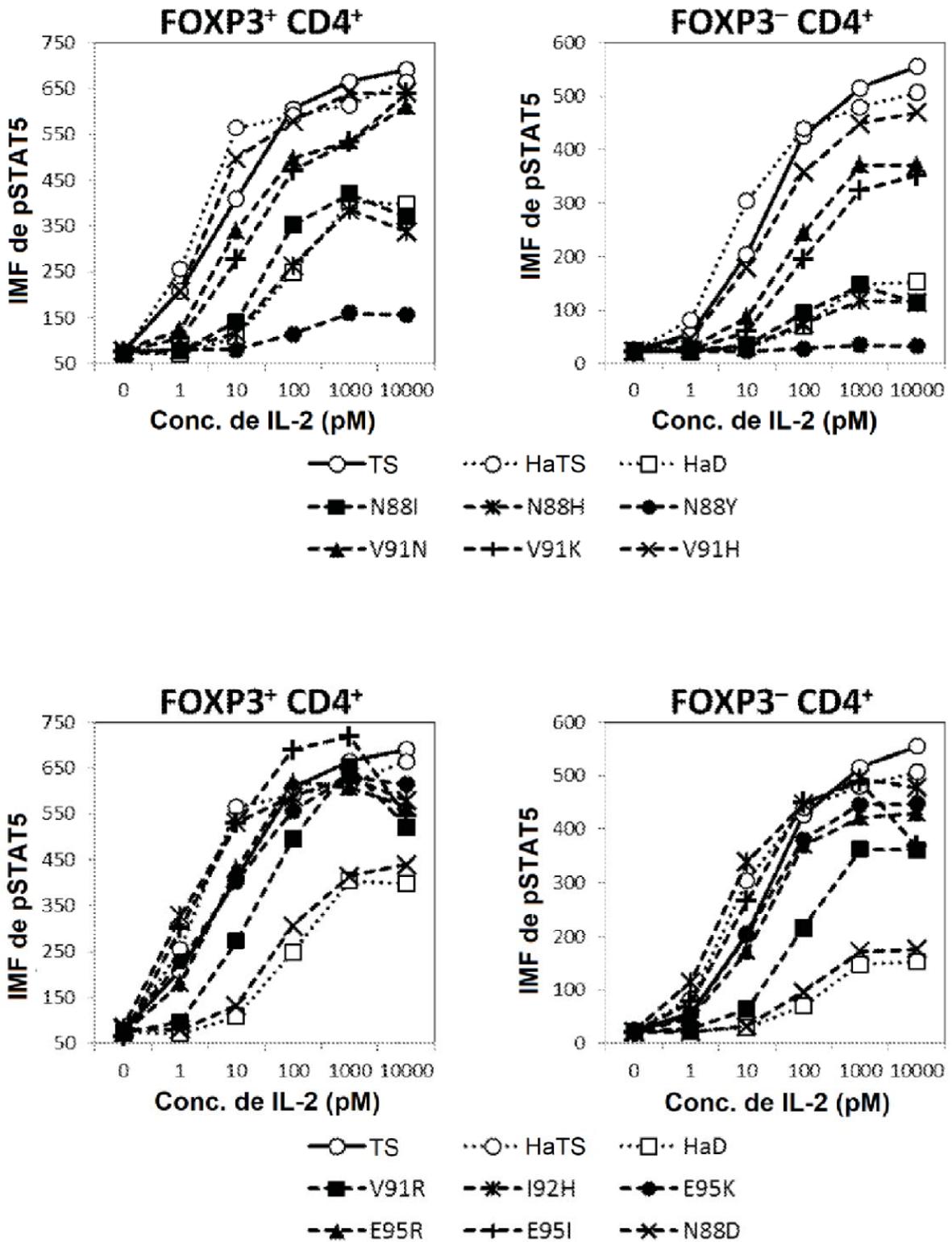


FIG. 2B



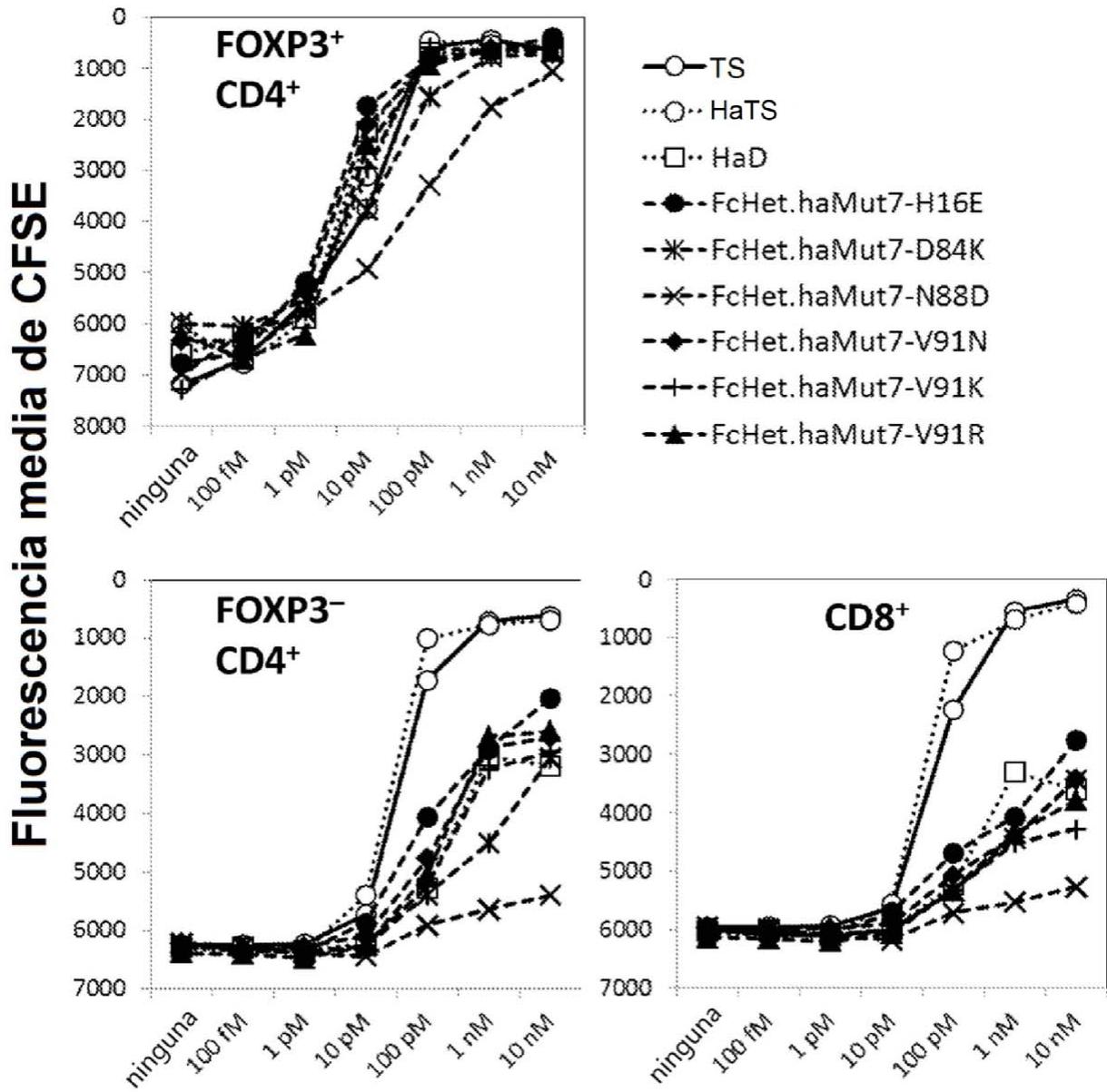


FIG. 3

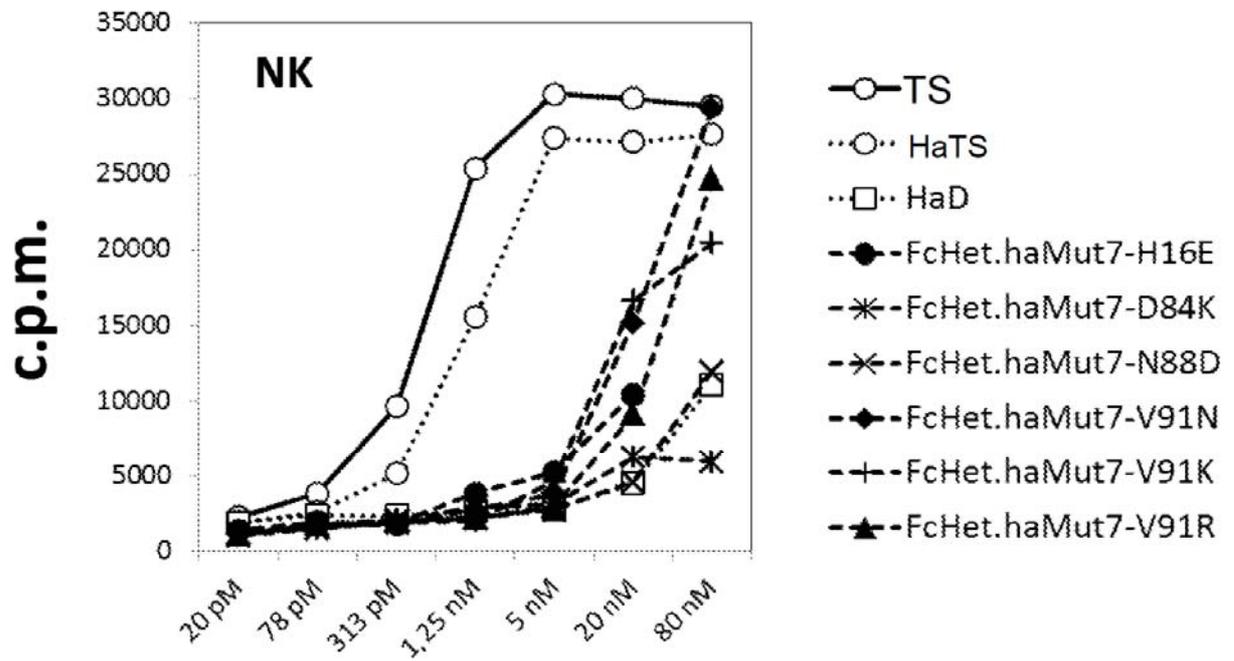


FIG. 4

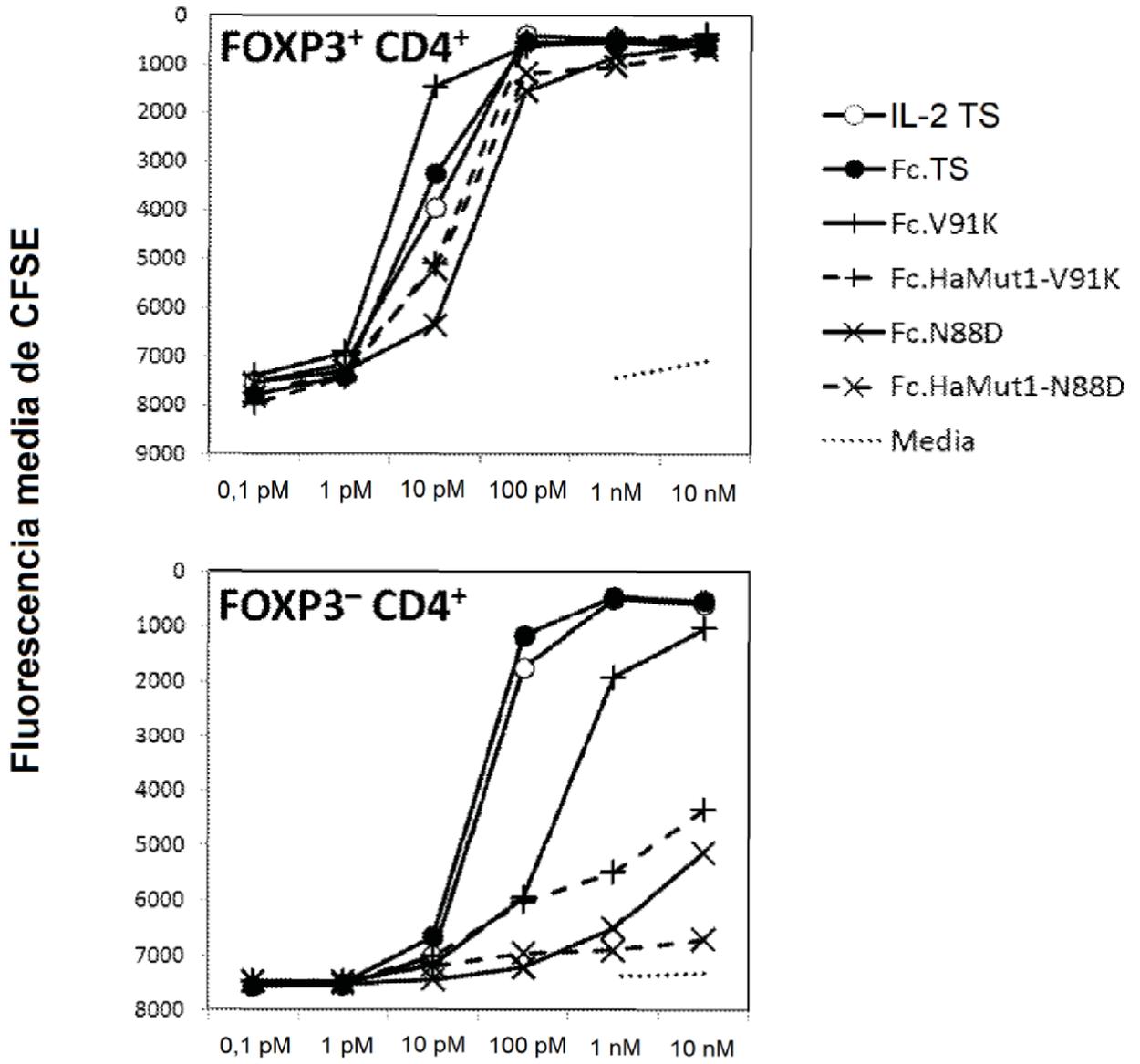


FIG. 5

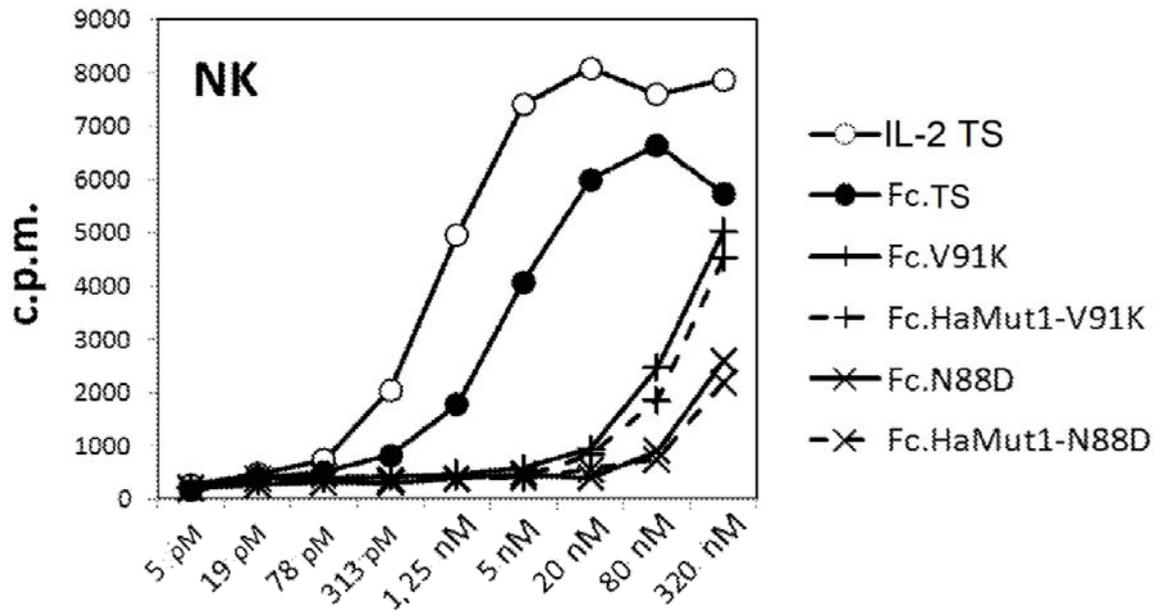


FIG. 6

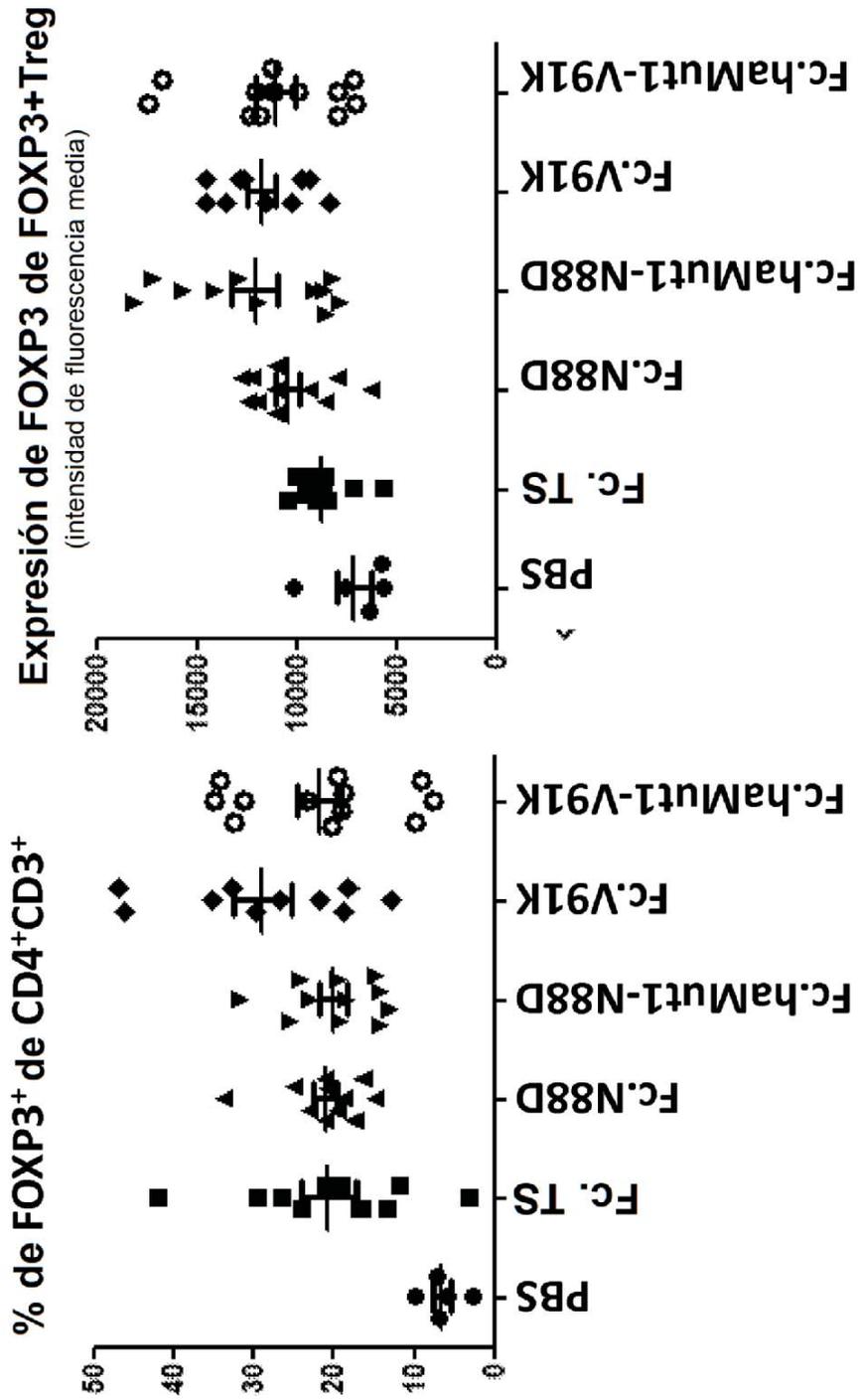


FIG. 7A

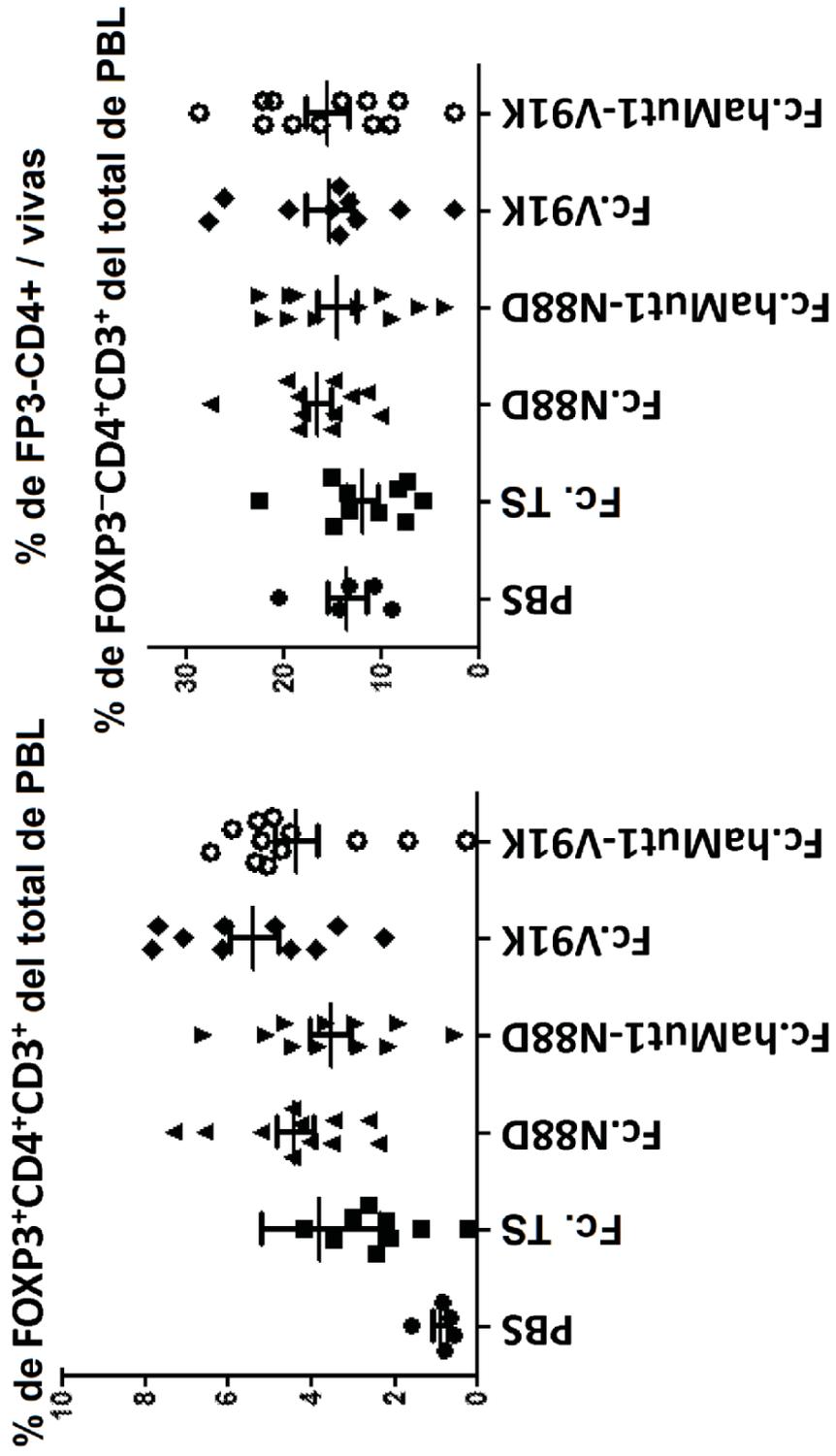
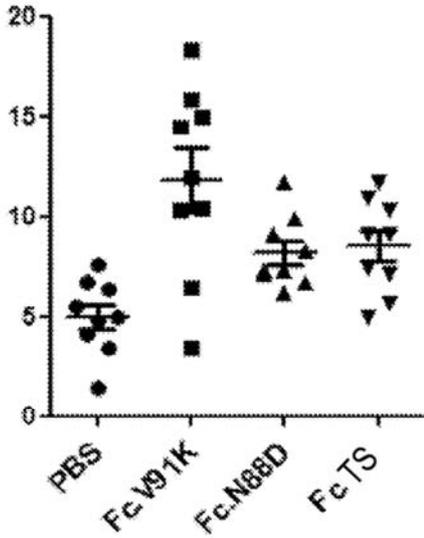


FIG. 7B

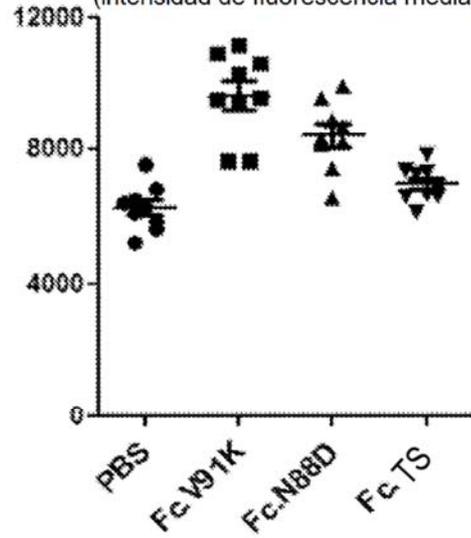
FIG. 8

% de FOXP3⁺ de CD4⁺CD3⁺



Expresión de FOXP3 en Treg FOXP3

(intensidad de fluorescencia media)



% de FOXP3⁺CD4⁺CD3⁺ del total de PBL **% de FOXP3⁻CD4⁺CD3⁺ del total de PBL**

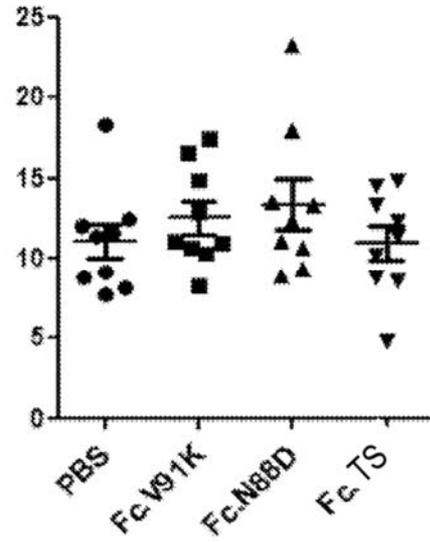
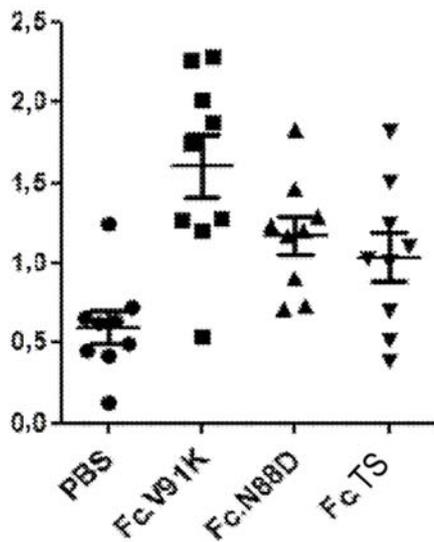


FIG. 9

Selección de CD3+ CD4+

